UNIVERSITE DE NANTES FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Année 2010

N° attribué par la bibliothèque

Etude de JAK2, Mpl et des cytokines liées à l'inflammation dans les Syndromes MyéloProlifératifs

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie, médecine et santé Spécialité : Hémato-cancérologie, Biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Cédric CLEYRAT

Le 13 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Président du jury :	
Dr Jean-Luc HAROUSSEAU	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Centre René Gauducheau, Nantes
Rapporteurs :	
Dr Catherine LACOMBE	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Hôpital Cochin, Paris
Dr Stefan CONSTANTINESCU	Professeur des Universités – MD, PhD Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles
Examinateurs :	
Dr Éric LIPPERT	Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier Hôpital Haut-Lévêque, Bordeaux
Dr Christian PECQUET	Chercheur – PhD Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles
Dr Yannick JACQUES	Directeur de Recherche CNRS/INSERM U892, Nantes
Dr Yannick JACQUES	Ludwig Institute for Cancer Research, Bruxelles Directeur de Recherche CNRS/INSERM U892, Nantes

Directrice de thèse :

Dr Sylvie HERMOUET, MCU-PH • Hôpital Hôtel-Dieu/INSERM U892, Nantes

Table des Matières

<u>REM</u>	ERC	IEMENTS	<u> </u>
TAB	LE D	DES MATIERES	<u> </u>
<u>LIST</u>	<u>e di</u>	ES ABREVIATIONS	v
<u>LIST</u>	E DI	ES FIGURES ET TABLEAUX	VIII
<u>RESI</u>	JME		IX
ABS	ΓRA	СТ	x
INTF	ROD	UCTION	1
T	Нг	MATODOÏESE	
1.			2
	л. R	DIFFERENCIATION DES CELLUI ES SOUCHES HEMATODOÏETIOUES	2
	р.	1 L'érythronoïèse	з л
		2 La granulonoïèse et la monocutonoïèse	4 5
		2. La grandiopolese et la monocytopolese	5
	C		5
	С.	1 Les facteurs de croissances "synergiques" / de "compétence"	6
		 Les facteurs de croissances "multinotonts" 	6
		 Les facteurs de croissances "spécifiques de lignée" 	0 7
		Les nacteurs de croissances specifiques de l'hématonoïèse	, 0
TT	Ιr	4. Le controle generique de l'hematopolese	ہ ۵
11.	LE	Description ceneral e	9
	л. R	LA DOLYCI ODIH IE DE VAQUEZ (DV)	10
	D. С	L = T = T = T = T = T = T = T = T = T =	10
	с. п	LA THROMBOUTTEME ESSENTIELEE (TE)	12
	D. F	Les criteres diagnostiques de l'OMS	12
	Ŀ. F	LES CRITERES DIRANOSTIQUES DE L'OMS	1/
Ш	I. IF	S CVTOKINES DANS I ES SMP ET I EURS DECEDTEURS	16
	. д .	GENERALITES SUR LES CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS	16
		1. Les cytokines	16
		 Les récepteurs de cytokines 	17
		3. Cas des cytokines hématopoïétiques	19

	В.	CYTOKINES ET RECEPTEURS LIES A JAK2/D'INTERET DANS LES SMP	22
		1. Epo/EpoR	22
		2. Tpo/Mpl	26
		3. HGF/c-MET	29
		4. Cytokines de la famille de l'Il-6 et leurs récepteurs	32
		5. CXCL8 (IL-8)/ CXCR1 et 2	40
	C.	DEREGULATION DES CYTOKINES DANS LES SMP	43
		1. La Polyglobulie de Vaquez	43
		2. La Thrombocytémie Essentielle	44
		3. La MyéloFibrose Primitive	44
IV.	Ім	PORTANCE DES TYROSINES KINASES JAKS	47
	A.	DESCRIPTION (FONCTION, SCHEMA ET MODELE)	47
	B.	PRINCIPALE VOIE DE SIGNALISATION	48
V.	Ge	NETIQUE DES SMP	53
	A.	LA MUTATION JAK2V617F	54
	B.	LES MUTATIONS DE JAK2 AUTRES QUE V617F	56
	C.	L'haplotype 46/1	56
	D.	LES MUTATIONS DE MPL	57
	E.	AUTRES ANOMALIES GENETIQUES ET CONSEQUENCES DANS LES SMP	57
		1. TET2	57
		2. IKAROS	58
		3. CBL	58
<u>PROJ</u>	ET :	DE RECHERCHE	59
<u>RESU</u>	LT/	ATS	63

RESULTATS, PARTIE I :

"MUTATION DE JAK2 ET PHENOTYPE : UNE DOUBLE MUTATION EN CIS L611V/V617F DE JAK2 EST	
ASSOCIEE AVEC UNE ERYTHROCYTOSE PURE ET UNE ACTIVATION ACCRUE D'AKT ET $ERK1/2$, mais pas de	
STAT5"	64
	~-

A.	PRESENTATION	65
B.	PUBLICATION	66
C.	Commentaires	75

RESULTATS, PARTIE II :

"L	EXPRESSION DE LA FORME SAUVAGE DE JAK2 VARIE DANS LES SYNDROMES MYELOPROL	IFERATIFS
СОММ	E DANS LES FORMES REACTIONNELLES ET LE TAUX D'EXPRESSION DE MPL MATURE EST A	ASSOCIE AVEC
CELUI	DE JAK2 SAUVAGE, MAIS PAS A CELUI DE LA FORME MUTEE JAK2V617F"	77
	A. PRESENTATION	78
	B. PUBLICATION	79
	C. Commentaires	90
Re	SULTATS, PARTIE III :	
"L	A SUREXPRESSION DE L'HGF (HEPATOCYTE GROWTH FACTOR) ET DE L'IL-11 (INTERL	EUKINE 11) ,
СҮТО	KINES ANTI-INFLAMMATOIRES, DANS LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ (PV) CONTRIBUE A	LA
PROL	FERATION CLONALE DES ERYTHROBLASTES, INDEPENDAMMENT DE JAK2V617F "	91
	A. PRESENTATION	93
	B. PUBLICATION	94
	C. Commentaires	129
<u>DISC</u>	USSION	130
I.	LES MUTATIONS DE JAK2	133
	A. MODELISATION MOLECULAIRE	134
	B. CONSEQUENCES SUR LA FONCTION DE JAK2	137
	C. CONSEQUENCES SUR L'EXPANSION DES CLONES PORTEURS DE MUTATION(S) DE JA	K2 138
II.	RELATIONS ENTRE LE RECEPTEUR MPL ET JAK2	140
III	ROLES DES CYTOKINES DANS LES SMP	142
<u>CON</u>	CLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	145
<u>REFE</u>	RENCES BIBLIOGRAPHIQUES	148
ANN	EXES	160

ANNEXE I :

"REDUCTION FREQUENTE, OU ABSENCE DE DETECTION, DU TAUX DE MUTANT JAK2 CHEZ LES PATIENTS

POSITIFS POUR LA MUTATION V617F, DANS LA PREMIERE ANNEE DE TRAITEMENT A L'HYDROXYUREE." 161

ANNEXE II :

"ABSENCE DE JAK2V617F DANS LA THROMBOSE ASSOCIEE A L'HEMOGLOBINURIE PAROXYSTIQUE NOCTURNE" 167

ANNEXE III :

"Utilisation de la HRM, technique simple, fiable et sensible, pour la detection des mu	TATIONS
DE L'EXON 12 DE JAK2 : PERTINENCE CLINIQUE POUR LE CONTROLE DE LA PV"	171

- CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
- Hb : Hémoglobine
- EPO : Erythropoïétine
- CSF : Colony Stimulating Factor
- TPO : Thrombopoïétine
- ADN : acide désoxyribonucléique
- Akt : « cellular homolgue of the v-akt oncogene » ou protéine kinase B
- AP-1 : activating protein 1 ou complexe transcriptionnel c-Fos/c-Jun
- ARN : acide ribonucléique
- AS : allele-specific
- Bcl2 : B cell leukaemia protein 2
- Bcl-xL : B cell leukaemia x large form protein
- BCR-ABL : break point cluster region-abelson tyrosine kinase
- b-FGF : basic fibroblast growth factor
- BFU-E : burst forming unit erythroid
- CBD : cytokine binding domain
- CD : cluster de differenciation
- C/EBP : CAAT/enhancer binding protein = nuclear factor de l'IL-6
- CEE : colonie érythroïde endogène
- CFU-E: colony forming unit erythroid
- CFU-GEMM : CFU granulocyte-érythrocyte-macrophage-mégacaryocyte
- CFU-GM : CFU granulocyte-macrophage
- CFU-MK : CFU mégacaryocytaire
- CME : colonie mégacaryocytaire endogène
- CMN : cellules mononucléées
- CRH : cytokine receptor homologue
- CSF : colony stimulating factor, facteur stimulant des colonies
- EGF-R : récepteur de l'epithelial growth factor

EP : érythrocytose pure

Epo: érythropoïétine

ERK : extracellular signal-regulated kinase

FACS : fluorescence activated cell sorter

FERM : 4.1 ezrin, radixin, moesin

FLT-3 : « Fms-like tyrosine kinase 3 »

Gab1 : growth factor-receptor-bound-protein 2 (Grb2) associated binder 1

GATA : GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)

G-CSF : granulocytes colony stimulating factor

 $Gro\alpha$: growth related gene alpha

Grb2 : growth factor receptor binding protein 2

gp : glycoprotéine

Hct : hématocrite

Hgb : hémoglobine

HGF : hepatocyte growth factor

HGFA : hepatocyte growth factor activator

HIF : hypoxia inducible factor

Hox : Homéobox

IFN : interféron

IL : interleukine

JAK : janus kinase

JH : JAK homology

JNK : jun kinase

LAM : leucémie aigue myéloïde

LDH : lactate deshydrogénase

LIF : leukemia inhibitory factor

LMC : leucémie myéloïde chronique

LOH : loss of heterozygotie

MAPK : mitogen activated protein kinase

M-CSF : macrophage colony stimulating factor

MEC : matrice extracellulaire

MEK : MAPK kinase

MFP : myélofibrose primititve

- MIP : macrophage inflammatory protein
- MMP : métalloprotéinase de la matrice
- MPP1 : membrane protein, palmitoylated 1,
- NAP-2 : neutrophil activating factor 2
- $NF\kappa B$: nuclear factor kappa B
- OMS : organisation mondiale de la santé
- OSM : oncostatine M
- PCR : polymerase chain reaction
- PDGF : platelet derived growth factor
- PF-4 : platelet factor 4
- Phi : philadelphie
- Pi3K : phosphatidyl inositol 3 kinase
- PLC : phospholipase C
- PNN : polynucléaires neutrophiles
- PS : polyglobulie secondaire
- PV : polyglobulie de Vaquez
- SBC : syndrome de Budd-Chiari
- SCF : stem cell factor, facteur de croissance des cellules souches
- SH2 : src homology
- SHIP : SH2-containing inositol 5' -phosphatase
- SHP : SH2-containing phosphatase
- SMD : syndrome myélodysplasique
- SMP : syndrome myéloprolifératif
- SOCS : suppressor of cytokine signaling
- SOS : son of sevenless
- STAT : signal transducer and activator of transcription
- Src : sarcoma

Liste des Figures et Tableaux

FIGURE 1 · CYCLE CELLULAIRE DES CSH	2
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIOUE DE L'HEMATOPOÏESE	4
FIGURE 3 : HEMATOPOÏESE ET CYTOKINES/FACTEURS DE CROISSANCE	7
FIGURE 4 : CONTROLE GENETIQUE DE L'HEMATOPOÏESE	8
FIGURE 5 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES GROUPES OU FAMILLES DE CYTOKINES	17
FIGURE 6 : FAMILLES DE CHAINES RECEPTRICES MEMBRANAIRES DES CYTOKINES	18
FIGURE 7 : STRUCTURE COMMUNE AUX RECEPTEURS DE CLASSE I	20
FIGURE 8 : FAMILLES DE RECEPTEURS DE CYTOKINES HEMATOPOÏETIQUES	21
FIGURE 9 : SCHEMA DU RECEPTEUR DE L'EPO ET DES SITES DE LIAISON POUR LES PROTEINES DE LA SIGNALISATIO	NC
CELLULAIRE (D'APRES LACOMBE ET AL. HAEMATOLOGICA, 1998)	23
FIGURE 10 : REGULATION DES PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR EPOR, D'APRES (RICHMONE 2005)), 25
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE (A) ET 3D (B) DE L'HGF, D'APRES (BIRCHMEIR, 2003)	29
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE (A) ET 3D (B) DU RECEPTEUR C-MET, D'APRES (BIRCHMEIR, 2003)
	31
FIGURE 13 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES PAS LE COMPLEXE HGF/C-MET, D'APRES	
(BIRCHMEIR, 2003)	31
FIGURE 14 : SCHEMA DES ASSOCIATIONS POSSIBLES AVEC LA CHAINE COMMUNE GP130, D'APRES (WANG, 2009)	32
FIGURE 15 : REPRESENTATION DE LA CHAINE COMMUNE GP130, D'APRES (WANG, 2009)	33
FIGURE 16 : FORMATION DU COMPLEXE DE SIGNALISATION HEXAMERIQUE IL-6/IL-6Rα/GP130, D'APRES (WANG 2009)	з, 34
FIGURE 17 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR L'IL-6, D'APRES CELL SIGNALLING	37
FIGURE 18 : PRINCIPALES FONCTIONS, ET GENES, REGULEES PAR L'IL-6 ET LEUR EFFET TUMORIGENIQUE POSSIBI	LE,
D'APRES (ARA, 2010)	37
FIGURE 19 : SIGNALISATION IL-8/CXCR1 ET CXCR2 D'APRES (HERMOUET, 2000)	42
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 7 DOMAINES JH DES JAKS	48
FIGURE 21 : STRUCTURE DES STATS	50
FIGURE 22 : SCHEMA GENERAL D'ACTIVATION, ET D'ACTION, DES STATS PAR LES RECEPTEURS AUX CYTOKINES	, - 1
D'APRES (LEONARD, 2008)	51
FIGURE 23 : PROPOSITION DE MODELE PATHOGENETIQUE POUR LES SMP	53
FIGURE 24 : LOCALISATION DE LA MUTATION VOT / F DANS LA PROTEINE JAK2	54
FIGURE 25 : REPRESENTATION DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE DU CHROMOSOME 9P CONDUISANT A L'HOMOZYCOTHE DOUBLA MUTATION V617E DE LAV2, D'ADDES (V DALOVICE, 2005)	55
L HOMOZYGOTIE POUR LA MUTATION VOT/F DE JARZ, D'APRES (KRALOVICS, 2003) Ficude 26 · Dedesentation des diffédentes dossidilites d'addadition des clones mutes cuez les tro	55
DATIENTES TESTEES · DEDDESENTE I ES DIFFERENTES D'AFFARITION DES CLONES MUTES CHEZ LES TROP DATIENTES TESTEES · DEDDESENTE I ES DIFFEDENTS CLONES MUTES · DEDDESENTE LINE	1.5
PREDISPOSITION & L'ACOUISITION DE MUTATIONS DE IAK2 (HAPLOTYPE 46/1, OU AUTRE) · REPRESENTE	ſ
IN EVENEMENT INCONNU A L'ORIGINE DE L'INSTABILITE GENETIOUE (EVENEMENT PRIMAIRE OU PRECOCE	
DANS LES SMP)	75
FIGURE 27 : STRUCTURE DE LA L-VALINE ET DE LA L-PHENYLALANINE	34
FIGURE 28 : REPRESENTATION DE JAK2 SAUVAGE DANS SA CONFORMATION INACTIVE, LA PLUS STABLE (A ET C	5)
ET DE JAK2V617F DANS SA CONFORMATION ACTIVE, LA PLUS STABLE (B ET D). IMAGES REALISEES PAR	<i>_</i>
Agnes Quemener1	35
FIGURE 29 : REPRESENTATION DE LA FORME SAUVAGE (A) ET MUTEE V617F (B) DE JAK2 EN CONFORMATION	
ACTIVE 1	36
FIGURE 30 : PROPOSITION DE MODELE MONTRANT LE ROLE DES CYTOKINES LIEES A L'INFLAMMATION DANS LA	
PATHOGENESE DES SMP 1	.44
TABLEAU 1 : CRITERES OMS 2008 POUR LE DIAGNOSTIQUE DES SMP, D'APRES (TEFFERI, 2009)	13
TABLEAU 2 : TABLEAU RECAPITULATIF DES JAKS ET STATS ACTIVEES PAR CERTAINES CYTOKINES, D'APRES	
(Levy, 2005)	49
TABLEAU 3 : TABLEAU RECAPITULATIF DES CALCULS D'ENERGIE REALISES PAR MODELISATION MOLECULAIRE.	
LES VALEURS POUR LES FORMES ACTIVES DE LA PROTEINE SONT DONNEES EN SE SERVANT DE LA FORME	
INACTIVE CORRESPONDANTE COMME REFERENCE (AGNES QUEMENER) 1	.35

"Etude de JAK2, Mpl et des cytokines liées à l'inflammation dans les syndromes myéloprolifératifs"

Les Syndromes MyéloProlifératifs (SMP) constituent un groupe de trois maladies clonales : la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la MyéloFibrose Primitive (MFP). La mutation activatrice V617F du gène JAK2, situé sur le chromosome 9p, est présente dans >95% des PV, 60% des TE et 50% des MFP. Récemment l'haplotype 46/1 du chromosome 9p a été trouvé associé à la mutation du gène JAK2 sur le même allèle. Nous avons étudié les mutations de JAK2 chez les patients atteints de PV, porteurs ou non de l'haplotype 46/1, et leurs conséquences sur l'expression de certaines cytokines (HGF, IL-11, IL-6) et récepteurs (Mpl, c-Met, gp130) liés à l'inflammation. Nous avons trouvé que certains patients présentent plusieurs sousclones porteurs de différentes mutations de JAK2. Ces mutations ne garantissent pas la prolifération clonale des cellules et peuvent altérer la fonction de JAK2, différemment de V617F. Nous décrivons un nouveau double mutant JAK2L611V/V617F, qui hyperactive JAK2, AKT et ERK1/2, mais pas STAT5. Nous avons ensuite étudié Mpl, récepteur de la thrombopoïétine, qui transmet des signaux de survie dans les progéniteurs hématopoïétiques. Nous montrons que le taux de Mpl mature est corrélé à celui de JAK2WT (forme sauvage), pas à celui de JAK2V617F, et qu'une variation d'expression de JAK2WT, fréquente dans les SMP, suffit à altérer l'expression et la maturation de Mpl. Enfin, nous montrons que les cytokines anti-inflammatoires HGF et IL-11 sont surexprimées dans la PV et contribuent à l'expansion des érythroblastes, indépendamment de JAK2V617F. En conséquence, le blocage de la voie c-MET/HGF pourrait être une approche thérapeutique intéressante dans la PV.

"Study of JAK2, Mpl and inflammation-linked cytokines in myeloproliferative neoplasms"

Myeloproliferative neoplasms (MPN) include three clonal diseases: Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). The V617F mutation of the JAK2 gene (located on chromosome 9p), is found in >95% PV, 60% ET and 50% PMF. Recently, the 46/1 haplotype of the 9p chromosome was found associated with JAK2 mutation on the same allele. We studied JAK2 mutations in PV patients and their consequences on expression of cytokines (HGF, IL-11, IL-6) and receptors (Mpl) linked to inflammation. We found that subsets of PV patients, with or without the 46/1 haplotype, can present several sub-clones carrying different mutations of JAK2. The presence of JAK2 mutations, functionally silent or activating, does not ensure clone expansion; however, JAK2 function may be altered, differently than V617F. We report on a new double L611V/V617F mutation, which increased activation of JAK2, AKT and ERK1/2 but not STAT5, and was found associated with isolated erythrocytosis. We then investigated the role of JAK2 in Mpl expression. Mpl transmits the survival signals of thrombopoietin in hematopoietic progenitors, and its expression is tightly regulated. We found that changes in expression of JAK2WT, frequent in MPN, are sufficient to alter Mpl expression and maturation, and that levels of mature Mpl are linked to those of JAK2WT (wild type form), not JAK2V617F. Finally, we show that the autocrine/paracrine production of anti-inflammatory HGF and IL-11 is increased in PV and likely contributes to the expansion of clonal erythroblasts, in a JAK2V617Findependent fashion. Consequently, blocking the c-MET/HGF pathway could be of interest in the treatment of PV.

Introduction

I. Hématopoïèse

A. Généralités

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui permet la fabrication et le remplacement continu et régulé des différentes cellules sanguines. Ces cellules sont pour la plupart hyperspécialisées et incapables de se multiplier ; les érythrocytes et les thrombocytes sont, par exemple, dépourvus de noyau. Leur durée de vie est, elle aussi, limitée (en moyenne 24 heures pour les granulocytes, 7 jours pours les thrombocytes et 120 jours pour les érythrocytes).

A l'origine des différentes lignées hématologiques, se trouvent les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Les CSH sont des cellules dites multipotentes, elles ont la capacité de s'auto-renouveler mais également de se différencier en plusieurs types cellulaires.

L'hématopoïèse normale est donc un processus qui permet l'équilibre entre l'auto-renouvellement des CSH, de façon à maintenir un stock constant de CSH qui reste alors au repos (elles sont dites quiescentes), et leur réintroduction dans une phase de prolifération et de différenciation (**Figure 1**).



Figure 1 : Cycle cellulaire des CSH

Le siège de l'hématopoïèse varie en fonction des différents stades de la vie. Chez l'embryon tout d'abord il existe 3 stades distincts :

<u>Stade primitif mésodermique</u> : les cellules sanguines sont d'abord identifiables au niveau des îlots de Wolf et Pander présents dans le sac vitellin au 16ème jour, puis dans le mésoblaste de l'embryon au 22ème jour. A ce stade sont produites uniquement des

cellules erythroïdes qui produisent des hémoglobines (Hb) de type embryonnaire puis fœtales. La production mésodermique de cellules sanguines décroît à partir du deuxième mois de la vie intra-utérine.

<u>Stade hépatosplénique</u> (3^{ème} au 6^{ème} mois) : les îlots hématopoïétiques présents dans le foie et la rate sont essentiellement constitués de cellules érythropoïétiques, la production de cellules granuleuses et mégacaryocytaires restant faible.

<u>Stade médullaire</u> : il débute au 4^{ème} mois et coïncide avec le développement des ébauches osseuses où les cellules souches se différencient en éléments myéloïdes. L'hématopoïèse médullaire devient prépondérante à partir du 6^{ème} mois et elle est exclusive dès la naissance. Seules des conditions pathologiques peuvent conduire à une reprise de l'hématopoïèse extra médullaire après la naissance (nous y reviendrons lors de l'introduction sur les Syndromes MyéloProlifératifs).

Puis, après la naissance et jusqu'à l'âge de cinq ans l'hématopoïèse a lieu dans la moelle de la totalité des cavités osseuses, on parle alors de moelle "rouge".

Enfin, chez l'adulte, l'hématopoïèse normale à exclusivement lieu dans la moelle des os plat et court (sternum, côtes, os iliaques, vertèbres).

B. Différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Deux voies principales constituent l'hématopoïèse normale :

Hématopoïèse

Myélopoïèse

Lymphopoïèse

- Erythropoïèse
- Granulopoïèse
- Monocytopoïèse
- Thrombocytopoïèse

Les voies de différenciations empruntées lors de l'hématopoïèse sont présentées dans la **Figure 2**.



Figure 2 : Représentation schématique de l'hématopoïèse

Nous ne nous intéresserons dans ce travail qu'à la myélopoïèse, et plus précisément à l'érythropoïèse et à la thrombocytopoïèse.

1. L'érythropoïèse

Il s'agit de l'ensemble des processus conduisant à la formation d'érythrocytes matures à partir d'un progéniteur myéloïde pluripotent commun appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit – Granulocyte Erythrocyte Monocyte Megakaryocyte). Ces progéniteurs s'engagent alors de façon irréversible vers la lignée érythroïde pour former les BFU-E (Burst Forming Unit - Erythroid) qui sont les progéniteurs les plus immatures, et les CFU E (Colony Forming Unit – Erythroid) qui sont les progéniteurs les plus immatures, les CFU E (Colony Forming Unit – Erythroid) qui sont les progéniteurs les plus matures. La prolifération/différenciation des BFU-E est sous la dépendance de l'Interleukine 3 et du GM CSF. La prolifération/différenciation des CFU-E est pour sa part sous la dépendance de l'érythropoïétine (Epo).

S'en suit le stade proérythroblaste (grosse cellule nucléée de 20 micromètres de diamètre) et le stade érythroblaste d'abord basophile, polychromatophile puis enfin acidophile (il y a acidification du milieu cellulaire au cours de cette différenciation car il y a baisse du nombre de ribosomes et augmentation du taux d'hémoglobine).

Il y a au cours de la différenciation diminution de la taille du noyau (par condensation) puis éjection de ce dernier au stade qui suit l'érythroblaste acidophile: on a alors une cellule anucléée contenant encore quelques organites (mitochondries, ribosomes) nommée réticulocyte. Le réticulocyte finit sa différenciation dans le sang et devient un érythrocyte mature (d'environ 7 micromètres de diamètre) (**Figure 2**).

Chez l'homme, l'érythropoïèse dure environ une semaine et est stimulée par l'érythropoïétine (Epo), dont le taux peut, notamment, être augmenté en condition hypoxique, induisant ainsi une plus grande production de globules rouges afin de compenser le manque d'oxygène.

2. La granulopoïèse et la monocytopoïèse

Ces deux processus font partie de la leucopoïèse, qui permet la fabrication des granulocytes, des monocytes et des lymphocytes. Ces phénomènes ont entièrement lieu dans la moelle osseuse.

La granulopoïèse permet la production de polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Chez l'homme, elle dure environ 11 jours et est caractérisée par plusieurs stades de différenciation (**Figure 2**).

3. La thrombocytopoïèse

Il s'agit de la fabrication des plaquettes. Un mégacaryoblaste se différencie en mégacaryocyte basophile, qui lui-même devient successivement un mégacaryocyte thrombocytogène (=mégacaryocyte granuleux) puis un ensemble de plaquettes (diamètre très petit: 2 à 4 micromètres): c'est le cytoplasme du mégacaryocyte granuleux qui se fragmente (Figure 2).

Contrairement aux érythrocytes, au cours de la différenciation, il y a augmentation de la taille des mégacaryoblastes puis des mégacaryocytes : les thrombocytes, ou plaquettes, résultent de la désagrégation du cytoplasme mégacaryocytaire.

Chez l'homme, la thrombopoïèse dure environ de 8 à 10 jours. Elle est stimulée par la thrombopoïétine (Tpo).

C. La régulation de l'hématopoïèse

Le microenvironnement médullaire, et plus précisément le stroma médullaire, joue un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse.

En effet, le stroma assure l'organisation générale de la moelle en "niches" hématopoïétiques favorables aux cellules souches pour leur maintien, leur engagement dans un lignage et leur progression dans leur différenciation.

La communication entre le stroma et les cellules hématopoïétiques en maturation se fait via des cytokines, dites hématopoïétiques, des chimiokines et des facteurs de croissance des colonies (CSF pour Colony Stimulating Factor).

Les facteurs de croissance régulent l'hématopoïèse en modulant de manière positive ou négative la prolifération, la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques. On les classe en 3 catégories essentiellement selon leur spécificité d'action.

1. Les facteurs de croissances "synergiques" / de "compétence"

Ce sont principalement l'IL-1, l'IL-6, l'IL-11, le SCF (Stem Cell Factor) et le G-CSF (Granulocytes Colony Stimulating Factor); le Flt3-ligand et le LIF (Leukemia Inhibitoring Factor) jouent également un rôle.

Ils augmentent le nombre de cellules souches en cycle cellulaire à partir du pool de CSH quiescentes et favorisent également leur survie. Ils sensibilisent les cellules souches multipotentes à l'action des autres facteurs de croissance, notamment en induisant l'expression de récepteurs membranaires spécifiques.

2. Les facteurs de croissances "multipotents"

Ce sont principalement l'IL-3 et le GM-CSF (Granulocytes/Monocytes - CSF) pour les progéniteurs myéloïdes. Ils agissent sur les cellules souches les plus immatures, après sensibilisation par les facteurs de croissance "synergiques", et ils permettent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches.

6

3. Les facteurs de croissances "spécifiques de lignée"

Ils agissent sur les cellules souches engagées dans une voie de différenciation et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs.

Ce sont principalement :

- le G-CSF (lignée granuleuse neutrophile)
- le M-CSF (lignée monocytaire)
- l'IL-5 (lignée granuleuse éosinophile)
- l'IL-4 (lignée granuleuse basophile)
- l'EPO (lignée érythroïde)
- la TPO (lignée mégacaryocytaire) (Figure 3)



Figure 3 : Hématopoïèse et cytokines/facteurs de croissance

Enfin, outre des rôles positifs, il est décrit que certains FC inhibent l'hématopoïèse en situation physiologique ou pathologique, comme par exemple le TGF β , l'INF γ ou le TNF α (Lu, Welte et al. 1986; Mitjavila, Vinci et al. 1988).

4. Le contrôle génétique de l'hématopoïèse

Il s'agit de facteurs de transcription qui favorisent la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques dans un lignage particulier (Figure 4).

Quelle que soit la voie de transduction du signal mise en jeu, elle aboutit à une régulation génétique des facteurs de transcription qui vont orienter la réponse cellulaire, en termes d'auto renouvellement, de différenciation, de prolifération, d'apoptose, de sénescence, de migration ou encore d'adhésion. Ces choix cruciaux se font *via* la combinaison de nombreux facteurs de transcription, s'antagonisant ou synergisant souvent les uns les autres, exprimés à des stades de différenciation particuliers et permettant de diriger les cellules vers un lignage spécifique.(Rosenbauer and Tenen 2007).



Figure 4 : Contrôle génétique de l'hématopoïèse

II. Les Syndromes MyéloProlifératifs

A. Description générale

En 1951, William Dameshek fut le premier à décrire les syndromes myéloprolifératifs (SMP). En se basant sur des similarités phénotypiques de myéloprolifération il regroupa : la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la MyéloFibrose Primitive (MFP) (Dameshek 1951).

Par la suite, une anomalie cytogénétique due à une translocation [t(9;22)(q34;q11)] (Nowell and Hungerford 1960), dont résulte la protéine de fusion BCR-ABL (une tyrosine kinase constitutivement active (Deininger, Goldman *et al.* 2000; Kantarjian, Talpaz *et al.* 2006) et présente chez 100% des patients (Erikson, Griffin et al. 1986)), a permis de séparer les SMP en deux catégorie :

- Les SMP Phi+, ou positifs pour le chromosome de Philadelphie : il s'agit de la LMC

- Les SMP Phi-, ou négatifs pour le chromosome de Philadelphie : y sont classés la PV, la TE et la MFP.

Les SMP Phi- sont caractérisés par une prolifération clonale et une accumulation de cellules myéloïdes matures de la lignée érythrocytaire, granulocytaire, thrombocytaire ainsi que par le développement d'une fibrose ostéo-médullaire.

En 2005, une mutation sur le gène codant pour la tyrosine kinase JAK2 à été mise en évidence. Cette mutation entraine un changement d'acide aminé, d'une valine pour une phénylalanine, en position 617 (V617F) dans la protéine JAK2. Cette mutation est retrouvée dans environ 95% des cas de PV, 60% des TE et 50% des MFP (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005; Zhao, Xing et al. 2005). D'autres marqueurs génétiques ont récemment été identifiés et feront l'objet du paragraphe "Génétique des SMP".

Parmi les SMP Phi-, la TE présente le meilleur pronostic, le plus mauvais étant celui de la MFP. De plus la TE peut évoluer en PV, qui peuvent toutes deux évoluer en MFP. Il est également à noté que ces trois syndromes peuvent se transformer en Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM) (Sterkers, Preudhomme et al. 1998; Jaffe ES 2001).

B. La Polyglobulie de Vaquez (PV)

La première description par Luis Henri Vaquez en 1892 faisait état d'une "hypercellularité persistante et excessive accompagnée de cyanose" (Vaquez 1892); Depuis, la PV a été classée dans les SMP (Dameshek 1951) et les connaissances sur cette pathologie n'ont cessé d'augmenter.

En 1974, il a été montré que des progéniteurs erythroïdes provenant de moelle osseuse de patients atteints de PV étaient capables de former des colonies (BFU-E, CFU-E) en l'absence d'Epo (Prchal and Axelrad 1974). Peu de temps après, les premières évidences du caractère clonal de la maladie, et d'anomalies touchant CSH furent rapportées (Adamson, Fialkow et al. 1976; Fialkow, Faguet et al. 1981).

La PV se caractérise par une prolifération des trois lignées myéloïdes, avec une accumulation de cellules hématologiques matures (malgré un pléomorphisme des mégacaryocytes, notamment) et ce avec une nette prédominance de la lignée érythroïde avec une augmentation de l'hématocrite et de l'hémoglobine, associée à un taux d'Epo sérique effondré ou bas.

Certains patients développent une splénomégalie due à une hématopoïèse extra médullaire, l'apparition d'un prurit est également courante (**Tableau 1**).

L'évolution de la maladie diffère en fonction des patients. Il peut y avoir une augmentation de la fibrose médullaire (Spivak 2002), due à une réponse polyclonale des cellules stromales suite à la dérégulation de la production de cytokines par le clone myéloprolifératif (Tefferi 2005). La PV peut donc évoluer vers la MFP et éventuellement se transformer en LAM, dans moins de 10% des cas. Ce dernier stade d'évolution ne semble pas être associé à la présence de la mutation V617F (Campbell, Baxter et al. 2006; Theocharides, Boissinot et al. 2007), mais l'exposition à des traitements cytoréducteurs semble augmenter ce risque (Barbui 2004). Les complications les plus courantes étant les thromboses et les hémorragies.

Plus récemment, d'autres anomalies génétiques ont été identifiées dans la PV :

- la perte d'hétérozygotie par recombinaison homologue du chromosome
9p, décrite comme l'altération cytogénétique la plus fréquente dans la PV (pour 1/3 des cas environ) (Kralovics, Guan et al. 2002),

- la pousse spontanée des progéniteurs erythroïdes dépendante de la voie de signalisation JAK-STAT (Roder, Steimle et al. 2001; Ugo, Marzac et al. 2004)

- la découverte de la mutation V617F dans l'exon 14 de JAK2 qui a été une avancée majeure dans la compréhension de cette pathologie (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005; Zhao, Xing et al. 2005). Cette mutation est retrouvée chez plus de 95% des patients atteints de PV et des cellules mutées de façon homozygote sont présentent chez la majorité des patients.

La présence de cette mutation sur le gène *JAK2* a ensuite pu être corrélée avec les différentes observations faites au cours du temps (Campbell and Green 2006). D'autres mutations de JAK2, portées par l'exon 12 du gène, ont également été décrites chez 1-2% des patients (Scott, Tong et al. 2007; Pietra, Li et al. 2008).

La tyrosine kinase JAK2, ainsi que son implication dans les SMP seront présentées dans les paragraphes "Importance des tyrosines kinases JAKs" et "Génétique des SMP".

C. La Thrombocytémie Essentielle (TE)

La TE a été définie comme une pathologie à part entière à partir des années 1930 (Epstein E 1934), mais les principales avancées ont eu lieu lors de la découverte de la mutation JAK2V617F, retrouvée dans 60% des cas, et plus récemment, des mutations de *MPL* (Pardanani, Levine et al. 2006; Pikman, Lee et al. 2006; Beer, Campbell et al. 2008), le récepteur à la thrombopoïétine, dans environ 4% des cas de TE (Skoda 2009).

La TE est caractérisée par une thrombocytose chronique (taux de plaquettes > 450.10⁹/L) et une splénomégalie (dans environ 50% des cas). Dans la moelle, on observe des mégacaryocytes de grande taille à ploïdie élevée et en général regroupés en amas, ainsi qu'une pousse endogène des CFU-MK (dans environ 75% des cas) et de CFU-E (dans environ 50% des cas) (Dobo, Boiret et al. 2004). Le nombre de leucocyte peut également être légèrement augmenté. Les complications les plus courantes sont de type thrombo-hémorragiques avec une prédominance des thromboses artérielles par rapport aux thromboses veineuses.

Son phénotype et sa pathogénicité présentent des similarités avec les autres SMP (PV et MFP). Les critères diagnostiques sont donc essentiellement des critères

d'exclusion des autres SMP, des thrombocytoses secondaires, ou réactionnelles, et des formes hyper plaquettaires des syndromes myélodysplasiques (principalement l'anémie sidéroblastique et le syndrome 5q-) (Beer and Green 2009).

On trouve toutefois certains critères diagnostiques qui sont des critères d'inclusion, tels que l'hyperplasie mégacaryocytaire médullaire, la présence d'une splénomégalie modérée, la pousse endogène de CFU-MK, voire de CFU-E et la présence de la mutation JAK2V617F, ou d'autres mutations de *JAK2* ou de *MPL* (Tableau 1).

D. La MyéloFibrose Primitive (MFP)

Décrite pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle, la MyéloFibrose Primitive (MFP) se caractérise par une fibrose ostéo-médullaire importante, avec disparition des niches hématopoïétiques, une splénomégalie, une anémie et une hématopoïèse extra médullaire (avec circulation sanguine de progéniteurs CD34+), notamment une érythropoïèse extra médullaire (foie et rate) (Barosi and Hoffman 2005; Thiele and Kvasnicka 2006; Cervantes 2007; Abdel-Wahab and Levine 2008). Son incidence est faible, estimée à 0,3-1,5 cas pour 100 000 personnes par an (Ahmed and Chang 2006).

La MFP débute par une phase asymptomatique, dite pré-fibrotique, puis évolue au stade fibrotique. Les causes principales de décès sont les infections, les hémorragies thrombotiques ou une évolution en LAM pour 4-20% des patients (Visani, Finelli et al. 1990; Mesa, Silverstein et al. 1999).

De plus, un des critères diagnostique de la MFP est une hyperplasie mégacaryocytaire avec des cellules atypiques et immatures produisant peu de plaquettes. Ces cellules présentent une localisation anormale de la P-sélectine, associée à une baisse d'expression de *GATA-1* (facteur de transcription régulant de nombreux gènes spécifiques des mégacaryocytes) (Vannucchi, Pancrazzi et al. 2005). Les mégacaryocytes de MFP libèrent dans le microenvironnement médullaire divers facteurs (FGF, TGF- β , TGF- α , VEGF, ANG1, PDGF) (Border and Noble 1994; Le Bousse-Kerdiles and Martyre 1999; Rameshwar, Narayanan et al. 2000), qui induisent l'activation de plusieurs types cellulaires du stroma médullaire : fibroblastes, cellules endothéliales et ostéoblastes, provoquant une fibrose, une néo-angiogénèse et une ostéosclérose médullaire, respectivement (Varricchio, Mancini et al. 2009).

E. Les critères diagnostiques de l'OMS

En 2008, l'organisation mondiale de la santé (OMS), aidée par le Polycythemia Vera Study Group (PVSG), a redéfini les critères diagnostiques des SMP.

	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocytémie Essentielle	MyéloFibrose Primitive
Critères Majeurs	1 - Hb >18,5 g/dL (♂) > 16,5 g/dL (♀) Ou Hb >17 g/dL (♂) > 15 g/dL (♀) si associé à une augmentation ≥2g/L de la valeur basale qui ne peut être attribuée à une correction d'une déficience en fer ou Augmentation ≥ 25% de la masse globulaire p/r à la moyenne Ou Taux d'Hb ou Hct > 99% à la gamme de référence	1- Taux de plaquettes ≥450.109/L	1- Prolifération mégacaryocytaire atypique associée à une fibrose réticulinique et/ou collagénique <i>Ou</i> En absence de fibrose réticulinique, la prolifération mégacaryocytaire atypique doit être associée à une augmentation de la cellularité médullaire, d'une prolifération granulocytaire et fréquemment d'une baisse de l'érythropoïèse (i.e. MFP pré- fibrotique)
	2- Présence de JAK2V617F (ou mutations similaires)	2- Prolifération de mégacaryocytes de grande taille morphologiquement matures. Peu, ou pas, de prolifération érythroïde ou granulocytaire	2- Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, les SMD et les autres SMP
		3- Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, la MFP, les SMD et les autres SMP	3- Présence de JAK2V617F <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve de fibrose ostéo-médullaire réactionnelle
		4- Présence de JAK2V617F <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve d'une thrombocytose réactionnelle	reactionnene
Critères Mineurs	1- Prolifération des 3 lignées myéloïdes dans la moelle osseuse		1- Leuco-érythroblastose
	2- Taux d'Epo sérique inférieur à la normale		2- Augmentation du taux de LDH sérique
	3- Pousse de CEE		3- Anémie

Critères diagnostiques OMS 2008

Tableau 1 : Critères OMS 2008 pour le diagnostique des SMP, d'après (Tefferi, 2009)

F. Les traitements

Les SMP ont souvent pour complications courantes des risques de thromboses et d'hémorragies, et plus rarement d'évolution en MFP, voire en LAM, qui sont généralement de mauvais pronostic.

La première cible thérapeutique dans le cas d'une PV est l'hématocrite. Il peut être stabilisé, ou réduit, par phlébotomie associée à une faible dose d'aspirine pour éviter les accidents thrombotiques. Des traitements cyto-réducteurs peuvent également être utilisés, tels que l'Hydroxyurée et le Pipobroman. Ces traitements peuvent également avoir pour effet, une baisse de la charge allélique de JAK2V617F (Girodon, Schaeffer et al. 2008).

Dans les cas de TE, sauf contre-indication, une faible dose d'aspirine est généralement recommandée. Dans le but de réduire les risques de complications thrombotiques, les patients âgés de plus de 60 ans, ou présentant des antécédents de thrombose, reçoivent généralement un traitement cyto-réducteur. En l'absence d'autres facteurs de risques (tabagisme, obésité, hypertension, diabète, hypercholestérolémie), les patients peuvent être divisés, en fonction de l'âge, en deux groupes en fonction du risque : bas (patients âgés de moins de 40 ans) et intermédiaire (patients âgés de 40 à 60 ans). Le seul agent cyto-réducteur réduisant les risques d'accident thrombotique est l'Hydroxyurée, il est donc utilisé en première ligne chez les patients à risque (Cortelazzo, Finazzi et al. 1995).

En cas d'intolérance à l'Hydroxyurée, un autre agent thérapeutique, l'Anagrélide, peut également être utilisé. Dans un premier temps, il a été développé afin de prévenir l'agrégation plaquettaire, puis s'est avéré être également un agent cyto-réducteur (utilisé alors à plus faible dose). Il permet ainsi de réduire le taux de plaquettes en inhibant la différenciation et la prolifération des mégacaryocytes, ainsi que l'action de l'AMPc phosphodiestérase (Tomer 2002). Une étude récente anglaise, PT-1 (Primary Thrombocytemia 1), menée sur des patients présentant une TE avec un fort risque de thrombose, a montrée que l'Hydroxyurée restée plus efficace pour la prévention des accidents thrombotiques que l'Anagrélide, (Harrison, Campbell et al. 2005). Enfin, chez les patients jeunes et les femmes enceintes, l'IFN- α (Interféron- α), pégylé ou non, semble efficace pour contrôler le taux de plaquettes (Kiladjian, Chomienne et al. 2008). De plus, il réduit la charge allélique en cas de mutation JAK2V617F (Kiladjian, Cassinat et al. 2008) (Kiladjian, Masse et al. 2010).

En ce qui concerne la MFP, le seul traitement curatif existant est la transplantation de cellules souches hématopoïétiques, qui n'est que rarement possible à cause de l'âge des patients, avec des taux de rémission allant de 30 à 70% selon la présentation clinique et les antécédents du patient (Guardiola, Anderson et al. 1999; Kerbauy, Gooley et al. 2007; Kroger, Holler et al. 2009).

Le rôle central de la voie JAK/STAT dans la signalisation intracellulaire induite par les récepteurs à cytokines, ainsi que l'implication des ces mêmes cytokines dans de nombreuses maladies du système immunitaire et dans la pathogénèse de certains cancers, font des kinases JAKs des cibles thérapeutique en pleine expansion. Plusieurs antagonistes ciblant la famille des kinases JAKs, ou ciblant plus spécifiquement un des membres de cette famille, sont en développement (à différents stades cliniques ou précliniques).

Parmi eux, on retrouve :

- ICNB18424 : inhibiteur "pan"-JAK testé en test clinique de phase II et qui semblerait efficace pour les MFP et les MF post-PV/ET.

- AG490 : Tyrphostine inhibiteur spécifique de JAK2 agissant sur la voie JAK/STAT. Des composés basés sur la même molécule auraient un potentiel cytotoxique sur les cellules porteuses de la mutation JAK2V617F : WP1066 (Verstovsek, Manshouri et al. 2008) et LS-10 (Lipka, Hoffmann et al. 2008).

- TG101348 et TG101209: inhibiteurs spécifiques de JAK2 capables de réduire une érythrocytose induite chez des souris (Pardanani, Hood et al. 2007; Wernig, Kharas et al. 2008).

La famille des JAKs présente quatre membres relativement proche les uns des autres, agissant à des points clés de la signalisation cellulaire et ayant des interconnections fortes (dans les voies de signalisation induites ou dans leur structure même). Il est donc important de pouvoir précisément caractériser les effets secondaires d'inhibiteurs de ces kinases et d'essayer d'en limiter au maximum la toxicité.

III. Les cytokines dans les SMP et leurs récepteurs

A. Généralités sur les cytokines et leurs récepteurs

1. Les cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles sécrétées par de nombreuses cellules de l'organisme. Leur taille est généralement comprise entre 8 et 50 kDa. Elles ont pour but d'induire, de contrôler ou d'inhiber l'intensité et la durée de la réponse immunitaire, ainsi que les mécanismes de différenciation et prolifération des cellules hématopoïétiques et d'autres types cellulaires.

Ce qui distingue les cytokines des hormones, ce sont les nombreuses sources potentielles, le grand nombre de cellules cibles différentes, impliquant un large spectre d'action et des activités qui peuvent être aussi bien autocrine que paracrine, voire ne pas nécessiter de sécrétion et agir lors d'un simple contact membranaire (juxtacrine).

Les cytokines ne sont généralement pas produites de manière constitutive, mais en réponse à des stimuli. Leur production ainsi que leur action sont en général brèves et intenses. On note également une grande redondance fonctionnelle, probablement liée à la pluralité des cibles et à la complexité des réseaux de régulation et de signalisation.

On peut classer les cytokines en six groupes, selon leur mode d'action et leurs effets biologiques (Figure 5) :

-les **interleukines** (**IL**-): cytokines sans parenté biochimique ni de fonction, classées au gré des découvertes. Il en existe environ 35 et de nouvelles sont découverte régulièrement.

- les interférons (IFNs)

- les **facteurs stimulant les colonies** (**CSFs**, "*Colony Stimulating Factors*") : cytokines jouant un rôle dans l'hématopoïèse

- les facteurs de nécrose des tumeurs (TNFs, "Tumor Necrosis Factors")

les facteurs de croissance (GFs, "Growth Factors")

- les **chimiokines** : petites molécules de 8 à 14 kDa capables d'induire une attraction (chimiotactisme) chez les cellules immunitaires.



Figure 5 : Représentation des différents groupes ou familles de cytokines

2. Les récepteurs de cytokines

Les cytokines exercent leur effet biologique via leur fixation sur un récepteur spécifique exprimé à la surface des cellules immunitaires cibles. Les chaînes réceptrices des cytokines présentent des homologies structurales qui ont permis de les classer en neuf familles différentes (Figure 6) :

- les récepteurs de classe I (cytokines hématopoïétiques) comme la chaîne gp130, la chaîne β commune (β_c) et la chaîne γ commune (γ_c),

- les **récepteurs de classe II (familles des IFNs et de l'IL-10)** tels IFN-Rs, IL-10R, IL-20R, IL-22R et IL-28R,

- les récepteurs de classe III (cytokines de la superfamille des TNFs) comme TNF-R, NGF-R, Fas, CD27, CD40 et TRAIL-R,

- les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines sans activité tyrosine kinase tels IL-1Rs et IL-18R,

- les **récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines avec activité tyrosine kinase** qui correspondent entre autres aux M-CSF-R, EGF-R et PDGF-R, c-Kit, - les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF β comprenant TGF β -R, Inh-R et Act-R,

- les récepteurs à domaine « sushi » dont les seuls membres sont l'IL-2R α et l'IL-15R α ,

- les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-17 (IL-17Rs),

- les **récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines** comme CXCR-1, CCRs, CXCRs et CX₃CR-1.



