

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

ÉCOLE DOCTORALE : Biologie-Santé (ED502)

Année 2012

N ° 14

Etude de l'expression de *JAK2* et *MPL* et de leurs formes mutées dans les syndromes myéloprolifératifs

THESE DE DOCTORAT
Discipline : Biologie moléculaire
Spécialité : Hématologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Mathias VILAINE

Le 17 octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Président :

Dr. DEMORY Jean-Loup – PU-PH, Université Catholique de Lille

Rapporteurs :

Dr. GARDIE Betty – Maître de conférence de l'EPHE de Paris

Dr. GIRODON François – PU-PH, CHU de Dijon

Examineurs :

Dr. MOREAU-AUBRY Agnès – MCU, Faculté des Sciences de Nantes

Dr. JACQUES Yannick – DR CNRS, CRCNA Inserm UMRs U892 CNRS
6299, Nantes

Directrice de thèse :

Dr. HERMOUET Sylvie - MCU-PH Faculté de Médecine CRCNA Inserm UMRs U892 CNRS 6299,
Nantes

Table des matières

Table des illustrations	1
Liste des abréviations.....	3
I- Introduction	5
I-1- L'hématopoïèse humaine, généralités	5
I-1-1 L'érythropoïèse	9
I-1-2 La mégacaryopoïèse	11
I-1-3 La granulopoïèse et la monopoïèse	13
I-2- Les syndromes myéloprolifératifs	15
I-2-1 La Leucémie Myéloïde Chronique	16
I-2-2 La Polyglobulie de Vaquez	17
I-2-3 La thrombocytemie essentielle	18
I-2-4 La myélofibrose primitive	19
I-2-5 Morphologie de la moelle osseuse	20
I-2-6 Les critères de diagnostic des SMP (OMS 2009).....	22
I-2-7 Les traitements	23
I-3- Hémopathies associées aux SMP	24
I-3-1 Les Thromboses Splanchniques	24
I-3-2 Les érythrocytoses idiopathiques	24
I-3-3 La Leucémie Myéloïde aiguë	25
I-3-3-1 La classification des LAM	27
I-4- Les cytokines et les récepteurs aux cytokines dans les SMP	28
I-4-1 Les récepteurs de la famille IL-6.....	32
I-4-1-1 La chaîne gp130	33
I-4-1-2 La chaîne IL-6R α (gp80) et l'interleukine 6 (IL-6)	35
I-4-1-3 La chaîne IL-11R α et l'IL-11	38
I-4-2 Le récepteur à l'hépatocyte growth factor c-Met (HGFR) et l'HGF	39
I-4-3 Le récepteur à la Thrombopoïétine, Mpl (TpoR) et la Tpo	41
I-4-4 Le récepteur à l'érythropoïétine (EpoR) et l'Epo	47
I-5- Génétique des SMP	52
I-5-1 L'haplotype 46/1	54
I-5-2 Mutations et anomalies génétiques spécifiques des SMP	59
I-5-2-1 La famille des Janus tyrosine-kinases et les mutations de <i>JAK2</i>	59
I-5-2-2 Disomie Uniparentale du chromosome 9p (9pUPD)	67
I-5-2-3 Mutations du gène <i>MPL</i>	70
I-5-3 Mutations non spécifiques des SMP	72
I-6- Signalisation intracellulaire dans les SMP	74
II- Présentation du projet de recherche	77
III- Matériels et méthodes	82
III-1- Echantillons de patients	83
III-2- Techniques de culture cellulaire et séparation des cellules.....	83
III-2-1 Cultures cellulaires	83
III-2-2 Transfections transitoires	84