Figure 6 : Familles de chaînes réceptrices membranaires des cytokines

De nouvelles cytokines, de nouveaux récepteurs et de nouveaux modes d'action sont découverts chaque année. Ils nous révèlent que le réseau cytokinique est un système complexe où beaucoup de choses sont encore à découvrir et à comprendre.

3. Cas des cytokines hématopoïétiques

Les cytokines hématopoïétiques sont des cytokines impliquées dans la différenciation et l'expansion des cellules sanguines. Elles présentent généralement des (N)- et des (O)-glycosylations. Leur structure tertiaire est maintenue par des ponts disulfures. L'organisation spatiale des structures secondaires donne une structure tertiaire cylindrique aux cytokines à hélices α longues, et une structure globulaire aux cytokines à hélices α longues, et une structure globulaire aux cytokines à hélices α courtes. Ces cytokines se fixent généralement sous forme monomérique sur différentes chaînes réceptrices.

Les récepteurs de cytokines hématopoïétiques, ou récepteurs de type I, sont des glycoprotéines membranaires qui constituent le groupe le plus important des récepteurs de cytokines. Chacun de ces récepteurs comporte un domaine transmembranaire, une extrémité NH₂-terminal extracellulaire et une extrémité COOH-terminal intracellulaire. Les régions extracellulaires sont variables, mais présentent toutes une architecture de type "*Cytokine binding Homology Region*" (Bazan 1990) caractérisée par deux domaines de type fibronectine III :

- le **premier domaine**, situé le plus proche du NH₂-terminal, contient quatre résidus cystéines conservés qui forment deux ponts disulfures intracaténaires successifs indispensables à la fonctionnalité du CHR (Yawata, Yasukawa et al. 1993),

- le **second domaine**, situé en dessous, possède un motif W-S-X-W-S (X : acide aminé quelconque) conservé au sein de la famille des récepteurs hématopoïétiques et indispensable à la fixation du ligand (de Vos, Ultsch et al. 1992).

Certains récepteurs de classe I présentent néanmoins des variations dans cette région par duplication des deux domaines et/ou ajout d'autres motifs, comme les domaines de type "immunoglobuline-like" (Ig-like) ou fibronectine de type III (FNIII). Les domaines Ig-like peuvent jouer un rôle dans la liaison de la cytokine (Layton, Hall et al. 2001 ; Bitard, Daburon et al. 2003) et les domaines FNIII peuvent permettre des interactions entre les chaînes réceptrices (Kurth, Horsten et al. 2000; Timmermann, Kuster et al. 2002).

La partie intracytoplasmique de ces récepteurs est de longueur variable et ne présente aucune activité tyrosine kinase intrinsèque. Elle comporte cependant deux motifs conservés, "Box1" et "Box2", tous deux essentiels pour la transduction du signal. Le motif "Box1" possède un site, riche en proline, nécessaire à l'ancrage de protéines tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille des "*Janus Kinases*" (JAKs). Le motif "Box2", moins conservé, augmenterait l'affinité des JAKs pour la région intracytoplasmique des chaînes transductrices (Bazan 1990) (**Figure 7**).



Figure 7 : Structure commune aux récepteurs de classe I

La fixation de la cytokine sur son récepteur induit une oligomérisation des sousunités réceptrices et le rapprochement des domaines intracellulaires. Les JAKs, constitutivement associées à ces domaines, sont alors activés et assurent leur propre phosphorylation et celle des domaines intracellulaires. Les tyrosines phosphorylées des chaînes réceptrices recrutent alors les *"Signal Transducer and Activator of Transcription"* (STATs), qui, une fois phosphorylés, seront transloqués dans le noyau et agiront en tant que facteurs de transcription (Leonard and O'Shea 1998).

La plupart des récepteurs de classe I n'induisent pas de signal par homodimérisation mais plutôt par hétéro-dimérisation (IL-4, IL-7, …), ou –trimérisation (IL-2, IL-15), voire -tetramérisation (IL-6 virale/gp130, G-CSF/G-CSFR), et même -hexa (IL- $6/IL-6R\alpha/gp130$) et -dodecamérisation (GM-CSF/GM-CSFR α/β_c) (Wang, Lupardus et al. 2009). Mais la caractéristique particulière de tous ces récepteurs hétéro-oligomériques est qu'ils partagent une sous-unité réceptrice commune responsable de la transduction du signal et possèdent une chaîne spécifique de chaque cytokine.

On peut ainsi classer les cytokines hématopoïétiques en trois familles selon la chaîne réceptrice partagée (Figure 8) :

- la famille utilisant la chaîne transductrice $\gamma_{c\text{,}}$

- la famille utilisant la chaîne transductrice gp130,



- la famille utilisant la chaîne transductrice β_c .

Figure 8 : Familles de récepteurs de cytokines hématopoïétiques

D'après Wang et al. (2008) et avec LIF, "Leukemia Inhibitory Factor"; OSM, "Onconstatin-M"; CNTF, "Cillary Neurotrophic Factor"; CLC, "Cardiotrophin-Like Cytokine"; HHV-8, "Human Herpes Virus"; GM-CSF, "Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor" et D, domaine.

C'est entre autre le fait que les chaînes transductrices soient souvent partagées par plusieurs cytokines qui explique la redondance fonctionnelle observée entre différentes cytokines.

B. Cytokines et récepteurs liés à JAK2/d'intérêt dans les SMP

1. Epo/EpoR

L'érythropoïétine (Epo) est une hormone de nature glycoprotéique de 34 kDa. Elle joue un rôle crucial en tant que facteur de croissance stimulant l'érythropoïèse en favorisant la survie, la prolifération et la différentiation des progéniteurs erythroïdes (Krantz 1991). Elle est produite par les cellules fibroblastiques du cortex rénal chez l'adulte et par le foie fœtal chez l'embryon. Elle exerce son action sur les progéniteurs médullaires de façon paracrine (Zwezdaryk, Coffelt et al. 2007).

L'expression de l'Epo est régulée par l'hypoxie, c'est également le cas d'autres facteurs hématopoïétiques comme l'Hepatocyte Growth Factor (HGF). En effet, le gène de l'Epo contient un site de liaison pour l'Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α). L'HIF est un complexe transcriptionel composé de deux sous-unités : alpha et béta. En condition de normoxie, les deux sous unités sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome. Par contre, en condition d'hypoxie, HIF1 α n'est pas ciblée pour la dégradation par le protéasome. Il peut donc se fixer sur le gène de l'Epo et ainsi permettre une augmentation de la synthèse d'ARN messager et donc d'Epo (Lacombe and Mayeux 1998).

L'érythropoïétine agit par liaison avec son récepteur (EpoR), qui appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type I (**Figure 9**) et dont le gène se trouve sur le chromosome 19 (19p13.3-p13.2).

EpoR est exprimé par les progéniteurs erythroïdes, à partir du stade CFU-E, mais aussi par les cellules endothéliales sur lesquelles l'Epo possède un effet proangiogénique en réponse à l'hypoxie en synergie avec le b-FGF et le VEGF (Ribatti, Presta et al. 1999; Zwezdaryk, Coffelt et al. 2007).

D'autres organes et types cellulaires non hématopoïétiques, comme le cerveau et les myocardiocytes, expriment l'EpoR dans des conditions physiologiques. Dans ce cas, l'Epo agit comme facteur de réponse au stress causé, par exemple, par l'hypoxie ou le glutamate qui est neurotoxique. L'Epo possède alors une action anti-apoptotique via l'activation de Bcl-xL (Jelkmann, Bohlius et al. 2008).





La tyrosine kinase JAK2 est impliquée dans la régulation de l'expression de l'EpoR à la surface des cellules en permettant à la forme non glycosylée (immature) présente dans le réticulum endoplasmique de passer dans l'appareil de Golgi afin d'y être glycosylée (forme mature) et conduire ainsi à son expression à la surface de la membrane plasmique (Huang, Constantinescu et al. 2001).

Seule une faible proportion des récepteurs à l'Epo sont présent à la surface des cellules, la majorité réside dans des pools intracellulaires (Yoshimura, D'Andrea et al. 1990) servant probablement à adapter la quantité de récepteurs présents à la surface de la cellule. La disponibilité du récepteur est donc modulée par la fixation de son ligand et son internalisation/recyclage (Becker, Schilling et al. 2010).

Le récepteur de l'Epo ne possède pas d'activité kinase intrinsèque, celle-ci lui est apportée par l'association avec JAK2 au niveau de la région Box1/Box2. Son activation conduit à sa dimérisation, puis à son activation. Cependant, le récepteur à l'Epo peut se trouver déjà à l'état dimérique, mais inactif, à la surface des cellules (Constantinescu, Keren et al. 2001), il est alors dans une conformation qui maintient les domaines cytoplasmiques éloignés (73 Å). La fixation de l'Epo induit alors un changement de conformation et le rapprochement de ces domaines à environ 39 Å de distance (Livnah, Stura et al. 1999), ce qui permettrait l' activation du récepteur *via* les JAKs qui y sont associées. Ce mécanisme serait également applicable au GHR, ainsi qu'à Mpl. La fixation de l'Epo induit donc une activation, et une phosphorylation de la tyrosine kinase JAK2 (Richmond, Chohan et al. 2005), qui va à son tour phosphoryler des tyrosines du domaine intracellulaire du récepteur, créant ainsi des sites de "docking" servant au recrutement des molécules de signalisation à domaine SH2 (sarcoma (src) homology) ou à motif PTB (phosphotyrosine binding) (Ihle 1995). Ces molécules, telles que les STATs (Signal Transducer and Activator of Transcription) 1, 3 et 5 a/b, la PI3K (PhosphoInositol-3-Kinase), AKT (cellular homologue of the v-akt oncogene ou protéine kinase B) et les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes.

D'autres molécules, impliquées dans la régulation de la signalisation cellulaire induite par la fixation du ligand, telles que les phosphatases SHP (Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase) 1 et 2 (Sharlow, Pacifici et al. 1997), SHIP1 et PTEN (Cantley and Neel 1999), peuvent également se fixer sur des sites spécifiques de EpoR. Cependant, alors que SHP2 semble avoir un rôle positif dans la stimulation de la prolifération, SHP1 présente une action inhibitrice sur le signal. En effet, la liaison de SHP1 sur la tyrosine 429 de l'EpoR induit une déphosphorylation de JAK2 (Lacombe and Mayeux 1998). Il en est de même pour les protéines de la famille des SOCS (Suppressors Of Cytokine Signalling) (Wormald and Hilton 2004), et notamment SOCS3 qui est capable de se lier à EpoR *via* son domaine SH2 et qui interagit également avec JAK2, dont elle inhibe l'activité kinase. Cette double interaction renforce l'effet négatif de SOCS3 sur la signalisation induite par l'Epo (Hookham, Elliott et al. 2007) (Figure 10).

Enfin, la fixation du ligand sur son récepteur conduit également à l'internalisation et à la destruction de celui-ci (Mellman and Warren 2000). Ces processus permettent de réguler le taux d'expression des récepteurs à la surface des cellules et donc constituent un moyen efficace de réguler l'érythropoïèse.

Comme décrit plus haut, le récepteur de l'érythropoïétine est aussi exprimé par les neurones, les cellules endothéliales et les myocardiocytes. Dans ce cas, l'érythropoïétine se comporte comme un facteur anti-apoptotique par activation de BclxL *via* la voie JAK2/STAT5, de plus STAT5 interagit avec la PI3K qui est requise pour la poursuite du cycle cellulaire (Jelkmann, Bohlius et al. 2008).



Figure 10 : Régulation des principales voies de signalisation induites par EpoR, d'après (Richmond, 2005)

2. Tpo/Mpl

L'existence de la thrombopoïétine (Tpo) a été évoquée pour la première fois en 1958. Elle doit son nom à son effet stimulant sur la mégacaryocytopoïèse ainsi que sur la production des plaquettes (Kelemen, Cserhati et al. 1958). En 1994 le gène codant pour la Tpo a été identifié et cloné ,de façon simultanée, par cinq groupes de recherche (Bartley, Bogenberger et al. 1994; de Sauvage, Hass et al. 1994; Kuter and Rosenberg 1994; Lok, Kaushansky et al. 1994; Kato, Ogami et al. 1995).

La Tpo, produite principalement par le foie, est le régulateur physiologique principal des stades précoces (Zeigler, de Sauvage et al. 1994), et des stades tardifs (Debili, Wendling et al. 1995) de la mégacaryocytopoïèse, depuis la formation des colonies de mégacaryocytes à la production des plaquettes.

Elle peut agir seule, ou en synergie avec d'autres cytokines telles que l'IL-6 l'association sert alors à protéger les progéniteurs CD34⁺ et les mégacaryocytes de l'apoptose via l'activation de Bcl-xL - l'IL-11, le leukemia inhibitory factor (LIF), le ciliary neurotrophic factor (CNTF) et l'oncostatine M (OSM) (Broudy, Lin et al. 1995). Elle peut également agir en synergie avec l'Epo pour stimuler l'érythropoïèse. De plus la présence de Tpo est nécessaire et suffisante pour obtenir une maturation complète des mégacaryocytes (Kaushansky, Broudy et al. 1995), et peut intervenir dans la prolifération des BFU-E, CFU-GM et des CFU-MK (Linden and Kaushansky 2000).

Enfin, la Tpo joue également un rôle dans la survie et la prolifération des CSHs *in vitro* (Kobayashi, Laver et al. 1996), et *in vivo* (Solar, Kerr et al. 1998). D'autres études mettent en avant le rôle de la Tpo dans la croissance et la survie des CSHs *via* l'augmentation de la production de VEGF en réponse l'activation de son principal facteur de transcription : HIF1 α . Ce mécanisme fait intervenir HoxB4 et HoxA9 (Kirito, Fox et al. 2005).

La Tpo est produite comme une protéine de 332 acides aminés, fortement glycosylée et composée de deux domaines distincts :

- Domaine N-terminal : domaine à activité biologique composé des résidus 1 à 152. Tout comme les autres cytokines de la familles des facteurs de croissances hématopoïétiques (notamment Epo et GH), il constitue le domaine de liaison à son
récepteur (Mpl), et est suffisant pour induire une signalisation et une prolifération cellulaire (Hunt 1995). On note une forte homologie avec l'Epo (22% de séquence identique et 24% de séquence similaires (Lok, Kaushansky et al. 1994)). Ce domaine contient également trois sites de (O)-glycosylation, sérine ou thréonine, mais est dépourvu de site de (N)-glycosylation (Hoffman, Andersen et al. 1996).

- Domaine C-terminal : également appelé domaine glycane, il est composé des résidus 153 à 332, c'est un domaine riche en sérine et en proline qui n'est pas retrouvé chez les autres cytokines hématopoïétiques. Ce domaine permet de nombreuses modifications post-traductionnelles sous forme de glycosylations. Les sites de glycosylation ont été déterminés expérimentalement pour les résidus 153 à 246 (quatre sites de (N)-glycosylation et cinq sites de (O)-glycosylation), et prédits pour les résidus 246 à 332 (deux sites supplémentaires pouvant porter une (N)-glycosylation et 16 résidus sérine et thréonine pouvant servir de site pour une (O)-glycosylation) (Harker, Marzec et al. 1996). Seule la forme (N)-glycosylée de la Tpo serait exprimée à la surface et participerait à la signalisation cellulaire (Kaushansky 2009).

Le récepteur de la thrombopoïétine (Mpl) appartient à la classe des récepteurs d' hématopoïétines de type I (Bazan 1990). Ce récepteur est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules de la lignée mégacaryocytaire ainsi que par les plaquettes. Il se situe sur le chromosome 1p34.

La fixation de la Tpo sur Mpl induit l'homo-dimérisation du récepteur et l'activation des kinases JAK2 et TYK2 qui y sont pré-associées, au niveau des sites Box1/Box2. JAK2 est indispensable à la signalisation *via* Mpl, ce qui n'est pas le cas de TYK2. JAK2 joue donc un rôle prédominant dans cette voie (Fishley and Alexander 2004). Une fois activée, JAK2 va s'auto-phosphoryler et phosphoryler Mpl. Le mécanisme d'activation du récepteur par son ligand, ainsi que les mécanismes de transduction du signal sont similaires à ceux du récepteur à l'Epo.

Plusieurs effecteurs et voies de signalisation vont alors être activés :

- La voie des MAPKs, qui est nécessaire à la maturation des progéniteurs mégacaryocytaires et à leur forte polyploïdie (Rojnuckarin, Drachman et al. 1999)

- La voie STAT3 et STAT5 impliquée dans la prolifération cellulaire et le développement des mégacaryocytes (Drachman, Sabath et al. 1997), mais également dans la survie cellulaire *via* l'activation de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-xL et Bcl-2 (Silva, Grillot et al. 1996)

- la phosphorylation d'AKT par la voie de la PI3K qui agit sur la survie et le contrôle du cycle cellulaire (Geddis, Fox et al. 2001; Miyakawa, Rojnuckarin et al. 2001)

- la voie de la PKC (Hong, Dumenil et al. 1998)

A l'instar de ces voies impliquées dans la différenciation, la prolifération ou encore la survie cellulaire, et afin d'éviter une prolifération anormale des cellules exprimant Mpl, d'autres mécanismes vont se mettre en place ayant pour objectif de réguler et de limiter la signalisation induite précédemment. Les protéines de la famille des SOCS (SOCS1 et SOCS3), activées par les STATs, vont intervenir en se liant directement au récepteur et aux JAKs (Wang, Miyakawa et al. 2000). Vont également intervenir des phosphatases, comme PTEN, et des protéines effectrices qui vont se lier, directement ou indirectement, à Mpl tels que FAK (Focal Adhesion Kinase) (Hitchcock, Fox et al. 2008), Lnk (Tong and Lodish 2004) et Lyn (Lannutti, Minear et al. 2006).

Toutefois, la régulation la plus efficace de la signalisation induite par Mpl est le contrôle de son expression à la membrane plasmique, et donc le contrôle de son internalisation, de son recyclage et de sa dégradation. Ce mécanisme semble être régulé par la protéine AP-2 (Adaptor Protein 2) (Collins, McCoy et al. 2002), grâce à un motif spécifiquement reconnu YRRL dans le domaine cytoplasmique du récepteur (Hitchcock, Chen et al. 2008). Il a aussi été montré que la tyrosine Y₅₉₁ était fortement impliquée dans le recyclage de TpoR, et notamment dans son acheminement jusqu'aux lysosomes après internalisation (Hitchcock, Chen et al. 2008). Deux sites potentiels d'ubiquitination ont également été proposés (K₅₅₃ et K₅₇₃), pouvant médier la dégradation du récepteur *via* le protéasome (Kaushansky 2009) et l'activation de Cbl, par la Tpo, qui agirait comme une ubiquitine E3 ligase (Saur, Sangkhae et al. 2010).

Enfin, le microARN miR-28 a été identifié comme un inhibiteur de l'expression de Mpl, ainsi que d'autres protéines importantes dans la différenciation des mégacaryocytes (E2F6 et ERK2), et pourrait donc jouer un rôle dans le développement de pathologies impliquant le récepteur Mpl (Girardot, Pecquet et al. 2010).

3. HGF/c-MET

L'HGF (Hepatocyte Growth Factor), également appelé SF (Scatter Factor), fait partie des cytokines de la famille des facteurs de croissance, c'est une protéine de 728 acides aminés produite sous forme d'un précurseur inactif à simple chaine. La forme biologiquement active est obtenue par clivage protéolytique et liaison des deux chaines, α et β , obtenues, par des ponts di-sulfure pour obtenir un hétérodimère fonctionnel (Nakamura, Nishizawa et al. 1989; Kataoka, Miyata et al. 2003) (**Figure 11**).

La chaine α se trouve en N-terminal et est suivie par quatre domaines Kringle. La chaine β quand à elle débute au niveau du résidu Val495 et est un homologue de la chymotrypsine, qui comme l'HGF est activée par un clivage protéolytique (Perona, Hedstrom et al. 1995; Hedstrom 2002). Cependant l'HGF ne possède pas d'activité protéolytique du fait de l'absence de résidus histidine et sérine indispensable à la formation de la triade catalytique caractéristique de cette famille de protéases à sérine (Lokker, Mark et al. 1992).

La comparaison de la forme hétérodimérique fonctionnelle de l'HGF avec sa forme immature à simple chaine, montre que les deux formes de l'HGF sont capables de se fixer à c-MET (le récepteur de l'HGF) avec la même affinité. Cependant, seule la forme mature est capable d'activer le récepteur et d'induire une signalisation cellulaire (Hartmann, Naldini et al. 1992; Lokker, Mark et al. 1992). De plus, il existe plusieurs formes tronquées de la chaine α , dénommées NK1, NK2 ou NK4 (en fonction du nombre de domaines Kringle consérvés), qui sont également capable de fixer c-MET, voir d'agir en tant qu'antagonistes de C-MET (Chan, Rubin et al. 1991; Cioce, Csaky et al. 1996; Date, Matsumoto et al. 1997).



Figure 11 : Représentation schématique (a) et 3D (b) de l'HGF, d'après (Birchmeir, 2003)

Le récepteur c-MET fait partie de la famille des récepteurs des facteurs de croissance. La partie extracellulaire est composée de trois domaines différents :

- Domaine Sema : il correspond aux 500 acides aminés en position Nterminale (homologie avec la famille des sémaphorine). le clivage d'une partie de ce domaine a lieu lors de la maturation du récepteur (Winberg, Noordermeer et al. 1998).

- Domaine PSI (ou domaine riche en cystéine) : il est constitué d'environ 50 résidus suivant le domaine Sema et contient quatre ponts di-sulfure. Ce type de domaine est également retrouvé dans les Plexines, les Sémaphorines et les Intégrines (PSI) (Bork, Doerks et al. 1999).

- Domaine IPT : ils sont au nombre de quatre, et permettent de relier le domaine PSI à l'hélice transmembranaire et donc également au domaine kinase intracellulaire du récepteur. Ce sont des domaines "immunoglobuline-like" retrouvés également dans la famille des Plexines et de certains facteurs de transcription (Ohta, Mizutani et al. 1995) (Figure 12).

c-MET est un récepteur de haute affinité pour son ligand, l'HGF (Jeffers, Rong et al. 1996). La fixation de l'HGF sur le domaine extracellulaire Sema de c-MET induit une dimérisation du récepteur et une activation de son activité tyrosine kinase intrinsèque (Kong-Beltran, Stamos et al. 2004; Stamos, Lazarus et al. 2004). De nombreux résidus sérine et tyrosine dans la partie intracellulaire du récepteur sont alors autophosphorylés, ce qui permet le recrutement d'autre molécules de signalisation (Ma, Tretiakova et al. 2007) (**Figure 13**).

Les dérégulations de la voie de signalisation HGF/c-MET, par surproduction d'HGF ou par la présence de mutations activatrices sur le récepteur c-MET, ont été rapportées dans différents cancers, notamment celui des poumons (Maulik, Shrikhande et al. 2002; Christensen, Burrows et al. 2005).



Figure 12 : Représentation schématique (a) et 3D (b) du récepteur c-MET, d'après (Birchmeir, 2003)





4. Cytokines de la famille de l'Il-6 et leurs récepteurs

On connait actuellement huit cytokines faisant parties de la famille de l'IL-6 : IL-6, IL-11, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), CNTF (Cillary NeuTrophic Factor), OSM (OncoStatin M), CT-1 (CardioTrophin 1), NNT-1/BSF3 (ou CLC Cardiotrophin-Like Cytokine)) et IL-27. On peut y ajouter deux homologues viraux de l'IL-6 : HHV-8 IL-6 (Human Herpes Virus 8) et Rm IL-6 (Rhesus macaque rhadinovirus) (Taga and Kishimoto 1997; Bravo and Heath 2000) (Figure 8).

Toutes ces cytokines ont la particularité de posséder une chaine réceptrice servant à la transduction de signal commune : la gp130. Dans la plupart des cas, l'affinité des cytokines pour cette chaine commune est relativement faible et nécessite leur préassociation avec un récepteur spécifique α pour former un complexe de haute affinité capable d'initier une cascade de signalisation intracellulaire. Ainsi, à l'exception des homologues viraux de l'IL-6 qui se fixent directement à la gp130, il existe un récepteur spécifique pour chaque cytokine de cette famille (**Figure 14**).



Figure 14 : Schéma des associations possibles avec la chaîne commune gp130, d'après (Wang, 2009)

Nous nous intéresserons ici uniquement aux interactions de la gp130 avec les complexes IL-6/IL-6R α et IL-11/IL-11R α .

a) La chaine commune gp130

La gp130 est une protéine ubiquitaire identifiée initialement comme la chaîne de transduction de signal du récepteur de l'IL-6. Le gène codant pour la gp130 se trouve sur le chromosome 5 (5q11). La transcription de la gp130 donne lieu à deux isoformes. L'isoforme 1 va donner la protéine complète. L'isoforme 2 est délétée d'une partie interne de la séquence codante résultant en une protéine dont les domaines C-terminal et N-terminal sont tronqués par rapport à ceux de la protéine traduite depuis l'isoforme 1. Cette seconde isoforme correspondrait, en fait, au pseudogène de la gp130, situé sur le chromosome 17 (17p11) (Rodriguez, Grosgeorge et al. 1995). Il existe également une forme soluble de la gp130. Cette forme est présente dans le sérum à l'état naturel. Elle est capable de s'associer à la forme soluble de l'IL-6R α , en présence d'IL-6, est joue alors un rôle antagoniste (Müller-Newen, Küster et al. 1998).

La partie extracellulaire de la gp130 se compose de six domaines à feuillets β , avec un domaine Immunoglobulin-like Ig (D1), un domaine CHR (D2+D3) et trois domaines fibronectin-like III (D4-D6) prenant ancrage dans la membrane plasmique (**Figure 15**). Les domaines CHR et Ig sont indispensables pour obtenir une activation complète du récepteur.



Figure 15 : Représentation de la chaîne commune gp130, d'après (Wang, 2009)

Comme nous venons de le voir, l'IL-6 et l'IL-11 doivent s'associer dans un premier temps à leur récepteur spécifique IL-6R α et IL-11R α (récepteurs ne pouvant initier de signalisation cellulaire), respectivement, puis former un complexe avec la gp130 pour pouvoir induire une signalisation intracellulaire. En effet, ces cytokines on en commun un site de fixation spécifique, site de fixation III au récepteur (au niveau du domaine Ig), nécessaire à l'activation de la gp130 (Kurth, Horsten et al. 1999; Boulanger, Chow et al. 2003). L'IL-6 et l'IL-11 s'associent de façon similaire avec leur récepteur spécifique α et la chaine gp130 pour former un complexe de signalisation fonctionnel hexamèrique (Skiniotis, Boulanger et al. 2005; Matadeen, Hon et al. 2007). Dans le cas précis de l'IL-6, il y a dans un premier temps fixation de l'IL-6R α grâce à un site de fixation I, cela entraîne la création d'une nouvelle interface (site de fixation II) qui permet le recrutement de la gp130 au niveau de son domaine CHR. Ce complexe trimèrique, qui possède également une nouvelle interface (site de fixation III), va alors s'associer à un autre complexe trimèrique IL-6/IL-6R α /gp130 *via* son site III pour former un complexe hexamèrique actif (**Figure 16**) (Boulanger, Chow et al. 2003).



Figure 16 : Formation du complexe de signalisation hexamèrique IL-6/IL-6Rα/gp130, d'après (Wang, 2009)

b) <u>*IL-6/IL-6Rα*</u>

L'IL-6 est une cytokine pléiotropique surexprimée en réponse à une blessure, une inflammation ou une infection (Scheller and Rose-John 2006). Elle a d'abord était identifiée comme un facteur, produit par les lymphocytes T, induisant la différenciation en plasmocytes des lymphocytes B activés, mais également celle des pré-ostéoclastes en ostéoclastes matures. Son ADN complémentaire a été cloné pour la première fois en 1986 (Hirano, Yasukawa et al. 1986). Il a ensuite été montré que l'IL-6, appelée alors BSF-2 ou encore IFN-β2, était une protéine de 185 résidus, contenant deux sites de glycosylation dans sa partie N-terminale et produite par de nombreux types cellulaires : lymphocytes B et T, monocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules synoviales (Nishimoto 2010) ; ainsi que les ostéoblastes, les macrophages et les BMMCs (Bone Marrow Mononuclear Cells).

Elle agit en synergie avec l'IL-3 dans le développement des mégacaryocytes et la production des plaquettes. L'IL-6 active la prolifération des cellules souches hématopoïétiques en stimulant leur entrée en phase G1.

Dans des conditions physiologiques, le taux sérique d'IL-6 est bas, voire non détectable. Cependant, la production de cette cytokine peut-être modifiée en fonction de plusieurs facteurs tels que la diète, l'exercice physique ou le stress (les muscles squelettiques et les tissus adipeux devenant des producteurs d'IL-6) (Pedersen and Febbraio 2008). Cependant, des taux élevés d'IL-6 sérique, accompagnés d'une élévation de la CRP (C Reactive Protein) de la phase aigüe, sont retrouvées dans la dépression, l'inflammation chronique et les maladies cardiaques (Howren, Lamkin et al. 2009).

Comme nous l'avons vu précédemment, pour induire une signalisation, l'IL-6 s'associe avec la gp130 après avoir formé un complexe avec son récepteur spécifique l'IL-6R α , également appelé gp80. Toutefois, à l'inverse de la gp130, l'IL-6R α n'est exprimé que par certaines cellules comme les lymphocytes B, les ostéoclastes, les macrophages et les CD34+ qui sont capables de répondre à l'Il-6 (Hilbert, Kopf et al. 1995).

L'IL-6R α existe également sous une forme soluble, sIL-6R de 55 kDa, produit par épissage alternatif ou par perte d'un fragment après clivage protéolytique de l'IL-6R α

INTRODUCTION

par des métalloprotéases telles que ADAM10 (A Desintegrin And Metalloproteinase 10) ou ADAM17, aussi appelée TACE (Tumor Necrosis factor- α -Converting Enzyme) (Holub, Szalai et al. 1999; Knupfer and Preiss 2008). Contrairement à la plupart des récepteurs solubles qui piègent leur ligand, et agissent donc comme des antagonistes, sIL-6R va stabiliser l'IL-6 et favoriser la formation du complexe de signalisation avec la gp130 (Peters, Meyer zum Buschenfelde et al. 1996). Cette trans-signalisation de l'IL-6 *via* sIl-6R permet aux cellules n'exprimant pas l'IL-6R α d'être sensibles à l'IL-6 (Rose-John, Scheller et al. 2006).

D'autre part, l'IL-6 peut activer différentes voies de signalisation intracellulaire par l'activation des kinases JAK1 et 2 et TYK2, préalablement liées au domaine cytoplasmique de la chaine gp130 (Heinrich, Behrmann et al. 2003). En réponse à cette activation, il ya phosphorylation des STATs, notamment STAT3, mais également activation de Ras, dont la translocation à la membrane plasmique va activer Raf, MEK et ERK1/2 (Hu, Shi et al. 2003). Une autre voie de signalisation activée est celle de la PI3K et de PKB/AKT (Zhang, Li et al. 2003; Jee, Chu et al. 2004).

La fixation de la protéine STAT3, après dimérisation et translocation dans le noyau, sur l'ADN va favoriser l'expression d'un grand nombre de gènes. C'est le cas de protéines impliquées dans la survie cellulaire comme la survivine, la XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis), Bcl-xL et Mcl-1; de protéines impliquées dans la survie cellulaire comme les cyclines et MYC; et de facteurs pro-angiogéniques comme HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) et MMP-2 et -9 (Matrix MetalloProteinase) (**Figure 17**).

L'IL-6 peut intervenir dans plusieurs voies de signalisations importante, ce qui contribue à son activité pro-tumorigénique, notamment par son action sur Cox-2 (Cyclooxygénase-2) qui augmente la production de PGE2 (Prostaglandin E2) qui augmente à son tour la production de RANK/RANKL (Liu, Kirschenbaum et al. 2005); Wnt qui favorise la différenciation des BMMCs en ostéoblastes et augmente la production de collagène par ces cellules (Hall and Keller 2006); TGF- β (Transforming Growth Factor- β) qui va agir en synergie avec l'IL-6 et favoriser la dégradation osseuse (Yamamoto, Matsuda et al. 2001) et NF κ B (Nuclear Factor κ B cells) (Lee, Herrmann et al. 2009) (**Figure 18**).









c) <u>*IL-11/IL-11Rα*</u>

L'interleukine 11 (IL-11) appartient aux cytokines de la famille IL-6. Elle a été isolée pour la première fois en 1990.

Le gène codant pour l'IL-11 est situé sur le chromosome 19 (19q13.3-q13.4). Il a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires que la production de son ARN messager était induite par l'IL-1 α et le PMA. La partie 3' du gène contient deux sites de polyadénylation qui vont former deux variants d'ARN messager de 2,5 et 1,5 Kb. L'IL-11, bien que dépourvue de résidus cystéine, présente une structure à quatre hélices alpha caractéristique de cette famille de cytokine (Du and Williams 1997).

L'interleukine-11 est une cytokine qui possède un large spectre d'actions sur différents types cellulaires. Elle a été initialement caractérisée par sa capacité à stimuler la thrombocytopoïèse. De façon générale, l'IL-11 est produite par les cellules stromales (Paul, Bennett et al. 1990). Cependant, il a été démontré qu'elle était exprimée et qu'elle agissait sur de nombreux types cellulaires, dont les pré-adipocytes, dont elle inhibe l'activité lipoprotéine lipase ; les hépatocytes ou elle stimule la production des protéines de la phase aigüe ; ou encore les neurones en régulant leur différenciation (Mehler, Rozental et al. 1993).

L'IL-11 seule, ne peut stimuler les progéniteurs hématopoïétiques précoces, cependant elle peut agir en synergie avec l'IL-3, l'IL-4, l'IL-12, l'IL-13, le SCF, le Flt3 ligand et le GM-CSF. Ainsi, elle joue un rôle à différents stades de la mégacaryocytopoïèse, stimule l'érythropoïèse, augmente la production d'immunoglobulines et favorise la différenciation des ostéoclastes (Girasole, Passeri et al. 1994; Cherel, Sorel et al. 1995). Elle exerce son action en stimulant l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et en diminuant la durée du cycle (Du and Williams 1997).

Nombre des activités biologiques de l'IL-11 sont également assurées par l'IL-6 (effets sur les progéniteurs hématopoïétiques, sur les mégacaryocytes, les lymphocytes B, les adipocytes ou encore les hépatocytes), ainsi que par le LIF, l'OSM et le CNTF. Cette redondance fonctionnelle est probablement due à la chaine de transduction de signal gp130, partagée par ces cytokines.

Le récepteur spécifique de l'IL-11 est l'IL-11R α dont le gène est situé sur le chromosome 9 (9p13). Il existe deux isoformes de l'IL-11R α qui différent au niveau de leur domaine cytoplasmique :

- L'IL-11R α 1, similaire à l'IL-6R α et à l'IL-11R α murin. Il possède un domaine cytoplasmique court.

- l'IL-11R α 2, est similaire au récepteur α du CNTF. Cette isoforme ne possède pas de domaine intracytoplasmique.

L'ARN messager de l'IL-11R α est exprimé par les tissus hématopoïétiques (moelle osseuse, rate et thymus) mais aussi le foie, le cerveau, le cœur, les reins, les muscles, les glandes salivaires et le tractus gastro-intestinal.

L'IL-11R α possède une homologie de séquence avec les chaînes alpha des récepteurs de l'IL-6 et du CNTF. La région extracellulaire de l'IL-11R α humain contient un domaine hématopoïétine ainsi que les motifs conservés propres aux récepteurs de type I.

Afin d'induire une signalisation cellulaire, l'IL-11 doit se fixer à son récepteur spécifique, puis former un complexe avec la chaine de transduction commune gp130 selon un mécanisme similaire à celui utilisé par l'IL-6.

La cascade de signalisation activée en aval du complexe commence avec l'activation de tyrosines kinases de la famille JAK, en particulier JAK1 mais aussi JAK2. La voie Ras/MAPK est également activée. Il a été démontré que JAK2 forme un complexe avec la protéine adaptatrice Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) et la gp130. Ce complexe permet le recrutement de SOS (son of sevenless) au niveau de la membrane plasmique, où Ras est localisée, et va permettre l'activation de Ras. En plus de la voie des MAPK, la gp130 peut activer la protéine ribosomale S6 kinase pp90rsk qui va activer un groupe de gènes communs codant pour les phosphatases qui vont inactiver les MAPK. La famille des kinases Src est également impliquée dans la signalisation induite par l'IL-11. En particulier la tyrosine kinase Fyn qui s'associe de façon transitoire avec JAK2 à la protéine Grb2, ceci suggère que l'activation de Ras par l'IL-11 est médiée partiellement par Fyn (Du and Williams 1997).

5. CXCL8 (IL-8)/ CXCR1 et 2

La famille des chimiokines est impliquée dans la régulation de l'inflammation grâce à des récepteurs couplés aux protéines G, fortement exprimés par les leucocytes. Elles jouent également un rôle dans l'adhésion des cellules endothéliales, la migration et l'activité cytotoxique de certains types cellulaires (Baggiolini, Dewald et al. 1997). Il existe quatre types de chimiokines (C, CC, CXC, and CX3C), selon le nombre et la position des résidus cystéines N-terminaux. De façon générale, la plupart des chimiokines peuvent activer plusieurs récepteurs, tout comme certains récepteurs à chimiokines peuvent être activés par plusieurs chimiokines (Murphy, Baggiolini et al. 2000).

L'interleukine 8 (IL-8), ou CXCL8, appartient à la famille des chimiokines à motif CXC. Elle se présente sous deux isoformes, souvent produites par un même type cellulaire (Hermouet, Corre et al. 2000) :

- $\alpha\colon$ composé de 77 résidus, principalement produit par les cellules endothéliales

- β : composé de 72 résidus, tronqué dans la partie N-terminale, principalement produit par les monocytes et les lymphocytes

Le gène codant pour l'interleukine 8 est situé sur le chromosome 4 (4q13-q21). Son promoteur contient des sites de fixation pour les facteurs de transcription NF κ B et AP-1, qui, sans être indispensables à l'initiation de la transcription, contribuent à l'expression maximale du gène. Le facteur de transcription AP-1 est activé par la voie des JNK kinases qui est essentielle à l'expression de l'IL-8 (Hoffmann, Dittrich-Breiholz et al. 2002). La voie des p38MAPK, également impliquée dans la régulation de l'expression de l'IL-8, sert à la stabilisation de son ARN messager (Holtmann, Enninga et al. 2001).

L'IL-8 est présente dans le sérum des sujets sains à de faibles taux (< 20 pg/ml). C'est un facteur majeur de la réponse inflammatoire aigue. Elle agit en tant que chimioattractant et activateur des neutrophiles (Denizot, Fixe et al. 1996).

Elle est produite, *in vitro*, par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules endothéliales (rôle de l'IL-8 dans l'angiogénèse sur des cellules exprimant les récepteurs CXCR1 et CXCR2 de

manière constitutive (Li, Dubey et al. 2002)), les kératinocytes, les lymphocytes T, les neutrophiles, les mastocytes ainsi que les monocytes et les macrophages, en particulier quand ces derniers sont activés. De plus, en condition normale, les cellules stromales de la moelle osseuse et les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ produisent de grandes quantités d'IL-8 (< 4 ng/ml) (Corre, Pineau et al. 1999).

L'IL-8 est capable d'inhiber la formation de BFU-E et de CFU-GM, probablement par interaction directe avec les progéniteurs hématopoïétiques humains (Broxmeyer, Cooper et al. 1996). L'IL-8 joue également un rôle dans l'hématopoïèse précoce en stimulant, de manière directe, la prolifération des progéniteurs CD34+ et en favorisant la différenciation vers la lignée monocytaire et la prolifération des monocytesmacrophages en synergie avec le G-CSF. Il a été mis en évidence l'existence d'une boucle de régulation autocrine/paracrine de l'IL-8 dans les progéniteurs CD34+, qui expriment de faibles quantités de récepteurs à l'IL-8 (CXCR2 principalement) (Corre, Pineau et al. 1999) et sont capables de produire de l'IL-8 en réponse à des cytokines hématopoïétiques.

L'IL-8 est capable d'activer deux récepteurs :

- CXCR1 : récepteur spécifique de l'IL-8

- CXCR2 : récepteur partagé par CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8 (Baggiolini 2000).

A noter qu'il existe un troisième récepteur dépourvu d'activité de transduction de signal exprimé uniquement par les cellules érythroïdes. Ce récepteur se lie au parasite du paludisme Plasmodium vivax, il pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la concentration d'IL-8 soluble (Hermouet, Corre et al. 2000).

Après fixation de leur ligand, ces deux récepteurs se couplent aux protéines G sensibles à la PTX (protéine pertussique) (protéine G_i et en particulier la protéine G_{i2}) et ils sont alors capables d'activer les voies des MAPK ERK1/2 et de la PLC, mais seul CXCR1 peut activer la phospholipase D. des rôles physiologiques différents peuvent donc être envisagés pour ces deux récepteurs. L'IL-8 induit également la voie de la PI3K, cette voie est importante dans la fonction chimio-attractante de l'IL-8.

Il a aussi été mis en évidence lors d'une étude sur le cancer de la prostate qu'en condition d'hypoxie, on observe une augmentation de l'expression de CXCR1 et CXCR2 en réponse à l'HIF1 α et à NF κ B (Maxwell, Gallagher et al. 2007).

Comme beaucoup de récepteurs couplés aux protéines G, CXCR1 et CXCR2, après activation, sont phosphorylés, puis internalisés. Cependant, on observe qu'après 2 à 5 minutes de stimulation par l'IL-8 plus de 95% du récepteur CXCR2 a été internalisé, contre seulement 10% pour CXCR1. De plus, après arrêt de la stimulation par l'IL-8, CXCR2 est ré-exprimé plus lentement à la surface des cellules (35% après 90 minutes) que CXCR1 (100% après 90 minutes). Cette différence dans le recyclage de ces deux récepteurs semble importante pour la capacité de chacun d'eux à médier l'activation des leucocytes ainsi que la régulation de la réponse à l'IL-8 (Nasser, Raghuwanshi et al. 2007).

CXCR1 et CXCR2 ont une forte homologie (77%), avec toutefois des différences au niveau de leur région N-terminale, de leur quatre domaines transmembranaire, de leur seconde boucle extracellulaire et de leur partie C-terminale (Holmes, Lee et al. 1991; Catusse, Liotard et al. 2003). Les deux récepteurs sont internalisés *via* le même mécanisme : phosphorylation/arrestine/dynamine ; cependant CXCR2 peut également être internalisé *via* un mécanisme de phosphorylation indépendant faisant appel à la protéine AP-2 (Adaptor Protéine 2) (Fan, Yang et al. 2001; Fan, Yang et al. 2001).



Figure 19 : Signalisation IL-8/CXCR1 et CXCR2 d'après (Hermouet, 2000)

C. Dérégulation des cytokines dans les SMP

Les cellules mononuclées de moelle osseuse, de patients atteints de PV et de TE, sont capables *in vitro* de produire des colonies en absence de sérum et de cytokines exogènes : colonies érythroïdes endogènes (CEE) et colonies mégacaryocytaires endogènes (CME). Cependant, les progéniteurs restent hypersensibles aux cytokines et semblent dépendre partiellement des cellules accessoires présentes dans la moelle osseuse (cellules du stroma, cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes...).

1. La Polyglobulie de Vaquez

Notre équipe a montré que des taux élevés d'IL-11 et d'IL-8 étaient présents dans le sérum, le plasma médullaire et le surnageant de cellules stromales de patients atteints de PV(Hermouet, Godard et al. 2002). L'IL-11 est connue pour stimuler l'érythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse. Dans une autre étude, le plasma et le sérum de patients atteints de SMP (PV, TE, MFP) ont été testés sur des membranes permettant la détection de nombreuses cytokines (Musolino, Calabro et al. 2002). Cette étude a mis en évidence une élévation du taux de VEGF dans le plasma et du b-FGF dans le sérum des patients atteints de SMP dont certains cas de PV. Le VEGF est relargué par les plaquettes dont le taux est généralement augmenté dans la PV ; il active les cellules endothéliales et est impliqué dans le risque de complications thrombotiques. Le b-FGF agit également sur les cellules endothéliales et le stroma. Le stroma activé par le b-FGF produits des inducteurs de l'angiogénèse comme b-FGF (action autocrine), l'IL-6 et l'IL-8.

Ainsi, les études déjà conduites sur la dérégulation des cytokines et son rôle dans la pathogénèse de la PV ont permis de mettre en évidence l'implication d'au moins quatre molécules : l'IL-11, l'IL-8, le VEGF et le b-FGF. Cependant, il est possible que d'autres cytokines soient dérégulées et impliquées dans la pathogénèse de la PV. En effet, l'hypersensibilité des progéniteurs aux cytokines et leur capacité à produire des CEE *in vitro* n'est que partiellement dépendante de l'IL-11 et de l'IL-8 (Corre-Buscail, Pineau et al. 2005).

2. La Thrombocytémie Essentielle

Les patients atteints de TE présentent un taux sérique de Tpo normal ou bas, et présentent un défaut de l'expression de Mpl (le récepteur de la Tpo) incluant la diminution du nombre de récepteurs à la surface et une hypersensibilité à la Tpo, soit à cause de la présence de la mutation JAK2V617F, soit à cause de la mutation MPLW515K/L, qui sont toutes deux des mutations activatrices induisant une auto-signalisation cellulaire.

Une étude publiée en 2002 a montré des taux plasmatiques élevés de VEGF dans la MFP, la PV et particulièrement dans la TE (Musolino, Calabro et al. 2002; Ho, Lasho et al. 2007). Le VEGF était le plus augmenté chez les patients présentant des complications vasculaires. Le taux sérique de VEGF était corrélé au chiffre de plaquettes dans la TE, et est donc associé au risque de complications thrombotiques. Le b-FGF a également été trouvé augmenté dans le sérum de la TE, la PV et la MFP, mais il ne corrèle pas avec le chiffre de plaquettes dans la TE.

Pour le moment, peu d'études ont été conduites dans le domaine de la dérégulation des cytokines dans les SMP et notamment dans la thrombocythémie essentielle. Cependant, il a été montré une hypersensibilité des progéniteurs mégacaryocytaires à l'IL-3 (Kobayashi, Teramura et al. 1993) et à la Tpo (Axelrad, Eskinazi et al. 2000). La surproduction sérique de sIL-6R par les monocytes pourrait également être impliquée dans la prolifération mégacaryocytaire observée chez les patients présentant une TE (Marta, Goette et al. 2004; Goette, Lev et al. 2010).

Les mécanismes cytokiniques impliqués dans cette pathologie restent encore à étudier.

3. La MyéloFibrose Primitive

C'est le syndrome myéloprolifératif dont le profil cytokinique a été le plus étudié. Une première étude publiée en 1992 (Le Bousse-Kerdiles, Souyri et al. 1992) s'appuie sur un modèle de MFP chez la souris induite par le virus MPSV (MyeloProliferative Sarcoma Virus). Cette étude a permis de mettre en évidence une augmentation d'IL-6, de G-CSF, d'IL-1 α et du M-CSF (= CSF-1) dans le sérum des souris ainsi que la production de TNF α par les cellules de la rate, le TNF α étant connu pour interférer avec les

cytokines de l'hématopoïèse précoce. Une autre étude (Le Bousse-Kerdiles, Chevillard et al. 1996) a montré que les progéniteurs CD34+ de patients atteints de MFP expriment moins de TGFßR II et au contraire surexpriment les récepteurs du b-FGF (b-FGFR I et II) et hyperproduisent le b-FGF; cette association d'évènements facilite l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques en stimulant leur survie et leur prolifération mais aussi en diminuant les signaux de régulation négatifs.

La production de PDGF est également augmentée dans les mégacaryocytes de patients MFP. Le PDGF est issu des mégacaryocytes, il est impliqué dans la prolifération des fibroblastes en collaboration avec le TGF^β et l'EGF également contenus dans les granules α des plaquettes. Le PDGF stimule également la production de collagène. Le TGFß1 est lui aussi hyperproduit par les cellules du sang périphérique de la lignée mégacaryocytaire de patients atteints de MFP, il appartient, avec le b-FGF, à une famille de polypeptides multifonctionnels impliqués dans la croissance et la différenciation et sont produits à la fois par les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales. Le TGFß1 régule négativement le cycle cellulaire des progéniteurs CD34+ ; et est également produit par ces cellules, son effet peut être abrogé par le b-FGF. Le TGFβ apparaît comme le facteur de croissance le plus puissant dans la régulation de l'activité des gènes de la matrice extracellulaire (MEC) : augmentation de différents types de collagène (I, III, IV, V). Le b-FGF, quant à lui, agit en synergie avec l'IL-3, le SCF, et le GM-CSF sur les progéniteurs précoces et aussi sur les progéniteurs engagés (Granulo-monocytiques, érythroïdes et mégacaryocytaires) en présence d'Epo. Le b-FGF n'est pas sécrété par les mégacaryocytes car sa sécrétion est sous le contrôle d'un peptide signal. Il est excrété par exocytose, blessure sévère ou lyse de la cellule, or dans la MFP, les mégacaryocytes sont dysplasiques et nécrotiques.

Le VEGF est également augmenté dans le plasma de patients MFP. Il est aussi produit par les mégacaryocytes, sa production est régulée positivement par le PDGF, le b-FGF et le TGFβ (Le Bousse-Kerdiles and Martyre 2001; Musolino, Calabro et al. 2002; Ho, Lasho et al. 2007).

Dans la myélofibrose primitive, il semblerait qu'une cascade d'évènements induisant la dérégulation de la production de cytokines pro-fibrotiques par les mégacaryocytes (VEGF, bFGF, TGF β , PDGF) soit impliquée dans le développement de la fibrose médullaire.

De plus, il a été mis en évidence un taux sérique élevé d'IL-8 chez les patients atteints de MFP. Cette élévation serait due en partie par une production accrue d'IL-8 par les plaquettes. Les progéniteurs CD34+, les cellules de la lignée granulo-monocytaire et les mégacaryocytes de patients produisent des taux d'IL-8 proches de ceux des cellules de sujets sains. Cependant, leur nombre élevé dans la MFP pourrait également contribuer à l'élévation du taux sérique d'IL-8. Dans la MFP, l'IL-8 serait impliquée dans la migration des progéniteurs CD34+ vers la rate et le foie. L'IL-8 jouerait aussi un rôle dans la maturation anormale des mégacaryocytes de patients MFP car en présence d'un anticorps dirigé contre ses récepteurs, la ploïdie des mégacaryocytes est restaurée. L'IL-8 étant également produite par les cellules endothéliales et les fibroblastes, son rôle potentiel dans la néoangiogénèse et la fibrose ne peut être exclu (Emadi, Clay et al. 2005).

IV. Importance des tyrosines kinases JAKs

A. Description (fonction, schéma et modèle)

La tyrosine kinase JAK2, et ses formes mutées, est impliquée dans la pathogénèse des SMP. JAK2 fait partie de la famille des JAnus Kinases (JAK) qui fut découverte en 1989, JAK signifiait alors "Just Another Kinase". Le nom de Janus Kinases (Wilks, Harpur et al. 1991; Wilks 2008) vient de celui du dieu romain "Janus" veillant sur les ouvertures, les commencements et les fins et que Saturne doua d'une rare prudence, qui rendait le passé et l'avenir toujours présents à ses yeux, ce qui fut exprimé en le représentant avec deux visages tournés en sens contraires. Ceci faisant référence aux deux domaines "kinase-like" que possèdent les JAK.

La famille des JAK compte 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, localisés sur les chromosomes 1p31.3, 9p24, 19p13.1 et 19p13.2, respectivement (pour note : les gènes murins codant pour JAK1, JAK2 et JAK3 se trouvent sur les chromosomes 4, 19 et 8, respectivement). Leur expression est quasi-ubiquitaire, sauf pour JAK3 qui est essentiellement exprimé dans les lymphocytes.

Leur implication dans plusieurs types de cancers humain a été démontrée : LAL-T, LAM, cancer du sein et du poumon pour JAK1 ; cancer du sein, de l'estomac et les leucémies aigües mégacaryoblastiques pour JAK3 ; et SMP et LAL associées à une trisomie 21 pour JAK2. Cependant, seules les mutations de JAK2 dans les SMP et de JAK1 dans la LAL-T sont fréquentes (Tefferi 2009).

Les JAKs ont un poids moléculaire qui varie de 120 à 140 KDa et sont constituées de sept parties JH (Jak Homology), définissant 4 domaines (Figure 20):

1 - **Domaine kinase** (JH1 : partie C-terminale) : il s'agit du domaine à activité catalytique (tyrosine kinase).

2 - **Domaine pseudo-kinase** JH2 : domaine dont la fonction n'est pas encore clairement explicitée, mais qui servirait à réguler l'activité du domaine JH1 en exerçant une auto-inhibition.

3 - **Domaine SH2-like** (JH3 et une partie du JH4) : la fonction de ce domaine n'est pas connue, cependant, et par analogie avec les protéines STATs, il pourrait servir à la dimérisation des JAKs en se liant à des phospho-tyrosines.

4 - **Domaine FERM** (4.1; Protéine Ezrin; Radixin; Moesin) une partie du JH4, JH5, JH6 et JH7 (partie N-terminale), impliqué dans la liaison aux récepteurs à cytokines au niveau de leur domaine Box1/Box2 riche en proline (Schindler, Levy et al. 2007).



Figure 20 : Représentation schématique des 7 domaines JH des JAKs

B. Principale voie de signalisation

Dans la famille des JAKs :

TYK2 est couplée aux récepteurs des IFN de classe I, ainsi qu'aux récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6/IL-10/IL-12 et de l'IL-23.

Pour sa part, JAK1 est couplée aux récepteurs des IFN de classe I (IFN- α/β), de classe II (IFN- γ) et aux récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-6.

JAK3 s'associe spécifiquement avec la chaîne réceptrice γc de l'IL-2. Il s'agit d'une chaîne commune à plusieurs récepteurs à cytokines lymphotrophiques, telles que l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21.

En ce qui concerne JAK2, elle est couplée aux récepteurs de la famille de l'IL-3 (IL-3R, IL-5R et GM-CSFR) et aux récepteurs à simple chaîne (EpoR, TpoR, GHR et PrIR) (Kisseleva, Bhattacharya et al. 2002; O'Shea, Gadina et al. 2002; Levy and Shoham 2005).

Les JAKs sont constitutivement associées à ces récepteurs, cependant une augmentation du taux de cytokines fixées sur leur récepteur peut en augmenter le recrutement. Les mécanismes permettant ce recrutement ne sont pas encore élucidés.

Les tyrosines kinases de cette famille sont donc couplées à des récepteurs à cytokines de Type I et jouent un rôle essentiel dans la signalisation cytokinique

principalement via l'activation des facteurs de transcription STAT (Signal Transducers & Activator of Transcription), on parle alors des voies de signalisation JAK-STAT.

La voie JAK/STAT est une voie de signalisation extrêmement rapide, permettant de transduire le signal reçu à la membrane directement au noyau.

Il existe sept facteurs de transcription de la famille des STATs connus à ce jour : Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b et Stat6. Leur taille est comprise entre 750 et 900 acides aminée environ; au niveau génétique ils forment des clusters sur les chromosomes, notamment Stat5a et Stat5b sur le chromosome 17 (Lin, Mietz et al. 1996). Dans les cellules au repos, les STATs se trouvent principalement dans le cytoplasme, alors qu'après activation, par des cytokines par exemples, on les retrouve en grande quantité dans le noyau après seulement quelques minutes d'incubation (Mertens, Zhong et al. 2006). Il existe des spécificités d'activation des STATs par les JAKs, en réponse à certaines cytokines ou interférons (**Tableau 2**).

Type I Cytokines	Jaks	STATS
Cytokines whose receptors share γ_c		
IL-2, IL-7, IL-9, IL-15	Jak1, Jak3	Stat5a, Stat5b, Stat3
IL-4	Jak1, Jak3	Stat6
IL-13*	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat6
Cytokines whose receptors share β_c		
IL-3, IL-5, GM-CSF	Jak2	Stat5a, Stat5b
Cytokines whose receptors share gp130		
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	Jak1, Jak2, Tyk2	Stat3
IL-12 ⁺	Jak2, Tyk2	Stat4
Leptin ⁺		Stat3
Cytokines with homodimeric receptors		
Growth hormone	Jak2	Stat5a, Stat5b, Stat3
Prolactin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Erythropoietin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Thrombopoietin	Jak2	Stat5a, Stat5b
Type II Cytokines		
Interferons		
IFN α , IFN β	Jak1, Tyk2	Stat1, Stat2
IFNγ	Jak1, Jak2	Stat1
IL-10 [‡]	Jak1, Tyk2	Stat3

*IL-13 does not share γ_c but uses IL-4R α .

+IL-12 and leptin do not share gp130, but their receptors are related to gp130.

[‡]IL-10 is not an interferon, but its receptor is a type II cytokine receptor.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des JAKs et STATs activées par certaines cytokines, d'après (Levy, 2005) Ils présentent plusieurs domaines conservés (**Figure 21**) dont un domaine SH2 (généralement situé entre les résidus 600 et 700) permettant l'arrimage aux récepteurs.



Figure 21 : Structure des STATs

Les STATs présentent six caractéristiques principales :

- Fixation à des tyrosines phosphorylées
- Sont eux même phosphorylables sur une tyrosine (voir une sérine)
- Hétéro- ou Homo-dimérisables (en fonction des STATs)
- Translocables dans le noyau
- Fixation à l'ADN
- Modulation de l'expression des gènes

Ces six caractéristiques permettent de faire ressortir un schéma principal d'activation.

Dans un premier temps, il y a fixation d'un ligand (cytokine) sur son récepteur, cela induit la phosphorylation et l'activation de la protéine JAK associée à ce récepteur.

La protéine JAK activée va à son tour phosphoryler le récepteur et créer ainsi un site de "docking" permettant la fixation d'une protéine Stat spécifique via son site SH2. La protéine Stat devient alors le nouveau substrat de la tyrosine kinase JAK activée et se trouve donc phosphorylée puis relâchée dans le milieu cellulaire.

Le domaine SH2 d'une Stat va alors fixer la phospho-tyrosine d'une autre Stat (et inversement) pour former une homo- ou un hétéro-dimère antiparallèle capable de se transloquer dans le noyau et de moduler l'expression d'un gène cible par reconnaissance d'une séquence de régulation de la famille des GAS ou des ISRE (Schindler, Levy et al. 2007) (Figure 22).



Figure 22 : Schéma général d'activation, et d'action, des STATs par les récepteurs aux cytokines, d'après (Leonard, 2008)

La régulation de l'activation de la voie JAK/STAT peut se faire par plusieurs mécanismes impliquant des phosphatases (Haspel, Salditt-Georgieff et al. 1996; Shuai, Liao et al. 1996) ou des pertes de la phosphorylation des JAKs et des STATs de façon plus générale, des dégradations par le protéasome (Kim and Maniatis 1996; Azam, Lee et al. 1997), ou encore par une baisse de l'expression des récepteurs à la surface, tout comme de la dissociation des JAKs de leur récepteur (Murray 2007). Des mécanismes plus classiques de régulation négative par les protéines de la famille des CIS/SOCS/JAB/SSSI, qui antagonisent directement l'activation des STATs, ont également été montré (Aman and Leonard 1997; Alexander and Hilton 2004). D'autres molécules peuvent aussi jouer le rôle d'inhibiteur compétitif pour le site de fixation des STATs, ce mécanisme a été mis en évidence uniquement pour Stat6 (Dent, Shaffer et al. 1997).

Un autre mode de régulation important est l'import/export nucléaire des STATs. A l'état basal, il existe une balance entre l'import nucléaire et l'export nucléaire des STATs régulé par des séquences de localisation nucléaire (NLS) et des séquences d'export nucléaire (NES), respectivement. Lors d'une activation, cytokinique par exemple, cette balance est en faveur d'une accumulation nucléaire des STATs, alors qu'en phase de déclin du signal cette balance penche vers un export nucléaire de ces facteurs de transcription. La régulation de cette balance revêt alors un enjeu majeur pour le contrôle de la durée et de l'intensité de la réponse cellulaire à une stimulation (Bhattacharya and Schindler 2003; McBride and Reich 2003; Vinkemeier 2004).

Enfin, il a récemment été montré que JAK2 pouvait être retrouvée dans le noyau et agir sur la phosphorylation de l'histone H3Y41 dans les cellules hématopoïétiques (Dawson, Bannister et al. 2009). Ceci ouvre de nouvelles perspectives quand au fonctionnement de cette cascade de signalisation.

Le rôle des JAKs dans la maturation et le recyclage des récepteurs de type I est lui aussi discuté (Huang, Constantinescu et al. 2001; Bonifacino 2002; He, Wang et al. 2003; Pelletier, Gingras et al. 2006). Même si leur implication n'est pas remise en question, il semblerait que les mécanismes gouvernant les interactions/régulations entre les récepteurs et les JAKs soient à déterminer au cas par cas (Tong, Sulahian et al. 2006).

D'autres investigations sont donc nécessaires pour comprendre les mécanismes de cette voie de signalisation, de la maturation des récepteurs à leur association avec les JAKs, en passant par la transduction du signal et sa régulation.

V.Génétique des SMP

La PV, la TE et la MFP ont une présentation clinique différente, cependant ces trois pathologies ont en commun la présence d'anomalies génétiques conduisant à une myéloprolifération clonale. Dans les cinq dernières années, notamment grâce à l'utilisation de techniques de plus en plus performantes, nombre d'anomalies génétiques ont été découvertes, nous permettant de mieux comprendre les causes moléculaires de la diversité des SMP.

Ces données nous permettent de construire un modèle pathogénétique qui évolue au grès des nouvelles découvertes (**Figure 23**). Certaines de ces anomalies peuvent être congénitales, comme l'haplotype 46/1. D'autres sont acquises et peuvent survenir avant, ou après, la mutation JAK2V617F, c'est le cas des mutations TET2, des del5q et del20q. Le paragraphe qui suit n'est pas exhaustif, seules certaines de ces anomalies seront présentées.



Figure 23 : Proposition de modèle pathogénétique pour les SMP

A. La mutation JAK2V617F

La mutation V617F, découverte en 2005 (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005; Zhao, Xing et al. 2005), est retrouvée dans environ 95% des cas de PV, 60% des TE et 50% des MFP (**Figure 24**). Il s'agit de la mutation la plus fréquemment retrouvée dans les SMP.

Située dans l'exon 14 du gène codant pour la tyrosine kinase JAK2, elle résulte d'une mutation G>T de la base 1849 faisant partie du codon 617, et induit un changement d'acide aminé, d'une valine (V) pour une phénylalanine (F).



Figure 24 : Localisation de la mutation V617F dans la protéine JAK2

Cette mutation se situe dans le domaine pseudo-kinase (JH2) de la protéine. Elle aurait pour effet une levée de l'auto-inhibition du domaine pseudo-kinase sur le domaine kinase (JH1), ce qui résulte en une auto-activation de la protéine JAK2. On observe une hypersensibilité, voire une indépendance, aux cytokines des clones mutés, due à une activation constitutive des voies de signalisations JAK-STAT et donc à une dérégulation des grandes fonctions cellulaires comme la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire.

Excepté dans la PV, ou elle est retrouvée majoritairement au stade homozygote, la mutation V617F est principalement retrouvée sous forme hétérozygote. La perte d'hétérozygotie se faisant par recombinaison homologue du chromosome 9p (**Figure 25**).



Figure 25 : Représentation de la recombinaison homologue du chromosome 9p conduisant à l'homozygotie pour la mutation V617F de JAK2, d'après (Kralovics, 2005)

Bien que présente dans la majorité des SMP, JAK2V617F ne semble pas en être l'évènement initiateur, mais plutôt un évènement secondaire reflétant un sous clone particulier, et dont la présence est due à une instabilité, ou à une prédisposition, génétique plus générale.

D'autres possibilités de mutation de la valine en position 617 de JAK2 ont été testées par mutagénèse dirigée. Les mutants V617W, V617M, V617I, et V617L permettent d'obtenir une indépendance aux cytokines et une activation constitutive des voies de signalisation JAK-STAT, mais seul le mutant V617W induit une activation comparable à celle de V617F (Dusa, Staerk et al. 2008). Cependant, la mutation V617F semble rester la "meilleure" mutation possible, car après avoir testé toutes les possibilités, il ressort que la seule mutation permettant une activation comparable à celle de V617F soit V617W, qui nécessite la mutation de trois bases et qui a donc peu de chance d'être retrouvée chez un patient. Toutefois, ces mutants peuvent nous aider à comprendre les mécanismes d'activation de la protéine JAK2.

B. Les mutations de JAK2 autres que V617F

La quasi-totalité des patients PV (95%) sont porteurs de la mutation V617F, des chercheurs se sont donc intéressés aux 5% de patients négatif pour V617F. ils ont ainsi identifié de nouvelles mutations de JAK2 portées par l'exon 12 du gène (Scott, Tong et al. 2007). D'autres études ont ensuite montré que ces mutations de l'exon 12 étaient retrouvées chez environ la moitié des patients PV négatifs pour V617F.

Les mutations de l'exon 12 de JAK2 sont variées : délétions, insertions, mutations ponctuelles ou encore duplications. Elles sont généralement associées avec une érythrocytose et des taux de leucocytes et de plaquettes normaux, et sont retrouvées très majoritairement chez des patients PV. Des mutations différentes sur un même gène peuvent donc induire des différences phénotypiques.

De nouvelles mutations de JAK2 ont également été trouvées dans l'exon 14 du gène. Ces mutations peuvent être seule ou associées avec la mutation V617F.

On compte aujourd'hui une vingtaine de mutations de JAK2 autres que V617F, elles sont majoritairement retrouvées dans la PV et restent relativement rares (Yoo, Park et al. 2009).

La recherche de ces mutations peut donc permettre de montrer le caractère clonal des cellules chez les patients négatifs pour V617F.

C. L'haplotype 46/1

Egalement appelé "GGCC", en référence aux quatre bases de cet haplotype faisant parties du gène JAK2, l'haplotype 46/1 a été récemment caractérisé comme prédisposant à la mutation JAK2V617F sur le même allèle (Jones, Chase et al. 2009; Kilpivaara, Mukherjee et al. 2009; Olcaydu, Harutyunyan et al. 2009).

Des études ultérieures ont montré que cet haplotype était associé avec des mutations de l'exon 12 de JAK2 (Olcaydu, Skoda et al. 2009), une prédisposition au développement d'une TE indépendamment de JAK2V617F (Pardanani, Lasho et al. 2010), et aux mutations de Mpl dans la TE ou la MFP (Jones, Campbell et al. 2010).

D. Les mutations de MPL

Les mutations du gène MPL sont rares, elles apparaissent essentiellement dans les SMP et induisent une activation constitutive de la voie JAK/STAT. On les retrouves en général chez les patients négatifs pour la mutation V617F de JAK2.

MPLW515L est la mutation la plus courante de MPL. Découverte en 2006 (Pikman, Lee et al. 2006), elle est retrouvée dans la TE et la MFP. Par la suite, d'autres mutations acquises ont été identifiées comme MPLW515K, MPLW515S et MPLS505N. Cette dernière mutation est également retrouvée dans des cas de thrombocytoses familiales associées à une splénomégalie, une myélofibrose et une augmentation du risque de thrombose (Teofili, Giona et al. 2010). Environ 8 à 10% des patients MFP présentent une mutation du codon 515 de l'exon 10 de MPL (W515L/K)

On peut également retrouver les mutations de MPL à l'état homozygote chez certains patients. Un mécanisme de recombinaison homologue du chromosome 1p, similaire à décrit pour le chromosome 9p et la mutation V617F, a été récemment rapporté (Szpurka, Gondek et al. 2009).

E. Autres anomalies génétiques et conséquences dans les SMP

1. TET2

TET2 "Ten Eleven Translocation 2" fais parti d'une famille de trois protéines homologues. Son gène est situé sur le chromosome 4q24. La fonction précise de TET2 n'est pas connue, mais par analogie avec une récente étude faite sur TET1, elle pourrait influer sur la conversion des 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine, et donc affecter la régulation épigénétique de l'expression de certains gènes (Tahiliani, Koh et al. 2009).

Les mutations de TET2, décrites récemment (Delhommeau, Dupont et al. 2009), sont très variées et réparties sur la majeure partie de la séquence du gène. Elles sont trouvées chez environ 16% des patients PV, 5% des patients TE et 17% des patients MFP, qu'ils soient positifs, ou négatifs, pour la mutation V617F. Ces mutations peuvent survenir avant, ou après, l'apparition de mutation de JAK2 (sur l'exon 12 ou sur l'exon 14), ou dans un progéniteur distinct, conduisant ainsi à la coexistence de plusieurs clones (Beer, Delhommeau et al. 2010; Schaub, Looser et al. 2010).

2. IKAROS

IKZF1 (IKAROS Zinc Finger 1), dont le gène est situé sur le chromosome 7p12, est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de l'expression de gènes spécifiques de lignées *via* un mécanisme de remodelage de la chromatine. Il existe de nombreux transcrits de ce gène, obtenus par épissage alternatif.

Les mutations d'IKZF1, ou l'augmentation de la production d'isoformes dominantes négatives, sont retrouvées dans la LLA et la LLA BCR-ABL1 positive, suggérant un rôle du facteur de transcription dans la transformation leucémique (Mullighan, Miller et al. 2008).

La délétion d'IKZF1 est un événement tardif dans l'évolution clonale des progéniteurs myéloïdes, apparaissant après l'acquisition de la mutation V617F de JAK2 et la del13q. Cette délétion est supposée favoriser une instabilité chromosomique et la transformation leucémique des progéniteurs myéloïdes touchés. La délétion d'IKZF1 est retrouvée dans 21% des cas de LAM post-SMP. IKZF1 pourrait également agir en activant la voie JAK/STAT et contribuer à une transformation leucémique JAK2V617F dépendante (Jager, Gisslinger et al. 2010).

3. CBL

Le gène codant pour CBL, situé sur le chromosome 11q23.3, code pour une protéine cytosolique possédant deux fonctions. La première est de réguler négativement la signalisation induite par les kinases, grâce à une activité ubiquitine E3 ligase. La seconde est une fonction de protéine adaptatrice favorisant la transduction de signal (Swaminathan and Tsygankov 2006).

CBL joue un rôle important dans le recyclage des récepteurs tels que Mpl (Saur, Sangkhae et al. 2010), c-Kit et FLT3, fonction qui n'est plus assurée en présence de mutants CBL (Sargin, Choudhary et al. 2007; Bandi, Brandts et al. 2009).

Les mutations de CBL dans les pathologies myéloïdes sont souvent associées à une perte d'hétérozygotie du chromosome 11q, ce qui fut identifié dans la LAM (Sanada, Suzuki et al. 2009). Cependant, les mutations de CBL sont peu retrouvées dans les SMP ou elles pourraient jouer un rôle dans la MFP, ou les MF post-PV/TE, voire dans la transformation leucémique (Grand, Hidalgo-Curtis et al. 2009).

Projet de Recherche

Les syndromes MyéloProlifératifs (SMP) regroupent 3 maladies clonales, présentant une accumulation de cellules myéloïdes matures, avec prédominance de la lignée érythrocytaire dans la Polyglobulie de Vaquez (PV), de la lignée mégacaryocytaire dans la Thrombocytémie Essentielle (TE) et une fibrose ostéo-médullaire dans la MyéloFibrose Primitive (MFP). Les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs myéloïdes précoces sont anormaux, hypersensibles, voire indépendants, des cytokines pour leur survie, leur différenciation ou leur prolifération.

Depuis la découverte, en 2005, de la mutation V617F portée par l'exon 14 du gène JAK2 (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005; Zhao, Xing et al. 2005), de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de la pathogénèse des SMP. Plusieurs des ces avancées sont dues à l'intérêt qu'a suscité cette découverte, tant au niveau de la caractérisation génétique des patients porteurs d'un SMP, qu'au niveau des répercussions de cette mutation dans la régulation de la signalisation cellulaire, et au niveau de l'environnement cytokinique et son contrôle.

La mutation JAK2V617F est retrouvée chez la grande majorité des patients présentant un SMP (>95% des cas de PV et >50% des cas de TE et de MFP) à l'état hétérozygote ou homozygote. La perte d'hétérozygotie, qui se produit par recombinaison homologue du chromosome 9p, est principalement retrouvée dans la PV (majorité des cas de PV) et la MFP.

Plusieurs techniques ont alors été développées afin de connaitre la charge allélique en mutation V617F et de caractériser les patients négatifs pour JAK2V617F (qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), pyroséquençage, HRM (High Resolution Melting curve analysis), et SCA (Single Colony Assay)).

De nouvelles mutations de JAK2 ont été ainsi découvertes, portées par l'exon 12 du gène, et retrouvées chez environ la moitié des patients PV négatifs pour la mutation V617F (Scott, Tong et al. 2007). D'autres investigations ont permis de montrer la présence de mutations dans le gène codant pour le récepteur Mpl (W515L et W515K), chez une faible proportion de patients présentant une TE ou une MFP, et qui étaient en majorité négatif pour la mutation V617F de JAK2.

PROJET DE RECHERCHE

La protéine JAK2 est une tyrosine kinase couplée à beaucoup de récepteurs aux cytokines et joue un rôle important dans leur maturation, leur localisation cellulaire et leur recyclage. A l'exception de quelques mutations silencieuses, toutes les mutations de JAK2 décrites sont activatrices et induisent une activation constitutive, plus ou moins importante, des voies de signalisations impliquant JAK2 ou les récepteurs qui y sont associés. C'est le cas de voies impliquées dans la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire telles que JAK2-STAT5, JAK2-STAT3, la voie des MAP kinases et la voie Pi3K/AKT.

Malgré ces avancées, plusieurs questions importantes restaient en suspend au début de mon doctorat, fin 2007. Comment une seule mutation (JAK2V617F) peut conduire à l'apparition de trois maladies aux phénotypes très différents ? JAK2V617F est-elle l'événement primaire, un événement précoce ou tardif ? Quel(s) événement(s) précède(nt) ou indui(sent)t la mutation JAK2V617F, ou les autres anomalies génétiques détectées dans les SMP ? Quels sont leurs rôles dans le développement de ces pathologies ?

Suite à un cas de patient PV possédant un taux de JAK2V617F très bas, nous avons recherché et trouvé chez ce patient d'autres mutations de JAK2. Ensuite, nous avons étudié des patients PV négatifs pour la mutation JAK2V617F, ou avec un taux de mutant inférieur à 25%, et présentant un phénotype typique des patients porteurs de mutations de l'exon 12 de JAK2. Pour mieux comprendre le rôle des mutations de JAK2 dans la PV, nous avons commencé à caractériser ces nouveaux mutants de JAK2 identifiés.

Ensuite, parce qu'il existe un lien très étroit entre JAK2 et certains récepteurs cytokiniques, notamment EpoR et Mpl. Nous avons décidé d'étudier l'expression de Mpl en fonction des diverses formes de JAK2 (EpoR étant peu, ou pas exprimé dans la PV). En effet, plusieurs études montrent que JAK2 joue un rôle dans la maturation des récepteurs, leur export à la membrane, leur recyclage et leur destruction. Dans les SMP, les plaquettes montrent fréquemment une baisse, voire une absence, d'expression de Mpl, qui est considérée comme une conséquence de la présence de la mutation V617F. Ces données nous ont incitées à analyser le taux d'expression de JAK2, muté ou non, en relation avec le taux d'expression Mpl, toujours dans le but de comprendre l'implication de JAK2 dans la pathogénèse des SMP.

Par ailleurs, de très nombreuses études ont démontré la dérégulation de la production des cytokines hématopoïétiques dans les SMP. JAK2 joue un rôle central dans la signalisation induite par certaines de ces cytokines, et une étude réalisée dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence une augmentation de la production d'IL-11 et d'IL-8 dans le sérum, le plasma médullaire et les surnageants de culture de cellules stromales de patients atteints de PV (Hermouet, Godard et al. 2002). Ces cytokines étant liées à l'inflammation, nous avons donc recherché de manière systématique (cytokine arrays) d'autres cytokines et molécules liées à l'inflammation dont l'expression pourrait être dérégulée dans la PV. Puis nous nous sommes intéressés au rôle de JAK2 dans la régulation, ou la dérégulation, de la production de ces cytokines.

Enfin, au cours de mes travaux des réponses ont commencé à être apportées sur la génétique des SMP, notamment par la découverte de l'haplotype 46/1 (Olcaydu, Harutyunyan et al. 2009) prédisposant aux mutations de JAK2, mais aussi par l'étude des voies de signalisation en amont et en aval de JAK2. Ainsi, les mutations de JAK2 pourraient être les conséquences d'une instabilité génétique ou d'un environnement cellulaire dérégulé. Nous nous sommes donc aussi intéressés au rôle que pouvaient avoir les différentes formes, mutées ou non, de JAK2 dans la signalisation cellulaire, le phénotype des patients, la maturation et le recyclage de récepteurs liés à JAK2, et l'environnement cytokinique des cellules.
Résultats

Résultats, Partie I :

"Mutation de JAK2 et phénotype : une double mutation en cis L611V/V617F de JAK2 est associée avec une érythrocytose pure et une activation accrue d'AKT et ERK1/2, mais pas de STAT5"

(Cleyrat et al., Leukemia 2010)

A. Présentation

La Polyglobulie de Vaquez (PV) est un syndrome myéloprolifératif (SMP) caractérisé par la présence de la mutation activatrice V617F, dans l'exon 14 du gène JAK2, dans plus de 95% des cas. Parmi les patients négatifs pour JAK2V617F, la moitié sont retrouvés positif pour d'autres mutations de JAK2 portées par l'exon 12 du gène. Ces patients ont une présentation clinique différente de ceux porteurs de la mutation V617F, le plus souvent une érythrocytose pure.

Deux cas de patients PV présentant plusieurs sous-clones porteurs de la mutation V617F ou d'une mutation de l'exon 12 de JAK2, de même que des patients positifs pour la mutation V617F et porteurs de mutations additionnelles de l'exon 14 de JAK2 (V615L, C616Y, C618R, D620E) ont été rapportés.

Nous avons donc recherché de nouvelles mutations de JAK2 chez plusieurs patients PV présentant au moment du diagnostic un taux de JAK2V617F négatif ou bas (<25%).

Différentes mutations peuvent avoir différents effets sur l'activité de JAK2 et donc peuvent également influencer la survenue de plusieurs sous-clones ou encore le phénotype des patients. Pour mieux comprendre le rôle des mutations de JAK2 dans la PV, nous avons commencé à caractériser les nouveaux mutants de JAK2 identifiés chez ces patients.

B. Publication

PI3K/AKT pathway, respectively. Inhibitors of *RAS*-processing enzymes and agents that interfere with the activation of downstream effectors such as *MEK* have already been evaluated. Our data point to the possibility that these new drugs provide a potential to increase the cure rate in *CBFB–MYH11*-positive AML, which may be evaluated in prospective clinical trials.

In conclusion, *CBFB–MYH11* rearrangements are accompanied in more than 90% of cases by alterations leading to an activation of the *RAS* pathway because of mutations within the *RAS* genes (*KRAS*, *NRAS*) themselves or alterations in genes regulating *RAS* (*FLT3*, *KIT*, *CBL*, *NF1*). *NF1* was identified by SNP arrays as a new target gene in AML with *CBFB–MYH11* and was found to be deleted in 16% of cases in our cohort. These data underline that alterations of the *RAS* pathway have an important role in *CBFB–MYH11*-positive AML pathogenesis and furthermore may explain the favorable response to HDAC. New treatment approaches for *CBFB–MYH11*-positive AML patients with drugs also targeting the *RAS* pathway should be considered in future clinical trials, as the majority of patients with *CBFB–MYH11*positive AML might benefit from such targeted approach.

Conflict of interest

CH, WK, SuS and TH are equity owners of the Munich Leukemia Laboratory, and FD, AK, SoS and TW are employed by the Munich Leukemia Laboratory.

Acknowledgements

We thank all clinicians for sending AML samples to our laboratory for diagnostic purposes and for providing clinical information and follow-up data. In addition, the authors thank all co-workers at the MLL—Munich Leukemia Laboratory for approaching together many aspects in the field of leukemia diagnostics and research.

Letters to the Editor

Especially the technical assistance of Annika Eßer who performed FISH analyses is greatly appreciated.

C Haferlach, F Dicker, A Kohlmann, S Schindela, T Weiss, W Kern, S Schnittger and T Haferlach MLL Munich Leukemia Laboratory, Munich, Germany E-mail: claudia.haferlach@mll-online.com

References

- 1 Castilla LH, Perrat P, Martinez NJ, Landrette SF, Keys R, Oikemus S et al. Identification of genes that synergize with Cbfb-MYH11 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 4924–4929.
- 2 Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; **107**: 3847–3853.
- 3 Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrozek K, Chen H, Kittles RA et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. J Clin Oncol 2006; 24: 3904–3911.
- 4 Abbas S, Rotmans G, Lowenberg B, Valk PJ. Exon 8 splice site mutations in the gene encoding the E3-ligase CBL are associated with core binding factor acute myeloid leukemias. *Haematologica* 2008; **93**: **1**595–1597.
- 5 Cutts BA, Sjogren AK, Andersson KM, Wahlstrom AM, Karlsson C, Swolin B et al. Nf1 deficiency cooperates with oncogenic K-RAS to induce acute myeloid leukemia in mice. *Blood* 2009; 114: 3629–3632.
- Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol* 2002; **39**: 6–11.
 Bullinger L, Rucker FG, Kurz S, Du J, Scholl C, Sander S *et al.*
- 7 Bullinger L, Rucker FG, Kurz S, Du J, Scholl C, Sander S et al. Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 1291–1300.
- 8 Neubauer A, Maharry K, Mrozek K, Thiede C, Marcucci G, Paschka P *et al.* Patients with acute myeloid leukemia and RAS mutations benefit most from postremission high-dose cytarabine: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 4603–4609.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (http://www.nature.com/leu)

JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F *in cis* mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5

Leukemia (2010) **24**, 1069–1073; doi:10.1038/leu.2010.23; published online 25 February 2010

Polycythemia vera (PV), a myeloproliferative neoplasm (MPN), is characterized by the presence of a mutated, activated form of the tyrosine kinase JAK2.¹ In 95% of cases, PV patients present the V617F mutation in exon 14 (JAK2–V617F) and half of V617F-negative PV patients carry mutations or deletions in exon 12.² Both types of mutations result in activation of JAK2 and STAT5. Recently the 46/1 (or 'GGCC') haplotype of chromosome 9p was found associated with a pre-disposition to JAK2 mutations in the same allele. As this haplotype is relatively frequent, unrecognized mutations of JAK2 may not be rare. Indeed healthy donors were reported positive for JAK2 V617F using nested PCR assays, and the repeated occurrence of the V617F mutation of JAK2 has been demonstrated in

essential thrombocythemia (ET) and in PV.³⁻⁵ In addition, in 2 PV patients, JAK2-V617F and mutations in exon 12 of JAK2 co-existed in separate sub-clones originating from a single progenitor in one case, or from unrelated hematopoietic stem cells in the other case.^{6,7} V617F-positive PV patients with additional mutation(s) in exon 14 of JAK2 (V615L, C616Y, C618R and D620E) are also evidence of multiple JAK2 mutations.⁸ As different JAK2 mutants may have different JAK2 activity, the JAK2 mutational status may influence subclone outcome and affect disease phenotype.

To address this question, we studied 3 PV patients found to be carriers of a new mutation in exon 14 of JAK2, leucine 611 changed for a valine (L611V) present *in cis* with V617F, that resulted in the double JAK2-L611V/V617F mutant. DNA and RNA extracted from purified granulocytes, platelets, CD3 + T-lymphocytes and colonies were analyzed using allele-specific quantitative PCR assays (AS-qPCRs), pyrosequencing and

Leukemia



npg

1070

Letters to the Editor

Table 1 Clinical and biological characteristics of the three PV patients with the double JAK2- L611V/V617F mutation

	Na249	Na382	Di362
Sex Age (years)	Female 86	Female 22 (58)ª	Female 71
Blood cell counts Leukocytes (\times 10 ⁹ /l) Hemoglobin (g/dl) Hematocrit (%) Platelets (\times 10 ⁹ /l)	6.6 20.1 62.1 209	9.5 (5.7) ^a 21.0 (15.8) ^a 64.0 (50.0) ^a 106 (131) ^a	10.0 19.6 61.7 159
Red cell mass (ml/kg) (%) Palpable splenomegaly Serum Epo (IU/I)	39 (189%) No 4.8	No data No (no) ^a No data	45.5 (178%) No 1.8
Endogenous colony assay (at the time of diagnosis) EEC (colonies/10 ⁵ cells) EMC (colonies/10 ⁵ cells)	Negative O O	Positive ^a 1 0	Positive 17 0
Single JAK2-V617F mutant alleles At the time of diagnosis During treatment with pipobroman During treatment with hydroxyurea After 21 months After 28 months	2% — 0% 0%	Not done 0% 	0%
Double JAK2-L611V/V617F mutant alleles At the time of diagnosis Granulocyte gDNA Platelet cDNA Lymphocyte gDNA During treatment with pipobroman ^a 16 months after interruption of pipobroman Granulocyte gDNA (cDNA) Platelet cDNA Lymphocyte gDNA 24 months after interruption of pipobroman	19% 0% 0% 	Not done Not done Not done 5% 27% (28%) 14% 0% 26%	28% Not done Not done
33 months after interruption of pipobroman During treatment with hydroxyurea After 21 months After 28 months	 0.8% 0.9%	27% 	

Abbreviations: EEC, endogenous erythroid colonies; EMC, endogenous megakaryocytic colonies.

For all three patients, the biological and clinical information presented above were collected at the time of diagnosis.

^aFor patient Na382, biological and clinical information was available after 36 years of disease evolution, when the patient was receiving treatment with pipobroman and phebotomies. Single V617F-mutated alleles, found solely in patient Na249, were identified by the sense V617F AS-qPCR assay and confirmed by pyrosequencing of cloned PCR products. Double L611V/V617F-mutated alleles were identified by sense L611V and antisense V617F AS-qPCR assays, by pyrosequencing of granulocyte DNA and cloned PCR products, and by sequencing of granulocyte DNA and cloned PCR products.

conventional sequencing.^{9–11} The primers and probes used are listed in Supplementary Table 1. With informed consent, DNA samples from 10 healthy donors, 199 control patients with idiopathic erythrocytosis (n=22), secondary erythrocytosis (n=148) or splanchnic vein thrombosis (n=29), and 465 patients diagnosed following the 2002 WHO criteria with PV (n=168), ET (n=271) or primary myelofibrosis (n=26) were analyzed, as were DNA from 31 archival samples from MPN transformed into acute myeloid leukemia.

We first investigated the case of patient Na249, who presented with criteria of PV (Table 1) but only 2% JAK2-V617F in granulocyte DNA using a sense V617F AS-qPCR assay.⁹ Verification of the mutational burden using pyrosequencing detected 20% JAK2-V617F.¹⁰ Cloning and sequencing analysis of exon 14 of JAK2 revealed an additional mutation of base 1831 (1831T>G), changing leucine 611 for a valine (L611V) (Figure 1a). Reasoning that the additional mutation DNA amplification, we re-analyzed granulocyte gDNA from

Leukemia

patient Na249 using a second V617F AS-qPCR assay that used anti-sense primers (Supplementary Figure 1) and now found 19% JAK2-V617F. Cloning of PCR products in a sequencing plasmid and pyrosequencing of plasmid DNA from hundreds of bacterial clones established that L611V occurred *in cis* with V617F. The existence of double, L611V/V617F mutant alleles was confirmed by conventional sequencing of selected plasmid clones.

Pyrosequencing and AS-qPCR assays specific for L611V were designed and DNA samples from the 465 MPN and 209 control patients were screened (Supplementary Table 2). Blasts from 31 transformed MPN were also tested. L611V was detected in 2 (1.8%) PV patients, Na382 and Di362, considered V617F-negative. Using the anti-sense V617F AS-qPCR assay, they were both found positive (27 and 28% V617F, respectively). Sequencing of cloned alleles confirmed that L611V also occurred *in cis* with V617F for these patients. No other mutation was detected using sequencing and high-resolution melting curve analysis of exons 12 and 14 of JAK2.

npg

1071

Letters to the Editor

The predominance of L611V/V617F alleles in granulocytes was confirmed by pyrosequencing of ≥ 100 clones per patient: Na249: 15%; Na382: 23%; and Di362: 26%.¹⁰ It is interesting to note that single mutant alleles were also found, representing 0.9% of alleles for V617F (4/429 of cloned PCR products from genomic DNA). These results were consistent with the 2% V617F alleles detected in granulocyte DNA of patient Na249 by the sense V617F AS-qPCR assay, which covers the sequence coding for L611 and is thus unable to amplify double mutated alleles. Altogether, this indicated the co-existence of two separate clones, one carrying JAK2-V617F singly, the other carrying the double JAK2-L611V/V617F mutation. Of note, a

low (1.5–3%) representation of V617F alleles had been reported in 1 PV patient with additional JAK2 mutations in exon 12.⁶ Hence the presence of JAK2-V617F does not ensure clone expansion, implying that other factors intervene in the expansion of JAK2-mutated progenitors: perhaps a defective bone marrow micro-environment, abnormal cytokine stimulation or the congenital or acquired genetic background. Regarding the latter, patients Na382 and Di362 were found positive, each in a heterozygous manner, for the rs12343867 polymorphism of JAK2 intron 14 characteristic of the 46/1 haplotype associated with a pre-disposition to JAK2 mutations. L611V/V617F and rs12343867 were on the same allele in 13/13 (Na382) and



Figure 1 For caption see next page.

Letters to the Editor

1072

10/10 (Di362) clones sequenced (Supplementary Figure 1). Yet patient Na249 (with three JAK2 mutations) was negative for the 46/1 haplotype.

It is interesting to note that at the time of diagnosis the presentation of JAK2-L611V/V617F patients (Table 1) was similar to those of most patients with JAK2 exon 12 mutations.² The 3 female patients showed a high hematocrit (>61.5%), normal leukocyte counts and normal or low platelet counts and no splenomegaly; 2/3 patients had endogenous erythroid colonies. JAK2-L611V/V617F was present at the time of diagnosis for patients Na249 and Di362; for patient Na382, it was discovered after interruption of pipobroman. The two JAK2 mutations were acquired, as the blood lymphocytes were wild-type.

Pyrosequencing and AS-qPCR analysis found similar proportions (15-28%) of L611V/V617F alleles in granulocyte DNA from the 3 patients. However, in platelet cDNA, studied for 2 patients, L611V/V617F alleles were either absent or reduced by half compared with granulocyte cDNA. Among erythroid colonies, only 0-30% carried L611V/V617F, always in a heterozygous fashion, the rest being wild type (Figure 1b). Thus for L611V/V617F patients, hematopoiesis remained predominantly 'wild-type JAK2'. Clonal cells with the double L611V/ V617F mutation were sensitive to cytoreductive treatment, even after three decades of evolution (Na382). Patient Na249 responded to hydroxyurea with almost complete disappearance of JAK2-mutated alleles (<1% in granulocyte DNA after 21 months of treatment). Conversely, 16 months after interruption of pipobroman treatment of patient Na382, the L611V/V617F allelic ratio was raised from 5 to 27%, remaining stable after 33 months.

The effects of L611V, V617F and double L611V/V617F mutations on the function of JAK2 were analyzed using transient transfection of murine BaF-3/EpoR cells, which depend on

erythropoietin (Epo) for their growth. Immunoblotting analysis (Figure 1c) confirmed the tyrosine phosphorylation of JAK2, STAT5, AKT and ERK1/2 in response to Epo, and the activation of JAK2 by V617F, as assessed by the constitutive tyrosine phosphorylation of JAK2 and increased phosphorylation of JAK2, STAT5 and AKT in response to Epo, compared with JAK2-WT. The single JAK2-L611V mutant showed tyrosine phosphorylation of STAT5 and AKT similar to JAK2-WT; phosphorylation of JAK2 and ERK1/2 in response to Epo was low. The double L611V/V617F mutant revealed greater constitutive and Epo-stimulated phosphorylation of JAK2, AKT and ERK1/2, compared with both wild-type JAK2 and JAK2-V617F, but low activation of STAT5.

In summary, subsets of PV patients with or without the 46/1 haplotype may present several sub-clones carrying different mutations of JAK2, unrecognized unless sensitive assays with sense and anti-sense primers are used. The presence of JAK2 mutations, functionally silent or activating, does not ensure clone expansion. Certain activating mutations may alter JAK2 function differently than V617F and may be associated with a distinct disease phenotype. The double L611V/V617F mutation increased the activation of JAK2, AKT and ERK1/2 but not STAT5 and was found associated with isolated erythrocytosis.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We are indebted to colleagues of the Clinical Hematology Departments of the University Hospitals of Nantes and Dijon for providing patient samples; to Dr Radek Skoda (Basel, Switzerland)

-

Figure 1 Characterization of the double L611V/V617F mutation of JAK2.(a) Localization and configuration in cis of the L611V and V617F mutations in exon 14 of JAK2. Exon 14 of JAK2 was amplified by PCR from patient genomic DNA using iProof HF master mix (Biorad, Hercules, CA, USA). PCR products were cloned in the pCR4 sequencing vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and transformed in TOP10 bacteria (Invitrogen). Individual bacterial colonies were picked and grown overnight at 37 °C in 96 well plates with ampicillin (100 µg ml⁻¹) medium, without shaking. A total of 2 µl of bacterial cultures were used as template for PCR with primers JAK200F and JAK200Rbio (see Supplementary Table 1 for sequences). After PCR the biotinylated strand was captured on streptavidin sepharose beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) Table 1 for sequences). After PCR the biotinylated strand was captured on streptavidin sepharose beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and annealed with a pyrosequencing primer JAK1831S. Pyrosequencing was carried out using PSQ HS 96 Gold SNP Reagents and the PSQ HS 96 pyrosequencing machine (Qiagen, Valencia, CA, USA).¹⁰ Mutational status at nucleotides 1831 T > G and 1849 G > T was analyzed by the pyrosequencing PSQ HS 96A1.2 software. In selected clones, plasmid DNA was purified and the pyrosequencing results were confirmed by sequencing at the MD Anderson Cancer Center DNA Core Facility using ABI Big Dye terminator cycle chemistry. (b) Proportion of JAK2-mutated erythroid colonies grown from blood progenitors of PV patients carrying the double JAK2-L611V/V617F mutation. Colony assays were carried out in methylcellulose-based media (H4531, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) using frozen peripheral blood mononuclear cell (PBMC), plated at 50 000 per ml. Cultures were incubated at 37 °C without erythropoietin (Epo) for 7 days to obtain Epo-independent erythroid colonies is a constrained by 14 after a selection of the EEC without erythropoietin colonies is for DNA and the DNA and the the EEC without erythropoietin (Epo) for 7 days to obtain Epo-independent erythroid to be the selection of the terms of a were incubated at 37 °C without erythropoietin (Epo) for 7 days to obtain Epo-independent erythroid to be the selection of the selection o colonies (EEC). Between days 7 and 10, Epo was added to the EEC cultures to obtain colonies of sufficient size for DNA analysis. At day 14, after the identification of colonies under microscope, erythroid colonies were picked one by one and analyzed by allele-specific quantitative PCR assays (AS-qPCR) following DNA extraction. All JAK2-mutated colonies, representing 12% (Na249), 30% (Na382) and 0% (Di362) of the colonies, were heterozygous for the double L611V/V617F mutation. GRA%mut: % of JAK2-L611V/V617F-mutated alleles in granulocyte genomic DNA. Nbr: number of single erythroid colonies analyzed for each patient. (c) Transient expression and functional analysis of the L611V, V617F and L611V/ V617F mutant forms of JAK2 in BaF-3/Epo-R cells. Plasmids pCR2.1 containing the cDNA of JAK2-WT and (gift from Dr Jan Cools) and JAK2-V617F served as matrices for L611V- and L611V/V617F-directed mutagenesis. PCRs were carried out with the relevant L611 or V611 primers (see Supplementary Table 1) using Pfu Ultra DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Mutagenesis was checked by sequencing then another Pfu PCR was performed to extract JAK2 cDNAs (WT, L611V, V617F and L611V/V617F). Purified PCR products were cloned into expression vector pcDNA3.1. For functional analyses, 10⁷ murine BaF-3/Epo-R cells grown in RPMI with 2% fetal calf serum (FCS) and 11U ml⁻¹ Epo were transfected with 25 μ g of pcDNA3.1 containing JAK2-WT and mutant cDNA using the Amaxa Nucleofector device. After transfection, cells were grown in RPMI medium supplemented with 2% FCS and 11U ml⁻¹ Epo for 24 h. Transfected cells were then washed, deprived of Epo for 5 h, then stimulated with Epo (25 IU ml⁻¹) for 10 min at 37 °C. Cells were then harvested, washed twice in PBS and lysed in RIPA buffer. Successful mRNA expression of single and double JAK2 mutant cDNAs was verified using RT-qPCR in aliquots of transfected cells. For intra-cellular signalling studies, 25 μ g of proteins were loaded on a 10% polyacrylamide SDS-PACE and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes were incubated with antibodies specific for p-JAK2, p-STAT5, p-ERK1/2 and p-AKT (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) or β-actin (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), then stripped and re-probed with antibodies specific for total JÄK2 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), STAT5 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), ERK1/2 and AKT (Cell Signalling, Danvers, MA, USA). Blots were revealed using the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche, Mannheim, Germany). Results shown are representative of four series of transient transfections (For Figure see previous page).

Leukemia

Letters to the Editor

for murine BaF-3/Epo-R cells and JAK2-V617F cDNA; to Dr Serge Carillo for JAK2 exon 12 mutation analysis; to Dr Isabelle Corre for expert advice; and to Mrs Danielle Pineau for excellent technical help. The study was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Loire-Atlantique, Comité du Morbihan, Comité d'Ille-et-Vilaine) and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). CC and MB benefited from scholarships from the French Ministry of Research.

C Cleyrat¹, J Jelinek², F Girodon³, M Boissinot¹, T Ponge⁴, J-L Harousseau⁵, J-P Issa² and S Hermouet^{1,6} ¹INSERM UMR 892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers (CRCNA), Institut de Recherche Thérapeutique-Université de Nantes (IRT-UN), Nantes, France;

²Department of Leukemia, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA; ³Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU), Dijon, France;

⁴Service de Médecine Interne, CHU, Nantes, France; ⁵Department of Leukemia, The University of Texas M D Anderson Cancer Center, Houston, USA and ⁶Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, CHU, Nantes, France E-mail: sylvie.hermouet@chu-nantes.fr

References

- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144–1148.
- 2 Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med 2007; 356: 459–468.

- 3 Sidon P, El Housni H, Dessars B, Heimann P. The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia* 2006; 20: 1622.
- 4 Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F et al. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the pre-disposing mutations for JAK2-V617F. Blood 2009; 113: 2022–2027.
- 5 Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE. In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutantpositive patients: a new disease paradigm. *Blood* 2009; 114: 3018–3023.
- 6 Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* 2008; 111: 3863–3866.
- 7 Beer PA, Jones AV, Bench AJ, Goday-Fernandez A, Boyd EM, Vaghela KJ et al. Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. Br J Haematol 2009; 144: 904–908.
- 8 Yoo JH, Park TS, Maeng HY, Sun YK, Kim YA, Kie JH et al. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 189: 43–47.
- 9 Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2006; 108: 1865–1867.
- 10 Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, Bueso-Ramos C, Prchal JT, Verstovsek S et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosomenegative CMI, and megakaryocytic leukemia. Blood 2005; 106: 3370–3373.
- 11 Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Dos Santos F *et al.* Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2 V617F-positive patients within the first years of hydroxurea therapy. *Haematologica* 2008; **93**: 1723–1727.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (http://www.nature.com/leu)

The anti-apoptotic gene BCL2A1 is a novel transcriptional target of PU.1

Leukemia (2010) **24.** 1073–1076; doi:10.1038/leu.2010.26; published online 4 March 2010

The transcription factor *PU.1* is a key player in myeloid and B-cell development as evidenced by *PU.1* knockout mouse models. PU.1 is necessary for the generation and function of macrophages and granulocytes through the regulation of essential myeloid genes such as the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSFR), the macrophage CSF (M-CSF), the granulocyte CSF (G-CSF), CD11b, myeloper-oxidase, lysozyme, neutrophil elastase, CD45, and others.^{1–3}

Anti-apoptotic Bcl2 proteins are frequently overexpressed during tumorigenesis⁴ and three of them are expressed in myeloid cells: *BCL2A1* (also designated as *A1* or *BFL-1*) and Mcl-1 in neutrophils, whereas *BCL2A1* and *Bcl-x_L* can both be upregulated in macrophages by proinflammatory stimuli *in vitro*. Sevilla *et al.*⁵ reported that *PU.1* together with another Ets-family member, *Ets2*, transactivate the *Bcl-x_L* promoter and increase macrophage survival. Hamasaki *et al.*⁶ have shown that *BCL2A1* deficiency accelerates spontaneous neutrophil apoptosis. Furthermore, it was reported that PU.1 is a direct target of caspase-3, an apoptosis executor, upon treatment of leukemic cells with DNA-damaging agents.⁷ In line, it was found that PU.1 induces cell death in a subset of myeloma cell lines by direct activation of TRAIL.⁸ Thus, Ets-family members and PU.1 directly and indirectly regulate cell death pathways.

To identify additional PU.1-regulated genes involved in cell survival, we profiled gene expression patterns of PU.1 restored 503 PU.1-null cells. We identified the anti-apoptotic BCL-2 family protein, BCL2A1, as PU.1-regulated gene. Several known PU.1 target genes, for example neutrophil collagenase, CD45, myeloperoxidase, lysozyme, and F4/80 were highly upregulated in the PU.1 rescued 503 cell line thus confirming successful restoration of PU.1 (Supplementary Table 1). To validate PU.1dependent BCL2A1 upregulation, we knocked down PU.1 in NB4, HT93, and HL60 neutrophil differentiation models. To accomplish this goal, lentiviral vectors were used for stable expression of two different PU.1 short hairpin (sh) RNAs, both of which significantly reduced BCL2A1 mRNA levels in untreated control cells and upon all-trans retinoic acid (ATRA) treatment as compared with the corresponding SHC002 control cells (Figure 1; Supplementary Figures 1a-c, left panels). PU.1 knockdown efficiency was confirmed by quantitative RT-PCR and/or by western blotting (Figure 1; Supplementary Figures 1a-c,

Leukemia



Supplementary Figure 1: Sense and anti-sense JAK2-V617(F), JAK2-L611(V) and rs12343867 allele-specific quantitative PCR (AS-qPCR) assays.

A



В





Legend to Supplementary Figure 1: Sense and anti-sense JAK2-V617(F), JAK2-L611(V) and rs12343867 allele-specific quantitative PCR (AS-qPCR) assays.

A) Sense and anti-sense JAK2-V617(F), JAK2-L611(V) assays. "Sense" and "antisense" AS-qPCR assays, using sense forward or anti-sense reverse primers specific for V617(F), were performed as described earlier (9-11). The L611V mutation was analyzed using sense forward primers specific for L611 or V611 and the same common probe and reverse primer as for the sense V617F AS-qPCR assays. DNA preparations of pCR4-TOPO-TA (Invitrogen) constructs containing relevant amplicons were used as copy number standards. Results were expressed as mean numbers of copies of WT and mutant JAK2 and as the percentage of total JAK2 represented by mutant JAK2. The ASqPCR assays thus developed were specific, reproducible and highly sensitive, detecting 0.5% of V617F or L611V mixed with WT JAK2.

B) Analysis of the rs12343867 polymorphism of intron 14 of JAK2. An AS-qPCR assay using a common forward primer specific for WT; WT and rs12343867 reverse primers; and a common probe, was designed to characterize patients as WT or heterozygous for the rs12343867 polymorphism used to detect the 46/1 or "GGCC" haplotype of chromosome 9p (cf. Olcaydu et al. Nat Genet 2009; 41: 450-454). To determine whether the double mutation L611V/V617F was in *cis* with the rs12343867 polymorphism, we used a PCR assay with forward primers specific for JAK2-L611V/V617F or JAK2-WT, and a common reverse primer down-stream of rs12343867. PCR products thus obtained were cloned into the sequencing vector pCR4-TOPO-TA. DNA from cloned PCR products was genotyped using AS-qPCRs specific for rs12343867; presence of the L611V and V617F mutations was verified by conventional sequencing using T3 and T7 universal sequencing primers (Invitrogen). Sequences of all primers and probes can be found in Supplementary Table 1.

Supplementary Table 1: Sequences of the primers and probes used for the various V617F, L611V, V617F and rs12343867 AS-qPCR assays, conventional sequencing, pyrosequencing, mutagenesis and cloning.

	Primer sequence (5'→3')				
JAK2 AS-qPCR primers/probes (exon 14)					
Forward JAK2-V617 sense	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGT <u>G</u>				
Forward JAK2-F617 sense	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGT <u>T</u>				
Forward JAK2-L611 sense	CGGCGTTTCTCACAAGCATTTGGTT <u>T</u>				
Forward JAK2-V611 sense	CGGCGTTTCTCACAAGCATTTGGTT <u>G</u>				
Reverse JAK2-V617(F)/L611(V) sense	GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC				
Probe 1 JAK2-V617(F)/L611(V) sense	TGGAGACGAGAGTAAGTAAAACTACAGGCT				
Reverse anti- JAK2-V617 sense	CCCGTTACTCTCGTCTCCACAGA C				
Reverse JAK2-F617 anti-sense	GCCGTTACTCTCGTCTCCACAGA <u>A</u>				
Forward JAK2-V617(F) anti-sense	GCGCGTGCATCTTTATTATGGCAGA				
Probe 2 JAK2-V617(F) anti-sense	GAGAAAGCTTGCTCATCATACTTGCTGC				
Mutagenesis primers (human JAK2)					
Forward L611V mutagenesis	CACAAGCATTTGGTT <u>G</u> TAAATTATGGAGTATG				
Reverse L611V mutagenesis	CATACTCCATTATTTA <u>C</u> AACCAAATGCTTGTG				
Sequencing p	rimers (JAK2 exon 14)				
Forward exon 14 sequencing	GCGCGTGCATCTTTATTATGGCAGA				
Reverse exon 14 sequencing	GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC				
Pyrosequencing	primers (JAK2 exon 14)				
JAK14-249F	TGGACAACAGTCAAACAACAA				
JAK14-229R	CTGACACCTAGCTGTGATCCTG				
JAK200F	GCAGAGAGAATTTTCTGAACTAT				
JAK200Rbio	biotin-CTCTGAGAAAGGCATTAGAAAG				
JAK1831S	TCACAAGCATTTGGTT				
rs12343867 AS-qPCR primers/probe (JAK2 intron 14)					
Forward primer	GGCGAGATTATGGCAGGTTCAACATAA				
Reverse (T)	CGCGGCGGATCTAGTATCATATCAAC <u>A</u>				
Reverse (C)	CGCGGCGGATCTAGTATCATATCAAC <u>G</u>				
Probe	CTGGCCTTTTCAGTACAAACTTATCTGGAA				
Cloning primers (JAK2 rs12343867 intron 14)					
Forward JAK2L611/V617	GCGCGGTT <u>T</u> TAAATTATGGAGTATGT <u>G</u>				
Forward JAK2V611/F617	GCGCGGTT <u>G</u> TAAATTATGGAGTATGT <u>T</u>				
Reverse primer	CAAGGTGCAATAAAATGAGGCATGCC				

	HD	SVT	SE	IE	PV	ET	PMF	AML
Ν	10	29	148	22	168	271	26	31
L611V- positive	0	0	0	0	3	0	0	0
%	0	0	0	0	1.8%	0	0	0

Supplementary Table 2: Analysis of genomic DNA from patients with MPN, MPN transformed into AML, and controls.

The L611(V) ASqPCR assay (see Methods and Supplementary Table 1 for the sequences of the primers and probes) was used to analyze genomic DNA from blood granulocytes of MPN patients and controls. (*) In MPN patients who transformed into acute myeloid leukemia (AML), genomic DNA was prepared from stained bone marrow smears, after scraping (cf. Theocharides et al. Blood 2007; 110: 375-379). N: number of individuals tested. HD: healthy donors, SVT: splanchnic vein thrombosis, SE: secondary erythrocytosis, IE: idiopathic erythrocytosis, PV: polycythemia vera, ET: essential thrombocythemia; PMF: primary myelofibrosis.

C. Commentaires

La nouvelle mutation L611V, portée par l'exon 14 du gène JAK2, rapportée dans ce travail a été trouvée associée en *cis* avec la mutation V617F. Nous avons également pu mettre en évidence des clones porteurs d'une seule de ces deux mutations. Les mutations sur le gène JAK2 peuvent donc survenir plusieurs fois chez un même patient, voire sur un même allèle.

Les trois patientes porteuses de cette mutation L611V, ont été testées pour l'haplotype 46/1, et seulement deux patientes sur trois en sont porteuses. Il existe donc un autre facteur prédisposant aux mutations multiples de JAK2 chez ce patient (**Figure 26**).



Figure 26: Représentation des différentes possibilités d'apparition des clones mutés chez les trois patientes testées. une prédisposition à l'acquisition de mutations de JAK2 (haplotype 46/1, ou autre), ? : représente un événement inconnu à l'origine de l'instabilité génétique (événement primaire ou précoce dans les SMP).

La présence de mutations sur JAK2 n'assure pas nécessairement un avantage prolifératif au clone porteur. En effet, nous avons pu constater la présence de clones simplement mutés L611V, ou V617F, présents en très faible proportion par rapport au clone doublement muté largement prédominant. Après une étude fonctionnelle, la mutation L611V a été trouvée comparable, en termes d'activité de la protéine JAK2, à la forme sauvage de JAK2, alors que la forme doublement mutée présente une activation constitutive de JAK2, AKT et ERK1/2, nettement supérieure à celle de JAK2V617F. Cependant, le double mutant n'active pas STAT5, à l'inverse de JAK2V617F. Ces données nous permettent de penser que les différences d'activation de JAK2 observées en fonction des différentes mutations peuvent conduire à une signalisation cellulaire elle aussi différente. Ce point est d'ailleurs corrélé par l'association de la double mutation de l'exon 14 de JAK2 avec un phénotype retrouvé chez les patients porteurs de mutations de l'exon 12 de JAK2 (hématocrite élevé, taux de leucocytes et de plaquettes normal ou bas).

Dans les cas de patients PV avec un phénotype atypique, ou un taux de mutant JAK2V617F négatif, ou inférieur à 25%, il est donc intéressant de rechercher la présence de mutations additionnelles sur le gène JAK2 qui pourraient nous aider à comprendre le, ou les, mécanisme(s) responsable(s) de leur survenue.

Résultats, Partie II :

"L'expression de la forme sauvage de JAK2 varie dans les syndromes myéloprolifératifs comme dans les formes réactionnelles et le taux d'expression de Mpl mature est associé avec celui de JAK2 sauvage, mais pas à celui de la forme mutée JAK2V617F"

(Cleyrat et al., en préparation)

A. Présentation

La thrombopoïétine (Tpo) et son récepteur, Mpl, sont les régulateurs principaux de la thrombocytopoïèse précoce et tardive, *via* l'activation des tyrosines kinases JAK2 et TYK2. Mpl est exprimé à la surface des plaquettes, des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs précoces où il induit, après fixation de son ligand, des signaux de survie et de prolifération cellulaire. En captant la Tpo circulante, *via* la fixation au récepteur Mpl, les plaquettes exercent une régulation négative de la thrombocytopoïèse, à l'inverse la baisse de l'expression de Mpl à la leur surface favorise l'augmentation du taux de plaquette, du fait de l'augmentation du taux de Tpo circulante.

Mpl est présent sous deux isoformes : une forme immature de 74 kDa, et une forme mature (glycosylée) de 84 kDa. Plusieurs études montrent que JAK2 joue un rôle important dans cette maturation des récepteurs, puis dans leur export à la membrane et enfin dans leur recyclage et leur destruction. Dans les SMP, les plaquettes montrent fréquemment une baisse, voire une absence, d'expression de Mpl, qui est considérée comme une conséquence de la présence de la mutation V617F. Un mécanisme possible serait l'augmentation du ciblage de l'ARN messager de Mpl par miR-28, *via* la dérégulation de la fonction de JAK2.

Ces données nous ont incités à analyser le taux d'expression de Mpl dans les plaquettes en fonction du taux d'expression de JAK2, muté ou non, chez des patients atteints de PV ou de TE.

B. Publication

In myeloproliferative neoplasms as in reactive states, expression of wild type JAK2 (JAK2WT) varies and levels of mature Mpl follow those of JAK2WT, not JAK2V617F

Cédric Cleyrat^{1*}, Isabelle Corre^{1*}, Marjorie Boissinot¹, François Girodon², Irène Dobo³, Nathalie Boiret-Dupré⁴, Eric Lippert^{5,6}, Sylvie Hermouet^{1,7}

*these authors contributed equally

¹INSERM UMR 892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, Nantes, France; ²Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France; ³Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France; ⁴Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Clermont-Ferrand, France; ⁵Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France; ⁶INSERM UMR 876, Université Victor Segalen Bordeaux II, Bordeaux, France; ⁷Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.

Correspondance to : Sylvie Hermouet, INSERM UMR 892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France.

Phone : +33 2 40 08 40 51 Fax : +33 2 40 08 40 50

E-mail: <u>sylvie.hermouet@univ-nantes.fr</u>

<u>Keywords</u>: Mpl / JAK2 / JAK2V617F / polycythemia vera / essential thrombocythemia

Acknowledgements: This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (comités des Départements de Loire-Atlantique, Morbihan, Ille-et-Vilaine) and Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) to SH and from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Région Bourgogne) to FG. MB and CC were recipients from scholarships from the French Ministry of Research (MB: 2004-2007; CC: 2007-2010).

Abstract

myeloproliferative (MPN), In neoplasms platelets frequently show decreased/absent Mpl expression, a characteristic assumed to be a consequence of JAK2V617F. Here we analysed mRNA levels of JAK2, wild type (WT) and mutated, in relation to Mpl expression. Four MPN subgroups were defined according to Mpl pattern: (1) Mpl revealed as 2 isoforms: 84 kDa (mature) and 74 kDa (immature) Mpl, expressed at comparable levels (pattern of normal platelets); (2) mature Mpl only; (3) immature Mpl only; (4) no Mpl. We found that Mpl patterns were not correlated with JAK2V617F but with JAK2WT mRNA levels, reduced to <200 copies/100 ABL for patterns 3 and 4. Pattern 2, observed in 15% of MPN and in reactive erythrocytosis or thrombocytosis, was associated with high JAK2WT expression. Transient transfection of JAK2WT in JAK2V617F^{+/+} HEL cells normalized Mpl maturation. In summary, JAK2WT expression varies widely in MPN and levels of JAK2WT and mature Mpl are linked.

Introduction

Thrombopoietin (Tpo) and its receptor, Mpl, are the principal regulators of early and late thrombopoiesis, via the activation of JAK2 and Tyk2 pathways (1). Mpl is expressed on platelets, hematopoietic stem cells and early progenitors, where it initiates critical cell survival and proliferation signals after stimulation by Tpo (2,3). In normal platelets, Mpl is revealed as two isoforms: the long (84 kDa) isoform is the Golgiprocessed, fully glycosylated, functional form expressed at the platelet surface whereas the short (74 kDa) isoform is the immature form of the receptor (4). By binding Tpo through Mpl, thus lowering Tpo level in circulating blood serum, platelets exert a negative feedback on thrombopoiesis (5,6). Inversely, lowering Mpl protein expression in platelets contributed to raising the platelet count in recent murine models, via increased circulating Tpo (7,8).

In humans, mutations in the MPL gene lead either to congenital thrombocytopenia or to thrombocytosis, congenital (S505N mutation) or acquired, in case of myeloproliferative neoplasm (MPN) (W515K/L mutations) (9-11). In addition, Mpl levels are frequently abnormal in platelets of patients diagnosed with MPN;

maturation and glycosylation of Mpl are also altered (12-14). The majority of MPN patients with decreased/absent Mpl carry the activating V617F mutation of JAK2 (JAK2V617F) characteristic of MPNs (14,15). Besides signal transmission, JAK2 is involved in the regulation of Mpl Golgi-processing, cellular localization and membrane expression (4,16,17). It is commonly assumed that the V617F mutation alters all JAK2 functions and therefore, impedes Mpl expression, possibly via Mpl-targeting miR-28 (18). However, Moliterno et al. reported only a weak inverse correlation between the JAK2V617F allelic ratio and the amount of Mpl in platelets of JAK2V617F-positive MPN patients (19). In addition, these authors found decreased Mpl expression in JAK2V617F-negative MPN patients.

We investigated the relationship between wild-type JAK2 (JAK2WT) and mutated JAK2 (JAK2V617F) and platelet expression of mature Mpl. Platelet Mpl proteins were studied in relation to mRNA levels of JAK2WT and JAK2V617F of healthy donors (HD) and patients diagnosed with reactive erythrocytosis or thrombocytosis, polycythemia vera (PV), and essential thrombocythemia (ET). We also confirmed that JAK2WT expression varies in MPN, JAK2V617F-mutated or not (20), and show that levels of mature Mpl are linked to those of JAK2WT, not JAK2V617F.

Materials and Methods

Forty HD and 81 patients (19 with reactive erythrocytosis or thrombocytosis, 38 PV, 24 ET) were examined at the time of diagnosis. Mpl expression was studied in platelet lysates by immunoblotting with an antibody (Ab) raised against the C-terminus of human Mpl. JAK2WT and JAK2V617F mRNA levels were measured by allele-specific quantitative RT-PCRs and normalized for ABL expression (20,21). For 7 patients, platelets had been collected in sufficient quantity to allow JAK2 mRNA studies: platelet levels of JAK2WT and JAK2V617F mRNAs correlated with those of blood granulocytes (JAK2WT: r=0.78, p=0.04; and JAK2V617F: r=0.77, p=0.04). Consequently, JAK2 mRNA levels were measured in blood granulocytes for all patients. Transient transfections of HEL cells were performed using pcDNA3.1 constructs containing JAK2WT or JAK2V617F cDNA, and the Amaxa Nucleofector device (Amaxa, Cologne, Germany) (22).

Results and Discussion

A previous study had determined that the average JAK2WT expression in HD was 230 \pm 130 JAK2WT copies/100 ABL (20). Immunoblotting studies (Figure 1A) of HD platelets confirmed the expression of Mpl as two isoforms, wih a 50:50 ratio (pattern 1). Compared to HD, reactive states were characterized by increased expression of JAK2WT (Table 1) and acceleration of Mpl maturation, noted in 63% of patients, who expressed only the mature Mpl isoform (pattern 2). Pattern 2 was also observed in 14.5% of MPNs (PV: 18%; ET: 8%). In PV and ET, JAK2-mutated or not, additional Mpl patterns were observed (Figure 1A): pattern 3, immature Mpl only; pattern 4, no Mpl. Although not designed to be quantitative, the study revealed that pattern 1 (expression of both forms of Mpl at similar levels) was observed in 37% of MPNs (33% of PV, 46% of ET); the total amount of Mpl proteins was decreased in 45% of cases (18% of MPN tested). Mpl was absent or immature in 49% of PV and 46% of ET, including JAK2V617F-negative ET (Table 1). Altogether, mature Mpl was decreased or absent in 66.5% of MPNs.

Low/absent expression of mature Mpl was not associated with higher platelet counts (Table 1). Perhaps because most MPN patients present with both low Mpl levels and JAK2V617F, this differed from mouse models of Mpl expression (6,7). In mice, expression of JAK2V617F induced thrombocytosis but in PV and ET, JAK2V617F is associated with lowered platelet numbers, compared to non JAK2-mutated patients (20,23). Hence, patient platelet counts likely reflect the combined "platelet-reducing" effect of JAK2V617F and "platelet-enhancing" effect of low Mpl levels.

Consistent with observations in JAK2V617F+ mice, where Mpl levels were unexpectedly found elevated, MPN subgroups with normal or high expression of mature Mpl (patterns 1 or 2) showed high JAK2V617F mRNA levels. Thus, JAK2V617F was unlikely to be responsible for the low Mpl expression in MPN. Analysis of JAK2WT mRNA levels revealed wide variations, with low levels of JAK2WT (comparable to those of HD) in MPNs with no mature Mpl, and high JAK2WT expression in MPNs with mature Mpl. Importantly, 75.0% (24/32) of MPNs with \geq 200 JAK2WT/100 ABL expressed mature Mpl *vs* only 26.7% (8/30) of MPNs with <200 JAK2WT/100 ABL (p=0.0286, χ^2 test). Interestingly, 9/10 PV with \geq 90% JAK2V617F expressed < 200 JAK2WT/100 ABL but 6/10 expressed mature Mpl. These 6 patients had a moderately decreased

expression of JAK2WT and high levels of JAK2V617F (medians: 145 and 1682 copies/100 ABL, respectively). The 4 patients with no mature Mpl expressed low amounts of JAK2WT and JAK2V617F (medians: 50 and 753 copies/100 ABL, respectively). Thus, low levels of JAK2WT might be counterbalanced by very high levels of total JAK2. Accordingly, JAK2V617F^{+/+} HEL cells (no JAK2WT) expressed mainly immature Mpl (Figure 1A). Re-introduction of JAK2WT in HEL cells using transient transfection was sufficient to restore normal maturation of Mpl: JAK2WT⁺ HEL cells expressed immature and mature Mpl at a 50:50 ratio (Figure 1B). In JAK2WT^{+/+} BaF-3/MPL cells, which expressed both immature and mature Mpl, transient expression of JAK2V617F did not change the Mpl pattern (not shown). Altogether, in MPN low expression and maturation of Mpl were found linked to low JAK2WT levels, not to JAK2V617F. JAK2V617F may retain residual activity regarding Mpl maturation, since mature Mpl was detected in HEL cells. Alternatively, Mpl maturation may occur via JAK2-independent mechanisms in case of severe/complete deprivation of JAK2WT (17). In addition, stimulation of hematopoiesis, in reactive states and in MPNs, was associated with acceleration of Mpl maturation and increased expression of JAK2. In such conditions, a sufficient level of JAK2WT (> 200 copies/100 ABL) seems critical to maintain mature Mpl at the membrane surface. Finally, to better appreciate the frequency of abnormal JAK2WT expression in MPN, we re-analysed data from a large series of MPN patients (62 PV, 61 ET) assembled previously (20). Low JAK2WT expression (<200 mRNA copies/100 ABL) was frequent (53% of PV, 38% of ET), and JAK2WT was elevated (>400 mRNA copies/100 ABL) in 29% of PV and 30% of ET (Figure 1C).

In summary, levels of mature Mpl are linked to those of JAK2WT, which is consistent with JAK2's established role in Golgi-processing and stabilization of the mature form of cytokine receptors. Mpl transmits survival signals in hematopoietic progenitors, and its expression seems tightly regulated. Elucidating why JAK2WT and Mpl levels vary in MPNs should help understand the pathogenesis of MPN. **Acknowledgements.** We are indebted to colleagues of the Clinical Hematology Departments of the hospitals of Angers, Bordeaux, Clermont-Ferrand, Dijon and Nantes for providing patient samples. The study was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer and the Association pour la Recherche contre le Cancer. CC and MB were recipients of scholarships from the French Ministry of Research (CC: 2007-2010; MB: 2004-2007) and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (MB, 2008).

Authorship: CC, IC, MB performed research, analysed data and helped write the manuscript; FG, ID, NBD, EL contributed important materials, patient data, and analysed data. SH designed research, analysed data and wrote the manuscript.

References

- Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. J Clin Invest 2005; 115: 3339-3347.
- 2. De Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. J Exp Med 1996; 183: 651-656.
- Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, et al. Role of c-Mpl in early hematopoiesis. Blood 1998; 92: 4-10.
- Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. J Biol Chem 2005; 280: 27251-27261.
- 5. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanish E, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mplmediated binding to platelets. Blood 1996; 87: 2154-2161.

- Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC. Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence again regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. Blood 1996; 87: 567-573.
- Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakhanova S, de Sauvage F, Jackson CW, Skoda RC. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. Blood 2009; 113: 1768-1777.
- Lannutti BJ, Epp A, Roy J, Chen J, Josephson NC. Incomplete correction of Mpl expression in the mpl^{-/-} mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. Blood 2009; 113: 1778-1785.
- 9. Ihara K, Ishii E, Eguchi m, et al. Identification of mutations in the c-Mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 3132-3136.
- **10**. Ding J, Komatsu H, Wakita A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. Blood 2004; 103: 4198-4200.
- 11. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med 2006; 3 (7): e270.
- **12**. Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. Blood 1999; 94: 2555-2561.
- **13**. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. N Engl J Med 1998; 338: 572-580.
- Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. Blood 2003; 102: 1869-1871.
- 15. James C, Ugo V, Le Couedic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 2005; 434: 1144-1148.

- Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. Mol Cell 2001; 8: 1327-1338.
- 17. Tong W, Sulahian R, Gross AW, Hendon N, Lodish HF, Huang LJ. The membrane proximal region of the thrombopoietin receptor (TpoR) confers its high surface expression by JAK2dependent and independent mechanisms. J Biol Chem 2006; 281: 38930-38940.
- 18. Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, Giraudier S, Constantinescu SN. miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. Blood 2010; 116: 437-445.
- Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. Blood 2006; 108: 3913-3915.
- 20. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2006; 108: 1865-1867.
- 21. Lippert E, Girodon F, Hammond E, Reading NS, Jelinek J, Badbaran A, Hanlon K, Hermans M, Richard C, Swierczek S, Ugo V, Carillo S, Harrivel V, Marzac C, Pietra D, Sobas M, Migeon M, Ellard S, Fehse B, Hermans R, Prchal JT, Skoda RC, Hermouet S. Concordance of assays designed for the quantitation of *JAK2V617F* (1849G>T): a multi-centre study. Haematologica 2009; 94: 38-45.
- 22. Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F et al. JAK2 mutation and disease phenotype: A double L611V/V617F *in cis* mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. Leukemia 2010, 24: 1069-1073.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood 2008; 111: 3931-3940.





Cleyrat et al. Figure 1

Legend of Figure 1: Mpl patterns observed in platelets of healthy donors, reactive states, PV and ET.

A: Platelet-rich plasma was diluted in PBS, 1% EDTA, centrifuged then platelet pellets were frozen at -80°C. After thawing, platelet pellets were lysed in buffer consisting of 20 mM Tris pH 7,5, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 5 mM MgCl2, 2 mM Na3VO4, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin. Detergent-insoluble material was removed by centrifugation; protein concentration was determined using the BCA method (Pierce, New York, NY, USA) and 100 µg of platelet proteins were subjected to a 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis then transferred onto a PVDF membrane (Immobilon, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). After membrane blocking in PBS, 5% dry non-fat milk, immunoblotting was performed with polyclonal anti-Mpl Ab raised against the C-terminus of human Mpl (amino acid 615-628) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). Detection was by chemiluminescence (ECL detection Kit, Roche, Meylan, France). Membranes were then stripped and re-incubated with monoclonal anti-gpIIb (CD41) Ab (Immunotech Coulter, Marseille, France) to normalize for protein loading. Prior experiments with antiproteases established that the 74 kDa Mpl isoform is not a product of degradation of the 84 kDa isoform (not shown). The figure shows the typical Mpl patterns, and percentages of individuals with a given Mpl pattern, observed in healthy donors (HD), secondary idiopathic erythrocytosis erythrocytosis (SE), (IE), reactive (post-surgery) thrombocytosis (RT), PV and ET (mutated on non-mutated), diagnosed according to WHO criteria. Mpl patterns of expression in platelets: pattern 1, both isoforms present; pattern 2: 84 kDa, mature isoform only; pattern 3: 74 kDa, immature isoform only; pattern 4: no Mpl.

B: Transient expression of JAK2WT in JAK2V617F^{+/+} HEL cells was performed with 50 μ g of pcDNA3.1 empty (Ø) or containing JAK2WT cDNA for 10⁷ cells, using the Amaxa Nucleofector device (Amaxa, Cologne, Germany). 24 hours after transfection, cells were pelleted, washed twice in cold PBS and lysed. Extracted proteins were used to perform western blot analysis.

C: HD : Healthy Donnors, SP : Surgery patients, IE : Isolated Erythrocytosis, SE : Secondary Erythrocytosis, PV : Polycytemia Vera, RT : Reactive Thrombocytosis, ET : Essential Thrombocytemia.

	SE + IE + RT	JAK2V617F -p ositive PV		JAK2V617F-positive ET		JAK2V617F-negative ET	
Nbr of patients	19	19	19	9	8	4	3
Male/Female	15/4	11/8	10/9	5/4	3/5	2/2	2/1
Mpl Pattern	1 or 2	1 or 2	3 or 4	1 or 2	3 or 4	1 or 2	3 or 4
Main Mpl isoform	mature	mature	immature/absent	mature	immature/absent	mature	immature/absent
JAK2WT/100 ABL	482 ± 424	307 <u>+</u> 242	201 ± 243^{a}	733 <u>+</u> 422	174 ± 96^{a}	507 ± 478	280 ± 220
JAK2V617F/100 ABL	0	953 <u>+</u> 972	481 ± 479^{b}	262 <u>+</u> 255	56 <u>+</u> 54 ^b	0	0
Total JAK2/100 ABL	482 <u>+</u> 424	1243 <u>+</u> 972°	683 <u>+</u> 599 ^b	995 <u>+</u> 642°	230 ± 148^{b}	507 <u>+</u> 478	280 <u>+</u> 220
% JAK2V617F	0	67 <u>+</u> 26	68 ± 21	23 ± 10	20 ± 11	0	0
Leukocytes, x 10 ⁹ /L	8.9 <u>+</u> 2.9	14.3 <u>+</u> 6.5	12.2 <u>+</u> 4.8	10.9 <u>+</u> 4.6	11.0 ± 3.1	9.1 <u>+</u> 1.3	7.2 ± 1.2
Hematocrit, L/L	47 <u>+</u> 12	57 <u>+</u> 6	56 ± 5	43 <u>+</u> 6	42 <u>+</u> 5	37 ± 6	36 <u>+</u> 10
Hemoglobin, g/L	153 <u>+</u> 39	185 <u>+</u> 19	182 <u>+</u> 19	143 <u>+</u> 18	137 <u>+</u> 14	120 <u>+</u> 22	117 <u>+</u> 34
Platelets, x 10 ⁹ /L	385 <u>+</u> 298	448 ± 160	564 <u>+</u> 294	775 <u>+</u> 185	743 <u>+</u> 159	887 <u>+</u> 302	754 <u>+</u> 45

Table 1: Characteristics of patients: expression of Mpl isoforms, JAK2 mRNA

 levels, blood cell counts.

With consent and before treatment, blood samples were obtained from patients diagnosed as reactive states (secondary erythrocytosis (SE), 8 patients; idiopathic erythrocytosis (IE), 5 patients; reactive thrombocytosis (RT), 6 patients) or PV and ET, according to WHO criteria. All PV had low serum EPo and a positive endogenous erythroid colony (EEC) assay; all IE had normal serum EPo, a negative EEC assay and no cause of SE; all SE had high or normal serum EPo, no EEC and a documented cause of SE. All ET had a positive endogenous megakaryocytic colony assay. Levels of JAK2WT and JAK2V617F mRNA were studied in purified blood granulocytes by allele-specific quantitative RT-PCR and normalized for ABL expression (19,20). Expression of Mpl in platelets: pattern 1, both isoforms present; pattern 2: 84 kDa, mature isoform only; pattern 3: 74 kDa, immature isoform only; pattern 4: no Mpl at all. Data are presented as means \pm standard deviations. (a) p < 0.05 *vs.* sub-groups with pattern 1 or 2; (c) p < 0.05 *vs.* reactive states, Mann-Whitney rank sum test. NA: not available.

C. Commentaires

Nous avons défini quatre profils d'expression de Mpl: (1) profil normal avec expression équivalente des deux isoformes (74 et 84 kDa) de Mpl; (2) profil avec expression de la forme mature uniquement; (3) profil avec expression de la forme immature uniquement; (4) absence d'expression de Mpl. Nous avons ensuite analysé les taux d'ARN messager (ARNm) de la forme sauvage et mutée (V617F) de JAK2, en fonction de l'expression de Mpl. Les résultats obtenus montrent que ces différents profils d'expressions sont corrélés avec le taux d'expression de la forme sauvage de JAK2, mais pas avec celui de JAK2V617F. Ainsi, les formes réactives sont caractérisées par une élévation du taux de JAK2 sauvage et la présence uniquement de la forme mature de Mpl (profil 2). Dans la PV et la TE, positives ou négatives pour la mutation JAK2V617F, les quatre profils sont retrouvés, mais avec un taux de JAK2 sauvage bas pour les profils 3 et 4, soit dans 66,5% des cas de SMP.

En accord avec ces résultats, les cellules HEL et les patients possédant un taux de JAK2 sauvage bas expriment quasi uniquement la forme immature de Mpl, voire n'en expriment pas. De plus, la réintroduction de la forme sauvage de JAK2 dans des cellules HEL, redonne un profil normal (profil 1) d'expression de Mpl, avec un équilibre entre les formes matures et immatures, alors que l'inactivation de JAK2 semble inhiber l'expression du récepteur. En outre, l'expression faible, voire l'absence d'expression, de la forme mature de Mpl, n'est pas associée avec un taux élevé de plaquettes, ceci pouvant être du à un effet "réducteur du taux de plaquette" par la présence de la mutation V617F, combiné à un effet "élévateur du taux de plaquette" de part la réduction de l'expression de Mpl mature à la surface des cellules.

La présence de Mpl mature est donc liée au taux de JAK2 sauvage, ce qui confirme le rôle de JAK2 dans la maturation et la stabilisation de la forme mature de ce récepteur. L'expression de la forme sauvage de JAK2 varie dans les SMP. Ces variations, fréquentes, qu'il y ait présence, ou non, de la forme mutée V617F, altèrent directement l'expression de Mpl. Ce récepteur joue un rôle important dans la signalisation cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques et son expression est très finement régulée. L'étude des mécanismes induisant ces variations nous permettrait de mieux comprendre la pathogénèse des SMP.

| 90

Résultats, Partie III :

"La surexpression de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) et de l'IL-11 (Interleukine 11), cytokines antiinflammatoires, dans la Polyglobulie de Vaquez (PV) contribue à la prolifération clonale des érythroblastes, indépendamment de JAK2V617F"

(Cleyrat et al., Oncogene 2010)

A. Présentation

La mutation activatrice JAK2V617F est retrouvée chez 95% des patients présentant une Polyglobulie de Vaquez (PV). Cependant, la présence de cette mutation n'implique pas nécessairement l'expansion du clone muté. Ceci implique qu'un, ou plusieurs, autre(s) événement(s) sont requis pour obtenir une prolifération clonale des progéniteurs présentant une mutation de JAK2, et ainsi obtenir un phénotype de PV.

Par ailleurs, de très nombreuses études ont démontré la dérégulation de la production des cytokines hématopoïétiques dans les SMP. JAK2 joue un rôle central dans la signalisation induite par certaines de ces cytokines, et une étude réalisée dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence une augmentation de la production d'IL-11 et d'IL-8 dans le sérum, le plasma médullaire et les surnageants de culture de cellules stromales de patients atteints de PV (Hermouet, Godard et al. 2002).

Ces cytokines étant liées à l'inflammation, nous avons donc recherché de manière systématique (cytokine arrays, ELISA, qRT-PCR) d'autres cytokines et molécules liées à l'inflammation dont l'expression pourrait être dérégulée dans la PV. Puis, nous avons étudié l'effet de la mutation JAK2V617F sur la production de cytokines par des transfections transitoires et des tests de siRNA anti-JAK2.

B. Publication

Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia Vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F

Running title: Role of HGF and IL-11 in Polycythemia Vera

Cédric Cleyrat^{1*},

Marjorie Boissinot^{1*∫},

Mathias Vilaine¹,

Yannick Jacques¹,

Isabelle Corre¹,

Sylvie Hermouet^{1,2}

¹INSERM UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ²Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

* these authors contributed equally

 $^{\int}$ current address: LIMM, Experimental Haematology, Wellcome Trust Brenner Building, Leeds, United Kingdom

Correspondance to:

Sylvie Hermouet, INSERM UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes, Cedex, France.

Phone: +33 2 40 08 40 51; Fax: +33 2 40 08 40 50; E-mail: <u>sylvie.hermouet@chu-nantes.fr</u>

Keywords: Polycythemia Vera/*JAK2*V617F/Hepatocyte Growth Factor (HGF)/Interleukin 11 (IL-11)/Interleukin 6 (IL-6)/inflammation/erythroblasts

Abstract

The V617F activating mutation of JAK2, a kinase essential for cytokine signalling, characterizes Polycythemia vera (PV), one of the myeloproliferative neoplasms (MPN). However, not all MPN carry mutations of JAK2 and in JAK2-mutated patients, expression of JAK2V617F does not always result in clone expansion. In the present study, we provide evidence that inflammation-linked cytokines are required for the growth of JAK2V617F-mutated erythroid progenitors. In a first series of experiments, we searched for cytokines over-expressed in PV using cytokine antibody arrays and ELISAs for analyses of serum and bone marrow (BM) plasma, and quantitative RT-PCRs for analyses of cells purified from PV patients and controls. We found that PV patients overexpressed anti-inflammatory hepatocyte growth factor (HGF) and interleukin-11 (IL-11), BM mesenchymal stromal cells (BMMSC) and erythroblasts being the main producers. In a second series of experiments, autocrine/paracrine cytokine stimulation of erythroblasts was blocked using neutralizing antibodies specific for IL-11 or c-MET, the HGF receptor. The growth of JAK2V617F-mutated HEL cells and PV erythroblasts was inhibited, indicating that JAK2-mutated cells depend on HGF and IL-11 for their growth. Additional experiments showed that transient expression of JAK2V617F in BaF-3/Epo-R cells, and invalidation of JAK2V617F in HEL cells using anti-JAK2 siRNA, did not affect HGF and IL-11 expression. Thus, anti-inflammatory HGF and IL-11 are upregulated in PV and their over-production is not a consequence of JAK2V617F. As both cytokines contribute to the proliferation of PV erythroblasts, blocking the c-MET/HGF/IL-11 pathways could be of interest as an additional therapeutic option in PV.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) constitute a group of three clonal diseases: Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). About half of MPN patients present with activating mutations in the JAK2 gene, which encodes for a tyrosine kinase essential for the signalling of many cytokines (1-3). Among MPN, PV is characterized by an excessive production of erythrocytes, resulting in an elevated hematocrit associated with variable leukocytosis and thrombocytosis. Activating mutations of JAK2, most often V617F (JAK2V617F), are found in >95% of PV cases. It is well established that erythroid differentiation depends on erythropoietin (Epo) and that JAK2 is the main signal transducer activated by Epo receptors (Epo-R). Yet in murine models, *JAK2*V617F is associated with polycythemia only when expressed at high levels (>50% JAK2V617F-mutated alleles), whereas a significant proportion of PV patients carry <50% *JAK2*V617F (4-7). We now know that the *JAK2*V617F mutation is frequently associated with other molecular genetic abnormalities and that the *JAK2*V617F mutation can occur several times in certain patients; moreover, the presence of JAK2V617F does not ensure expansion of mutated progenitors (8-12). Hence, the role of JAK2V617F in MPN and the consequences of its expression in hematopoietic progenitors remain incompletely understood.

Recently, a particular haplotype of chromosome 9p including the gene *JAK2*, called the "46/1" or "GGCC" haplotype, was found associated with a pre-disposition to MPN, with or without mutation of *JAK2* (13-15). The "46/1" haplotype is also associated with chronic inflammation, notably inflammatory bowel disease (16). Interestingly, although most evident in PMF, signs of chronic inflammation, such as increased production of inflammatory cytokines interleukin-6 and vascular endothelial growth factor, are also observed in PV and in ET (17-20). Inflammation-associated symptoms were long considered consequences of activating mutations of *JAK2* but recent clinical trials of JAK2 antagonists showed that drugs not strictly specific for JAK2 were most efficient to reduce inflammation-linked cytokine levels and symptoms, indicating that molecules other JAK2 were likely involved (21).

We begun to investigate the possible stimulation of PV progenitors by inflammation-linked, JAK2-activating cytokines because of previous observations of high mRNA levels of JAK2 in patients with erythrocytosis, either reactive or secondary (SE high expression of wild type *JAK2* (*JAK2*WT)) or primary (PV - high expression of both [AK2WT and [AK2V617F] (7). In PV, high mRNA expression of [AK2 could be due to multiple copies (>2 per cell) of the *JAK2* gene but this concerns a small minority of patients (22). As JAK2V617F is not sufficient for the development of the PV phenotype and by analogy with SE with increased Epo secretion, we reasoned that increased JAK2 mRNA expression in PV could be due to chronic stimulation by pro-erythroid, JAK2activating cytokines other than Epo, which is low or undetectable in PV. To investigate this hypothesis, we used cytokine arrays to compare profiles of blood serum, bone marrow (BM) plasma and culture supernatants of BM mesenchymal stromal cells (BMMSC) from PV and SE patients. Several pro-erythroid molecules were found overexpressed in PV: all were known to be linked to inflammation and produced by BMMSC or/and by hematopoietic progenitors themselves. These molecules were studied at the protein and at the mRNA levels using ELISA and quantitative RT-PCRs in purified cells: BMMSC, CD34+ progenitors, glycophorin A-positive (GPA+) erythroblasts, CD3+ lymphocytes. Relevance to the pathogenesis of PV was investigated by studying effects on in vitro growth of JAK2V617F-mutated erythroblasts. In addition, transfection of JAK2V617F in BaF-3/Epo-R cells, and anti-JAK2 siRNA in JAK2V617F-mutated HEL cells, were used to determine whether their production was a consequence of *JAK2*V617F.

Materials and Methods

Patients. With consent, serum and/or BM plasma samples were obtained from 122 patients at the time of diagnosis (58 PV, 37 secondary erythrocytoses (SE), 12 idiopathic erythrocytoses (IE), 15 essential thrombocythemia (ET)). Diagnosis of PV and ET was made according to WHO criteria 2002 (23). All PV had low serum Epo and endogenous erythroid colonies (EEC); all SE had elevated serum Epo, no EEC and an identified cause of SE; IE patients had normal serum Epo and no EEC. *JAK2*V617F status was established for 107/122 patients; 34/34 SE and 8/8 IE tested were negative; 48/51 PV and 5/15 ET tested were found positive for *JAK2*V617F. Serum was also obtained from 17 healthy donors. Due to occasional insufficient sample collection, serum and BM assays were not performed for all patients.

Cell lines. UKE-1 and BaF-3/Epo-R cells were kindly provided by Dr. Walter Fiedler (Hamburg, Germany) and by Dr. Radek Skoda (Basel, Switzerland), respectively. Human cell lines HEL and UKE-1 were grown in RPMI and 10% foetal calf serum (FCS). Murine BaF-3/Epo-R cells were grown in RPMI, 2% FCS and 1 IU/ml Epo.

Cell preparation. BM samples were centrifuged at 150 *g* for 10 min without brake. Supernatant (= BM plasma) was pipetted off and cell pellets suspended in RPMI; BM mononuclear cells (BMMC) were separated on Ficoll medium (1.077*g*). After washing, aliquots of BMMC were either used for immediate cultures or cell purification, or frozen in DMSO in liquid nitrogen. Adherent BMMSC were obtained after 12 days of culture as described previously (24,25). Blood granulocytes were isolated from the lower interphase of a Ficoll density gradient (7,26). CD34+ cells (purity \geq 95%), CD3+ lymphocytes (purity \geq 98%) and GPA+ erythroblasts (purity \geq 98%) were purified from frozen BMMC using Microbead kits (Miltenyi Biotec, Germany). Cells pellets were kept in 500 µl Trizol (Invitrogen, Frederick, MD) and stored at –80°C until mRNA extraction.

Quantification of JAK2WT and JAK2V617F. Genomic DNA was prepared using QiaAmp DNA mini-kit (Qiagen, Valencia, CA) and *JAK2* wild type (WT) and *JAK2*V617F allele-specific quantitative PCRs (AS-qPCRs) were performed in genomic DNA and cDNA as described (7,27).
Cytokine studies. Cytokine profiles of serum and BM plasma, kept frozen at -80°C, were analysed using cytokine arrays VI and VII (Raybiotech, Inc.; the list of cytokines tested is shown in Supplementary Table 1) and ELISA assays: human and murine interleukin-6 (IL-6) and IL-11 Quantikine kits (R&D Systems, Abingdon, UK); IL-8, leptin and hepatocyte growth factor (HGF) EASIA kits (BioSource Europe); and macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1) and tissue inhibitor of metalloproteases-1 (TIMP-1) instant kits (Bender Medsystems, Vienna, Austria).

Quantitative mRNA studies of cytokines and signalling molecules. Cells pellets kept in Trizol were submitted to mRNA extraction. After DNAse treatment and reverse transcription (RT), cDNAs were kept frozen at -80° C. qPCRs for TIMP-1, HGF, IL-11, IL-6, c-MET, gp130 (sequence common to variant forms), STAT3 and STAT5 (sequence common to α and β forms), as well as β -actin and RPLP0, used as control genes, were performed with specific primers and probes (Supplementary Table 2) on Rotorgene 6000 (Corbett Research, Australia). Dilutions of DNA preparations of pCR4-TOPO-TA constructs (Invitrogen, Frederick, MD) containing the relevant amplicons were used as copy number standards for qPCR assays. Because less variation in mRNA expression was observed for RPLP0 than for β -actin, results were expressed as mean numbers of copies per 1000 copies of RPLP0.

Mutagenesis and transient expression of JAK2 constructs in BaF-3/Epo-R cells. Plasmid pCR2.1 containing the cDNA of *JAK2WT* (gift from Dr. Jan Cools) was used as matrix for directed V617F mutagenesis. PCR were performed using Pfu Ultra DNA polymerase (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) with the following primers: forward, 3'; 5'CACAAGCATTTGGTT<u>G</u>TAAATTATGGAGTATG reverse, 5'CATACTCCATTATTTACAACCAAATGCTTGTG3'. PCR products were amplified into TOP 10 chemically competent bacteria (Invitrogen, Frederick, MD), and purified. Another PCR using Pfu Ultra was performed to extract WT and V617F JAK2 cDNA from plasmid pCR2.1 for cloning into pcDNA3.1. Mutagenesis was checked by sequencing. 25 µg of pcDNA3.1 containing either JAK2WT or JAK2V617F cDNA were used to transfect 107 BaF-3/Epo-R cells using the Amaxa Nucleofector device (Amaxa, Cologne, Germany). Cells were then grown in 4 mL of RPMI medium supplemented with serum and Epo for 24 hrs, then harvested for immunoblotting and RT-qPCR studies. For cell signalling studies, transfected BaF-3/Epo-R cells were washed, deprived of Epo for 5 hrs in RPMI

medium supplemented with 10% FCS, then stimulated for 10 minutes with Epo (25 IU/mL) in RPMI and 2% FCS, at 37°C. Cells were harvested, washed twice in cold PBS, lysed in 60 μ L RIPA buffer, then proteins (25 μ g) were loaded on 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) (12,25). After blocking with 5% non-fat dry milk, membranes were incubated with antibodies (Ab) specific for p-STAT5 (Zymed, San Francisco, CA, USA), p-JAK2 and p-STAT3 (Cell Signalling, Danvers, USA) or β -actin (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), then stripped and re-probed with Ab specific for total JAK2 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), then stripped and STAT5 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Revelation was made with BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche, Mannheim, Germany).

Silencing of *JAK2* expression in HEL cells. 5.10^4 HEL cells were incubated without, or with 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} or 10^{-1} µM of human *JAK2* siRNA (Accell SMARTpool E-003146-00-0005, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 72 hrs and JAK2, IL-6, IL-11, HGF, and RPLP0 mRNA and protein levels were measured using the RT-qPCR and immunoblotting assays described above.

Semi-solid and liquid cultures of erythroid progenitors. BFU-E clonogenic assays were performed in collagen-based medium without cytokines or with stem cell factor (SCF, 25 ng/ml) and in methylcellulose (medium H4531, StemCell Inc., Vancouver, Canada) (25,26). Purified BM erythroblasts were grown for 24 hrs in IMDM liquid medium and serum, with or without Epo, with neutralizing polyclonal Ab, used at 2 2g/ml: anti-HGF, anti-c-MET and anti-IL-11 Ab were from R&D (Abingdon, UK). IL-8 Ab was from Endogen (Cambridge, MA, USA).

Statistical analysis. Pearson's and Spearman's rank correlation tests were used to investigate potential relationship between cytokine levels, *%JAK2*V617F and blood cell counts. The Mann-Whitney test was used to investigate differences in mRNA and protein levels, or groups of patients. *P*<0.05 was statistically significant.

Results

1. Over-expression of HGF and IL-11 in biological samples from PV patients.

Firstly, cytokine arrays were used to analyse cytokine expression in pools of serum from PV patients, compared to SE patients and healthy donors (HD), and pools of BM plasma from PV patients, compared to SE patients (Supplementary Figure 1). SE and PV differed from HD by high levels of IL-8, leptin and MCP-1 in serum. PV differed from SE by high levels of HGF in serum, and high levels of TIMP-1 in BM plasma. IL-8, leptin, MCP-1, HGF and TIMP-1 are molecules linked to inflammation, as was IL-11, previously reported elevated in PV (24,25).

Secondly, IL-8, leptin, MCP-1, HGF, TIMP-1, IL-11 and also IL-6, a major proinflammatory cytokine, were measured in PV and SE using ELISAs and levels were compared to those of HD. As shown in Table 1, analysis of serum of SE and PV patients confirmed high levels of IL-8, leptin, HGF and MCP-1; TIMP-1 levels were low. PV differed from SE by lower levels of leptin in serum (male patients only) and higher levels of IL-11 and HGF. For comparison, IL-11 and HGF measured in serum of 15 ET patients were either not detected (IL-11) or comparable to values observed for control SE patients: median serum HGF values, in pg/ml, were 1380 in SE (n=34) and 1594 in ET (n=15) *vs* 4673 in PV (n=49). TIMP-1 levels were confirmed elevated in PV compared to SE only in BM plasma. Although serum IL-6 was elevated for some PV patients, overall IL-6 levels were not found significantly high in PV.

Of the three molecules confirmed elevated in PV by ELISA, HGF and IL-11 seemed most interesting. Indeed, it was established that HGF could induce IL-11, an established stimulant of erythropoiesis (28-31). In PV patients, serum levels of HGF and IL-11 were correlated with blood neutrophil counts (n=21, r=0.71, p<0.005) and hematocrit (n=45, r=0.43, p<0.01), respectively. Consequently, the rest of the study focused on HGF and IL-11.

2. Sequential production of HGF, IL-11, IL-6 and IL-8 by PV BMMSC.

According to the literature, HGF induces the production of IL-11 and TIMP-1, IL-11 induces expression of IL-6 and IL-8, and TIMP-1 acts on the cleavage and activation of HGF. Accordingly, BM plasma levels of IL-11, IL-6 and IL-8, as well as serum levels of TIMP-1 and HGF (Table 1), were correlated in PV (IL-11/IL-6: n=29, r=0.51, p<0.01; IL-11/IL-8: n=60, r=0.43, p<0.01; TIMP-1/HGF, n=32, r=0.42, p=0.02).

Regulation of IL-11 by HGF and regulation of IL-6 and IL-8 by IL-11 were studied in BMMSC, an established source of cytokines linked to inflammation. ELISA performed on supernatants of 31 BMMSC cultures (12 PV, 5 IE, 14 SE) confirmed that IL-11 and IL-8 were present at high levels in supernatants of PV BMMSC but detected little or no HGF (Table 1). IL-11 and IL-8 levels were correlated in BMMSC supernatants (n=31, r=0.74, p<0.01). BMMSC cultures (4 PV, 2 IE, 9 SE) were then stimulated either with HGF to study production of IL-11 and TIMP-1, or with IL-11 to study production of IL-6 and IL-8. Exposure to HGF increased IL-11 and TIMP-1 produced by PV BMMSC (Figure 1A and 1B, respectively), while exposure to IL-11 significantly increased the production of both IL-8 and IL-6 (Figure 1C and 1D, respectively).

To verify that PV BMMSC cultures did not contain clonal, *JAK2*V617F-mutated cells, BMMSC of five PV patients with blood granulocytes positive for *JAK2*V617F were tested for the presence of *JAK2*V617F: all expressed only wild type *JAK2*.

3. High mRNA expression of HGF and IL-11 in purified erythroblasts from PV patients.

We also studied CD3+ lymphocytes, previously described as producers of IL-11 in PV (29); CD34+ progenitor cells; and GPA+ erythroblasts, all purified from BM of 6 PV patients and 7 SE controls. The %/*AK2*V617F measured in granulocyte DNA of the 6 PV patients ranged from 10% to 77%. Expression of HGF, IL-11 and IL-6 mRNAs was studied using RT-qPCRs (Figure 2). In PV and in SE, BMMSC were high producers of HGF and IL-6 (Figure 2A). Although protein levels of IL-11 measured by ELISA in supernatants of cultured BMMSC were clearly higher in PV than in SE, no significant difference was detected in IL-11 mRNA levels in BMMSC from PV and SE patients (Figure 2A). In BM CD3+ lymphocytes (Figure 2B) and in CD34+ progenitors (Figure 2C), mRNA expression of HGF, IL-11 and IL-6 was negligible. The BM origin of CD3+ lymphocytes in our series may explain the discrepancy with the results of Ishii et al., who studied blood T-lymphocytes (29). In contrast to other cell types, PV GPA+ erythroblasts expressed high mRNAs levels of both HGF and IL-11 (Figure 2D). In PV and SE erythroblasts, mRNA levels of HGF, IL-11 and IL-6 were correlated (r=1.00,

p<0.02 each). No correlation was found between *JAK2*V617F (% or mRNA levels), measured in each cell type, and HGF, IL-11 or IL-6 mRNA levels.

4. Increased expression of gp130 and STAT3 mRNAs in purified PV erythroblasts.

Expression of c-MET (the HGF receptor), gp130 (the receptor chain shared by IL-11 and IL-6), *JAK2*WT, *JAK2*V617F, STAT3 and STAT5 was analysed in BMMSC, in CD3+ lymphocytes and in purified BM progenitors using RT-qPCRs. No significant difference in expression of total JAK2, STAT3 or STAT5 was observed between PV and SE in BMMSC, CD3+ lymphocytes and CD34+ progenitors (not shown). In these cell types, there was no correlation between mRNA levels of HGF, c-MET, IL-11, IL-6, gp130, total JAK2, STAT3 or STAT5. In purified GPA+ erythroblasts, mRNA levels of c-MET, total JAK2 and STAT5 were similar in PV and in SE (Table 2). In contrast, mRNA levels of gp130 and STAT3, both activated by IL-11 and IL-6, were significantly elevated in PV erythroblasts. Moreover, in PV erythroblasts mRNA levels of c-MET, HGF, IL-11 and IL-6 were correlated, as were mRNA levels of HGF, IL-6, gp130 and STAT5 (Supplementary Table 3). No correlation was found with *JAK2*V617F mRNA levels. Taken together, correlation between HGF, IL-11 and IL-6 mRNA levels and increased HGF, IL-11, gp130 and STAT3 mRNA expression were consistent with activation of a HGF/c-MET/IL-11/IL-6/gp130/STAT3 cascade in PV erythroblasts.

5. Inhibition of *in vitro* growth of PV erythroid progenitors and HEL cells by neutralizing antibodies directed against c-MET and IL-11.

We previously reported that neutralizing anti-IL-11 Ab could block BFU-E and CFU-E growth in cultures of BM mononuclear cells from PV patients, indicating partial dependence of PV erythroid progenitors on IL-11 (25). HGF was blocked using neutralizing Ab directed against c-MET in cultures of HEL cells, which are homozygous for *JAK2*V617F and in liquid cultures of purified GPA+ erythroblasts from 4 patients with *JAK2*V617F-mutated PV (*JAK2*V617F allelic ratio: 37%, 91%, 95% and 98%) (Figure 3). Compared to control cultures without Ab, the number of viable cells in PV cultures incubated for 24 hours with anti-c-MET Ab (2 μ g/ml) was consistently decreased by more than 40%. Decreased viability in the presence of anti-c-MET Ab concerned *JAK2*V617F-mutated cells, as it was observed for HEL cells (100% *JAK2*V617F-mutated)

and for purified erythroblasts of PV patients, three with >90% cells bearing the *JAK2*V617F mutation. A similar inhibition of HEL and PV erythroblast growth was also observed with anti-IL-11 Ab (2 μ g/ml). Anti-IL-8 Ab (2 μ g/ml) - used as a control Ab - had no effect in these conditions. Incubation of erythroblasts from SE patients with anti-c-MET Ab and anti-IL-11 Ab resulted in no inhibition (2 patients) or a weak (-20%) inhibition (1 patient) of erythroblast growth.

6. *JAK2*V617F-independence of HGF and IL-11 expression.

Firstly, HGF level was measured in blood serum of 3 PV patients who were found positive for EEC but who carried no mutation of *JAK2* (negative for V617F and exon 12 mutations). For 2/3 of these "*JAK2*WT" patients, serum HGF was found elevated (3216 and 4795 pg/ml) and comparable to the average serum HGF level of *JAK2*V617F-positive PV patients (4409 pg/ml, *vs* less than 1285 pg/ml in healthy donors).

Secondly, HGF, IL-11 and IL-6 mRNA expression was studied in HEL and UKE-1, two human cell lines homozygous for the *JAK2*V617F mutation. As shown in Table 2, high expression of IL-6, IL-11 or HGF was observed in HEL but not in UKE-1, indicating that homozygosity for *JAK2*V617F is not sufficient to induce high expression of HGF, IL-11 and IL-6 (of note, UKE-1 cells were derived from a patient initially diagnosed with ET).

Thirdly, we used anti-*JAK2* siRNA to block expression of *JAK2*V617F in HEL cells. As shown in Figure 4A, *JAK2*V617F mRNA expression was almost abolished. *JAK2* expression was also inhibited at the protein level, by up to 70%, and a modest inhibition of cell survival was observed (Supplementary Figure 2). RT-qPCR and ELISA analysis of mRNA and protein expression showed that levels of HGF, IL-11 and IL-6 were not affected by invalidation of *JAK2*V617F (Figure 4 B-D, Supplementary Figure 2).

Fourthly, the effects of *JAK2*V617F were studied in murine BaF-3/Epo-R cells (Figure 5). Both WT and V617F human JAK2 were successfully expressed in BaF-3/Epo-R cells, as assessed by AS-RTqPCR and Western blotting analysis, which showed a clear increase in tyrosine phosphorylation of JAK2 in *JAK2*V617F transfectants (Figure 5A). In comparison, the increase in tyrosine phosphorylation of STAT5 and STAT3 in BaF-3/Epo-R cells expressing *JAK2*V617F was modest. Expression in BaF-3/Epo-R cells of wild type and V617F-mutated JAK2, as well as another *JAK2* mutant, *JAK2*L611V/V617F

(12), had no effect on mRNA expression of murine IL-11 or HGF, the latter remaining below detection level (Figure 5B). However, all forms of JAK2 induced a moderate increase in mRNA and protein levels of murine IL-6. Thus, *JAK2*WT and to a lesser extent, *JAK2*V617F and other *JAK2* mutants, may induce expression of pro-inflammatory IL-6 in certain cell types but have no effect on anti-inflammatory HGF and IL-11.

Last, we analysed HGF serum levels in PV patients in relation to JAK2V617F allelic burden; SE and ET patients negative for *JAK2*V617F were used as controls (Table 3). JAK2V617F-negative ET patients showed a moderate elevation of serum HGF levels, as did SE patients. HGF serum levels were further and similarly elevated for ET and PV patients with 1-50% JAK2V617F, with no correlation between serum HGF level and %JAK2V617F. PV patients with the highest serum HGF levels (\geq 3500 pg/ml) had the highest JAK2V617F allelic burden: $58.7\% \pm 27$ vs $41.0\% \pm 28.9$ for PV patients with < 3500 pg/ml (p = 0.044), also with no correlation between serum HGF level and %JAK2V617F. Consistent with the up-regulation of HGF being independent of JAK2V617F, a high secretion of HGF (> 3500 pg/ml HGF) was typical of PV with >50%/AK2V617F but also observed, with a lesser frequency, in other categories of patients, including JAK2V617F-negative PV, ET and SE. Hence, like very high hematocrit, high serum HGF was found associated with a high %/AK2V617F but /AK2V617F was neither required nor sufficient (UKE-1 cells; BaF-3/Epo-R transfectants) to induce HGF production. Rather, a high level of HGF in serum may be considered as a marker of the size of the MPN clone and disease severity.

Discussion

Up-regulation of inflammation-linked cytokines - IL-6, IL-10, VEGF, tumour necrosis factor alpha (TNF- α) - is now well established and generally assumed to be a consequence of *JAK2*V617F. Yet symptoms of chronic inflammation are observed both in *JAK2*V617F-mutated MPN and in MPN with no mutation of *JAK2*, particularly PMF (17-20,24,25,32). The findings of the present study of PV patients support the opposite reasoning, ie. that up-regulation of certain cytokines linked to inflammation is independent of the acquisition of the *JAK2*V617F mutation. This is consistent with recent reports that certain anti-JAK2 drugs, particularly those that are not strictly specific for JAK2, efficiently decrease inflammation-associated symptoms - splenomegaly, fever, loss weight - without affecting the *JAK2*V617F burden (21,33,34).

Our study demonstrates that anti-inflammatory cytokines HGF and IL-11, as well as of gp130, the signalling receptor chain common to IL-11 and IL-6, are up-regulated in PV independently of *JAK2*V617F. In addition TIMP-1, a molecule that controls HGF activity and has been reported over-expressed in PMF, was also found elevated in PV (35,36). HGF, IL-11 and IL-6 are produced by *JAK2*WT BMMSC and *JAK2*V617F-mutated erythroid progenitors; they act in cascade, activate the STAT3 pathway and stimulate myeloid hematopoiesis. Thus two autocrine/paracrine HGF/IL-11 loops appear to cooperate in PV bone marrow: one concerns BMMSC, main producers of HGF *in vitro*; the other concerns erythroblasts, main producers of IL-11 (Figure 6). Importantly, hematocrit and serum IL-11 were correlated in PV and antibodies blocking IL-11 or c-Met/HGF inhibited the growth of *JAK2*V617F-mutated erythroblasts. No correlation was found between *JAK2*V617F and HGF/IL-11 levels in patients and *in vitro*, *JAK2*V617F had no effect on HGF and IL-11 mRNA expression.

Autocrine/paracrine HGF/IL-11 loops do not seem to be activated in ET as levels of HGF were only moderately increased and IL-11, an established stimulant of erythropoiesis inducible by HGF, was not detected at all in serum of ET patients. Altogether, our data are consistent with the up-regulation of both HGF and IL-11 in MPN being characteristic of PV and independent of *JAK2*V617F.

Consistent with independence from JAK2V617F, deregulation of HGF, IL-11 and IL-6 has been reported in other haematological malignancies, notably multiple myeloma (37,38). In both PV and multiple myeloma, BMMSC were found to expressed high levels of IL-11 and IL-6, possibly in response to paracrine stimulation by HGF and IL-11 produced by malignant progenitors (39,40). In PV erythroblasts as in malignant plasma cells, over-expression of HGF and IL-11 was associated with high expression of the receptors for these cytokines, c-MET and gp130. Interestingly, the receptor for HGF, c-MET, belongs to a family of so-called "dependence receptors", which induce cell death unless they are activated by their ligand (41,42). Inversely, disturbing the equilibrium between a dependence receptor and its ligand, either by over-expression of ligand or deletion or inactivation of the receptor, leads to inappropriate cell survival and proliferation, accumulation of genetic abnormalities and eventually, cell transformation - a succession of events found in solid tumors and in chronic haematological malignancies such as MPN and multiple myeloma. This suggests that the HGF/c-MET pathway may exert a fundamental role in the maintenance of normalcy in dividing cells. Indeed, increased production of HGF is a common cellular response to hypoxia, frequent in the context of cancer and chronic inflammation (43,44). In addition to PV erythroblasts and myeloma cells, many solid tumors depend on sustained HGF/c-MET activity for their growth and survival. In consequence, HGF and c-MET have become novel targets in the therapy of solid tumors and multiple myeloma (45-48). Our results suggest that blocking the HGF/c-MET and IL-11 pathways could be novel therapeutic options in PV, perhaps for those patients no longer controlled by phlebotomy or/and hydroxyurea (49). In this regard, the established ability of interferon alpha (IFN- α) to suppress expression of c-MET and IL-11 may contribute to the disappearance of *JAK2*V617F-mutated clonal cells in PV patients treated with IFN- α (50-52).

In PV erythroblasts, over-expression of HGF and IL-11 was associated with increased expression of STAT3 and gp130, the receptor chain common to IL-11 and IL-6 responsible for intracellular signalling. According to Jenkins et al., a definite threshold of STAT3 signalling is critical for the regulation of normal hematopoiesis (53,54). These authors showed that abnormal activation of STAT3 via receptors of cytokines from the IL-6 family induced MPN-like disorders in mice, as well as an increase in expression of IL-6 and IL-11; HGF was not studied. The excellent correlations found in erythroblasts

between mRNA levels of STAT3-activating molecules gp130, IL-6, HGF and those of STAT5, presumably activated in PV because of the expression of *JAK2*V617F, are consistent with a tight regulation of the equilibrium between the STAT3 (cell survival) and STAT5 (proliferation) pathways in these cells. By providing a growth advantage, HGF/IL-11-induced excessive activation of the STAT3 pathway likely influences phenotype in MPN, as shown recently in chronic myeloid leukemia (CML) for BCR-ABL-induced phenotypes in animal models (55).

Last, because deregulation of HGF and/or IL-11, gp130 and STAT3 is common to many tumoral processes, the genetic events resulting in over-expression of these molecules in PV are unlikely to be primary events causing PV but rather, frequent parallel events that occur independently of *JAK2* mutation(s) and are also found in other malignancies, as described in MPN for several cytogenetic abnormalities (9,11). Parallel or "passenger" genetic events responsible for the deregulation of HGF and IL-11 would be consistent with the observations that not all PV patients show high levels of HGF, and that *JAK2*V617F alone does not ensure a PV phenotype nor the expansion of progenitors bearing this mutation. Candidate genes for deletion or mutation include c-MET, often mutated in cancer and leading to inappropriate cell proliferation, thus predisposing cells to acquire mutations in other genes. Other possible candidates are mutations of genes encoding for IL-11 receptors, or DNA demethylation of the promoters of the genes encoding for HGF and IL-11. One may also consider the possibility of acquired mutations of genes of the oxygen-sensing pathway, leading to increased HGF expression.

In summary, as described in multiple myeloma, autocrine/paracrine antiinflammatory HGF and IL-11 are over-expressed in PV and likely contribute to the expansion of clonal erythroblasts, in a *JAK2*V617F-independent fashion. Consequently, the value of blocking the c-MET/HGF pathway, tested as an additional therapeutic option in multiple myeloma and in solid tumors, might be of interest in PV. Finally, the genetic events responsible for over-expression of HGF and subsequently, of IL-11 and IL-6, deserve investigation in PV, as well as in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. **Acknowledgements.** We are indebted to Mrs. Danielle Pineau for excellent technical help and to colleagues of the Clinical Hematology Departments of the hospitals of Nantes, La Roche-sur-Yon and Lorient for providing patient samples. The study was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Loire-Atlantique) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). MB, CC and MV have been recipients of scholarships from the French Ministry of Research (MB: 2004-2007; CC: 2007-2010; MV: 2009-2010) and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (MB, 2008).

Authorship: MB, CC, MV, IC performed research, analysed data and helped write the manuscript; MB and CC contributed equally. YJ analysed data and revised the manuscript. SH designed and performed research, analysed data and wrote the manuscript.

References

- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144-1148.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Cancer Genome Project. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK-2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 365: 1054-1061.
- 3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R. Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005). A gain-of-function mutation of JAK-2 in myeloproliferative disorders. New Engl J Med 352: 1779-1790.
- 4. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood 108: 1652-1660.
- 5. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. (2006). Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 107: 4274-4281.
- 6. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood 111: 3931-3940.
- 7. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. (2006). The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 108: 1865-1867.
- 8. Nussenzveig RH, Swierczek SI, Jelinek J, Gaikwad A, Liu E, Verstovsek S, Prchal JF, Prchal JT. (2007). Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation. Exp Hematol 35: 32-38.

- 9. Kralovics R. (2008). Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. Leukemia 22: 1841-1848.
- 10. Lambert JR, Everington T, Linch DC, Gale RE. (2009). In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm. Blood 114: 3018-3023.
- Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Tichelli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC. (2009). Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and JAK2-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the pre-disposing mutations for JAK2-V617F. Blood 113: 2022-2027.
- 12. Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau J-L, Issa J-P, Hermouet S. (2010). JAK2 mutation and disease phenotype: A double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. Leukemia 24: 1069-1073.
- Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. (2009). A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. Nat Genet 41: 450-454.
- 14. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, Cario H, Pahl HL, Collins A, Reiter A, Grand F, Cross NC. (2009) JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. Nat Genet 41: 446-449.
- 15. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, Bass A, Marubayashi S, Heguy A, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Offit K, Stone RM, Gilliland DG, Klein RJ, Levine RL. (2009). A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. Nat Genet 41: 455-459.
- Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR, Duan H, Karunasinghe N. (2010). Genetic factors in chronic inflammation: Single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. Mutat Res. 690: 108-115.
- Musolino C, Calabro L, Bellomo G, Martello F, Loteta B, Pezzano C, Rizzo V, Alonci A. (2002). Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders. Am J Hematol 69:159-163.
- 18. Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC. (1999). Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. Ann Hematol 78: 437-44. Review.
- 19. Wickenhauser C, Thiele J, Lorenzen J, Schmitz B, Frimpong S, Schramm K, Neumann I, Zankovich R, Fischer R. (1999). Polycythemia vera megakaryocytes but not megakaryocytes from normal controls and patients with smoker's polycythemia spontaneously express IL-6 and IL-6R and secrete IL-6. Leukemia 13: 327-334.
- 20. Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, Katsaraki A, Seferiadis K, Stebbing J, Bourantas KL. (2005). Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. British J Haematol 130: 709-715.
- 21. Tefferi A. (2010). JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms. The Hematologist 7: 5. Review.
- 22. Najfeld V, Cozza A, Berkofsy-Fessler W, Prchal J, Scalise A. (2007). Numerical gain and structural rearrangements of JAK2, identified by FISH, characterize both JAK2617V>F-positive and -negative patients with Ph-negative MPD, myelodysplasia, and B-lymphoid neoplasms. Exp Hematol 35: 1668-7166.

- 23. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 100: 2292-2302.
- 24. Hermouet S, Godard A, Pineau D, Corre I, Raher S, Lippert E, Jacques Y. (2002). Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythemia vera. Cytokine 20: 178-183.
- 25. Corre-Buscail I., Pineau D., Boissinot. M, Hermouet, S. (2005). Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukins 11 and 8. Exp Hematol 33: 1299-1308.
- 26. Dobo I, Donnard M, Girodon F, Mossuz P, Boiret N, Boukhari R, Allégraud A, Campos L, Bascans E, Pineau D, Turlure P, Praloran V, Hermouet S. (2004). Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assay performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythaemia vera. Hematol J 5: 161-167.
- 27. Lippert E, Girodon F, Hammond E, Reading NS, Jelinek J, Badbaran A, Hanlon K, Hermans M, Richard C, Swierczek S, Ugo V, Carillo S, Harrivel V, Marzac C, Pietra D, Sobas M, Migeon M, Ellard S, Fehse B, Hermans R, Prchal JT, Skoda RC, Hermouet S. (2009). Concordance of assays designed for the quantitation of JAK2V617F (1849G>T): a multi-centre study. Haematologica 94: 38-45.
- 28. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. (1999). Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. Leukemia 13: 1307-1315.
- 29. Ishii T, Zhao Y, Shi J, Sozer S, Hoffman R, Xu M. (2007). T cells from patients with polycythemia vera elaborate growth factors which contribute to endogenous erythroid and megakaryocyte colony formation. Leukemia 21: 2433-2441.
- 30. Quesniaux VF, Clark SC, Turner K, Fagg B. (1992). Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. Blood 80: 1218-1223.
- 31. Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, Ozono K, Matsumoto K, Nakamura T, Hara J. (2004). Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. Exp Hematol 32: 955-961.
- 32. Geissler K, Ohler L, Fodinger M, Kabrna E, Kollars M, Skoupy S, Lechner K. (1998). Interleukin-10 inhibits erythropoietin-independent growth of erythroid bursts in patients with polycythemia vera. Blood 92: 1967-1972.
- 33. Verstovsek S. Therapeutic Potential of Janus-activated Kinase-2 Inhibitors for the Management of Myelofibrosis. Clin Cancer Res. 2010 Mar 9. [Epub ahead of print]
- 34. Hitoshi Y, Lin N, Payan DG, Markovtsov V. (2010). The current status and the future of JAK2 inhibitors for the treatment of myeloproliferative diseases. Int J Hematol 91:189-200.
- 35. Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S, Flechsig C, Krell HW, Antolovic D, Brew K, Nagase H, Stangl M, von Weyhern CW, Brücher BL, Brand K, Coussens LM, Edwards DR, Krüger A. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. Cancer Res 67: 8615-8623.
- 36. Ho CL, Lasho TL, Butterfield JH, Tefferi A. (2007). Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders. Leuk Res 31: 1389-1392.
- 37. Derksen PW, de Gorter DJ, Meijer HP, Bende RJ, van Dijk M, Lokhorst HM, Bloem AC, Spaargaren M, Pals ST. (2003). The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. Leukemia 17: 764-774.
- 38. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Rizzoli V. (2004). The RANK/RANK ligand system is involved in interleukin-6 and interleukin-11 up-regulation by human myeloma cells in the bone marrow microenvironment. Haematologica 89: 1118-1123.

- 39. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. Blood 82: 3712-3720.
- 40. Zdzisinska B, Bojarska-Junak A, Dmoszynska A, Kandefer-Szerszen M. (2008). Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. Arch Immunol Ther Exp 56: 207-221.
- 41. Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, Vande Woude GF. (2004). RNA interference reveals that ligand-independent MET activity is required for tumor cell signalling and survival. Cancer Res 64: 7962-7970.
- 42. Bernet A, Mehlen P. (2007). Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. Bull Cancer 94: E12-17.
- 43. Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. (2001). Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. Carcinogenesis 22: 1363-1371.
- 44. Kitajima Y, Ide T, Ohtsuka T, Miyazaki K. (2008). Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer. Cancer Sci 99: 1341-1347.
- 45. Sattler M, Salgia R. (2007). c-MET and hepatocyte growth factor: potential new targets in cancer therapy. Curr Oncol Rep 9: 102-108.
- 46. Du W, Hattori Y, Yamada T, Matsumoto K, Nakamura T, Sagawa M, Otsuki T, Niikura T, Nukiwa T, Ikeda Y. (2007). NK4, an antagonist of hepatocyte growth factor (HGF), inhibits growth of multiple myeloma cells: molecular targeting of angiogenic growth factor. Blood 109: 3042-3049.
- 47. Stellrecht CM, Phillip CJ, Cervantes-Gomez F, Gandhi V. (2007). Multiple myeloma cell killing by depletion of the MET receptor tyrosine kinase. Cancer Res. 67: 9913-9920.
- 48. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. Nat Rev Drug Discov 7: 504-516.
- 49. Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Dos Santos F, Vidal A, Maynadié M, Hermouet S. (2008). Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxurea therapy. Haematologica 93: 1723-1727.
- 50. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, et al. (2006). High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. Blood 108: 2037-2040.
- 51. Radaeva S, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Fan S, Cai H, Strom S, Liu Y, El-Assal O, Gao B. (2002). Interferon-alpha activates multiple STAT signals and down-regulates c-Met in primary human hepatocytes. Gastroenterology 122: 1020-1034.
- 52. Aman MJ, Bug G, Aulitzky WE, Huber C, Peschel C. (1996). Inhibition of interleukin-11 by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells. Exp Hematol 24: 863-867.
- 53. Jenkins BJ, Roberts AW, Najdovska M, Grail D, Ernst M. (2005). The threshold of gp130dependent STAT3 signalling is critical for normal regulation of hematopoiesis. Blood 105: 3512-3520.
- Jenkins BJ, Roberts AW, Greenhill CJ, Najdovska M, Lundgren-May T, Robb L, Grail D, Ernst M. (2007). Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis. Blood 109: 2380-2388.
- 55. Coppo P, Dusanter-Fourt I, Vainchenker W, Turhan AG. (2009). BCR-ABL induces opposite phenotypes in murine ES cells according to STAT3 activation levels. Cell Signal 21: 52-60.



Boissinot et al. Figure 1

Legend Figure 1: Cytokine secretion by BMMSC of SE and PV patients.

Adherent BM mononuclear cells (BMMC) were grown *in vitro* for 12 days weeks in RPMI and 10% foetal bovine serum (BMMSC), then scraped and pelleted for mRNA studies, or stimulated with HGF for 24 hrs or IL-11 for 48 hrs, prior to culture supernatant collection for IL-11, TIMP-1, IL-6 and IL-8 ELISA assays (see Methods). A: IL-11 secretion by BMMSC cells of a PV patient, after exposure to HGF (10 ng/ml) for 24 hrs; B: TIMP-1 secretion by BMMSC cells of a PV patient, after exposure to HGF (30 ng/ml) for 24 hrs; C: IL-8 secretion by PV (n=4), IE (n=2) and SE (n=9) BMMSC cells exposed to IL-11 (10 ng/ml) for 48 hrs;. D: IL-6 secretion by PV (n=4), IE (n=2) and SE (n=9) BMMSC cells exposed to IL-11 (10 ng/ml) for 48 hrs. C, D: horizontal bars represent median values. Differences in cytokine production are significant (p<0.05, Mann-Whitney's rank sum test).



Boissinot et al. Figure 2

Legend Figure 2: IL-11, IL-6 and HGF mRNA expression in purified cells of PV and SE patients.

mRNA expression levels of IL-11, IL-6 and HGF were studied using RT-qPCRs in purified cells isolated from BM of PV and SE patients (see Methods). Data shown are means of at least 3 determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used to analyse data; *p*<0.05 was statistically significant. **A**: BMMSC; **B**: purified CD3+ lymphocytes; **C**: purified CD34+ cell progenitors; **D**: purified GPA+ erythroblasts. Note the change of scale between BMMSC and the other cells types.



Boissinot et al. Figure 3

Legend Figure 3: *In vitro* effects of neutralizing anti-c-MET and anti-IL-11 antibodies on *JAK2*-V617F-mutated erythroid cells.

Viable cells excluding trypan blue were enumerated in triplicate before and after a 24 hr-incubation without Ab or with anti-c-MET, anti-IL-11 or anti-IL-8 Ab (used as a control Ab) (2 µg/ml each). **A.** HEL cells (100% *JAK2*V617F) kept in RPMI medium and FCS. **B.** GPA+ erythroblasts purified from frozen BMMC of four *JAK2*V617F positive PV patients (Na84, Na101, Na51, Na187, with 91%, 37%, 98% and 95% *JAK2*V617F, respectively) and kept in IMDM and FCS without Epo. Data shown are means <u>+</u> SD of 3 independent cultures. (*) *p*<0.05 compared to culture with control anti-IL-8 Ab (Student-*t* test).



Boissinot et al. Figure 4

Legend Figure 4: Effect of *JAK2* siRNA on IL-11, IL-6 and HGF mRNA expression in HEL cells.

5.10⁴ HEL cells were treated without, or with 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² or 10⁻¹ μ M of human *JAK2* siRNA, then mRNA levels of JAK2, IL-6, IL-11, HGF, and RPLP0 were quantified using RT-qPCRs (see Methods) and expressed as copies/1000 RPLP0 mRNA copies. Data shown are means of at least 2 determinations; these experiments were repeated twice, with similar results. Student's *t*-test was used to analyse data; *p*<0.05 was statistically significant. **A**: JAK2

mRNA levels; **B**: IL-6 levels; **C**: IL-11 mRNA levels; **D**: HGF mRNA levels (note the change of scales). (*) p value < 0.05, compared to the control and $10^{-4} \mu$ M conditions.



Boissinot et al. Figure 5

Legend Figure 5: Effect of *JAK2*-V617F on HGF, IL-11 and IL-6 mRNA expression.

The effect of *JAK2*-V617F on the mRNA expression of IL-11, IL-6 and HGF was studied in transient transfections of murine BaF-3/EPO-R cells. **A.** Western blotting analyses of the expression of wild type and V617F-mutated JAK2 in BaF-3/EPO-R cells, and effects on the tyrosine phosphorylation of JAK2, STAT5 and STAT3. **B.** mRNA levels of murine IL-11 and IL-6 studied using quantitative RT-PCRs in BaF-3/EPo-R cells transiently transfected with empty vector, wild type or V617F-mutated human JAK2; another mutant, L611V/V617F was also tested, as control. Data are expressed as number of copies of murine IL-11 and IL-6 per 1000 copies of murine RPLP0. HGF mRNA was not detected in BaF-3/EPo-R cells. Data shown are means of at least 3 determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used for data analysis; *p*<0.05 was statistically significant.



Boissinot et al. Figure 6

Legend Figure 6: Model for interactions between HGF, IL-11 and IL-6 in the bone marrow of PV patients: effects on the STAT3 pathway.

In PV erythroblasts, the JAK2 (WT or V617F)/STAT5 pathway is activated mainly via Epo and Epo-R. HGF and IL-11 are produced at high levels by BMMSC (HGF) and by GPA+ erythroblasts (IL-11). IL-11 being induced by HGF, the two cytokines act in cascade as autocrine and paracrine factors that activate the JAK2/STAT3 pathway. Activation of STAT3 via HGF and IL-11, which appears to be independent of *JAK2*V617F, contributes to the abnormal proliferation of clonal myeloid progenitors in PV since blocking the c-MET/HGF /IL-11 pathways inhibit the growth of *JAK2*V617F-mutated erythroid cells.

Table 1: Cytokine levels in serum, BM plasma and BMMSC supernatants of patients with polycythemia.

000 BMMSC/48 hrs)	IE PV	5 12	7 ± 3.3 13.0 ^{*a} ± 15.1	5 12	8 ± 4.8 $26.5^{*a} \pm 31.8$	4	2 ± 31.7 74.7 ± 87.3		ND ND	11	ND 17 ± 22	1	2900 Z900	6	ND 700 ± 500		11	
BMMSC (pg/10	SE	14	2.2 ± 2.1 3.0	13) 4.4 <u>+</u> 4.2 4.5	6	59.2 ± 66.4 46.1		ND	6	5 8 + 5	ς	800 ± 500	5	700 ± 300		ى.	
jg/ml)	ΡV	26	$8.4^{*^3} \pm 13.3$	23	9 $3665^{*a} \pm 5040$	10	$0 6259 \pm 13057$	6	488 ± 95.3	26	$7929^{*a} \pm 4786$	13	7083 ± 5201	26	$102200^{*a} \pm$	77360	26	
BM PLASMA (J	E	12	3.4 ± 8.2	12	5 1599 \pm 1619	~	3 6799 \pm 1218	2	635 ± 77		4 ND		1 ND		DN			
	SE	25	1.0 ± 4.4	26	$18 770 \pm 1195$	11	2275 ± 312	10	570 ± 206	26	71 4438 \pm 454	25	7125 ± 223	26	$58520 \pm$	39800	26	
(P	ΡV	32	99.1 ± 443	31	52 2566* ^b \pm 45.	13	166 ± 473	10	643 ± 131	49	$5176^{*a} \pm 307$	17	$\frac{11153^{*a}}{3053}$	33	$125990 \pm$	78660	33	
SERUM (pg/m	IE	10	2.1 ± 4.8	10	$1457^{*b} \pm 306$	9	5.9 ± 6.1	4	699 ± 225		ND		R S		Ð			
	SE	20	0.5 ± 2.4	17	$1196^{*b} \pm 2311$	6	25.6 ± 72.2	~	651 ± 170	34	1765 ± 987	31	17368 ± 10676	32	$109470 \pm$	134570	32	
	H	Nbr	Mean \pm SD	Nbr	$Mean \pm SD$	Nbr	Mean \pm SD	Nbr	Mean \pm SD	Nbr	$Mean \pm SD$	Nbr) Mean \pm SD	Nbr	Mean \pm SD		Nbr	
	CYTOKI	11	11-71		IIL-8	УШ	0-71	3U0	J)C		HGF	Lontin	(men only		TIMP-1			

For each patient, cytokine values were averages of duplicate or triplicate measures. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) of cytokine values of groups of patients. Nbr: number of patients tested. For healthy donors (HD), cytokine values in serum were, respectively: IL-11, 0-5 pg/ml; IL-8, 0-20 pg/ml; IL-6, 0-12 pg/ml; SCF, 550-1440 pg/ml; HGF, 663-1283 pg/ml; leptin (men), 2200-7800 pg/ml; TIMP-1, 259000-661000 pg/ml; MCP-1, 109-139 pg/ml. BM plasma values for healthy donors were not defined and SE values were used as controls. Because only 3 SE patients were female, PV and SE leptin levels were compared only for male patients. Serum leptin levels of female PV patients (22061 \pm 15321 pg/ml) tended to be higher than to those of female healthy donors (10000 \pm 7300 pg/ml) but differences were not significant. (*^a) p < 0.05 compared to SE; (*^b) p < 0.05 compared to healthy donors, Mann-Whitney's rank sum test. ND: not done.

]	mRNA copies / 1000 F	RPLP0 mRNA copies	
	SE erythroblasts	PV erythroblasts	HEL	UKE-1
HGF	19 <u>+</u> 15	151* <u>+</u> 66	2861 <u>+</u> 308	23 <u>+</u> 0
c-MET	327 <u>+</u> 338	383 <u>+</u> 442	585 <u>+</u> 164	0
IL-11	16 + 20	107*+85	615 + 60	10 + 0
IL-6	60 <u>+</u> 63	172 ± 121	744 <u>+</u> 254	21 ± 0
gp130	36 <u>+</u> 27	90* <u>+</u> 49	154 <u>+</u> 18	156 <u>+</u> 39
STAT3	78 <u>+</u> 45	538* <u>+</u> 310	1513 <u> </u> 996	457 <u>+</u> 70
STAT5	1061 <u>+</u> 1211	2470 ± 3014	572 <u>+</u> 99	76 <u>+</u> 13
JAK2 status	wild type	60% V617F (mean)	100% V617F	100% V617F

Table 2: Analysis of mRNA levels of HGF, IL-11, IL-6 and signaling molecules in erythroid cells according to JAK2 status.

* p<0.05 compared to SE, Mann-Whitney test

		Serum HGF (p	g/ml)
	Nbr of patients	Mean <u>+</u> SD	Patients with > 3500 pg/ml HGF (%)
PV with > 50% <i>JAK</i> 2V617Γ	27	6120 <u>+</u> 3308	22/27 (81%)
PV with 26-50% JAK2V617F	10	3712 ± 2034^{a}	4/10 (40%)
PV with 1-25% JAK2V617F	12	$3314 \pm 1501^{b,c}$	6/12 (50%)
ET with 1-25% JAK2V617F	5	3236 <u>+</u> 1556 ^d	3/5 (60%)
ET negative for JAK2V617F	10	1546 <u>+</u> 1032	1/10 (10%)
SE	34	1765 <u>+</u> 987	1/34 (3%)
Healthy donors	nd	Range: 663-1283	0 (0%)

Table 3: HGF levels in serum in relation to the presence and allelic burdenof JAK2V617F.

- a) Significantly different than PV with > 50% *JAK2*V617F, p = 0.028.
- b) Significantly different than PV with > 50% *JAK2*V617F, p = 0.0065.
- c) Similar to PV with 26-50% *JAK2*V617F, p = 0.340.
- d) Significantly different than *JAK2*V617F-negative ET, p = 0.042.

The Mann-Whitney test was used to compare data from the different groups of patients.

SERUM





Boissinot et al. Supplementary Figure 1

Legend Supplementary Figure 1: Analysis of cytokines present in pools of serum and BM plasma of SE and PV patients using cytokine arrays.

Human Cytokine Array VI and VII (Raybiotech, Inc.) containing each 60 cytokines and growth factors, in duplicate spots (see list in Annex 1) were used following the manufacturer's instructions to screen the same volume of pooled serum obtained from healthy donors, SE or PV patients, as well as pooled BM plasma from SE and PV patients. Molecules giving a stronger signal - over-expressed - in SE compared to healthy donors, or in PV compared to SE, are encircled and indicated on right side of the blots.

H. donors = healthy donors.



B





One way ANOVA statistical test								
Tukey's Multiple Comparison Test	Significant? 0.05?	P < Summary						
0 vs 10-4	Yes	***						
0 vs 10-3	Yes	***						
0 vs 10-2	Yes	***						
10-4 vs 10-3	No	ns						
10-4 vs 10-2	Yes	***						
10-3 vs 10-2	Yes	**						



Boissinot et al. Supplementary Figure 2

Legend Supplementary Figure 2: Functional consequences of the invalidation of *JAK2*V617F in HEL cells using anti-*JAK2* siRNA.

 5.10^4 HEL cells were incubated without, or with 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} or 10^{-1} µM of human *JAK2* siRNA for 72 hours (see Methods) and JAK2, IL-6, IL-11, HGF, and RPLP0 mRNA levels were quantified using RT-qPCR and immunoblotting assays.

A: Decrease in JAK2 and β -actin protein levels depending to the quantity of anti-*JAK2* siRNA used; the percentages of JAK2 inhibition are shown.

B: Reduced proliferation of HEL cells, as measured by the XTT assay, after a 72 hrincubation with anti-*JAK2* siRNA used at different doses. The data shown are means \pm SD of three measures.

C: No significant effect on protein levels of HGF and IL-6, measured by ELISA in culture supernatants of HEL cells, after a 72 hr-incubation with 10^{-3} and $10^{-2} \mu$ M of anti-*JAK2* siRNA. The data shown are means \pm SD of at least three measures. In these experiments, where the number of HEL cells per well was limited (5x10⁴) for optimal anti-*JAK2* siRNA efficacy, IL-11 was below the detection level of ELISAs and could not be measured in culture supernatants. In other assays where cells had been seeded at $\geq 10^{6}$ /well (inappropriate conditions for siRNA experiments), up to 350 pg/ml/24 hrs of IL-11 protein were detected in HEL supernatants.

Array VI													
SOG	POS	NEG	NEG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	t-dWB	BMP-6	CK 38-1	CNTF	EGF	Eotaxin
SOd	POS	NEG	NEG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	P-4MB	BMP-6	CK 38-1	CNTF	EGF	Eotaxin
Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN- γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN- γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	L-1α	IL-1ß	IL-1ra	IL-2	IL-3	1L-4	IL-5	IL-6	IL-7
IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-18	MIP-30	NAP-2	NT-3	PARC
Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	SIM	MIP-18	MIP-300	NAP-2	NT-3	PARC
PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-81	TGF-B3	TNF-α	₽-JNT	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-81	TGF-B3	TNF-α	₹UF-8	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
Array VII													
POS	POS	NEG	NEG	Blank	Acrp30	AgRP	Angiopoletin-2	Amphiregulin	Ax	bFGF	b-NGF	BTC	CCL-28
POS	POS	NEG	NEG	Blank	Acrp30	AgRP	Angiopoietin-2	Amphiregulin	AX	bFGF	b-NGF	BTC	CCL-28
CTACK	Dtk	EGF-R	ENA-78	Fas/TNFRSF6	FGF-4	FGF-9	GCSF	GITR-Ligand	GITR	GRO	GRO-01	HCC-4	HGF
CTACK	Dtk	EGF-R	ENA-78	Fas/TNFRSF6	FGF-4	FGF-9	GCSF	GITR-Ligand	GITR	GRO	GRO-∞	HCC-4	HGF
ICAM-1	ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 R α	IL-6 R	IL-8
ICAM-1	ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ro	IL-6 R	IL-8
I-TAC	Lymphotactin	MIF	MIP-1α	MIP-1B	MIP-3B	MSP-00	NT-4	Osteoprotegerin	Oncostatin	M PIGF	sgp130	STNF RII	sTNF-RI

Supplementary Table 1: Human Cytokine Antibody Arrays: List of the molecules

tested.

POS POS

<mark>sTNF RII</mark> Blank Blank

<mark>sgp130</mark> Blank Blank

M PIGF Blank Blank

<mark>Oncostatin</mark> Blank Blank

Osteoprotege VEGF-D VEGF-D

> VEGF VEGF

<mark>MSP-0.</mark> uPAR uPAR

<mark>MIP-3β</mark> Trail R4 Trail R4

<mark>MIP-1β</mark> TRAIL R3 TRAIL R3

MIP-1α Thrombopoietin Thrombopoietin

MIF TIMP-2 TIMP-2

Lymphotactin TIMP-1 TIMP-1

È

aerin

Supplementary Table 2: Primers and probes used for human and murine RTqPCR assays.

> Human IL-11: Amplicon: 99 bp Forward primer 5'-AACTGTGTTTGCCGCCTGGT-3' Reverse primer 5'-GGTCTGGGGGAAACTCGAGGG-3' 5'-TGAGCCTGTGGGCCAGATACA-3' Probe Human IL-6: Amplicon: 124 bp 5'-CCAGTACCCCCAGGAGAAGATTCC-3' Forward prime r Reverse primer 5'-CCTTTCTCAGGGCTGAGATGCC-3 5'-CAGACAGCCACTCACCTCTTCAG-3' Probe Human HGF: Amplicon: 93 bp 5'-CCGTCCAGCAGCACCATGT-3' Forward primer Reverse primer 5'-GATGGCGATGGGGAGCAG-3' Probe 5'-ACCAAACTCCTGCCAGCCC-3' Human TIMP-1 : Amplicon 126 bp Forward primer 5' CCA-CAG-ACG-GCC-TTC-TGC-AAT-T 3' Reverse primer 5' AAC-CGG-ATG-TCA-GCG-GCA-TC 3' 5' CCT-CGT-CAT-CAG-GGC-CAA-GTT-C 3' Probe Human ß-actin: Amplicon: 128 bp Forward primer 5'-GATGCAGAACGAGATCACTGCCC-3' Reverse primer 5'-TCTGCTGGAAGGTGGACAGC-3' 5'-AAGATCAAGGTCATTGCTCCTCCT-3' Probe Human RPLP0 : Amplicon 102 bp Forward primer 5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACTGG-3' Reverse primer 5'-GGACACCAGCCCAAAGGAGA-3' Probe 5'-GACAAAGTGGGAGCCAGCG-3' Human c-MET : Amplicon 125 bp Forward primer 5'- CCAGCTTGCTAGACAAATAGGAGCCA-3' Reverse primer 5'- GATAGGGAATGCACACATGGCAGATC-3 5'- TTT CGGGGTGTTCGCACAAAGC-3' Probe Human STAT5 : Amplicon 130 bp common to alpha and beta forms 5'- AGAAGCACCAGAAGACCCTGCA-3' Forward primer 5'- CAGGACTGTAGCACGTCCAGG-3' Reverse primer 5'- CGAGCTGATCCAGTGGAAGCG-3' Probe Human STAT3 : Amplicon 128 bp common to alpha and beta forms Forward primer 5'- CTTTTTTACCAAGCCCCCAATTGGAACC-3' Reverse primer 5'- ACCCTGAATAATTCACACCAGGTCCC-3' Probe 5'- TGAGCTGGCAGTTCTCCTCCA C-3' Human gp 130 : Amplicon 102 bp common to variant forms Forward primer 5'-GGGAAGAAAATGAGG TGTGAGTGGGATG-3' Reverse primer 5'-GGCAACACACAAGTTTGCTGATTGCAAA-3' Probe 5'-GGAAGGGAAACACACTTGGAGACAAACT-3' Murine IL-11 : Amplicon 140 bp Forward primer 5'-TGGTGTGCTGACAAGGCTTCG-3' Reverse primer 5'-GTAGCCGTTCCAGTCGGCTTG-3' Probe 5'-GTAGACTTGATGTCCTACCTCCGGCAT3' Murine HGF : Amplicon 123 bp Forward primer 5'-CAGCGTTGGGATTCGCAGTAC-3' Revserse primer 5'-TGGTAAAACACCATGGTGATTCAGCC-3' Probe 5'-TCACTCCCGAGAACTTCAAATGCAA-3' Murine IL-6 : Amplicon 106 bp Forward primer 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAGAGG-3' Reverse primer 5'-GCTCATTTCCACGATTTCCCAGAGAAC-3' Probe 5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTAATTACAC-3' Murine RPLP0 : Amplicon 120 bp Forward primer 5'-CTGATAAAGACTGGAGACAAGGTGGGAG-3' Reverse primer 5'-TGCCGTTGTCAAACACCTGCTG-3 5'-GCTGAACATGCTGAACATCTCCCC-3' Sonde

Supplementary Table 3: Correlations between mRNA levels of cytokines and signaling molecules.

Correlat	ions between mRNA levels (copies	s/1000 RPLP0 copies)
Cell Type	PV	SE
	HGF/IL-11 n= 5 r= 1 p= 0.017	HGF/IL-11 n= 5 r= 1 p= 0.017
	IL-11/IL-6 n= 5 r= 1 p= 0.017	IL-11/IL-6 n= 5 r= 1 p= 0.017
GPA+ erythroblasts	HGF/IL-6 n= 5 r= 1 p= 0.017	HGF/IL-6 n= 5 r= 1 p= 0.017
er y thi oblasts	HGF/c-MET n=6 r= 0.88 p= 0.03	HGF/c-MET $n=5 r=1 p=0.017$
	HGF/STAT5 n= 6 r= 0.94 p= 0.017	HGF/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0.017
	IL-11/STAT5 n= 5 r= 0.9 p= 0.08	IL-11/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0.017
	IL-6/STAT5 n = 6 = 0.88 = 0.02	IL-6/STAT5 n=5 r= 1 n= 0.017
	$\frac{1-0.1-0.88 \text{ p}-0.05}{\text{gp}130/\text{STAT5}}$ $n=5 \text{ r}=1 \text{ p}=0.017$	$\frac{11-51-1}{\text{gp130/STAT5}}$ $n=5 \text{ r}=1 \text{ p}=0.017$

C. Commentaires

Dans cette étude, nous montrons que les cellules stromales et les érythroblastes de patients atteints de PV surproduisent des cytokines anti-inflammatoires, HGF et IL-11. L'HGF induit la production de l'IL-11, et toutes deux activent les voies de signalisation impliquant le facteur de transcription STAT3.

Suite à l'utilisation d'anticorps bloquants spécifiques de l'IL-11, ou de c-Met (récepteur de l'HGF), la pousse *in vitro* d'érythroblastes positifs pour la mutation JAK2V617F, ainsi que celle de cellules HEL, a été inhibée de 40%. Ces cellules, positives pour la mutation JAK2V617F, dépendent donc de l'HGF et de l'IL-11 pour leur pousse.

Nous rapportons également une augmentation de l'expression de la gp130 et de STAT3 dans les érythroblastes de PV. Les taux d'expression de c-Met, HGF et de l'IL-11 ont été trouvés corrélés, cependant aucun lien n'a pu être établi avec le taux d'expression de JAK2V617F. Enfin, nous montrons que la surproduction d'HGF et d'IL-11 n'est pas une conséquence de la présence de la mutation JAK2V617F.

Les cytokines anti-inflammatoires HGF et IL-11 sont donc surproduites dans la PV. Ces cytokines contribuent à la pousse des progéniteurs érythroïdes porteurs de la mutation V617F, sans pour autant en être la conséquence. Les voies de signalisation induites par ces deux cytokines, utilisant principalement le facteur de transcription STAT3, jouent donc un rôle important dans la prolifération clonale des cellules mutées sur JAK2. Cependant, les causes de cette dérégulation ne sont pas encore élucidées. Parmi les causes possibles, on peut citer la mutation éventuelle de récepteurs c-Met ou gp130, des promoteurs des gènes codant pour ces cytokines, ou encore d'autres molécules conduisant à l'activation de STAT3.

Discussion

Les mutations du gène JAK2 sont retrouvées chez la grande majorité des patients atteints de SMP, principalement dans la PV. Il s'agit essentiellement de la mutation V617F portée par l'exon 14 du gène, les autres mutations de l'exon 14, ou de l'exon 12, de JAK2 étant beaucoup plus rares.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux conséquences de ces mutations sur la fonction de la protéine JAK2, et à leurs implications dans la pathogénèse des SMP. Dans un premier temps, nous avons décrit une nouvelle mutation de JAK2 présente en *cis* avec la mutation V617F. Cette double mutation a des conséquences sur la fonction de JAK2 qui sont différentes de celles provoquées par la mutation V617F. On retrouve ainsi une activation de la voie JAK2/AKT, préférentiellement à la voie JAK2/STAT5. La présentation clinique des patientes porteuses de cette double mutation est elle aussi différente d'un phénotype de PV classique, avec une érythrocytose pure et des taux de leucocytes et de plaquettes normaux, soit une présentation clinique moins grave et plus stable que dans les PV classiques. Nous avons pu mettre en évidence que les mutations sur le gène JAK2 étaient le fait de plusieurs événements génétiques distincts. De plus, ces mutations multiples de JAK2 ne semblent pas liées à la seule présence de l'haplotype 46/1 (récemment décrit comme prédisposant aux mutations du gène JAK2 sur le même allèle), car une des patientes porteuse d'au moins deux clones distincts ne possède pas cet haplotype. Enfin, ce travail nous a permis de montrer que la présence de mutations sur le gène JAK2 n'assurait pas nécessairement la prédominance du clone muté, et que les taux des différents mutants restaient stables dans le temps.

Le rôle de JAK2 dans la signalisation cellulaire, plus précisément *via* son association avec le récepteur Mpl, a aussi été étudié. Nous montrons que la présence de la forme sauvage de JAK2 est nécessaire à une expression normale du récepteur Mpl. Nous avons rapporté l'existence de quatre profils d'expression de Mpl dans les SMP : (1) profil normal avec expression équivalente des deux isoformes (74 et 84 kDa) de Mpl ; (2) profil avec expression de la forme mature uniquement ; (3) profil avec expression de la forme immature uniquement ; (4) absence d'expression de Mpl. Nous avons également montré des variations de l'expression de JAK2, ces variations étant directement reliées aux différents profils d'expression de Mpl. Ainsi, un taux élevé de la forme sauvage de JAK2 est associé à la présence de la forme mature de Mpl, et inversement, un faible taux de la forme sauvage de JAK2 est associé à la présence

majoritaire de la forme immature du récepteur, voire à l'absence d'expression de celuici. Il est à noter qu'aucune corrélation n'a pu être trouvée entre ces différents paramètres et la présence de la mutation JAK2V617F, quel que soit le niveau d'expression. Enfin, l'expression de JAK2 varie dans les SMP, les causes de ces variations ne sont pas connues et les identifier permettrait de mieux comprendre la pathogénèse des SMP, eu égard à l'importance de la signalisation induite par le récepteur Mpl dans les progéniteurs hématopoïétiques et au lien établi entre son expression normale et le taux de forme sauvage de JAK2.

La présence de mutations sur le gène JAK2 ne semble pas être suffisante pour l'expansion des clones mutés. Cependant, JAK2 joue un rôle prépondérant dans la signalisation cellulaire induite par les cytokines hématopoïétiques, dont la dérégulation a été montrée dans les SMP par de nombreuses études, notamment pour des cytokines anti-inflammatoires. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons donc recherché et trouvé des cytokines anti-inflammatoires dont la production était dérégulée dans les SMP. Les cytokines identifiées, HGF et IL-11, agissent en cascade et induisent une signalisation cellulaire *via* la voie JAK2/STAT3. Nous avons montré que ces cytokines étaient surproduites par des érythroblastes porteurs de la mutation JAK2V617F et qu'elles étaient nécessaires à leur prolifération clonale. Cependant, nous avons également montré que cette dérégulation n'était pas une conséquence de la présence de la mutation JAK2V617F, mais plutôt la réponse de la cellule à une dérégulation plus importante encore.

La discussion s'articulera donc en trois parties :

 Dans un premier temps nous nous intéresserons aux mutations du gène JAK2 et à leurs conséquences sur la fonction de la protéine, ainsi que sur l'expansion des clones mutés.

2) Puis, nous discuterons de l'importance de JAK2 pour l'expression du récepteur Mpl, tant au niveau de sa maturation, que de son export à la membrane et que de son recyclage.

3) Enfin, le rôle des cytokines et de leur régulation dans les SMP sera abordé, en faisant le lien avec la protéine JAK2.

I. Les mutations de JAK2

Des cas de patients présentant plusieurs mutations sur le gène JAK2 sont rapportés régulièrement (Li, Kralovics et al. 2008). Ces mutations peuvent être portées par un, ou plusieurs, clone(s) distinct(s). Nous rapportons également ici un cas de double mutation du gène JAK2 : L611V/V617F en tandem, avec la présence de clones simples et doubles mutants.

Ceci implique que les mutations sur ce gène peuvent survenir plusieurs fois sur le même allèle d'un clone déjà muté, ou dans un autre progéniteur hématopoïétique. Les modèles pathogéniques découlant de ces observations sont alors différents. Pour expliquer l'apparition de plusieurs clones mutés sur le gène JAK2, il faut envisager la présence d'une prédisposition génétique. A l'inverse des mutations de JAK2, qui sont très majoritairement acquises, cette prédisposition serait transmissible. Des pistes ont commencé à être apportées dans ce sens avec la découverte de l'haplotype 46/1, qui prédispose à l'acquisition de mutations de JAK2 sur le même allèle. Cependant, cet haplotype ne permet pas d'expliquer la totalité des cas de SMP, et encore moins la totalité des cas de SMP présentant des mutations sur le gène JAK2. Il existe donc un autre événement, ou une prédisposition, qui dans certaines circonstances conduit à l'apparition de mutations sur JAK2. Pour être complet, le modèle pathogénétique doit également faire mention des autres anomalies détectées dans les SMP, notamment les mutations sur le gène TET2 et la délétion du chromosome 20q, cependant des études montrent que ces événements peuvent survenir avant ou après l'apparition des mutations JAK2, ce qui complique encore le modèle et qui est en faveur d'une instabilité génétique plus générale.

Outre les conséquences sur le modèle pathogénétique des SMP, les mutations sur le gène JAK2 ont également des conséquences sur la fonction de la protéine. La présence de la mutation V617F induit une activation constitutive de la kinase, qui est généralement expliquée par la localisation de cette mutation. Elle se situe dans le domaine pseudo-kinase (JH1) de la protéine, dont le rôle est d'exercer une autoinhibition sur le domaine à activité catalytique (JH2). Cette activation se traduit par une phosphorylation plus importante de la forme mutée par rapport à la forme sauvage de JAK2.

Suite à la découverte, puis à la caractérisation, de la double mutation L611V/V617F, nous avons remarqué que les deux mutations agissaient en synergie et permettaient une activation constitutive de la protéine bien supérieure à celle obtenue avec la mutation V617F seule. Nous avons donc souhaité comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'activation de la protéine JAK2 en utilisant la modélisation moléculaire. Nous avons par ce fait apporté des explications sur l'activation constitutive de la protéine JAK2 portant la mutation V617F.

A. Modélisation moléculaire

La mutation V617F se caractérise par le changement de la valine en position 617 par une phénylalanine. Ce changement permet d'introduire un cycle aromatique (porté par la phénylalanine) en position 617 (**Figure 27**), c'est-à-dire dans le domaine JH2 de régulation de l'activité catalytique de la protéine.



Valine

Phénylalanine

Figure 27 : Structure de la L-valine et de la L-phénylalanine

Le modèle utilisé, réalisé à partir de celui de (Lindauer, Loerting et al. 2001), permet de représenter les domaines JH1 et JH2 de JAK2. La position 617 est une position stratégique, puisque qu'elle se trouve à l'interface entre ces deux domaines, au niveau de la boucle d'activation de la kinase (**Figure 28, A**). Grâce à la réalisation de calcul d'énergie totale, nous avons pu comparer la stabilité de la forme sauvage et mutée V617F de JAK2, dans leur conformation active et inactive (**Tableau 3**).
JAK2-J	H1JH2 model	Etotal	E _{JH1}	E _{JH2}	Eintermol
wт	Inactivated form	0	0	0	0
	Activated form	26	31	19	-29
V617F	Inactivated form	0	0	0	0
	Activated form	-40	5	12	-50

Relative energy (kcal.mol-1)

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des calculs d'énergie réalisés par modélisation moléculaire. Les valeurs pour les formes actives de la protéine sont données en se servant de la forme inactive correspondante comme référence (Agnès Quemener)

Il s'avère donc que la forme la conformation la plus stable, c'est-à-dire celle de plus basse énergie, pour la forme sauvage de JAK2 est la conformation inactive (**Figure 28, A et C**), alors que pour la forme mutée V617F, c'est la conformation active qui est la plus stable (**Figure 28, B et D**).



Figure 28 : Représentation de JAK2 sauvage dans sa conformation inactive, la plus stable (A et C) et de JAK2V617F dans sa conformation active, la plus stable (B et D). Images réalisées par Agnès Quemener.

De plus, lorsque l'on regarde plus précisément l'interface entre les deux domaines JH1 et JH2 en conformation active, dans la forme sauvage et dans la forme mutée V617F (Figure 29), on remarque qu'il y a une stabilisation de la conformation active de la forme mutée V617F. Cette stabilisation est due à un effet de "stacking" entre les cycles aromatiques de la phénylalanine 617 et la tyrosine 1008 qui favorise le maintient de la boucle d'activation (représentée en jaune) en position activée. Cette stabilisation de la forme active n'est pas retrouvée dans la forme sauvage de JAK2. Le résidu F595 joue lui aussi un rôle dans la stabilisation de cette forme mutée (non montré ici) et est indispensable à l'activation constitutive de JAK2V617F (Dusa, Mouton et al. 2010).



Figure 29 : Représentation de la forme sauvage (A) et mutée V617F (B) de JAK2 en conformation active

La stabilité plus importante de la forme active, par rapport à la forme inactive, de JAK2V617F corrèle tout à fait avec son activation constitutive et son hypersensibilité aux cytokines. Ainsi, en présence d'une très faible quantité de cytokines, voire en l'absence de cytokines, JAK2V617F va se trouver naturellement en position active et va y rester, induisant une signalisation cellulaire anormale et non régulée.

Dans le cas de la forme sauvage de JAK2, après avoir été activée par le changement de conformation du récepteur auquel elle est associée, la kinase va avoir naturellement tendance à retourner dans sa conformation inactive et donc va stopper l'induction de signal au niveau intracellulaire. Ces observations ont été corroborées par d'autres études (Lee, Ma et al. 2009).

La réalisation de ce modèle avait également pour objectif de comprendre l'effet synergique sur l'activation de JAK2 observé entres les mutations L611V et V617F. A ce jour, nous n'avons pas pu expliquer formellement cet effet. Toutefois, il semblerait que le changement de la leucine par une valine (qui compte un CH2 en moins) en position 611, soit six acides aminés seulement avant la mutation V617F, réduirait les contraintes stériques exercées sur le résidus 617. L'effet serait alors une plus grande efficacité de la stabilisation de la forme active par "stacking", du fait de contraintes stériques plus faibles, ce qui correspond aux observations réalisées *in vitro*.

Les modèles informatiques sont de plus en plus utilisés pour prédire de nouveaux sites d'intérêt pour la recherche de mutations, en ciblant des zones stratégiques des protéines étudiées. Elle peut également aider à imaginer de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Cependant, dès lors qu'il s'agit d'un modèle, les résultats obtenus doivent être validés par l'expérience, voire servir à comprendre les résultats expérimentaux obtenus. De telles études permettent de mieux comprendre les répercussions fonctionnelles des mutations de JAK2 que l'on peut observer chez les patients SMP (Lee, Ma et al. 2009). Toutefois, ces modèles, tout comme le nôtre, sont basés sur des homologies structurales, et il faudrait obtenir une structure cristallisée complète de JAK2 pour compléter ces modèles et s'approcher au plus près de la structure réelle de cette protéine.

B. Conséquences sur la fonction de JAK2

En attendant de posséder de tels modèles, nous observons des différences fonctionnelles entres les divers mutants de JAK2. Ces différences ne sont pas clairement expliquées, on peut néanmoins formuler plusieurs hypothèses. Le double mutant L611V/V617F, par exemple, active préférentiellement la voie JAK2/AKT, plutôt que la voie classique JAK2/STAT5. Il est possible que la forme mutée de JAK2 s'associe différemment avec ses récepteurs de prédilection, induisant ainsi une phosphorylation anormale du récepteur (nouveaux sites de phosphorylation, hyper- ou hypophosphorylation, ou phosphorylation de récepteurs non dimérisés pour EpoR et Mpl). Il en résulterait la formation de sites de "docking" permettant l'activation d'autres effecteurs cellulaires que ceux activés en conditions normales. Dans ce cas, il y aurait également des répercussions sur les mécanismes de régulations négatives de la signalisation cellulaire agissant au niveau du récepteur activé ou directement sur JAK2.

Pour vérifier ces hypothèses, il faudrait étudier l'association de JAK2 avec les récepteurs dans un environnement lipidique permettant de conserver la conformation native du complexe. Ces études sont très importantes, car, si la partie extracellulaire des récepteurs aux cytokines est très bien caractérisée, presque rien n'est connu de leur structure intracytoplasmique, ni de leur interaction avec les kinases JAKs. On pourrait ainsi mieux comprendre comment fonctionne la transduction de signal et les effets des mutations de JAK2 sur ce processus.

C. Conséquences sur l'expansion des clones porteurs de mutation(s) de JAK2

Dans la première partie des résultats, nous montrons que la présence d'une, ou de plusieurs, mutation(s) sur le gène JAK2 n'assure pas l'expansion du clone porteur, ce qui a également été rapporté dans d'autres études (Li, Kralovics et al. 2008; Lambert, Everington et al. 2009). Chez la patiente Na249, le taux du clone porteur de la mutation V617F seule est d'environ 2%, alors que celui du clone porteur de la double mutation est d'environ 25%. De plus, ces proportions restent stables dans le temps, ce qui indique que l'avantage procuré par la présence de ces mutations n'est pas suffisant pour que ces clones deviennent majoritaires.

On observe aussi des différences de phénotype en fonction des mutations de JAK2. Ainsi, la présence de mutations de l'exon 12, ou de la double mutation L611V/V617F, induit un phénotype de PV caractérisé par une érythrocytose pure et un taux de mutant bas. Il est alors envisageable que la prolifération cellulaire ne soit pas le but premier des mutations de JAK2, mais une conséquence secondaire de l'activation de voies de signalisation promouvant la différenciation et la survie cellulaire.

| 138

La quasi-totalité des patients PV sont porteurs de la mutation V617F de JAK2, lorsque que ce n'est pas le cas alors ils sont porteurs d'autres mutations plus rares de l'exon 12 ou de l'exon 14 du gène. Dans la TE et la MFP, lorsque la mutation V617F n'est pas présente, on peut retrouver des mutations du récepteur Mpl. Il y a donc dans la majorité des cas, activation des voies de signalisation impliquant JAK2. Chez les patients qui ne possèdent pas de mutations identifiées (de JAK2 ou autre), les cellules malignes utilisent aussi ces mêmes voies de signalisation pour se différencier, proliférer et survivre. De façon similaire, on peut observer *in vitro* la pousse endogène de progéniteurs hématopoïétiques exempts de mutations JAK2.

Ces observations suggèrent que les mutations, simples ou multiples, de JAK2 ne semblent pas suffire pour assurer la prolifération des clones mutés, et qu'elles pourraient agir en modifiant d'autres fonctions de JAK2.

Elles semblent apparaître en réponse à un événement, ou à un déséquilibre, majeur survenu précocément dans les progéniteurs hématopoïétiques. Pour compenser cette anomalie probablement létale, les cellules n'auraient alors d'autre choix pour survivre que d'activer fortement les voies de différenciation et de résistance à l'apoptose. Ces mêmes voies facilitent l'expression des cellules clonales mutées.

Une pression maximale existerait donc sur les molécules se trouvant à ces carrefours de signalisation, telles que JAK2 et les récepteurs qui, associés à JAK2, induirait leur activation. Ces modes d'activation peuvent être de différents ordres, comme la survenue de mutation (la mutation V617F étant la plus commune probablement car elle ne demande la mutation que d'une seule base tout en aboutissant à une activation constitutive très importante) sur les différents acteurs de ces voies de signalisation, une expression modifiée des récepteurs, ou encore une dérégulation des molécules de signalisation intracellulaire ou de communication intercellulaire (cytokines). Ces phénomènes peuvent être contemporains, mais pas forcément la conséquence, de la mutation JAK2V617F. Ce dernier point concernant la dérégulation de l'environnement cytokinique sera repris dans le paragraphe dédié.

En conséquence, on observe chez les patients SMP un mélange hétérogène de clones mutés et de cellules apparemment saines.

| 139

II. Relations entre le récepteur Mpl et JAK2

Il existe un lien étroit entre Mpl et JAK2, allant probablement au-delà de la simple association entre un récepteur et sa tyrosine kinase. Le récepteur Mpl est en effet dépourvu d'activité tyrosine kinase et nécessite donc d'être associé avec une protéine possédant cette activité pour pouvoir transduire le signal intracellulaire initié par la fixation de son ligand, la Tpo.

Avant d'être exprimé à la membrane plasmique, Mpl nécessite l'adjonction de glycosylations pour obtenir un récepteur mature et fonctionnel. Ces modifications posttraductionnelles ont lieu dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Dans les cellules normales, on observe un équilibre entre la forme mature et son pendant immature, *i.e.* non glycosylé. Cet équilibre peut être modifié dans certaines pathologies, notamment les SMP. Nous avons ainsi défini, quatre profils d'expression de Mpl chez les patients SMP : (1) profil normal avec expression équivalente des deux isoformes (74 et 84 kDa) de Mpl; (2) profil avec expression de la forme mature uniquement; (3) profil avec expression de la forme immature uniquement; (4) absence d'expression de Mpl.

L'expression de JAK2 est elle aussi modifiée dans les SMP. On observe de grandes variations dans l'expression de cette protéine, qu'il s'agisse de sa forme sauvage ou de sa forme mutée V617F.

Or, Mpl et JAK2 jouent tous deux un rôle important dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, ainsi que dans différentes voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire.

Dans le travail présenté, dans la partie II des résultats, nous avons corrélé le taux d'expression de JAK2 avec les différents profils d'expression de Mpl que nous avions observés précédemment. La présence de la forme mature de Mpl étant clairement reliée à un taux de JAK2 élevé et inversement.

DISCUSSION

JAK2 joue donc un rôle dans la maturation et l'expression normale du récepteur. Ceci implique que l'association entre les deux protéines n'a pas seulement lieu au niveau de la membrane plasmique. La constitution de ce complexe de signalisation semble se faire bien en amont, lors de la maturation de Mpl. Il existe donc une dépendance de Mpl envers JAK2. À ce jour aucun résultat ne semble indiquer que la réciproque soit vraie.

Un autre résultat important de nos travaux est que cette corrélation trouvée entre Mpl et JAK2 ne concerne que la forme sauvage de JAK2, pas sa forme mutée V617F. Il faut donc que la protéine JAK2 ait une conformation, ou une activité biologique, normale, pour pouvoir favoriser la maturation, et probablement dans l'export, de Mpl. Ainsi il semble que la forme mutée V617F de JAK2 ne joue pas, ou joue mal, son rôle dans la maturation de Mpl. On peut également penser que JAK2 intervient dans l'internalisation et le recyclage de Mpl, ce qui constitue un des moyens de régulation de la signalisation induite par ce récepteur, et que JAK2V617F n'assure pas ces fonctions correctement, contribuant ainsi à une signalisation cellulaire anormale et une mauvaise gestion des signaux extracellulaires (comme la Tpo).

D'autre part, l'expression faible, voire l'absence d'expression, de la forme mature de Mpl, n'est pas associée avec un taux élevé de plaquettes. Ceci peut être du à un effet "réducteur du taux de plaquettes" par la présence de la mutation V617F, combiné à un effet "élévateur du taux de plaquettes" de part la réduction de l'expression de Mpl mature à la surface des cellules. Dans ce cas, comme dans la partie précédente, la présence de la mutation V617F ne semble pas être à l'origine de ces dérégulations, mais encore une fois une réponse de la cellule à une anomalie plus importante. L'expression de JAK2, indépendamment de la présence de la mutation V617F, varie dans les SMP, les causes de ces variations ne sont pas connues et peuvent faire l'objet des mêmes interrogations. Il serait donc intéressant de pouvoir observer la localisation subcellulaire de JAK2 pendant les différents stades de la vie de Mpl, ainsi que rechercher la, ou les, cause(s) de la modification de l'expression de JAK2, qui influe directement sur phénotype des cellules touchées.

III.Rôles des cytokines dans les SMP

Les résultats rapportés dans les parties précédentes de ce travail sont en faveur d'un événement précoce qui conduit les progéniteurs hématopoïétiques à modifier leur cycle cellulaire. Pour répondre à ce stress, et le combattre, ils n'ont alors d'autres choix que de fortement activer les voies de signalisation induisant la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire.

Dans la dernière partie de notre étude, nous montrons une dérégulation de la production de plusieurs cytokines liées à l'inflammation dans les érythroblastes de PV. Suite à une première étude qui avait montré une augmentation de la production d'IL-8 et d'IL-11 dans le sérum, le plasma médullaire et le surnageant de culture de cellules stromales de patients atteint de PV ; nous avons mis en évidence une augmentation de la production de la producti de la producti

Ces deux cytokines agissent en cascade et activent le facteur de transcription STAT3. Le taux d'expression de STAT3 est lui aussi augmenté, comme celui de la gp130 (récepteur servant à la signalisation de l'IL-11, notamment), et les taux d'IL-11, d'HGF et de c-Met (récepteur de l'HGF) sont corrélés. On observe donc un ensemble de modifications et de dérégulations qui ont pour objectif d'augmenter la production de cytokines anti-inflammatoires et d'amplifier la réponse cellulaire à ces cytokines.

À l'instar de nos précédents résultats, aucune corrélation n'a pu être établie entre ces différentes dérégulations dans les progéniteurs érythroïdes et la présence de la mutation V617F de JAK2.

Au contraire, nous montrons que la production d'HGF et d'IL-11 dans les érythroblastes se fait indépendamment de la mutation V617F, et que bien que porteurs de cette mutation, les progéniteurs restent dépendants de ces cytokines pour leur croissance. Ces résultats corroborent nos observations sur l'existence de facteurs supplémentaires permettant d'expliquer l'expansion des clones mutés V617F. La présence de cette mutation n'étant, ici encore, pas à l'origine de ces dérégulations, nous ne pouvons que conclure que la mutation V617F est une tentative de défense pour la cellule face à des dérégulations importantes à la fois de son métabolisme interne, mais aussi de son environnement, notamment cytokinique.

D'un point de vue clinique, il faut noter que les anti-JAK2 les plus efficaces, sur la splénomégalie et les symptômes liés à l'inflammation, sont ceux qui sont le moins spécifiques de JAK2. Ainsi, les anti-JAK2 qui diminuent efficacement le taux de cytokines inflammatoires sont ceux qui ciblent aussi JAK1, impliquée dans la production de cytokines inflammatoires. Le ciblage des voies qui implique les cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires présente donc un intérêt majeur pour la mise en place de traitements dans les SMP.

La dérégulation de l'environnement cytokinique autocrine et paracrine des progéniteurs hématopoïétiques semble donc jouer un rôle important dans la pathogénèse des SMP. L'origine de ces altérations n'est pas connue, il peut s'agir d'un phénomène relativement précoce, lui-même cause d'autres désordres ou de mutations postérieurs, ou d'un événement parallèle, simple conséquence de l'adaptation des cellules à JAK2V617F ou à un événement antérieur, silencieux du point de vue phénotypique.

De nombreuses études ont rapporté des modifications de l'expression des cytokines dans les SMP, sans les expliquer. Ces dérégulations peuvent avoir de multiples origines telles que (i) la présence de mutations dans les récepteurs gp130/c-Met ou au niveau des facteurs de transcription comme STAT3 (des études montrent le rôle de STAT3 dans le maintient d'une hématopoïèse normale, une activation anormale de STAT3 par les récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 induit des phénotypes ressemblants aux SMP chez des souris (Jenkins, Roberts et al. 2005; Jenkins, Roberts et al. 2007)), (ii) une régulation défaillante de l'expression des gènes des cytokines concernées (au niveau des promoteurs ou de l'accès à l'ADN du complexe de transcription), (iii) une mauvaise régulation des ARNm et donc de la traduction.

On peut donc penser que la cellule cherche à maintenir un équilibre entre les différentes voies de signalisation qui sont activées soit par la présence de la mutation V617F, soit par un environnement cytokinique anormal qui entretient sa propre dérégulation. Ainsi, nous proposons un schéma avec ces différents éléments dans le but de montrer l'interdépendance de ces voies de signalisation et l'enjeu pour la cellule de maintenir l'équilibre entre les voies STAT5 et STAT3 (Figure 30).



Figure 30 : Proposition de modèle montrant le rôle des cytokines liées à l'inflammation dans la pathogénèse des SMP.

Conclusion générale & **P**erspectives

La pathogénèse des SMP est complexe et reste mal connue. Dans ce travail de thèse nous avons décidé d'aborder les SMP sous différents angles, dans le but d'en comprendre au mieux les mécanismes et de mettre en relief l'implication des mutations de JAK2.

Dans un premier temps, nous avons identifié et caractérisé une nouvelle mutation de l'exon 14 de JAK2. Cette mutation, L611V, est présente en *cis* avec la mutation V617F. La double mutation qui en résulte a des conséquences fonctionnelles différentes de la mutation V617F seule. Diverses mutations peuvent donc activer JAK2 différemment. Nous avons également montré que la présence de mutations de JAK2 ne garantie pas l'expansion des clones mutés.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'expression du récepteur Mpl. L'expression de ce récepteur a été trouvée modifiée, et nous avons identifié quatre profils d'expression, selon la proportion de la forme mature et fonctionnelle de récepteur présente. La présence de la forme mature de Mpl a été corrélée avec le taux de JAK2 sauvage, aucun lien n'a été fait avec sa forme mutée V617F. La réintroduction de JAK2 sauvage a permis de rétablir l'expression de la forme mature de Mpl dans des cellules n'exprimant que la forme mutée V617F de JAK2, ce qui confirme le rôle de JAK2 dans l'expression de ce récepteur. Nous avons également remarqué des variations de l'expression de JAK2 dans les SMP, indépendamment de la présence de la mutation V617F.

Enfin, nous avons mis en évidence une augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires, HGF et IL-11, dans les érythroblastes de patients atteints de PV. Cette augmentation est associée à une augmentation de l'expression de la gp130 et de STAT3. Les érythroblastes porteurs de la mutation V617F sont dépendants de ces cytokines pour leur croissance, cependant leurs dérégulation n'est pas la conséquence de la présence de cette mutation.

A l'instar des résultats obtenus, il apparait que les SMP résultent de dérégulations profondes impliquant les acteurs des grandes voies de signalisation cellulaire, de la maîtrise de, et de la réponse à, l'environnement cytokinique, à la transduction de signal et la régulation de l'expression des gènes. Les résultats obtenus dans ce travail posent de nouvelles questions, et ouvrent de nouvelles pistes de recherche.

Dans un premier temps, il faudrait continuer à identifier et caractériser de nouvelles mutations de JAK2, notamment des doubles mutations. Les conséquences sur la fonction de JAK2, comme celles sur l'expansion des clones porteurs, nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'apparition de ces mutations et leurs répercutions sur le phénotype des patients SMP. Il serait également très intéressant de poursuivre notre projet de modélisation moléculaire en parallèle de ces études fonctionnelles, dans le but d'affiner notre modèle et de proposer des pistes pour expliquer les résultats obtenus *in vitro*.

Un second objectif, directement lié au précédent, serait d'utiliser des techniques d'imagerie, comme la microscopie électronique, qui nous permettrait de mieux appréhender le rôle complexe de JAK2, et plus précisément des ses mutants, dans la signalisation cellulaire, notamment lors de son association avec les récepteurs aux cytokines.

Concernant l'étude de Mpl, un des points clé à élucider est la variation du taux de JAK2 qui est observée dans les SMP. Ce taux d'expression est directement relié à l'expression de Mpl et ce, indépendamment de la présence de la mutation V617F, c'est donc là encore la fonction de JAK2 qui est altérée par un biais différent. L'étude de ce phénomène apporterait d'ailleurs des réponses au-delà de l'étude stricte de Mpl.

Enfin, d'autres investigations sont nécessaires sur la régulation de la production des cytokines liées à l'inflammation, mais aussi sur les récepteurs qui régulent la réponse à ces cytokines. Il s'agit de mécanismes complexes et finement régulés, et dont le fonctionnement anormal reflète un fonctionnement cellulaire aberrant. Le ciblage de ces voies en thérapeutique peut donc avoir un intérêt certain.

Tous ces axes de recherches seraient évidemment avantageusement complétés par la création d'un lien avec une prédisposition génétique, ou un évènement, qui serait capable d'induire des désordres suffisamment importants dans les progéniteurs hématopoïétiques pour provoquer les dérégulations que nous observons.

Références **B**ibliographiques

- Abdel-Wahab, O. and R. Levine (2008). "Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment." <u>Annu. Rev. Med</u>.
- Adamson, J. W., P. J. Fialkow, et al. (1976). "Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease." <u>N Engl J Med</u> **295**(17): 913-916.
- Ahmed, A. and C. C. Chang (2006). "Chronic idiopathic myelofibrosis: clinicopathologic features, pathogenesis, and prognosis." <u>Arch Pathol Lab Med</u> **130**(8): 1133-1143.
- Alexander, W. S. and D. J. Hilton (2004). "The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response." <u>Annu Rev Immunol</u> **22**: 503-529.
- Aman, M. J. and W. J. Leonard (1997). "Cytokine signaling: cytokine-inducible signaling inhibitors." <u>Curr</u> <u>Biol</u> **7**(12): R784-788.
- Axelrad, A. A., D. Eskinazi, et al. (2000). "Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia." <u>Blood</u> 96(10): 3310-3321.
- Azam, M., C. Lee, et al. (1997). "Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing." <u>Immunity</u> **6**(6): 691-701.
- Baggiolini, M. (2000). "Reflections on chemokines." Immunol Rev 177: 5-7.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." <u>Annu Rev Immunol</u> 15: 675-705.
- Bandi, S. R., C. Brandts, et al. (2009). "E3 ligase-defective Cbl mutants lead to a generalized mastocytosis and myeloproliferative disease." <u>Blood</u> **114**(19): 4197-4208.
- Barbui, T. (2004). "The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy, or a combination of both?" <u>Semin Hematol</u> **41**(2 Suppl 3): 15-17.
- Barosi, G. and R. Hoffman (2005). "Idiopathic myelofibrosis." <u>Semin Hematol</u> **42**(4): 248-258.
- Bartley, T. D., J. Bogenberger, et al. (1994). "Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl." <u>Cell</u> **77**(7): 1117-1124.
- Baxter, E. J., L. M. Scott, et al. (2005). "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." Lancet **365**(9464): 1054-1061.
- Baxter, J. E., L. M. Scott, et al. (2005). "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." Lancet **365**: 1054-1061.
- Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **87**(18): 6934-6938.
- Becker, V., M. Schilling, et al. (2010). "Covering a broad dynamic range: information processing at the erythropoietin receptor." <u>Science</u> **328**(5984): 1404-1408.
- Beer, P. A., P. J. Campbell, et al. (2008). "MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort." <u>Blood</u> **112**(1): 141-149.
- Beer, P. A., F. Delhommeau, et al. (2010). "Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutationpositive myeloproliferative neoplasm." <u>Blood</u> **115**(14): 2891-2900.
- Beer, P. A. and A. R. Green (2009). "Pathogenesis and management of essential thrombocythemia." <u>Hematology Am Soc Hematol Educ Program</u>: 621-628.
- Bernardi, M., M. Ruggeri, et al. (2008). "Isolated erythrocytosisin V617F negative patients with JAK2 exon12 mutations : report of a new mutation." <u>Am J Hematol</u>.
- Bhattacharya, S. and C. Schindler (2003). "Regulation of Stat3 nuclear export." <u>J Clin Invest</u> **111**(4): 553-559.
- Bitard, J., S. Daburon, et al. (2003). "Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF." <u>J Biol Chem</u> **278**(18): 16253-16261.
- Bonifacino, J. S. (2002). "Quality control of receptor-kinase signaling complexes." <u>Dev Cell</u> **2**(1): 1-2.
- Border, W. A. and N. A. Noble (1994). "Transforming growth factor beta in tissue fibrosis." <u>N Engl J Med</u> **331**(19): 1286-1292.
- Bork, P., T. Doerks, et al. (1999). "Domains in plexins: links to integrins and transcription factors." <u>Trends</u> <u>Biochem Sci</u> **24**(7): 261-263.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, et al. (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." <u>Science</u> **300**(5628): 2101-2104.
- Bravo, J. and J. K. Heath (2000). "Receptor recognition by gp130 cytokines." EMBO J 19(11): 2399-2411.
- Broudy, V. C., N. L. Lin, et al. (1995). "Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro." <u>Blood</u> **85**(7): 1719-1726.

- Broxmeyer, H. E., S. Cooper, et al. (1996). "Involvement of Interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue." <u>The Journal of experimental medicine</u> **184**(5): 1825-1832.
- Butcher, C. M., U. Hahn, et al. (2007). "Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients." <u>Leukemia</u>.
- Campbell, P. J., E. J. Baxter, et al. (2006). "Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation." <u>Blood</u> **108**(10): 3548-3555.
- Campbell, P. J. and A. R. Green (2006). "The myeloproliferative disorders." <u>N Engl J Med</u> **355**(23): 2452-2466.
- Cantley, L. C. and B. G. Neel (1999). "New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 96(8): 4240-4245.
- Catusse, J., A. Liotard, et al. (2003). "Characterization of the molecular interactions of interleukin-8 (CXCL8), growth related oncogen alpha (CXCL1) and a non-peptide antagonist (SB 225002) with the human CXCR2." <u>Biochem Pharmacol</u> **65**(5): 813-821.
- Cazzola, M. (2007). "Somatic mutations of JAK2 exon12 as a molecular basis of erythrocytosis." <u>Haematologica</u> **92**(12): 1585-1589.
- Cervantes, F. (2007). "Myelofibrosis: biology and treatment options." Eur J Haematol Suppl(68): 13-17.
- Chan, A. M., J. S. Rubin, et al. (1991). "Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript." <u>Science</u> **254**(5036): 1382-1385.
- Cherel, M., M. Sorel, et al. (1995). "Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11." <u>Blood</u> **86**(7): 2534-2540.
- Christensen, J. G., J. Burrows, et al. (2005). "c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention." <u>Cancer Lett</u> **225**(1): 1-26.
- Cioce, V., K. G. Csaky, et al. (1996). "Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity." <u>J Biol Chem</u> **271**(22): 13110-13115.
- Collins, B. M., A. J. McCoy, et al. (2002). "Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex." <u>Cell</u> **109**(4): 523-535.
- Constantinescu, S. N., T. Keren, et al. (2001). "Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **98**(8): 4379-4384.
- Corre-Buscail, I., D. Pineau, et al. (2005). "Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukin-11 and interleukin-8." <u>Exp Hematol</u> **33**(11): 1299-1308.
- Corre, I., D. Pineau, et al. (1999). "Interleukin-8: an autocrine/paracrine growth factor for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factor-1 to promote monocyte-macrophage growth and differentiation." <u>Experimental hematology</u> **27**(1): 28-36.
- Cortelazzo, S., G. Finazzi, et al. (1995). "Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis." <u>N Engl J Med</u> **332**(17): 1132-1136.
- Dameshek, W. (1951). "Some speculations on the myeloproliferative syndromes." <u>Blood</u> 6(4): 372-375.
- Date, K., K. Matsumoto, et al. (1997). "HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor." <u>FEBS Lett</u> **420**(1): 1-6.
- Dawson, M. A., A. J. Bannister, et al. (2009). "JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin." <u>Nature</u> **461**(7265): 819-822.
- de Sauvage, F. J., P. E. Hass, et al. (1994). "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand." <u>Nature</u> **369**(6481): 533-538.
- de Vos, A. M., M. Ultsch, et al. (1992). "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex." <u>Science</u>. **255(5042)**: 306-312.
- Debili, N., F. Wendling, et al. (1995). "The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets." <u>Blood</u> **85**(2): 391-401.
- Deininger, M. W., J. M. Goldman, et al. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." <u>Blood</u> **96**(10): 3343-3356.
- Delhommeau, F., S. Dupont, et al. (2009). "Mutation in TET2 in myeloid cancers." <u>N Engl J Med</u> **360**(22): 2289-2301.
- Denizot, Y., P. Fixe, et al. (1996). "Serum interleukin-8 (IL-8) and IL-6 concentrations in patients with hematologic malignancies." <u>Blood</u> **87**(9): 4016-4017.

- Dent, A. L., A. L. Shaffer, et al. (1997). "Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6." <u>Science</u> **276**(5312): 589-592.
- Dobo, I., N. Boiret, et al. (2004). "A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia." <u>Haematologica</u> **89**(10): 1207-1212.
- Drachman, J. G., D. F. Sabath, et al. (1997). "Thrombopoietin signal transduction in purified murine megakaryocytes." <u>Blood</u> **89**(2): 483-492.
- Du, X. and D. A. Williams (1997). "Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use." <u>Blood</u> **89**(11): 3897-3908.
- Dusa, A., C. Mouton, et al. (2010). "JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors." <u>PLoS One</u> **5**(6): e11157.
- Dusa, A., J. Staerk, et al. (2008). "Substitution of pseudokinase domain residue Val-617 by large non-polar amino acids causes activation of JAK2." J Biol Chem **283**(19): 12941-12948.
- Emadi, S., D. Clay, et al. (2005). "IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis." <u>Blood</u> **105**(2): 464-473.
- Epstein E, G. A. (1934). "Haemorrhagische thrombocythamie bei vascularer schrumpfmilz." <u>Virchov's</u> <u>Archiv Abteilung</u> **293**: 233-247.
- Erikson, J., C. A. Griffin, et al. (1986). "Heterogeneity of chromosome 22 breakpoint in Philadelphiapositive (Ph+) acute lymphocytic leukemia." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **83**(6): 1807-1811.
- Fan, G. H., W. Yang, et al. (2001). "Phosphorylation-independent association of CXCR2 with the protein phosphatase 2A core enzyme." J Biol Chem **276**(20): 16960-16968.
- Fan, G. H., W. Yang, et al. (2001). "Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization." <u>Biochemistry</u> **40**(3): 791-800.
- Fialkow, P. J., G. B. Faguet, et al. (1981). "Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell." <u>Blood</u> **58**(5): 916-919.
- Fishley, B. and W. S. Alexander (2004). "Thrombopoietin signalling in physiology and disease." <u>Growth</u> <u>Factors</u> **22**(3): 151-155.
- Geddis, A. E., N. E. Fox, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors." J Biol Chem **276**(37): 34473-34479.
- Girardot, M., C. Pecquet, et al. (2010). "miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets." <u>Blood</u> **116**(3): 437-445.
- Girasole, G., G. Passeri, et al. (1994). "Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development." J <u>Clin Invest</u> **93**(4): 1516-1524.
- Girodon, F., C. Schaeffer, et al. (2008). "Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy." <u>Haematologica</u> **93**(11): 1723-1727.
- Goette, N. P., P. R. Lev, et al. (2010). "Abnormal regulation of soluble and anchored IL-6 receptor in monocytes from patients with essential thrombocythemia." <u>Exp Hematol</u>.
- Grand, F. H., C. E. Hidalgo-Curtis, et al. (2009). "Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms." <u>Blood</u> **113**(24): 6182-6192.
- Guardiola, P., J. E. Anderson, et al. (1999). "Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European Group for Blood and Marrow Transplantation, Societe Francaise de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto del Midollo Osseo, and Fred Hutchinson Cancer Research Center Collaborative Study." <u>Blood</u> **93**(9): 2831-2838.
- Hall, C. L. and E. T. Keller (2006). "The role of Wnts in bone metastases." <u>Cancer Metastasis Rev</u> **25**(4): 551-558.
- Harker, L. A., U. M. Marzec, et al. (1996). "Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates." <u>Blood</u> **88**(2): 511-521.
- Harrison, C. N., P. J. Campbell, et al. (2005). "Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia." <u>N Engl J Med</u> **353**(1): 33-45.
- Hartmann, G., L. Naldini, et al. (1992). "A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **89**(23): 11574-11578.
- Haspel, R. L., M. Salditt-Georgieff, et al. (1996). "The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase." <u>EMBO J</u> **15**(22): 6262-6268.
- He, K., X. Wang, et al. (2003). "Janus kinase 2 determinants for growth hormone receptor association, surface assembly, and signaling." <u>Mol Endocrinol</u> **17**(11): 2211-2227.

Hedstrom, L. (2002). "Serine protease mechanism and specificity." <u>Chem Rev</u> **102**(12): 4501-4524.

- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." <u>Biochem J</u> **374**(Pt 1): 1-20.
- Hermouet, S., I. Corre, et al. (2000). "Interleukin-8 and other agonists of Gi2 proteins: autocrine paracrine growth factors for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors." Leukemia & lymphoma **38**(1-2): 39-48.
- Hermouet, S., A. Godard, et al. (2002). "Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythaemia vera." <u>Cytokine</u> **20**(4): 178-183.
- Hilbert, D. M., M. Kopf, et al. (1995). "Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms." J Exp Med **182**(1): 243-248.
- Hirano, T., K. Yasukawa, et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." <u>Nature</u> **324**(6092): 73-76.
- Hitchcock, I. S., M. M. Chen, et al. (2008). "YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation." <u>Blood</u> **112**(6): 2222-2231.
- Hitchcock, I. S., N. E. Fox, et al. (2008). "Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout." <u>Blood</u> **111**(2): 596-604.
- Ho, C.-L., T. L. Lasho, et al. (2007). "Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders." <u>Leukemia</u> <u>Research</u> **31**(10): 1389-1392.
- Hoffman, R. C., H. Andersen, et al. (1996). "Peptide, disulfide, and glycosylation mapping of recombinant human thrombopoietin from ser1 to Arg246." <u>Biochemistry</u> **35**(47): 14849-14861.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, et al. (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." <u>Journal of leukocyte biology</u> **72**(5): 847-855.
- Holmes, W. E., J. Lee, et al. (1991). "Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor." <u>Science</u> **253**(5025): 1278-1280.
- Holtmann, H., J. Enninga, et al. (2001). "The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation." <u>The Journal of biological chemistry</u> **276**(5): 3508-3516.
- Holub, M. C., C. Szalai, et al. (1999). "Generation of 'truncated' interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R." <u>Immunol Lett</u> **68**(1): 121-124.
- Hong, Y., D. Dumenil, et al. (1998). "Protein kinase C mediates the mitogenic action of thrombopoietin in c-Mpl-expressing UT-7 cells." <u>Blood</u> **91**(3): 813-822.
- Hookham, M. B., J. Elliott, et al. (2007). "The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3." <u>Blood</u> **109**(11): 4924-4929.
- Howren, M. B., D. M. Lamkin, et al. (2009). "Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis." <u>Psychosom Med</u> **71**(2): 171-186.
- Hu, L., Y. Shi, et al. (2003). "Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells." <u>Blood</u> **101**(8): 3126-3135.
- Huang, L. J., S. N. Constantinescu, et al. (2001). "The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor." <u>Molecular cell</u> 8(6): 1327-1338.
- Huang, L. J., S. N. Constantinescu, et al. (2001). "The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor." <u>Mol Cell</u> 8(6): 1327-1338.
- Hunt, P. (1995). "The physiologic role and therapeutic potential of the Mpl-ligand in thrombopoiesis." <u>Stem Cells</u> **13**(6): 579-587.
- Ihle, J. N. (1995). "Cytokine receptor signalling." <u>Nature</u> **377**(6550): 591-594.
- Jaffe ES, H. N., Stein H (2001). "World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues." <u>IARC Press</u>.
- Jager, R., H. Gisslinger, et al. (2010). "Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms." Leukemia **24**(7): 1290-1298.
- James, C., V. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." <u>Nature</u> **434**(7037): 1144-1148.
- James, C., V. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera." <u>Nature</u> **434**: 1144-1148.
- Jee, S. H., C. Y. Chu, et al. (2004). "Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways." J Invest Dermatol **123**(6): 1169-1175.

- Jeffers, M., S. Rong, et al. (1996). "Enhanced tumorigenicity and invasion-metastasis by hepatocyte growth factor/scatter factor-met signalling in human cells concomitant with induction of the urokinase proteolysis network." <u>Mol Cell Biol</u> **16**(3): 1115-1125.
- Jelkmann, W., J. Bohlius, et al. (2008). "The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues." <u>Critical</u> <u>reviews in oncology/hematology</u>.
- Jelkmann, W., J. Bohlius, et al. (2008). "The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues." <u>Crit Rev</u> <u>Oncol Hematol</u> **67**(1): 39-61.
- Jenkins, B. J., A. W. Roberts, et al. (2007). "Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis." <u>Blood</u> **109**(6): 2380-2388.
- Jenkins, B. J., A. W. Roberts, et al. (2005). "The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis." <u>Blood</u> **105**(9): 3512-3520.
- Jones, A. V., P. J. Campbell, et al. (2010). "The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms." <u>Blood</u> **115**(22): 4517-4523.
- Jones, A. V., A. Chase, et al. (2009). "JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms." <u>Nat Genet</u> **41**(4): 446-449.
- Jones, A. V., N. C. Cross, et al. (2008). "Rapid identification of JAK2 exon12 mutations using high resolution melting analysis." <u>Haematologica</u> **93**(10): 1560-1564.
- Kantarjian, H. M., M. Talpaz, et al. (2006). "New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance." <u>Ann Intern Med</u> **145**(12): 913-923.
- Kataoka, H., S. Miyata, et al. (2003). "Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor." <u>Cancer Metastasis Rev</u> **22**(2-3): 223-236.
- Kato, T., K. Ogami, et al. (1995). "Purification and characterization of thrombopoietin." <u>Journal of biochemistry</u> **118**(1): 229-236.
- Kaushansky, K. (2009). "Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling." <u>J Thromb Haemost</u> **7 Suppl 1**: 235-238.
- Kaushansky, K., V. C. Broudy, et al. (1995). "Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy." <u>J Clin Invest</u> 96(3): 1683-1687.
- Kelemen, E., I. Cserhati, et al. (1958). "Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera." <u>Acta haematologica</u> **20**(6): 350-355.
- Kerbauy, D. M., T. A. Gooley, et al. (2007). "Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera, and essential thrombocythemia." <u>Biol</u> <u>Blood Marrow Transplant</u> **13**(3): 355-365.
- Kiladjian, J. J., B. Cassinat, et al. (2008). "Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera." <u>Blood</u> **112**(8): 3065-3072.
- Kiladjian, J. J., C. Chomienne, et al. (2008). "Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms." <u>Leukemia</u> **22**(11): 1990-1998.
- Kiladjian, J. J., A. Masse, et al. (2010). "Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon alpha-2a treatment targets JAK2(V617F) clones without affecting TET2 mutant cells." <u>Leukemia</u>.
- Kilpivaara, O., S. Mukherjee, et al. (2009). "A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms." <u>Nat Genet</u> **41**(4): 455-459.
- Kim, T. K. and T. Maniatis (1996). "Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitinproteasome pathway." <u>Science</u> **273**(5282): 1717-1719.
- Kirito, K., N. Fox, et al. (2005). "Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha." <u>Blood</u> 105(11): 4258-4263.
- Kisseleva, T., S. Bhattacharya, et al. (2002). "Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges." <u>Gene</u> **285**(1-2): 1-24.
- Knupfer, H. and R. Preiss (2008). "sIL-6R: more than an agonist?" Immunol Cell Biol 86(1): 87-91.
- Kobayashi, M., J. H. Laver, et al. (1996). "Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3." <u>Blood</u> **88**(2): 429-436.
- Kobayashi, S., M. Teramura, et al. (1993). "Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3." <u>Br J Haematol</u> **83**(4): 539-544.
- Kong-Beltran, M., J. Stamos, et al. (2004). "The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation." <u>Cancer Cell</u> **6**(1): 75-84.
- Kralovics, R., Y. Guan, et al. (2002). "Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera." <u>Exp Hematol</u> **30**(3): 229-236.

- Kralovics, R., F. Passamonti, et al. (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." <u>N Engl J Med</u> **352**(17): 1779-1790.
- Kralovics, R., F. Passamonti, et al. (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." <u>New England Journal of Medicine</u> **352**(17): 1779-1790.
- Krantz, S. B. (1991). "Erythropoietin." <u>Blood</u> 77(3): 419-434.
- Kroger, N., E. Holler, et al. (2009). "Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation." <u>Blood</u> 114(26): 5264-5270.
- Kurth, I., U. Horsten, et al. (1999). "Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes." <u>J Immunol</u> **162**(3): 1480-1487.
- Kurth, I., U. Horsten, et al. (2000). "Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130." <u>I Immunol</u> **164**(1): 273-282.
- Kuter, D. J. and R. D. Rosenberg (1994). "Appearance of a megakaryocyte growth-promoting activity, megapoietin, during acute thrombocytopenia in the rabbit." <u>Blood</u> **84**(5): 1464-1472.
- Lacombe, C. and P. Mayeux (1998). "Biology of erythropoietin." <u>Haematologica</u> 83(8): 724-732.
- Lambert, J. R., T. Everington, et al. (2009). "In essential thrombocythemia, multiple JAK2-V617F clones are present in most mutant-positive patients: a new disease paradigm." <u>Blood</u> **114**(14): 3018-3023.
- Lannutti, B. J., J. Minear, et al. (2006). "Increased megakaryocytopoiesis in Lyn-deficient mice." <u>Oncogene</u> **25**(23): 3316-3324.
- Layton, J. E., N. E. Hall, et al. (2001). "Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor." <u>J Biol Chem.</u> **276(39)**:: 36779-36787.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., S. Chevillard, et al. (1996). "Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia." <u>Blood</u> **88**(12): 4534-4546.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C. and M. C. Martyre (1999). "Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis." <u>Ann Hematol</u> **78**(10): 437-444.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C. and M. C. Martyre (2001). "Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis." <u>Pathol Biol (Paris)</u> **49**(2): 153-157.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., M. Souyri, et al. (1992). "Enhanced hematopoietic growth factor production in an experimental myeloproliferative syndrome." <u>Blood</u> **79**(12): 3179-3187.
- Lee, H., A. Herrmann, et al. (2009). "Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors." <u>Cancer Cell</u> **15**(4): 283-293.
- Lee, T. S., W. Ma, et al. (2009). "Mechanisms of constitutive activation of Janus kinase 2-V617F revealed at the atomic level through molecular dynamics simulations." <u>Cancer</u> **115**(8): 1692-1700.
- Lee, T. S., W. Ma, et al. (2009). "Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations." <u>BMC Struct Biol</u> **9**: 58.
- Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." <u>Annu Rev Immunol</u> **16**: 293-322.
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." <u>Cancer Cell</u> **7**(4): 387-397.
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutations in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis." <u>Cancer Cell</u> **7**: 387-397.
- Levy, S. and T. Shoham (2005). "The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes." <u>Nat Rev</u> <u>Immunol</u> **5**(2): 136-148.
- Li, A., S. Dubey, et al. (2002). "Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells." <u>Microvascular research</u> **64**(3): 476-481.
- Li, S., R. Kralovics, et al. (2008). "Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations." <u>Blood</u> **111**(7): 3863-3866.
- Lin, J. X., J. Mietz, et al. (1996). "Cloning of human Stat5B. Reconstitution of interleukin-2-induced Stat5A and Stat5B DNA binding activity in COS-7 cells." <u>J Biol Chem</u> **271**(18): 10738-10744.
- Lindauer, K., T. Loerting, et al. (2001). "Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation." <u>Protein Eng</u> **14**(1): 27-37.

- Linden, H. M. and K. Kaushansky (2000). "The glycan domain of thrombopoietin enhances its secretion." <u>Biochemistry</u> **39**(11): 3044-3051.
- Lipka, D. B., L. S. Hoffmann, et al. (2008). "LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells." <u>Mol Cancer Ther</u> **7**(5): 1176-1184.
- Lippert, E., M. Boissinot, et al. (2006). "The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera." <u>Blood</u> **108**(6): 1865-1867.
- Liu, X. H., A. Kirschenbaum, et al. (2005). "Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-{kappa}B (RANK) ligand/RANK system." Endocrinology **146**(4): 1991-1998.
- Livnah, O., E. A. Stura, et al. (1999). "Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation." <u>Science</u> **283**(5404): 987-990.
- Lok, S., K. Kaushansky, et al. (1994). "Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo." <u>Nature</u> **369**(6481): 565-568.
- Lok, S., K. Kaushansky, et al. (1994). "Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo." <u>Nature</u> **369**(6481): 565-568.
- Lokker, N. A., M. R. Mark, et al. (1992). "Structure-function analysis of hepatocyte growth factor: identification of variants that lack mitogenic activity yet retain high affinity receptor binding." <u>EMBO I</u> **11**(7): 2503-2510.
- Lu, L., K. Welte, et al. (1986). "Effects of recombinant human tumor necrosis factor alpha, recombinant human gamma-interferon, and prostaglandin E on colony formation of human hematopoietic progenitor cells stimulated by natural human pluripotent colony-stimulating factor, pluripoietin alpha, and recombinant erythropoietin in serum-free cultures." <u>Cancer Res</u> **46**(9): 4357-4361.
- Ma, P. C., M. S. Tretiakova, et al. (2007). "Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion." <u>Br I Cancer</u> **97**(3): 368-377.
- Marta, R., N. Goette, et al. (2004). "Increased levels of plasma interleukin-6 soluble receptor in patients with essential thrombocythemia." <u>Haematologica</u> **89**(6): 657-663.
- Martinez-Aviles, L., C. Besses, et al. (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera or idiopathic erythrocytosis." <u>Hematologica</u> **92**(12): 1717-1718.
- Matadeen, R., W. C. Hon, et al. (2007). "The dynamics of signal triggering in a gp130-receptor complex." <u>Structure</u> **15**(4): 441-448.
- Maulik, G., A. Shrikhande, et al. (2002). "Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition." <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **13**(1): 41-59.
- Maxwell, P. J., R. Gallagher, et al. (2007). "HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells." <u>Oncogene</u> **26**(52): 7333-7345.
- McBride, K. M. and N. C. Reich (2003). "The ins and outs of STAT1 nuclear transport." <u>Sci STKE</u> **2003**(195): RE13.
- Mehler, M. F., R. Rozental, et al. (1993). "Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells." <u>Nature</u> **362**(6415): 62-65.
- Mellman, I. and G. Warren (2000). "The road taken: past and future foundations of membrane traffic." <u>Cell</u> **100**(1): 99-112.
- Mertens, C., M. Zhong, et al. (2006). "Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain." <u>Genes Dev</u> **20**(24): 3372-3381.
- Mesa, R. A., M. N. Silverstein, et al. (1999). "Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995." <u>Am I Hematol 61(1)</u>: 10-15.
- Mitjavila, M. T., G. Vinci, et al. (1988). "Human platelet alpha granules contain a nonspecific inhibitor of megakaryocyte colony formation: its relationship to type beta transforming growth factor (TGFbeta)." <u>I Cell Physiol</u> **134**(1): 93-100.
- Miyakawa, Y., P. Rojnuckarin, et al. (2001). "Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes." <u>I Biol Chem</u> **276**(4): 2494-2502.
- Müller-Newen, G., A. Küster, et al. (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." <u>Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)</u> 161(11): 6347-6355.
- Mullighan, C. G., C. B. Miller, et al. (2008). "BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros." <u>Nature</u> **453**(7191): 110-114.

- Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." <u>Pharmacol Rev</u> **52**(1): 145-176.
- Murray, P. J. (2007). "The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration." <u>I Immunol</u> **178**(5): 2623-2629.
- Musolino, C., L. Calabro, et al. (2002). "Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders." <u>Am J Hematol</u> **69**(3): 159-163.
- Nakamura, T., T. Nishizawa, et al. (1989). "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor." <u>Nature</u> **342**(6248): 440-443.
- Nasser, M. W., S. K. Raghuwanshi, et al. (2007). "CXCR1 and CXCR2 activation and regulation. Role of aspartate 199 of the second extracellular loop of CXCR2 in CXCL8-mediated rapid receptor internalization." <u>J Biol Chem</u> **282**(9): 6906-6915.
- Nishimoto, N. (2010). "Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases." <u>Clin</u> <u>Pharmacol Ther</u> **87**(4): 483-487.
- Nowell, P. C. and D. A. Hungerford (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." <u>J Natl Cancer Inst</u> 25: 85-109.
- O'Shea, J. J., M. Gadina, et al. (2002). "Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway." <u>Cell</u> **109 Suppl**: S121-131.
- Ohta, K., A. Mizutani, et al. (1995). "Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions." <u>Neuron</u> **14**(6): 1189-1199.
- Olcaydu, D., A. Harutyunyan, et al. (2009). "A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms." <u>Nat Genet</u> **41**(4): 450-454.
- Olcaydu, D., R. C. Skoda, et al. (2009). "The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera." <u>Leukemia</u> **23**(10): 1924-1926.
- Palais, R. A., M. A. Liew, et al. (2005). "Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping." <u>Anal Biochem</u> 346(1): 167-175.
 Pardanani, A., J. Hood, et al. (2007). "TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently
- Pardanani, A., J. Hood, et al. (2007). "TG101209, a small molecule JAK2-selective kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations." <u>Leukemia</u> 21(8): 1658-1668.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, et al. (2007). "Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera." Leukemia **21**(9): 1960-1963.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, et al. (2010). "The JAK2 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of JAK2V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients." Leukemia **24**(1): 110-114.
- Pardanani, A. D., R. L. Levine, et al. (2006). "MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients." <u>Blood</u> **108**(10): 3472-3476.
- Paul, S. R., F. Bennett, et al. (1990). "Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cellderived lymphopoietic and hematopoietic cytokine." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(19): 7512-7516.
- Pedersen, B. K. and M. A. Febbraio (2008). "Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6." <u>Physiol Rev</u> 88(4): 1379-1406.
- Pelletier, S., S. Gingras, et al. (2006). "Two domains of the erythropoietin receptor are sufficient for Jak2 binding/activation and function." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(22): 8527-8538.
- Percy, M. L., L. M. Scott, et al. (2007). "The frequency of JAK2 exon12 muattions in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels." <u>Hematologica</u> **92**(12): 1607-1614.
- Perona, J. J., L. Hedstrom, et al. (1995). "Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin." <u>Biochemistry</u> **34**(5): 1489-1499.
- Peters, M., K. H. Meyer zum Buschenfelde, et al. (1996). "The function of the soluble IL-6 receptor in vivo." Immunol Lett **54**(2-3): 177-184.
- Pierre, R., M. Imbert, et al. (2001). Polycythemia vera. <u>WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues</u>. E. S. Jaffe, N. L. Harris, H. Stein and J. W. Vardiman. Lyon, IARC Press: 32-34.
- Pietra, D., S. Li, et al. (2008). "Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders." <u>Blood</u> **111**(3): 1686-1689.
- Pikman, Y., B. H. Lee, et al. (2006). "MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia." PLoS Med **3**(7): e270.
- Prchal, J. F. and A. A. Axelrad (1974). "Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera." <u>N Engl J Med</u> **290**(24): 1382.

- Rameshwar, P., R. Narayanan, et al. (2000). "NF-kappa B as a central mediator in the induction of TGF-beta in monocytes from patients with idiopathic myelofibrosis: an inflammatory response beyond the realm of homeostasis." <u>J Immunol</u> **165**(4): 2271-2277.
- Rapado, I., S. Grande, et al. (2009). "High resolution melting analysis for JAK2 Exon 14 and Exon 12 mutations: a diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms." <u>I Mol Diagn</u> **11**(2): 155-161.
- Ribatti, D., M. Presta, et al. (1999). "Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo." <u>Blood</u> 93(8): 2627-2636.
- Richmond, T. D., M. Chohan, et al. (2005). "Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin." Trends Cell Biol 15(3): 146-155.
- Roder, S., C. Steimle, et al. (2001). "STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera." <u>Exp Hematol</u> **29**(6): 694-702.
- Rodriguez, C., J. Grosgeorge, et al. (1995). "Human gp130 transducer chain gene (IL6ST) is localized to chromosome band 5q11 and possesses a pseudogene on chromosome band 17p11." Cytogenetics and cell genetics **70**(1-2): 64-67.
- Rojnuckarin, P., J. G. Drachman, et al. (1999). "Thrombopoietin-induced activation of the mitogenactivated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis." Blood **94**(4): 1273-1282.
- Rose-John, S., J. Scheller, et al. (2006). "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer." <u>I Leukoc Biol</u> 80(2): 227-236.
- Rosenbauer, F. and D. G. Tenen (2007). "Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation." <u>Nat Rev Immunol</u> 7(2): 105-117.
- Sanada, M., T. Suzuki, et al. (2009). "Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms." Nature 460(7257): 904-908.
- Sargin, B., C. Choudhary, et al. (2007). "Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML." Blood 110(3): 1004-1012.
- Saur, S. J., V. Sangkhae, et al. (2010). "Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl." <u>Blood</u> **115**(6): 1254-1263.
- Schaub, F. X., R. Looser, et al. (2010). "Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms." <u>Blood</u> **115**(10): 2003-2007.
- Scheller, J. and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." Med <u>Microbiol Immunol</u> **195**(4): 173-183.
- Schindler, C., D. E. Levy, et al. (2007). "JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines." J Biol Chem **282**(28): 20059-20063.
- Schnittger, S., U. Bacher, et al. (2009). "Detection of JAK2 exon 12 mutations in 15 patients with JAK2V617F negative polycythemia vera." <u>Haematologica</u> **94**(3): 414-418.
- Scott, L. M., P. A. Beer, et al. (2007). "Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera." Br | Haematol 139(3): 511-512.
- Scott, L. M., W. Tong, et al. (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathicerythrocytosis." New England Journal of Medicine 356: 459-468.
- Scott, L. M., W. Tong, et al. (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis." <u>N Engl J Med</u> 356(5): 459-468.
- Sharlow, E. R., R. Pacifici, et al. (1997). "Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced hemoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells." Blood 90(6): 2175-2187.
- Shuai, K., J. Liao, et al. (1996). "Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1." Mol Cell Biol 16(9): 4932-4941.
- Silva, M., D. Grillot, et al. (1996). "Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2." <u>Blood</u> **88**(5): 1576-1582. Skiniotis, G., M. J. Boulanger, et al. (2005). "Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130
- when in complex with IL-6 and IL-6 receptor." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **12**(6): 545-551.
- Skoda, R. C. (2009). "Thrombocytosis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 159-167.
- Solar, G. P., W. G. Kerr, et al. (1998). "Role of c-mpl in early hematopoiesis." Blood 92(1): 4-10.
- Spivak, J. L. (2002). "Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management." Blood 100(13): 4272-4290.
- Stamos, J., R. A. Lazarus, et al. (2004). "Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor." <u>EMBO J</u> 23(12): 2325-2335.
- Sterkers, Y., C. Preudhomme, et al. (1998). "Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion." <u>Blood</u> **91**(2): 616-622.

- Swaminathan, G. and A. Y. Tsygankov (2006). "The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling." <u>J Cell Physiol</u> **209**(1): 21-43.
- Szpurka, H., L. P. Gondek, et al. (2009). "UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation." <u>Leukemia</u> **23**(3): 610-614.
- Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." <u>Annu Rev Immunol</u> **15**: 797-819.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, et al. (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." <u>Science</u> **324**(5929): 930-935.
- Tefferi, A. (2005). "Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia." <u>I Clin Oncol</u> **23**(33): 8520-8530.
- Tefferi, A. (2009). "Molecular drug targets in myeloproliferative neoplasms: mutant ABL1, JAK2, MPL, KIT, PDGFRA, PDGFRB and FGFR1." <u>I Cell Mol Med</u> **13**(2): 215-237.
- Teofili, L., F. Giona, et al. (2010). "Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis." <u>Haematologica</u> **95**(1): 65-70.
- Theocharides, A., M. Boissinot, et al. (2007). "Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation." <u>Blood</u> **110**(1): 375-379.
- Thiele, J. and H. M. Kvasnicka (2006). "Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders--dynamics and clinical impact." <u>Histol Histopathol</u> **21**(12): 1367-1378.
- Timmermann, A., A. Kuster, et al. (2002). "A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor." <u>Eur J Biochem</u> **269**(11): 2716-2726.
- Tomer, A. (2002). "Effects of anagrelide on in vivo megakaryocyte proliferation and maturation in essential thrombocythemia." <u>Blood</u> **99**(5): 1602-1609.
- Tong, W. and H. F. Lodish (2004). "Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis." <u>I Exp Med</u> **200**(5): 569-580.
- Tong, W., R. Sulahian, et al. (2006). "The membrane-proximal region of the thrombopoietin receptor confers its high surface expression by JAK2-dependent and -independent mechanisms." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **281**(50): 38930-38940.
- Ugo, V., C. Marzac, et al. (2004). "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera." <u>Exp Hematol</u> **32**(2): 179-187.
- Ugo, V., S. Tondeur, et al. "Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients." <u>PLoS One</u> **5**(1): e8893.
- Vannucchi, A. M., A. Pancrazzi, et al. (2005). "Abnormalities of GATA-1 in megakaryocytes from patients with idiopathic myelofibrosis." <u>Am J Pathol</u> **167**(3): 849-858.
- Vaquez, H. (1892). "Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante." <u>C R Soc Biol (Paris)</u> **44**: 384-388.
- Varricchio, L., A. Mancini, et al. (2009). "Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis." <u>Expert Rev Hematol</u> **2**(3): 315-334.
- Verstovsek, S., T. Manshouri, et al. (2008). "WP1066, a novel JAK2 inhibitor, suppresses proliferation and induces apoptosis in erythroid human cells carrying the JAK2 V617F mutation." <u>Clin Cancer Res</u> **14**(3): 788-796.
- Vinkemeier, U. (2004). "Getting the message across, STAT! Design principles of a molecular signaling circuit." <u>I Cell Biol</u> **167**(2): 197-201.
- Visani, G., C. Finelli, et al. (1990). "Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients." <u>Br J Haematol</u> **75**(1): 4-9.
- Wang, Q., Y. Miyakawa, et al. (2000). "Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1." <u>Blood</u> **96**(6): 2093-2099.
- Wang, X., P. Lupardus, et al. (2009). "Structural biology of shared cytokine receptors." <u>Annu Rev Immunol</u> **27**: 29-60.
- Wernig, G., M. G. Kharas, et al. (2008). "Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera." <u>Cancer Cell</u> **13**(4): 311-320.
- Wilks, A. F. (2008). "The JAK kinases: not just another kinase drug discovery target." <u>Semin Cell Dev Biol</u> **19**(4): 319-328.
- Wilks, A. F., A. G. Harpur, et al. (1991). "Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase." <u>Mol Cell Biol</u> 11(4): 2057-2065.

- Winberg, M. L., J. N. Noordermeer, et al. (1998). "Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance." <u>Cell</u> **95**(7): 903-916.
- Wormald, S. and D. J. Hilton (2004). "Inhibitors of cytokine signal transduction." <u>J Biol Chem</u> **279**(2): 821-824.
- Yamamoto, T., T. Matsuda, et al. (2001). "Cross-talk between IL-6 and TGF-beta signaling in hepatoma cells." <u>FEBS Lett</u> **492**(3): 247-253.
- Yawata, H., K. Yasukawa, et al. (1993). "Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130." <u>EMBO I</u> **12**(4): 1705-1712.
- Yoo, J. H., T. S. Park, et al. (2009). "JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature." <u>Cancer Genet Cytogenet</u> **189**(1): 43-47.
- Yoshimura, A., A. D. D'Andrea, et al. (1990). "Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **87**(11): 4139-4143.
- Zeigler, F. C., F. de Sauvage, et al. (1994). "In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of cmpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells." <u>Blood</u> **84**(12): 4045-4052.
- Zhang, J., Y. Li, et al. (2003). "PI3-K/Akt pathway contributes to IL-6-dependent growth of 7TD1 cells." <u>Cancer Cell Int</u> **3**(1): 1.
- Zhao, R., S. Xing, et al. (2005). "Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **280**(24): 22788-22792.
- Zwezdaryk, K. J., S. B. Coffelt, et al. (2007). "Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a proangiogenic program in human mesenchymal stem cells." <u>Experimental hematology</u> **35**(4): 640-652.
- Zwezdaryk, K. J., S. B. Coffelt, et al. (2007). "Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a proangiogenic program in human mesenchymal stem cells." <u>Exp Hematol</u> **35**(4): 640-652.

Annexes

Annexe I :

"Réduction fréquente, ou absence de détection, du taux de mutant JAK2 chez les patients positifs pour la mutation V617F, dans la première année de traitement à l'hydroxyurée."



Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy

François Girodon,¹² Céline Schaeffer,¹ Cédric Cleyrat,³ Morgane Mounier,² Ingrid Lafont,⁴ Frédéric Dos Santos,¹ Aurélie Vidal,¹ Marc Maynadié,¹ and Sylvie Hermouet^{3,5}

¹Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Dijon, Dijon; ²Registre des hémopathies malignes de Côte d'Or, EA Université de Bourgogne, Dijon; ³INSERM U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers, Nantes; ⁴Service d'Hématologie Clinique, CHU de Dijon, Dijon and ⁵Laboratoire d'Hématologie, Centre Hopitalier Universitaire, Nantes, France

ABSTRACT

We analyzed the effect of hydroxyurea on the *JAK2V617F* allelic ratio (%*JAK2*V617F), measured in purified blood granulocytes, of patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. Thirty-six patients were examined sequentially prior to and after start of hydroxyurea therapy (8 polycythemia vera, 17 essential thrombocythemia), or while remaining untreated (2 polycythemia vera, 9 essential thrombocythemia). Hydroxyurea therapy (median duration: 15 months) reduced the %*JAK2*V617F by >30% in 13/25 patients (4 polycythemia vera, 9 essential thrombocythemia). For 3 patients, *JAK2*V617F remained undetectable for 3-27 months. In addition, a single time point study of two large cohorts of patients, examined either at the time of diagnosis (99 polycythemia vera, 178 essential thrombocythemia) or while receiving hydroxyurea (36 polycythemia vera, 98 essential thrombocythemia) for therapy: 32 months), confirmed reduction of %*JAK2*V617F in the hydroxyurea-treated group (24% vs. 33% *JAK2*V617F at diagnosis, *p*<0.01). Prospective studies are needed to determine the prognostic value of reduced *JAK2*V617F allele burden under cytoreductive therapy.

Key words: JAK2V617F, hydroxyurea, myeloproliferative neoplasm, polycythemia vera, essential thrombocythemia, allele-specific real time quantitative PCR.

Citation: Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Dos Santos F, Vidal A, Maynadié M, and Hermouet S. Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy. Haematologica 2008; 93:1723-1727. doi: 10.3324/haematol.13081

©2008 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

Detection of the V617F mutation of JAK2 (JAK2V617F), recently discovered as specifically expressed in the majority of BCR-ABL-negative myeloproliferative diseases (MPDs), has become a main diagnostic test for polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET).¹³ In contrast, the relevance of the JAK2V617F mutation load for predicting the risk of thrombosis, myelofibrosis or leukemic transformation remains controversial.⁴⁹ The lack of consensus may be explained by heterogeneity in techniques and materials (purified cells, whole blood, genomic DNA, cDNA) used to quantify JAK2V617F, and by the cohorts of patients studied. Indeed, since the JAK2V617F load is currently thought not to be affected by conventional treatments, most of the published studies of the JAK2V617F mutation load have mixed treated and untreated patients. However, the insensitivity of the JAK2V617F-mutated clone to conventional therapy has never been proven. So far

the JAK2V617F allelic ratio (%JAK2V617F) has usually been analyzed at a single time point. Studies analyzing the %JAK2V617F sequentially are rare: Passamonti et al. described an increase in %JAK2V617F in a cohort of 8 patients over a mean period of 17 months.¹⁰ Kiladjian et al. reported a high molecular response rate in PV patients treated with interferon α -2a (IFN α -2a).¹¹ Using sequential %/AK2V617F analyses, Barosi et al. described transformation from heterozygous to homozygous forms of primary myelofibrosis.¹² Surprisingly, the effect of hydroxyurea (HU), an inexpensive drug widely used in MPDs, on the *JAK2*V617F mutation load is still unknown. To address this question, we quantified JAK2V617F in purified blood granulocytes from three distinct cohorts of PV and ET patients. A first group of patients was examined at diagnosis then followed as they remained untreated (11 patients) or received HU (25 patients), then two large cohorts of patients, either at the time of diagnosis or under treatment with HU, were studied retrospectively.

Correspondence: François Girodon, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital du Bocage, CHU de Dijon, Dijon, France. E-mail: francois.girodon@chu-dijon

haematologica | 2008; 93(11) | 1723 |

Acknowledgments: we wish to thank Mrs. Dominique Bouchot, Marie-Christine Boursier, Martine Courtois, Laetitia Ergand, Isabelle Helot, Fabienne Perrault-Hu and Danielle Pineau, for excellent technical help. We are indebted to our colleagues from the Departments of Clinical Hematology of the hospitals of Dijon, Châlon sur Saône, Nantes and La Roche sur Yon for providing patient samples.

Funding: this work was sponsored by the University Hospital of Dijon for regulatory and ethic submission, and was supported by a grant from the Lions Club Châlon Tulipes Contre le Cancer to FG, and by a grant from the Comité Grand Ouest of the Ligue Nationale contre le Cancer to SH. Manuscript received March 18, 2008. Revised version arrived on May 29, 2008. Manuscript accepted on June 4, 2008.

F. Girodon et al.

Design and Methods

Patients

Patients from two centers diagnosed with MPD according to the WHO criteria were studied as three groups. Thirty-six patients from center 1 (10 PV, 26 ET) were examined first at diagnosis then sequentially without (11 patients) or with HU treatment (25 patients). In a second, retrospective study, two distinct groups of patients were examined at a single time point: group A (n=277; 99 PV, 178 ET; 124 from center 1, 153 from center 2) was examined at the time of diagnosis; group B (n=134; 36 PV, 98 ET; 51 from center 1, 83 from center 2), while under treatment with HU. The study was approved by the institutional ethics committee on human experimentation, Comité de Protection des Personnes Est I and informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki.

Analysis of %JAK2V617F

Purified blood granulocytes were prepared in the two centers as described.13 Cytospins, stained with May-Grünwald-Giemsa, confirmed the purity (>95%) of the granulocyte preparations. Genomic DNA was prepared using QIAamp DNA mini-kits (Qiagen). In both centers, levels of expression of JAK2 wild-type (WT) or mutated (V617F) were determined in duplicate using the same sensitive (0.15% JAK2V617F) allele-specific quantitative PCRs (AS-qPCR) with the specificity based on sense forward primers.¹³ Copy numbers were determined by comparison with serial dilutions of plasmids.13 Absence of significant inter-center variability in the AS-qPCR assay was verified by parallel analysis in both centers of 70 DNA samples (data not shown). To limit inter-assay variability, sequential samples from a same patient were analyzed in the same AS-gPCR run. Whenever the JAK2V617F allele burden decreased by >30% or became undetectable during treatment, quantification was repeated on the same sample, then on new samples. A second AS-qPCR assay with the specificity based on anti-sense reverse primers was developed to verify the JAK2V617F allelic ratio in HU-treated patients. Sequences of primers and probes were: forward primer, 5'-GCGCGTGCATCTTTAT-TATGGCAGA-3'; JAK2 wild-type reverse primer, 5'-CCCGTTACTCTCGTCTCCACAGAC-3'; JAK2V617F reverse primer, 5'-GCCGTTACTCTCGTCTCCACA-GAA-3'; and probe, 5' 6FAM-GAGAAAGC TTGCT-CATCATACTTGCTGC-3' TAMRA.

Statistical analysis

Mean comparison one-sided parametrical test was used to compare different groups of patients, and Fisher's exact or χ^2 tests to compare proportions. Analysis of sequential %JAK2V617F was made with a ttest. Data were analyzed using the Stata software. p<0.05 was considered statistically significant.

Results and Discussion

The effect of HU on the JAK2V617F-mutated clone

| 1724 | haematologica | 2008; 93(11)



Figure 1. Evolution of the %JAK2V617F in treated and untreated polycythemia vera and essential thrombocythemia patients. (A) Patients who did not receive any cytoreductive treatment. (B) essential thrombocythemia patients who were treated with hydroxyurea for the indicated time (expressed in months). (C) polycythemia vera patients who were treated with hydroxyurea for the indicated time (expressed in months). (C) polycythemia vera patients in months). There was no significant change in %JAK2V617F in untreated patients. The %JAK2V617F was significantly decreased for both essential thrombocythemia and polycythemia vera patients who received HU (p<0.05). (– –) female patients; (–) male patients.

was studied with sequential assessment of %JAK2V617F in 36 patients. These patients (10 PV, 26 ET) had at least two determinations of the JAK2V617F mutation load, at the time of diagnosis and after a median period of 16 months of follow-up, with or without HU (Figure 1). Twenty-five patients were treated with HU (8 PV, 17 ET) with a 15-month median duration of treatment at the time of the second assessment of the %JAK2V617F; 11 patients (2 PV, 9

Detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients

ET) did not receive cytoreductive therapy (median follow-up: 16 months; range: 1-47 months). The group of ET patients to whom HU was prescribed had higher platelet counts at diagnosis than patients who were not given HU (758 vs. 620 G/L, p=0.0289). Consistent with aggressive forms of MPD justifying cytoreductive therapy, they also had a higher %JAK2V617F at diagnosis (PV, 64%; ET, 34%) than patients who remained untreated (PV, 43%; ET, 20%). In the group of untreated patients, the %JAK2V617F remained stable (Figure 1A). In contrast, treatment with HU resulted in decreased %JAK2V617F, from 43% at diagnosis to 24% during HU-treatment (p<0.0001). The decrease in %JAK2V617F was significant in PV (from 64 to 40%, p=0.0141) and in ET (from 34 to 16.7%, p<0.01) (Figure 1 B, C). Of note, a >30% decrease was noted in 13 patients (5 females, 8 males). JAK2V617F became undetectable in 4 ET patients (1 female, 3 males) after a 5-55 month period of treatment, and remained undetectable for a 3-27 month period of follow-up.

Table 1. %JAK2V617F	analysis in	patients	tested	before	and	dur
ing hydroxyurea treatn	nent.	-				

					%JAK2V617F	-			
			Bef	ore	During HU				
			ueau	nem		uea	uneni		
ID N.	Dg.	Sex	Age*	AS-q PCR 1	Duration**	* AS-q PCR 1	AS-q PCR 2	Mean	Variation
Patients with molecular response >30%									
D690	ET	F	75 vrs	33%	4 mo.	11%	17%	14%	-58%
D469	ET	M	54 yrs	28%	5 mo.	0%	0%	0%	-100%
D525	PV	M	73 yrs	57%	9 mo.	20%	24%	22%	-61%
D490	ET	М	75 yrs	79%	12 mo.	26%	43%	35%	-56%
D335	ET	F	76 yrs	27%	12 mo.	14%	17%	15%	-44%
TD66	ET	М	66 yrs	20%	15 mo.	0%	0%	0%	-100%
D348	ET	М	51 yrs	58%	16 mo.	17%	15%	16%	-72%
D273	ET	F	32 yrs	69%	18 mo.	0%	0%	0%	-100%
D317	ET	F	29 yrs	29%	19 mo.	5%	7%	6%	-79%
D212	ET	М	78 yrs	28%	22 mo.	0%	1%	0.5%	-98%
D161	PV	М	44 yrs	56%	27 mo.	2%	4%	3%	-95%
D110	PV	М	68 yrs	83%	31 mo.	61%	56%	58%	-30%
D63	PV	F	55 yrs	76%	50 mo.	18%	13%	15%	-80%
Patien	ts wit	h no m	olecular	recnons	e or response	<30%			
D216	FT	M	71 vrs	4%	1 mo.	7%	9%	8%	+100%
D529	ĒŤ	F	87 vrs	6%	7 mo.	4%	8%	6%	0
D670	ĒT	Ň	83 vrs	29%	7 mo.	19%	23%	21%	-28%
D501	ET	M	78 vrs	14%	8 mo.	23%	33%	28%	+100%
D504	ET	M	71 yrs	17%	8 mo.	11%	18%	14%	-18%
D478	ET	F	94 yrs	31%	10 mo.	23%	24%	23%	-27%
D301	PV	М	77 yrs	59%	15 mo.	70%	79%	74%	+25%
D434	PV	М	72 yrs	62%	15 mo.	48%	62%	55%	-11%
D324	PV	М	70 yrs	88%	20 mo.	94%	92%	93%	+6%
D245	ET	М	65 yrs	69%	23 mo.	68%	76%	72%	+4%
TD132	ET	F	61 yrs	50%	29 mo.	66%	68%	67%	+34%
D80	ET	М	34 yrs	29%	45 mo.	34%	ND	ND	+17%

Patients were tested first at the time of diagnosis then at variable time points after the start of HU therapy, using two AS-qPCR assays: AS-qPCR 1, with specificity based on forward, sense primers, and AS-qPCR 2, with specificity based on reverse, anti-sense primers. Data presented are mean values of duplicates or triplicates. ID N: patient identification number; Dg: diagnosis. *Age at the time of diagnosis; yrs: years. **Duration of treatment at time of JAK2V617F analysis: no.: months. Mean: mean of %JAK2V617F results obtained with AS-qPCRs 1 and 2. ND: not done. Variation: [(mean JAK2V617F during HU treatment -%JAK2V617F at diagnosis)/(JAK2V617F at diagnosis)] x 100. Decreases in %JAK2V617F were confirmed by a second AS-qPCR assay (Table 1). Importantly, 3 of the 4 ET patients found negative for JAK2V617F while receiving HU were confirmed negative by the second AS-qPCR assay; the fourth patient was found positive, but with 1% JAK2V617F only.

The effect of HU on the %JAK2V617F was then investigated in a retrospective study of large cohorts of PV and ET patients, using two distinct groups of patients tested at a single time point. Patients of group A were examined at the time of diagnosis. JAK2V617F was not detected in granulocytes of 5/99 PV patients (5%) and 51/178 ET patients (29%) (Table 2). These cohorts of PV and ET patients were comparable to those previously described.13 Mean %JAK2V617F in patients carrying the mutation was 54% in PV and 18% in ET. A minority of PV (13/99, 13%) had <25% JAK2V617F and a minority of ET (10/178, 6%) had >40% JAK2V617F. JAK2V617F -positive ET patients were older, with lower platelet counts and higher hematocrit and hemoglobin levels (controlled for gender) than JAK2V617F-negative ET patients. The proportion of male patients was 51% for PV and 40% for ET. There was no difference in JAK2V617F mutation load between male and female patients; this was true in both the PV and ET groups.

Patients of group B, a distinct cohort, had been treated with HU for a median duration of 32 months (same median duration of treatment for PV and ET patients), with no significant difference in treatment duration between male and female patients. The mean ages of PV and ET patients were similar in groups A and B; the proportions of male patients in group B were 50% for PV and 40% for ET. As expected, hematocrit, hemoglobin level, white blood cell (WBC) and platelet counts were significantly lower in the treated group (for both PV and ET) than in the group at diagnosis (Table 2). HU-treated patients had a significantly lower JAK2V617F allelic ratio (24%) than patients at diagnosis (33%, p<0.01). JAK2V617F was not detected in granulocytes from 5/36 treated PV patients (14%) and 34/98 treated ET patients (35%); these proportions were not significantly different from those of group A.

Interestingly, under HU treatment, PV patients with <25% JAK2V617F (15/36, 7 males, 8 females) represented a higher percentage than in the PV cohort at diagnosis (42% vs. 13%, p<0.001). Consistently, treated PV patients had a lower %JAK2V617F than PV patients at diagnosis (44% vs. 54%, p=0.0257). There was no difference in %JAK2V617F for the group of ET patients under treatment compared to those tested at time of diagnosis. However, analysis of ET data by gender revealed a lower %JAK2V617F during HU therapy for female patients (p < 0.01). The same analysis of PV also showed that the decrease in %JAK2V617F associated with HU treatment was significant only in women (39% with HU vs. 53% at diagnosis, p=0.0249), suggesting that the JAK2V617F-mutated clone may be more sensitive to HU in female than in male MPD patients. A similar gender difference had previously been reported by Pemmaraju et al.7 in a series of 80 ET patients that included treated patients.

haematologica | 2008; 93(11) | 1725 |

F. Girodon et al.

Table 2. Hematologic and clinical features of patients.									
	Group A: tested at the time of diagnosis Group B: tested while receiving HU								Comparison of Group B vs. Group A
	All	V617F+	V617F-	р	All	V617F+	V617F-	р	<i>p*</i>
ET Males/Females Age (mean±SD)	70/108 63±16	50/77 65±16	20/31 59±18	0.01	40/58 64±14	25/39 66±14	15/19 60±13	0.03	NS
Hematologic paran Hemoglobin Hematocrit MCV WBC platelets	neters (mean±S 13.6±1.6 42.0±6.4 90±5 10.0±4.0 819±368	b) 14.0±1.5 43.2±6.7 90±6 10.1±4.1 753±234	12.8±1.5 39.1±4.7 90±4 9.7±3.1 981±552	0.0001 0.0001 NS NS 0.0001	12.9±2.1 39.9±6.2 106±12 6.9±3.2 524±274	13.0±2.2 40.1±6.6 104±10 6.9±2.8 497±232	12.7±1.9 39.5±5.6 109±14 7.0±3.7 576±340	NS NS 0.0276 NS NS	0.0002 0.0016 <0.0001 <0.0001 <0.0001
% JAK2-V617F (m e All Males Females	ean ±SD) 13±13 14±13 12±13	18±12 19±12 17±12	0 0 0	NS males <i>vs.</i> females	10±14 11±16 8±13	15± 15 18± 16 13±14	0 0 0	males vs. females	NS NS 0.0364
PV Males/Females Age (mean±SD)	51/48 71±11	48/46 72±10	3/2 56±17	0.0007	18/18 67±14	15/16 68±13	3/2 63±20	NS	NS
Hematologic paran Hemoglobin Hematocrit MCV WBC Platelets	neters (mean±S 18.7±1.7 58.2±4.9 86±8 12.6±5.0 433±200	5D) 18.7±1.7 58.2±5.0 86±8 12.8±5.1 433±200	18.8±0.5 57.9±2.4 88±7 8.1±2.0 432±232	NS NS 0.0202 NS	14.7±2.7 45.2±9.2 103±12 10.4±9.6 336±147	14.8±2.8 45.4±9.5 104±12 10.6±10.0 314±128	14.3±2.2 44.2±7.6 98±8 9.1±6.7 477±189	NS NS NS NS 0.0093	<0.0001 <0.0001 <0.0001 0.0495 0.0011
% JAK2-V617F (m e All Males Females	ean±SD) 51±27 52±29 50±24	54±24 56±27 53±22	0 0 0	NS males <i>vs.</i> females	38±31 41±33 35±28	44±29 49±30 39±27	0 0 0	NS males <i>vs.</i> females	0.0257 NS 0.0249

Groups A and B were distinct groups of patients. Group A was tested at a single time point, at the time of diagnosis (before receiving any treatment). Group B was tested at a single time point while already receiving HU therapy (median duration of treatment: 32 months). p*: comparison of group A ("V617F+") and group B ("V617F+"). NS: not statistically significant. MCV: mean corpuscular volume; WBC: white blood counts.

The finding that HU, the drug most commonly used in MPDs, reduces and occasionally renders the JAK2V617F-mutated clone undetectable with sensitive (0.15%) AS-qPCR assays underlines the importance of detecting and quantifying JAK2V617F before initiating cytoreductive therapy. This is necessary in order to rule out false negatives under treatment. In this regard, JAK2V617F-negative should be applied solely to patients for whom the V617F mutation was not detectable prior to treatment. Furthermore, molecular response to HU, in addition to assay sensitivity, may explain the differences in ratios of JAK2V617F-positivity for ET reported in studies mixing treated and untreated patients (usually 50% JAK2V617F-positive) compared to studies of patients at diagnosis (70-75% JAK2V617F-positive).7,8,13,14

The delay and length of response of the JAK2-mutated clone to HU therapy could not be evaluated in this mostly retrospective study. However, all but 2 patients who responded to HU had been treated for <3 years (median: 18 months) and decreases in JAK2V617F allele burden were observed in 2 patients with <6months of treatment, suggesting that reduction of the JAK2V617F -mutated clone likely occurs within the

| 1726 | haematologica | 2008; 93(11)

first year of HU therapy. This could explain the apparent contradictions between our study and others, which reported no change in %JAK2V617F in sequential analysis of treated MPD patients, likely under HUtherapy for several years when first tested for JAK2V617E.¹⁵ We tried to compare patients with molecular response to HU with those who did not respond. The only difference between ET patients responding to HU with decreased %JAK2V617F and those with no variation was younger age (mean age: 60 vs. 71 years respectively, p<0.05). There was no difference in blood parameters (WBC, platelet counts, Ht, Hb) at the time of diagnosis. Similarly, blood counts of patients for whom JAK2V617F became undetectable with HU treatment did not differ from those with moderate or no decrease in %JAK2V617F.

Finally, it is important to determine whether one should aim towards complete molecular response in JAK2V617F-positive patients. As treatment affects the (mutated) granulocyte/(non-mutated) lymphocyte ratio, accurate assessment of the molecular response of treated patients – quantification of low levels of JAK2V617F – can only be achieved using purified granulocytes, not whole blood.¹⁶ However, the prognostic

Detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients

value of the *disappearance* of the *JAK2*V617F-mutated clone during treatment is currently not known. We and others previously reported sharp decreases and disappearance of *JAK2*V617F-mutated clones in PV and ET patients in association with transformation into acute myeloid leukemia.^{*v*} In the present series, none of the patients who became *JAK2*V617F-negative with HU therapy showed signs of leukemic transformation for as long as 27 months. Prospective studies with sequential assessments of %*JAK2*V617F – taking into account gender – are needed to determine whether obtaining a molecular response has a favorable influence on MPD evolution, compared to patients for whom the *JAK2*V617F load remains stable.

Authorship and Disclosures

FG and SH conceived the study, analyzed the data, wrote the paper and created Table 2; CC performed AS-qPCRs; MM carried out statistical analyses, CS collected and analyzed the data, created Table 1 and Figure 1; FDS and AV collected the data; IL enrolled patients, MM enrolled patients and revised the manuscript, FG is responsible for the patient database.

All the individuals listed as co-authors meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship as detailed in the ICMJE website: http://www.icmje.org/#author. The authors reported no potential conflicts of interest.

References

- Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Leukemia 2008;22: 437-8.
- Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia 2008;22:14-22.
- Girodon F, Lippert E, Mossuz P, Dobo I, Boiret-Dupre N, Lesesve JF, et al. JAK2V617F detection and dosage of serum erythropoietin: first steps of the diagnostic work-up for patients consulting for elevated hematocrit. Haematologica 2007;92: 431-2.
- 431-2.
 4. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. Leukemia 2007;21: 1952-9.
- 5. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bogani C, Verrucci M, Ponziani V, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. Leukemia 2005; 19:1847-9.
- 6. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G,

Bogani C, Pancrazzi A, Longo G, et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. Haematologica 2008;93:41-8.

- antonioocydenna: Internatologica 2008;93:41-8.
 Pemmaraju N, Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. The quantitative JAK2 V617F neutrophil allele burden does not correlate with thrombotic risk in essential thrombocytosis. Leukemia 2007;21: 2210-2.
- Kittur J, Knudson RA, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Wolanskyj AP, et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. Cancer 2007; 109: 2279-84.
- Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj A. The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia. Blood 2007;109:4105.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. Blood 2006;107:3676-82.
- Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon α-2a. Blood 2006;108:2037-40.
- Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to

large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. Blood 2007;110:4030-6.

- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2006;108:1865-7.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. Lancet 2005;366:1945-53.
- 15. Gale RE, Allen AJ, Nash MJ, Linch DC. Long-term serial analysis of X-chromosome inactivation patterns and JAK2 V617F mutant levels in patients with essential thrombocythemia show that minor mutant-positive clones can remain stable for manutary are Riod 2007.100.1241.3
- cylicinia show that finite intrainpositive clones can remain stable for many years. Blood 2007;109:1241-3.
 16. Hermouet S, Dobo I, Lippert E, Boursier MC, Ergand L, Perrault-Hu F, et al. Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of JAK2(V617F). Leukemia 2007;21: 1128-30.
- 17. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. Blood 2007;110:375-9.

haematologica | 2008; 93(11) | 1727 |

Annexe II :

"Absence de JAK2V617F dans la thrombose associée à l'hémoglobinurie paroxystique nocturne" Letters to the Editor

Absence of JAK2-V617F in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-associated thrombosis

Marc Fouassier¹; François Girodon²; Cédric Cleyrat³; Nelly Robillard¹; Richard Garand¹; Sylvie Hermouet^{1,3} ¹Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France; ²Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France; ³INSERM UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

Dear Sir,

Thrombotic manifestations in haematological malignancies are frequent in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) and in myeloproliferative diseases (MPD), particularly in polycy-thaemia vera (PV) and in essential thrombocytaemia (ET). Localisation of thrombotic complications of PNH, PV and ET is unusual, with a high percentage of splanchnic vein thrombosis (SVT) and Budd-Chiari (BC) syndromes (1–5). The V617F mutation of the *JAK2* gene (JAK2-V617F) is detected in >90% of PV and >60% of ET cases and may play a role in the thrombotic complications of MPD (6–8). The mechanism of these complications is not fully elucidated but activation of leukocytes is probably involved (9, 10). JAK2-V617F is also frequently detected in patients with normal or low blood cell counts who present with SVT or BC syndrome, and in patients with cytopenia, notably certain cases of myelodysplastic syndromes (MDS)

Correspondence to: Dr. Marc Fouassier Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie Centre Hospitalier Universitaire 9 quai Moncousu, 44093 Nantes cedex, France Tel.: +33 2 40 08 40 49, Fax: +33 2 40 08 40 50 E-mail: marc.fouassier@chu-nantes.fr

Financial support:

This work was supported by a grant from the Comités Loire-Atlantique and Morbihan of the Ligue Nationale contre le Cancer; to SH. CC is the recipient of a fellowship from the French Ministry of Research.

Received: March 2, 2009 Accepted after minor revision: April 28, 2009

Prepublished online: June 4, 2009 doi:10.1160/TH09-03-0140

Thromb Haemost 2009; 102: 180-182

(11–13) and PNH clones in patients with MDS has been described recently (14).

PNH is an acquired disorder related to mutations of the phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A) gene, which encodes for an enzyme required for the first step in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Clonal PNH cells are detected by deficient expression of GPI-anchored proteins, such as CD55 and CD59 (red blood cells) and CD16, CD24 and CD66b (granulocytes) from the cell surface. Clinical manifestations are marrow hypoplasia, chronic intravascular haemolysis, and a high frequency of SVT and BC syndrome (15, 16). Multiple clones - subsequent or simultaneous - can be observed in PNH, which is consistent with an yet unknown genetic abnormality of haematopoietic stem cells pre-disposing to mutations, as recently described in MPD (17-20). Interestingly, CD55and/or CD59-deficient red cell populations have been reported in up to 21% of MPD (21). In addition, expression of polycythemia rubra vera-1 (PRV-1), a gene of the urokinase-plasminogen activator receptor (u-PAR) family, is altered in MPD, particularly in PV where it correlates with the JAK2-V617F allelic ratio (9, 22). In PNH, inactivation of u-PAR, no longer attached to the cell membrane via GPI but secreted into extracellular compartment, where it is no longer able to assure fibrinolysis, may facilitate occurrence of thrombosis (23). Other mechanisms, such as altered formation of microvesicles, nitric oxyde depletion and defect of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) expression on endothelial cell surface, may be common to PNH and MPD and deserve further investigation in both disorders (24-26).

Because of the many abnormalities shared by PNH and MPD, we asked whether JAK2-V617F could be associated with unusual thrombosis in PNH also, not solely in MPD. To answer this question, the presence of JAK2-V617F in PNH clonal cells

180

Letters to the Editor

Table 1: Characteristics of patients. Clonal PNH cells were studied by flow cytometry by quantifying the proportion of CD55⁻CD59⁻ red blood cells, and the proportion of CD16⁻CD24⁻CD66b⁻ polymorphonuclear granulocytes in the peripheral blood; data are expressed as % of red blood cells and % of PMN granulocytes. Levels of expression of JAK2 wild-type or V617F were determined in genomic DNA extracted from May-Grünwald-Giemsa-stained bone marrow smears (10/11 patients) and in blood granulocytes (patient Na07), using highly sensitive allele-specific quantitative polymerase chain reactions (sensitivity threshold: 0.2% JAK2-V617F), performed as previously reported [9, 11, 12].

Patients Age		Sex	Pathology	PNH clone		JAK2-V617F	Observation time	Thrombosis	Outcome
	(years)			% RBC	% PMN		(% total JAK2)	(years)	
Na02	30	М	Aplastic anemia	0.3	0.5	0	1	No	Death
Na04	81	F	Aplastic anemia	0.2	0.9	0	0.1	No	Death
Na03	14	F	Aplastic anemia	0.6	7.2	0		No	BMT; lymphoma
Di03	35	М	PNH	ND	20	0	2	No	AML, death
Di04	31	F	PNH	15	20	0	4	No	Alive, cytopenia
Di02	30	F	Aplastic anemia	ND	50	0	3	vencus	BMT at age 32
Na0 I	39	М	MDS	58	62	0	4	No	Alive, cytopenia
Di0I	39	М	PNH	20	70	0	7	chronic BC syndrome	BMT at age 42
Na05	5	М	PNH	30	81	0	11	No	Alive, cytopenia
Na06	23	F	PNH	17	84	0	5	No	Alive, cytopenia
Na07	66	М	PNH	17	92	0		arterial and venous	Alive, cytopenia
Yrs, years; M, male; F, female; RBC. red blood cells; PMN, polymorphonuclear cells, BC, Budd-Chiari; AML, acute myeleid leukaemia: BMT, bene marrow transplantatior; nd, not done.									

was examined in genomic DNA extracted from bone marrow smears from 11 patients with PNH (Table 1). PHN clonal cells had previously been detected in peripheral blood by deficient expression of CD55 and CD59 (red blood cells) and CD16, CD24 and CD66b (granulocytes) using multi-color flow cytometry, as described by Parker et al. (15). The PNH granulocyte ratio was <10% for three patients (3 idiopathic aplastic anemia) but ranged from 20% to 92% for eight patients. Of note, among the five patients with a PNH cell ratio \geq 50%, three had presented thrombotic complications. JAK2-V617F, studied using highly sensitive allele-specific quantitative polymerase chain reactions (9, 11, 12), was not detected in bone marrow samples from PNII patients.

Thus, a common genetic abnormality pre-disposing MPD and PNH patients to unusual thromboses remains a possibility but an association between JAK2-V617F and SVT and BC syndromes is unlikely in PNH. Coagulation activation and fibrinolysis impairment remain good candidates to explain the high incidence of unusual thromboses in PNH. However, PNH being a rare disease, the size of our cohort is inevitably small. This very fact makes it difficult to draw solid conclusions; further studies on a large series would be useful.

References

 Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek GW, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. Elood 2008; 111: 4922–4929.

2. Randi ML, Lombardi AM, Capin M, et al. Haemostatic proteins gene polymorphismsin patients with unusual vein thrombosis and Ph- myeloproliferative disorders. Thromb haemost 2007; 98 : 702–704.

 Valla D, Dhumeaux D, Babany G, et al. Hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A spectrum from asymptomatic occlusion of hepatic venules to fatal Budd-Chiari syndrome. Gastroenterclogy. 1987; 93: 569–575.

 Peffault de Latour R, Mary JY, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria : natural history of disease subcategories. Blood 2008, 112. 3099–3106.

5. Poulou LS, Xila V, Rokas GI, et al. Temporal trends in mortality rates from visceral vein thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: An optimistic view. Thromb Haemost 2008; 99: 642–645.

6. Cheung B, Radia D, Pantelidis P, et al. The presence of the JAK2 V617F mutation is associated with a higher haemoglobin and increased risk of thrombosis in essen-

tial thrombocythaemia. Br J Haematol 2006; 132: 244-245.

7. Finazzi G, Rambaldi A, Guerini V, et al. Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status. Haematologica 2007; 92: 135–136.

 Ziakas PD. Effect of JAK2 V617F on thrombotic risk in patients with essential thrombocythemia: measuring the uncertain. Haematologica2008; 93: 1412–1414.

 Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2006; 108: 1865–1867.

 Cazzola M, Passamonti F. Not just clonal expansion of hematopoietic cells, but also activation of their progeny in the pathogenesis of myeloproliferative disorders. Haematologica 2006; 9: 159.

11. Beissinot M, Lippert E, Girodon F, et al. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation in patients with splanchnic vein thrombosis and normal or low hematcerit and platelet counts. Blood 2006; 108: 3223-3224. 12. Plumé G, Vayá A, Ferrando F, et al. JAK2V617F mutation as a marker of a latent myeloproliferative disorder in a patient with Budd-Chiari syndrome and faetor V Leiden mutation. Thromb Haemost 2007; 98: 681–682.

13. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, et al. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). Blood 2005; 108: 1781–1782.

14. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnosis pitfalls and caveats. Haematologica 2009; 94: 29–37.

 Parker C, Omine M, Richards S et al; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood 2005; 106: 3699–3709.

16. Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood Rev 2008; 22: 65–74.

181

Letters to the Editor

17. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, et al. Clonal heterogeneity in polycythemia yera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. Blood 2008; 111: 3863–3866.

2008; 111: 3863 3866. 18. Wanachiwanawin W, Siripanyaphinyo U, Piyawattanasakul N, et al. A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. Eur J Haematol 2006; 76: 502–509.

matol 2006; 76: 502–509. 19. Trauslen A, Pacheco JM, Dingli D. On the origin of multiple mutant clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Stem Cells 2007; 25: 3081–3084.

20. Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. Leukemia 2008; 22: 1841–1848. Meletis J, Terpos E, Samarkos M, et al. Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. Haematologia (Budap) 2001; 31: 7–16.
 Kralovies R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene

 Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V017F mutation of Jak2. Blood 2005; 106: 3374–3376.

23. Ploug M, Plesner I, Rønne E, et al. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinutia. Blood 1992; 79: 1447–1455. 24. Rother RP, Bell L, Hillmen P, et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human discase. J Am Med Assoc 2005: 293: 1653–1662.

passia neurogrown, a nove internation in numan disecase. JAm Med Assoc 2005; 293: 1653–1662.
25. Hugel B, Socié G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. Blood 1999; 93: 3451–3456.

26. Maroney SA, Cunningham AC, Ferrel J, et al. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. J Thromb Haemost 2006; 4: 1114–1124.
Annexe III :

"Utilisation de la HRM, technique simple, fiable et sensible, pour la détection des mutations de l'exon 12 de JAK2 : pertinence clinique pour le contrôle de la PV"

> (article actuellement en révision pour le journal "The Journal of Molecular Diagnostics")

NESTED HIGH RESOLUTION MELTING CURVE (HRM) ANALYSIS, A HIGHLY SENSITIVE, RELIABLE AND SIMPLE METHOD FOR DETECTION OF *JAK2* EXON 12 MUTATIONS: CLINICAL RELEVANCE IN THE MONITORING OF POLYCYTHEMIA.

Serge CARILLO^{*1}, Laurent HENRY¹, Eric LIPPERT^{*2}, François GIRODON^{*3}, Isabelle GUIRAUD¹, Céline RICHARD⁴, Frédérique DUBOIS GALOPIN^{*4}, Cedric CLEYRAT⁵, Eric JOURDAN^{*6}, Robert KRALOVICS⁷, Sylvie HERMOUET^{*5}, Thierry LAVABRE-BERTRAND^{*1}.

1 - Laboratoire de Cytologie Clinique, CHU Caremeau, Nîmes, Laboratoire d'Histologie, Faculté de Médecine, Université de Montpellier 1, France and IBMM, UMR CNRS 5247 ;

- 2 Laboratoire d'Hématologie, CHU Bordeaux, France;
- 3 Laboratoire d'Hématologie, CHU Dijon, France;
- 4 Laboratoire d'Hématologie, CHU Clermont-Ferrand, France;
- 5 Laboratoire d'Hématologie, CHU Nantes, France ;
- 6 Service d'Hématologie et Oncologie médicale, CHU Nîmes, France ;
- 7 Center for Molecular Medicine, Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria;
- * Member of the French Intergroup on MPN (FIM)

Running title: HRM screening of JAK2 exon 12 mutations

Grants and support:

This work was supported by grants from the University Hospital of Nîmes AOI 2008-A00569-46 to SC; by grants from the Ligue contre le Cancer: Comité du Gard to SC, Comité de la Gironde to EL, Comité de Côte d'Or to FG, and Comités d'Ille-et-Vilaine et du Morbihan to SH; Austrian Science Fund (FWF, P20033-B11) to RK; and by a grant from INCa to the tumor bank of the CHU de Bordeaux

Corresponding author:

Pr T. Lavabre-Bertrand, Laboratoire de Cytologie clinique et Cytogénétique, C.H.U., Place du Professeur Robert Debré, 30029 Nîmes Cedex 9, France Phone: +33 4 66 68 41 60; Fax : +33 4 66 68 41 61; E-mail : tlavabre@univ-montp1.fr

The authors reported no potential conflicts of interest.

Key words: HRM, *JAK2* exon 12, erythrocytosis, PV, MPN

Abstract

JAK2 exon 12 mutations are found in myeloproliferative disorders characterized by erythrocytosis. Lying in a 33bp region and conserving the open reading frame, they often present a low allelic burden (<10%). This excludes screening with usual techniques like allelespecific or different sequencing protocols. High resolution melting, a fast in-tube method, seems the most accurate routine technique for that. We described a reliable and powerful nested HRM, independent of DNA preparation and with technical sensitivity of 100% (95% CI: 93% - 100%) and specificity of 96.7% (95% CI: 89.7% - 96.7%). Screening a cohort of 10 idiopathic erythrocytoses, 28 polycythemia vera and 7 secondary erythocytoses allowed the detection of 15 mutants including 9 different mutations of which 3 were unreported, all in the PV group and present a characteristic profile: pure erythocytosis associated with low serum EPO. Threshold detection level ranged from 0.66 to 3% allelic burden, depending on the mutation. All the HRM positive signals were found mutated by sequencing. Six of them (40%), however, required cloning before sequencing due to low allelic burden. Classical techniques like genomic sequencing may therefore miss up to 40 to 50% of cases. Given its sensitivity, HRM, and nested HRM can be used in routine diagnosis and seem the most efficient current techniques for the detection of *JAK2* exon 12 mutations.

The description of an acquired JAK2 c1849G>T (V617F) mutation represents a major improvement in the understanding and management of myeloproliferative disorders (Baxter, Scott et al. 2005; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005). Investigation of c1849G>T negative polycythemic cases led to the characterization of new mutations in JAK2 exon 12 (Butcher, Hahn et al. 2007; Martinez-Aviles, Besses et al. 2007; Pardanani, Lasho et al. 2007; Percy, Scott et al. 2007; Scott, Tong et al. 2007; Pietra, Li et al. 2008). These exon 12 mutations are associated with pure erythrocytosis, in contrast to classical myeloproliferative syndromes. Nineteen different JAK2 exon 12 mutants have to date been reported (Butcher, Hahn et al. 2007; Martinez-Aviles, Besses et al. 2007; Pardanani, Lasho et al. 2007; Percy, Scott et al. 2007; Scott, Beer et al. 2007; Scott, Tong et al. 2007; Bernardi, Ruggeri et al. 2008; Li, Kralovics et al. 2008; Pietra, Li et al. 2008). They are all located between AA 536 and 547. Mutations, deletions, insertions and duplications have been described, all respecting the open reading frame (ORF), indicating a huge number of predictable mutational types. Techniques like allele specific – polymerase chain reaction (AS-PCR) are therefore inappropriate and sequencing or pyrosequencing lack sensitivity to screen them. There is obviously a need for a rapid and sensitive assay for *JAK2* exon 12 mutation screening (Cazzola 2007). Two molecular biology techniques are suitable to detect any kind of mutation with an acceptable sensitivity (about 1%): one is denaturing high pressure liquid chromatography (DHPLC), and the other high resolution melting (HRM) curve analysis. As DHPLC requires specialized equipment, we turned to HRM, which can be performed in every laboratory equipped with a real-time thermocycler. It allowed the detection of 15 JAK2 exon 12 mutants. Previous papers already reported on HRM applications in this field, each one trying to improve this new technology: sensitivity (Jones, Cross et al. 2008), technical reproductiveness (Rapado, Grande et al. 2009), multicenter reliability (Ugo, Tondeur et al.) and original cDNA application (Schnittger, Bacher et al. 2009). However, technical and diagnostic specificity and sensitivity remain unanswered.

PATIENTS AND METHODS

Patients:

After informed patient's consent, 59 granulocyte DNA samples from five French centers (14 controls, 7 secondary erythrocytoses (SE), 10 idiopathic erythrocytoses (IE) and 28 polycythemia vera (PV) patients, according to 2008 WHO diagnostic criteria (Pierre, Imbert et al. 2001) were centralized and tested at the University Hospital of Nîmes. All patients were tested for V617F status, according to WHO recommendations. *JAK2* c1849G>T detection was previously performed according to Lippert *et al.*(Lippert, Boissinot et al. 2006). IE and PV were selected among patients referred to each center for erythrocytosis with a putative Jak2 exon12 pattern: c1849G>T negative and low EPO or positive EEC. Main clinical and basic biological data are summarized in Table 1. Endogenous (EEC) and cytokine-stimulated erythroid colonies were obtained from blood or bone marrow progenitors as described (Li, Kralovics et al. 2008). This study has been approved by the local Comité de Protection des Personnes (2008.07.07.bis) and the French organization AFSAPS (on 2008.12.12).

c1627_1632 del mutant DNA (Vi327) was previously characterized by one of us and served as exon 12 positive control in experiments (Li, Kralovics et al. 2008).

Genomic DNA was isolated from density gradient purified peripheral blood granulocytes (Lymphoprep, Eurobio, Les Ulis, France) by routine center's protocols, *i. e.* salt purification or QiAmp (Qiagen, Hilden, Germany). Quality and concentration were assessed with a NanoDrop-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE).

14 samples of non-polyglobulic individuals served as control, including patients referred for thombocytosis or non-MPN haematological disorders.

Nested PCR: For mutation detection, a first 496 bp PCR product was obtained from 100 ng genomic granulocyte DNA with primers 5'–CTCCTCTTTGGAGCAATTCA-3' and 5'–GAGAACTTGGGAGTTGCGATA-3' (nested PCR) as previously reported[10]. The PCR program consisted of 95°C for 10 min to activate Taq DNA polymerase followed by 35 amplification cycles (denaturation 95°C for 3 seconds, annealing 56°C for 1 min and elongation 72°C for 20 seconds). PCR reactions were performed in a 25 🛛 volume, using 2.5 mM MgCl₂, 1🖾 M primers and 1.25 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). For sensitivity test, PCR were purified on Quiaquick columns (Qiagen, Hilden Germany) and quantified on NanoDrop.

HRM: An appropriate dilution of the nested PCR product (starting with 10⁻³) or 10 ng total DNA for detection threshold tests, were then amplified with the HRM kit (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany), 3.5 mM MgCl₂, 0.4 \square M of each internal primers 5'-CAGAGGCCTACTCATATGAACCAAA-3' and 5'-ACAGATGTTGTTTTAAAAGGACAAA-3', in 10 \square l final volume (HRM-PCR). HRM amplicon was shorter than the previous one to improve sensitivity (118 bp long). Amplification and melting conditions were as follows: 95°C for 10 min, 50 cycles at 95°C for 10 seconds, 58 to 65°C for 20 seconds touch down annealing programs (0.5°C a step) and 72°C for 20 seconds elongation, and a melt from 65 to 95°C at 0.01°C per second, 50 fluorescence acquisitions per °C, all performed on a LC480 apparatus (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany).

HRM analysis was performed on the dedicated Gene Scanning Software (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) using normalized, temperature shifted difference plot. Tm (melting temperature) Calling Analysis Software (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) was also used to confirm the previous analysis as mutations gave a left (low temperature) sided shoulder on the melting peak graph (Fig. 1A). Negative controls were used as reference curve to generate the difference plot. A plasmid containing the c1627_1632del mutation was used as positive control (Fig. 1B) [12].

All the analyses were performed in Nîmes on a Light Cycler 480 apparatus. Confirmatory results were obtained with a similar technique on a RotorGene (Labgene Scientific instruments, Archamps, France).

Sequencing HRM products:

All mutations were confirmed and characterized by sequencing PCR product or cloned plasmid.

10 ng of genomic DNA or 1 ng of purified plasmid was amplified using 0.4 \mathbb{Z} M chimeric <u>M13-JAK2</u> oligonucleotides (Forward 5'-<u>TGTAAAACGACGGCCAGT</u>TTTGGAGCAATTCATACTTT-3'; Reverse 5'-<u>GGATAACAATTTCACACAGG</u>GACAGTAATGAGTATCTAAT-3'), 1.5 mM MgCl₂ and 1.25 U AmpliTaq Gold in a 25 \mathbb{Z} l volume reaction. After 95°C for 5 min, PCR program consisted of 10 cycles with denaturation 95°C for 30 seconds, annealing 50.6°C for 1 min, amplification 72°C for 20 seconds, followed by 25 cycles with hotter annealing temperature (65°C). Sequencing was performed on 10 ng purified PCR, using <u>M13</u> oligonucleotides and Big Dye Terminator V1.1 chemistry following supplier's recommendations on ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster, CA), in Bordeaux and Nîmes.

Sometimes, a too low allelic burden (generally estimated lower than 10%) did not allow direct sequencing of mutant allele from genomic DNA. In those cases, previous PCR products were subcloned into PCR2.1 Topo vector (Topo TA, Invitrogen, Carlsbad, CA) and transformed using One Shot Top10 Electrocompetent E. coli, according to supplier's recommendations. Plasmids were purified on Qiagen columns (Plasmid mini kit, Qiagen Hilden, Germany), quantified and directly screened with the above mentioned HRM reaction. The DNA of the positive colonies were then sequenced, using M13 oligonucleotides.

All the mutations described herein followed the Human Genome Variation Society recommendations. They all referred to NM_004972.3.

Statistical analysis was performed using the Student's t test.

RESULTS

Nested HRM technique allows and improves the detection of exon 12 mutants.

Using c1627_1632del mutant (Vi327) (Li, Kralovics et al. 2008), we set up HRM reaction. To improve sensitivity, we designed a short amplicon encompassing the region where all the described mutants were located, corresponding to *JAK2* AA536 to AA547. Forward

oligonucleotides end at position 5060016 (NM_008413, GenBank), corresponding to AA534, whereas the reverse ones end at intron 12 position 5060085, giving a 118 bp large amplicon, approximately the same size as the one used by Jones *et al.* (126 bp), and shorter than those used by Ugo *et al.* (184 bp) and Rapado *et al.* (280 bp) (Ugo, Tondeur et al. ; Rapado, Grande et al. 2009). Schnittger *et al.* developed an original hybridization probe technique which overcomes the need for a short amplicon(Schnittger, Bacher et al. 2009). Our amplicon is devoid of any reported single nucleotide polymorphism (SNP), the nearest one being intron 12 rs12351248, at position 5060182 (NCBI search for SNP). It allowed us to detect Vi327 mutation but we obtained a broad dispersion of wild type differential plot curves, as shown in Fig. 1 C.

Fine discrimination of mutants from wild type requires having the smallest dispersion of wild type graphs to clearly set up a cut-off threshold. This was not possible when using native genomic DNA, due to the probable presence of chemical contaminants introduced by the different purification protocols used. Therefore, we designed a nested HRM, the first PCR (Scott, Tong et al. 2007) encompassing the 118 bp HRM amplicon and diluting any potential contaminant. As shown in Fig. 1 D, we were able to reduce dispersion and reproducibly set the cut-off at 2.

Nested HRM is a reliable technique for *JAK2* exon 12 mutant screening.

Evaluating the technical reliability of nested HRM presents some difficulty. Mainly, we could not exclude presence of a mutation in patients found negative by any of the today usual techniques (which corresponds to diagnostic reliability). Therefore, to determine the technical sensitivity and specificity of the nested HRM, we took advantage of cloning, using wild type and c1614_1616CAA>GTT mutant plasmids (Fig. 1E). By this way, there will not be any trouble regarding mutation status of the analysed samples. We analysed each sample of wild type plasmid and mix mutant/wild type (1/10th, to get heterozygotes), 30 times in the same experiment. We did not find any false negative and only one false positive result (3.33%). In the latter case, there was only a small peak height (3.9) whereas positive control provided a strong signal (21.5). In order to fit with routine screening, this point must be discarded (no specific peak on Tm graph). A retrospective way relied on sequencing all the HRM mutants found, which was highly probing: no false positives found to the present in this work (see below). Therefore, we were able to evaluate HRM's technical reliability.

HRM technique allows detection of exon 12 JAK2 mutants in clinical conditions.

To validate clinical application of HRM, we screened a series of 45 patients devoid of any known molecular lesion. *JAK2* status was determined as part of standard evaluation. Among these 45 cases, there were 28 PV cases, according to 2008 WHO classification. An HRM positive signal was detected in 15 patients, all of them being PV (Table 2). As expected, neither controls, nor SE, nor IE gave a positive signal. The complete mutation list and the corresponding HRM curves can be seen in Table 2 and Fig. 2A. We could describe three new mutants (Fig. 2B): c1619T>C / p540I>T (Na141), a complex double substitution c1609T>A; c1616A>T / p537F>I; p539K>I (Bo3) and a novel mutation at nucleotide level corresponding to a previously described abnormal aminoacid sequence c1614-1616CAA>GTT / p538-539HK>QL (Na571). As can be seen in Fig 2A, there was no clear correlation between the type of mutation and the HRM curve profile. Even when using the Gene Scanning Software, which includes a specific module

dedicated to mutant sorting, based on graph's shape analysis, no clear correlation could be found.

Except for the 3 duplications which required gel isolation, direct sequencing of genomic DNA identified only 6 mutants out of 12. Plasmid cloning of PCR allowed sequencing of the 6 remaining mutants. This result is of major importance. First, it emphasizes the higher sensitivity of HRM above sequencing, if needed. Second, to our knowledge, it is the first report showing that conventional open techniques like sequencing may miss between half to one third (40%, incorporating the 3 duplications) of the mutants. It highlights the need for a sensitive screening technique and put forward HRM as the most potent currently available screening technique.

All main biological data for the exon 12 HRM positive patients are shown in Table 2.

Nested HRM is more sensitive than HRM.

We assessed HRM sensitivity with the new mutants c1609T>A; 1616A>T / (Bo3) and c1614_1616CAA>GTT (Na571). Their allelic burdens were estimated to be close to 53% (Bo3) and 26.9% (Na571) on sequencing chromatograms. Serial 1/3 dilution of mutant into wild type purified and quantified PCR was adapted to 10 pg. We could detect a positive signal in a 1:81 dilution, corresponding to 0.66 % burden for the first one and 1:27, corresponding to 1% burden for the latter (Fig 3A). We then extended the procedure to different mutants, and obtained a detection threshold ranking from less than 1% (Bo3), to 2% (Bo2, Di0151) and 3% (Di0121). Detection thresholds are (i) mutant dependent and (ii) largely under previous report (Jones, Cross et al. 2008) or sequencing (currently estimated at 10%) or pyrosequencing (2 to 5%) thresholds.

We then took advantage of low allelic burden of a positive patient, Cf705, to compare HRM and nested HRM, *i.e.* without or with nested PCR (as described in the *Method* section above). As shown in Fig. 3B, nested HRM curve provided a clearly positive shape, in contrast with the profile obtained with the direct HRM, and converts an uncertain result into a clear-cut one, which was confirmed by sequencing after cloning. Higher sensitivity of nested HRM is probably the result of matrix complexity lowering by the first PCR. This explains why the results are better than those reported by Jones *et al.*(Jones, Cross et al. 2008). So, HRM appears to be as sensitive as AS-PCR, an inappropriate technique for *JAK2* exon 12 mutation screening.

DISCUSSION

Nested HRM provides a reliable procedure, independent of DNA purification techniques. When correctly defining a threshold cut-off of 2, this technique looks particularly reliable with technical sensitivity of 100% (95% CI: 93% - 100%) and specificity of 96.7% (89.7% - 96.7%). 15 out of 45 patients were found mutated, corresponding to 9 different mutations including 3 unreported ones, but HRM was unable to identify the mutations. Dilution assay showed a threshold sensitivity ranging from 0.66% to 3%, depending on the mutation. All the positive cases found by HRM were shown to be mutated, but 6 of them required cloning before sequencing.

HRM is a simple, reliable and sensitive screening technique for detection of *JAK2* exon 12 mutations. The use of HRM in this situation has already been reported (Ugo, Tondeur et al. ;

Jones, Cross et al. 2008; Rapado, Grande et al. 2009; Schnittger, Bacher et al. 2009). To improve HRM sensitivity, the amplicon size was as short as possible, corresponding to 118 bp.

The technique described herein (nested HRM) improves HRM technique (Jones, Cross et al. 2008; Schnittger, Bacher et al. 2009). Given that samples were obtained from different laboratories, we tried to bypass problems induced by local genomic DNA purification. Putative contaminants lowered sensitivity by a broad dispersion of wild type graphs used to determine a cut-off threshold. Nested HRM improves the overall sensitivity by lowering the cut-off as well as matrix complexity. This could be demonstrated namely when comparatively testing the same sample by HRM and nested HRM.

We have to precisely specify the meaning of this cut-off. In case of a single melting domain containing short amplicon, like those described herein, melting peak heights depend on two parameters (Palais, Liew et al. 2005): first, sequence which determines the melting capability of heteroduplexes; second, the allelic burden which influences the fraction of heteroduplexes we could estimate by measuring fluorescence decay during the controlled melting analysis. Therefore, the cut-off threshold is not an absolute discriminating one but just a parameter which could depend on the allelic burden, and so, just helps assess a mutant. This is clearly highlighted by serial dilution experiments and elsewhere (Jones, Cross et al. 2008; Rapado, Grande et al. 2009; Schnittger, Bacher et al. 2009). Namely, a peak under the cut-off could correspond to a true wild type or to a mutant with an allelic burden lower than the detection threshold.

Technical sensitivity estimated by serial dilution of different mutants in wild type samples ranged from 0.66 to 3%, with a reproducible cut-off of 2. Depending on mutation, it is better than, or in the range, described by others (1 to 20%) (Jones, Cross et al. 2008; Rapado, Grande et al. 2009; Schnittger, Bacher et al. 2009), except for Schnittger and coll. where the problem probably resulted from an inappropriate apparatus: Light Cycler 2 only runs melting analysis and not HRM (Schnittger, Bacher et al. 2009). This is also in the range of well-known sensitive technique AS-PCR, but nested HRM has two prominent advantages: it can detect any kind of mutation (whereas AS-PCR is allele specific and requires therefore to be specifically designed for each mutation) and this two-step technique works regardless of the purification methods. These are two major points in routine screening.

Improving sensitivity must not impair specificity. This is much more difficult to assess because it is more or less impossible to select a wild type control, since there is no gold standard method from this point of view. Actually, on one hand, lack of mutant detection could result from an undetectable mutation (when using AS-PCR) or a too low allelic burden (when using sequencing). On the other hand, a normal hemoglobin level does not preclude a mutation at a very low level. The use of wild type and mutated exon 12 sequenced plasmids allowed us to correctly evaluate specificity, but with an artificial material. In this context, we obtained a technical specificity of 96.7% (95% CI: 89.7% - 96.7%) and sensitivity of 100% (95% CI: 93% - 100%). But what about diagnostic specificity in clinical conditions? In this report, all HRM positive samples were found mutated by sequencing either the direct genomic DNA or after cloning when the allelic burden was lower than 10%. To reach such a diagnostic specificity, we recommend running each sample in triplicate, discarding any wrong curves (compared to the 2

others) or in duplicate. In the latter case, a too large dispersion of the curves will require a new screening of the same sample. Therefore, we will be able to correct the imperfect technical specificity. Defining the exact diagnostic specificity of HRM would require, however, the study of a larger cohort. For the above-mentioned reasons, diagnostic sensitivity in clinical conditions cannot be evaluated, so defining predictive value is impossible.

This highlights one major point of this report. It is rather easy to define technical sensitivity by serial dilution assay, but diagnostic process is totally different. To the best of our knowledge, the present report is the first to address this point. Sequencing, the reference technique, may miss one third to half of the mutants, depending on whether or not we include the special large duplications cases. Nested HRM appears therefore to be the routine technique of choice in terms of sensitivity. While showing HRM to be more sensitive than genomic sequencing, Rapado *et al.* were able to directly sequence all their positive patients (Rapado, Grande et al. 2009). This could result from the small size of their positive cohort (3 positive patients). We would like to emphasize the importance of fine tuning the cut-off threshold, which implies always including at least 3 negative controls in each run.

We found nested HRM technique to be a highly sensitive technique with a strong specificity. Therefore we will have problems with HRM positive patients with too low allelic burden to be directly sequenced. The answer would require either genomic DNA cloning, as reported here, or sequencing of isolated erythroid colonies as reported elsewhere (Scott, Tong et al. 2007). Both are not suitable in routine conditions. Large follow-up studies would be necessary to document the signification of such a weak signal, that could be done quite easily, given that our technique is designed for routine screening.

Applying nested HRM to a retrospective cohort allowed us to detect fifteen exon 12 mutated patients, of whom three had novel mutations. The percentage reported here must not be confused with prevalence because of the study's design: we aimed to analyse *JAK2* exon 12 mutations in a retrospective cohort of polyglobulic patients lacking the hallmark V617F exon14 *JAK2* mutation.

From a clinical point of view, we confirm the previously described classical exon 12 *JAK2* mutated profile: pure erythocytosis associated with low EPO level. The new mutants described herein were associated with the same pattern.

In conclusion, HRM and nested HRM appear to be highly potent, sensitive and specific *JAK2* exon 12 screening techniques now adaptable to high throughput systems. The use of a twostep technique allows working with different DNA sources. There still remains a need to design a large collaborative study to improve unsolved points, such as diagnostic sensitivity and predictive value of a positive signal in low allelic burden patients.

Acknowledgements:

We wish to thank Dominique Bouchot, Martine Courtois, Isabelle Helot, Danielle Pineau, Marina Migeon, Magali Sciou for their excellent technical assistance.

References (cf paragraphe bibliographie du manuscrit)

		Control	SE	PV Ex12 +	PV Ex12 -	IE Ex12 -
	Total N	14	7	15	13	10
	M %	64.3	100	60	69.2	100
	F %	35.7	0	40	30.8	0
EPO	Mean	7.3	20.2	1.1	6.4	7.3
	SD	2.9	15.2	0.5	5.4	3.0
	Max	12.2	45.2	2.2	15.8	12.5
	Min	4.2	4.9	0.6	0.6	2.8
	n	9	6	12	10	9
EEC	%		0	70.0	66.7	0
	n		3	10	10	7
Hb	Mean	159.6	181.7	181.0	182.6	186.1
	SD	18.4	8.6	54.2	30.3	10.3
	Max	182	191	221	228	203
	Min	125	170	177	116	170
	n	14	6	12	11	10
Ht	Mean	47.3	54.4	62.6	55.7	55.7
	SD	5.6	1.9	9.0	9.6	1.9
	Max	54.9	57	90	69.5	60
	Min	36.3	51.5	52.5	35.6	50.8
	n	14	6	15	11	10
Plt	Mean	434	178.1	350.4	314.6	221.1
	SD	425.9	37.9	176.7	215.0	98.5
	Max	1725	241	749	707	481
	Min	154	129.5	134	138	137
	n	14	6	15	10	10
WBC	Mean	8.9	6.4	9.2	7.8	7.2
	SD	4	2.1	3.0	4.2	2.1
	Max	18.3	10.6	16.4	15.5	10.5
	Min	4.8	5.2	5.2	0.8	4.6
	n	14	6	15	10	10

Table 1: Patients' clinical and biological data

Control: non-polyglobulic patients; SE: secondary erythrocytosis; IE: idiopathic erythrocytosis; PV: polycythemia vera; PV/IE Ex 12 +/-: PV/IE with (+) or without (-) Jak2 exon12 mutation. N, n: number of patients; EPO : serum erythropoietin level (International Unit or IU/L); EEC: endogenous erythroid colonies (% of patient presenting positive culture); Hb : hemoglobin level (g/L); Ht : hematocrit (% vol/vol); Plt: platelet counts (10⁹/L), WBC: white blood cells count (10⁹/L)

Patient	Age/	Diag.	Mutation type	Ht	Hb	WBC	Plt	EPO	EEC	Seq
Number	Sex		NM_005972.3 :	(%)	(g/L)	(10 ⁹ /L)	(10 ⁹ /L)	(IU/L)		
Bo1	51/F	PV / u	c1624_1626 del	62	187	5.4	278	1.3	ND	Clo
Bo2	55/M	PV / d	c1624_1626 del	71	NA	11	224	0.8	ND	Clo
Bo3	61/M	PV / d	c1609T>A;1616A>T*	60	NA	7	250	1.3	+	Gen
Bo4	21/F	PV / d	c1615_1616AA>TT	58	NA	6.5	318	1	+	Clo
Bo5	51/F	PV / d	c1624_1626 del	66	214	7	749	0.6	ND	Gen
Cf0705	45 / M	PV / d	c1620_1621del;	59.1	197	12.3	134	ND	+	Clo
			1624_1627del							
Di0121	68/M	PV / d	c1614_1616CAA>ATT	59	188	11.3	429	1.7	+	Gen
Di0151	78/F	PV / d	c1622_1627 del	58	192	8.5	452	1	+	Gen
Di0475	35/M	PV / d	c1606_1640 dup	58	183	5.2	242	1.5	-	Clo
Di0569	93/F	PV / u	c1615_1616AA>TT	53	157	16.4	372	2.2	+	Gen
Di0871	42/M	PV / d	c1606_1640 dup	59	196	11.1	281	0.8	+	Clo
Di1066	56/M	PV / d	c1606_1640 dup	65	213	7.5	275	0.8	-	Clo
Na141c	70/M	PV / t	c1619T>C*	53.3	177	6.5	205	ND	ND	Clo
Na571	55/M	PV / d	c1614_1616CAA>GTT*§	66	221	7.7	227	ND	+	Clo
Ni0846	68/F	PV / d	c1624_1629del	62.5	206	11.4	391	0.8	ND	Gen

Table 2: Characteristics of patients with JAK2 exon 12 mutation

*: novel mutations, §: undescribed mutation at nucleotidic level corresponding to an already described pathological amino-acid sequence. M: male, F: female, Diag.: diagnosis / sampling at diagnostic (d) under treatment (t) or unknown (u), Ht: hematocrit, Hb: hemoglobin, NA: not available, WBC: white blood cell counts, Plt: platelet counts, EPO: serum erythropoietin level, EEC: endogenous erythroid colony, ND: Not done. Seq: sequencing the mutation, Clo: cloning prior sequencing, Gen: genomic sequencing, *Clo*: large duplication for which cloning is helpful but not necessary.

Table 3: Correspondence between the new recommended HGVS classification of mutationdescription and the usual classification used.

Patient Number	cDNA	Predicted amino acid change	Cited in previous paper
Bo1	c624_1626 del	p543_544 del	N542 E543 del
Bo2	c624_1626 del	p543_544 del	N542 E543 del
Bo3	c1609T>A;1616A>T	p537F>I; 539K>I	F537I K539I
Bo4	c1615_1616AA>TT	p539K>L	K539L
Bo5	c1624_1626 del	p543_544 del	N542E543 del
Cf0705	c1620_1621del;1624_1627del	p540_543 delins MK	R541 E543 delins MK
Di0121	c1614_1616CAA>ATT	p538_539HK>QL	H538Q K539L
Di0151	c1622_1627 del	p541-543 delins K	R541 E543 delins K
Di0475	c1608_1640 dup	p537_546 dup; 547F>L	F537-I546 dup 10 + F547L
Di0569	c1615_1616AA>TT	p539K>L	K539L
Di0569	c1608_1640 dup	p537_546 dup; 547F>L	F537-I546 dup 10 + F547L
Di1066	c1608_1640 dup	p537_546 dup; 547F>L	F537-I546 dup 10 + F547L
Na141c	c1619T>C	p540I>T	І540Т
Na571	c1614_1616CAA>GTT	p538_539HK>QL	H538Q K539L
Ni0846	c1624_1629del	p542_543 del	N542 E543 del

Figure 1: Nested HRM setting (differential curves)

Normalized and temperature shifted difference plot (differential plot graph) magnifies high resolution melting analysis, compared to Tm graph.

Black: wild type (Ni002)

Grey: mutant c1627_1632del (Vi327)

A: typical Tm graphs

B: corresponding normalized and temperature shifted difference plot

C: Large dispersion of differential plot curves by applying HRM directly to genomic DNA (12 negative controls).

D: Nested HRM (post PCR HRM) allows reducing wild type peak's dispersion and defining a cut off value.

Black: 9 negative controls

Grey: one negative control, 10 times replicated

Dashed: PCR positive control (Vi327)

E: Reliability test

30 points of wild type (black) or mutant (grey: c1614_1616CAA>GTT / Na571) 5x10⁵ plasmids were used. To get heterodimers of mutant, we add 10% (5x10⁴) of wild type. Positive control: c1627_1632del (Vi327) PCR (dotted)





| 184

Figure 2: Mutant detection in clinical sample:

A: normalized and temperature shifted difference plot of the different kind of mutation found.

1: Ni002
2: c1614_1616CAA>GTT* / Na571; 3: c1619T>C / Na141;
5: c1608_11640 dup / Di0871
6: c1615_1616AA>TT / Bo4; 7: c1614_1616CAA>ATT /
9: c1624_1626 del / Bo5; 10: c1624_1629del / Ni0846

* novel nucleotidic mutation corresponding to an already described abnormal aminoacid sequence

B: chromatogram of wild type and the 3 new mutants

Figure 2



Figure 3: sensitivity of nested HRM versus HRM

A: Comparison of serial dilution of c1609T>A; 1616A>T* (Bo3, allelic burden: 53%) analyzed with HRM or nested HRM. Serial dilution of c1614_1616CAA>GTT (Na571, allelic burden: 27%) with nested HRM.

B: routine analysis of a low allelic burden patient, using nested HRM versus HRM.

Dashed line: wild type (Ni002) control

Grey: c1627_1632 del (Vi327) control

Black: c1620_1621del; 1624_1627del/Cf705 with (thick) or without (thin) PCR

For the sake of clarity, only one of the wild type controls is shown.

Figure 3



Resume

"Etude de JAK2, Mpl et des cytokines liées à l'inflammation dans les syndromes myéloprolifératifs"

Les Syndromes MyéloProlifératifs (SMP) constituent un groupe de trois maladies clonales : la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la MyéloFibrose Primitive (MFP). La mutation activatrice V617F du gène JAK2, situé sur le chromosome 9p, est présente dans >95% des PV, 60% des TE et 50% des MFP. Récemment l'haplotype 46/1 du chromosome 9p a été trouvé associé à la mutation du gène JAK2 sur le même allèle. Nous avons étudié les mutations de JAK2 chez les patients atteints de PV, porteurs ou non de l'haplotype 46/1, et leurs conséquences sur l'expression de certaines cytokines (HGF, IL-11, IL-6) et récepteurs (Mpl, c-Met, gp130) liés à l'inflammation. Nous avons trouvé que certains patients présentent plusieurs sous-clones porteurs de différentes mutations de JAK2. Ces mutations ne garantissent pas la prolifération clonale des cellules et peuvent altérer la fonction de JAK2, différemment de V617F. Nous décrivons un nouveau double mutant JAK2L611V/V617F, qui hyperactive JAK2, AKT et ERK1/2, mais pas STAT5. Nous avons ensuite étudié Mpl, récepteur de la thrombopoïétine, qui transmet des signaux de survie dans les progéniteurs hématopoïétiques. Nous montrons que le taux de Mpl mature est corrélé à celui de JAK2WT (forme sauvage), pas à celui de JAK2V617F, et qu'une variation d'expression de JAK2WT, fréquente dans les SMP, suffit à altérer l'expression et la maturation de Mpl. Enfin, nous montrons que les cytokines anti-inflammatoires HGF et IL-11 sont surexprimées dans la PV et contribuent à l'expansion des érythroblastes, indépendamment de JAK2V617F. En conséquence, le blocage de la voie c-MET/HGF pourrait être une approche thérapeutique intéressante dans la PV.

Mots-clés : JAK2 / JAK2V617F / JAK2L611V/V617F / Haplotype 46/1 / Polyglobulie de Vaquez / Syndromes myéloprolifératifs / Mpl / Hepatocyte Growth Factor (HGF) / Interleukine 11 (IL-11) / Interleukine 6 (IL-6)

ABSTRACT

"Study of JAK2, Mpl and inflammation-linked cytokines in myeloproliferative neoplasms"

Myeloproliferative neoplasms (MPN) include three clonal diseases: Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). The V617F mutation of the JAK2 gene (located on chromosome 9p), is found in >95% PV, 60% ET and 50% PMF. Recently, the 46/1 haplotype of the 9p chromosome was found associated with JAK2 mutation on the same allele. We studied JAK2 mutations in PV patients and their consequences on expression of cytokines (HGF, IL-11, IL-6) and receptors (Mpl) linked to inflammation. We found that subsets of PV patients, with or without the 46/1 haplotype, can present several sub-clones carrying different mutations of JAK2. The presence of JAK2 mutations, functionally silent or activating, does not ensure clone expansion; however, JAK2 function may be altered, differently than V617F. We report on a new double L611V/V617F mutation, which increased activation of JAK2, AKT and ERK1/2 but not STAT5, and was found associated with isolated erythrocytosis. We then investigated the role of JAK2 in Mpl expression. Mpl transmits the survival signals of thrombopoietin in hematopoietic progenitors, and its expression is tightly regulated. We found that changes in expression of JAK2WT, frequent in MPN, are sufficient to alter Mpl expression and maturation, and that levels of mature Mpl are linked to those of JAK2WT (wild type form), not JAK2V617F. Finally, we show that the autocrine/paracrine production of anti-inflammatory HGF and IL-11 is increased in PV and likely contributes to the expansion of clonal erythroblasts, in a JAK2V617F-independent fashion. Consequently, blocking the c-MET/HGF pathway could be of interest in the treatment of PV.

Keywords: JAK2 / JAK2V617F / JAK2L611V/V617F / polycythemia vera / Myeloproliferative neoplasms / Haplotype 46/1 / Mpl / Hepatocyte Growth Factor (HGF) / Interleukin 11 (IL-11) / Interleukin 6 (IL-6)

Cédric CLEYRAT

INSERM U892 – Centre de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers Equipe "Cytokines et Récepteurs de l'Inflammation en Immuno-Hémato-Cancérologie" Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes 8, quai Moncousu – BP 70721 – 44007 NANTES Cedex 1