III-2-3 Tri cellulaires.....	85
III-3- Techniques de biochimie	86
III-3-1 Dosage protéique	86
III-3-2 Western Blotting.....	86
III-3-3 Extractions des protéines des plaquettes.....	87
III-3-4 Dosages cytokiniques	88
III-4- Techniques de biologie moléculaire	88
III-4-1 Préparation des ADN, des ARN et des ADNc.....	88
III-4-2 PCR et RT-PCR quantitatives	89
III-4-3 High Resolution Melting curve analysis (HRM).....	90
III-4-4 Clonages et séquençages.....	91
III-4-5 SNP arrays	91
III-5- Techniques d'immunofluorescences	92
IV- Résultats	93
IV-1- Etude de l'expression de <i>JAK2</i> dans la Polyglobulie de Vaquez	94
IV-1-1 <u>Article 1</u> : Mise en évidence de recombinaison pré- et post- <i>JAK2V617F</i> chez 2 patients atteints de Polyglobulie de Vaquez (<i>Vilaine et al.</i> , Blood 2011 ; 118: 6468-6470)	94
IV-1-2 <u>Article 2</u> : <i>JAK2</i> mRNA expression levels, reflection of <i>Mpl/Jak2</i> function (<i>Vilaine et al.</i> , en préparation)	109
IV-1-3 <u>Article 3</u> : Point des connaissances sur l'haplotype 46/1 et de son influence sur le phénotype des patients (<i>Hermouet S. et Vilaine M.</i> , Haematologica, 2011 ; 96(11): 1575-9).	150
IV-2- Etudes fonctionnelles de <i>Mpl</i>	154
IV-2-1 <u>Article 4</u> : Etude de l'expression et de la localisation cellulaire de <i>Mpl</i> et de <i>Jak2</i> (<i>Cleyrat et al.</i> , en préparation)	156
IV-2-2 <u>Article 5</u> : Etude fonctionnelle des formes mutées <i>MplW515K/L/A/R</i>	183
IV-3- Rôle des cytokines inflammatoires et de leurs récepteurs dans la pathogénèse des SMP	204
IV-3-1 <u>Article 6</u> : Les cytokines anti-inflammatoires HGF et IL-11 sont surexprimés chez les patients atteints de Polyglobulie de Vaquez et contribuent à la prolifération clonale des érythroblastes indépendamment de la mutation <i>JAK2V617F</i> . (<i>Boissinot et al.</i> , Oncogene 2011 ; 30(8): 990-1001).	205
V- Discussion	218
VI- Conclusion générale et perspectives.....	232
Annexe.....	236
Inflammation and clone evolution in myeloproliferative neoplasms: Interest of combining drugs that target key cytokines with different signaling pathways. <i>Hermouet et al.</i> , e-Blood 2012.	
Références bibliographiques	240

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures :

Figure 1 : Hématopoïèse et cytokines hématopoïétiques	7
Figure 2 : Principes de la division asymétrique et symétrique des cellules souches	8
Figure 3 : Schéma de l'érythropoïèse.....	10
Figure 4 : Photo d'un mégacaryocyte normal lors de la fragmentation de son cytoplasme pour la production des plaquettes	11
Figure 5 : Schéma de la mégacaryopoïèse et de la production de plaquettes.....	12
Figure 6 : Schéma de la granulopoïèse et de la monopoïèse	14
Figure 7 : Principales lignées cellulaires touchées dans les SMP	16
Figure 8 : Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et des différents stades cellulaires impliqués dans la leucémie myéloïde chronique	17
Figure 9 : Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et des différents stades cellulaires impliqués dans la leucémie aiguë myéloïde.....	26
Figure 10 : Représentation schématique de la structure des récepteurs aux cytokines hématopoïétiques	29
Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs de la famille IL-6.....	33
Figure 12 : Représentation schématique du gène <i>GP130</i> et du pseudogène <i>IL6STP</i>	34
Figure 13 : Représentation schématique du gène <i>GP80</i> , de l'épissage alternatif donnant la forme soluble et de son pseudogène	36
Figure 14 : Représentation schématique de la formation du complexe hexamérique du récepteur à l'IL-6	37
Figure 15 : Représentation schématique et 3D du récepteur à l'HGF (HGFR) composé de 2 sous-unités α et β	40
Figure 16 : Représentation schématique et 3D de la forme mature de l'HGF après formation des ponts di-sulfure entre les 2 sous-unités α et β	41
Figure 17 : Représentation schématique du gène <i>MPL</i> et des différents épissages possibles	43
Figure 18 : Représentation schématique du récepteur <i>Mpl</i> dans la membrane plasmique et des domaines important dans la signalisation <i>Tpo</i>	44
Figure 19 : Représentation schématique du gène <i>EPO</i> et des sites régulateurs de la transcription liés à l'hypoxie.....	49
Figure 20 : Représentation schématique de la structure du récepteur à l'érythropoïétine (<i>EpoR</i>)	50
Figure 21 : Modèle de développement d'un SMP.....	52
Figure 22 : Représentation karyotypique des différentes anomalies détectées par des analyses de SNP array	54
Figure 23 : Représentation schématique du chromosome 9 et zoom sur la zone contenant le gène <i>JAK2</i> et l'haplotype 46/1	55
Figure 24 : Représentation schématique et structure 3D des différents domaines caractéristiques des tyrosines kinases de la famille <i>JAK</i>	60
Figure 25 : Modèle de régulation par phosphorylation de l'activité de <i>Jak2</i>	62
Figure 26 : Structure 3D et positions des différents sites importants pour la régulation de l'activité de la protéine <i>Jak2</i> [2B7A].....	63
Figure 27 : Modèle de <i>UPD</i> segmentale	68
Figure 28 : Représentation schématique des deux mécanismes possibles aboutissant à une mutation homozygote de <i>JAK2V617F</i>	69
Figure 29 : Représentation schématique de l'effet des différentes mutations détectées chez des patients atteints de <i>SMP</i>	72
Figure 30 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation induite par <i>Jak2</i> et <i>Mpl</i>	75
Figure 31 : Hypothèses pouvant expliquer l'effet de transformation cellulaire par <i>Jak2V617F</i> en l'absence de récepteur homo-dimérique	76
Figure 32 : Représentation schématique des différents axes d'étude du projet de recherche	81
Figure 33 : Principe de la PCR quantitative de type <i>Taqman</i>	89
Figure 34 : Principe de la <i>HRM</i>	90
Figure 35 : Exemple de profil obtenu sur des puces <i>Affymetrix Genome-wide human SNP array Nsp/Sty 6.0</i> ..	92
Figure 36 : Résumé de la séquence des événements mis en évidence dans les deux cas de <i>PV</i> décrit ci-dessous	95
Figure 37 : Arbre généalogique de la famille étudiée présentant un historique d'hyperplaquettose bénigne	183

Figure 38 : Analyse HRM de l'exon 10 de <i>MPL</i> sur ADN génomique des deux cas d'hyperplaquettose bénigne familiale	184
Figure 39 : Electrophérogrammes du séquençage direct de l'exon 10 de <i>MPL</i> sur ADN génomique des deux cas d'hyperplaquettose bénigne familiale	184
Figure 40 : Modèle de la pathogénèse des SMP avant 2012.....	219
Figure 41 : Relation entre le niveau d'expression de JAK2 au niveau ARNm et le profil d'expression de Mpl dans les plaquettes.....	224
Figure 42 : Nouveau modèle de pathogénèse des SMP proposé.....	227

Liste des tables :

Table 1 : Critères de l'OMS pour le diagnostic des SMP.....	22
Table 2 : Fréquence de l'haplotype 46/1 et corrélations cliniques	58
Table 3 : Liste non-exhaustive des mutations du gène <i>JAK2</i> mises en évidence et publiées chez des patients atteints d'hémopathies.....	65
Table 4 : Liste des différents types de UPD identifiés dans les SMP avec les gènes cibles identifiés.....	69
Table 5 : Liste des mutations du gène <i>MPL</i> mises en évidence chez des patients atteints de SMP	71
Table 6 : Autres anomalies génétiques détectées chez des patients atteints de SMP	73

LISTE DES ABREVIATIONS

17p: bras court du chromosome 17
5q: bras long du chromosome 5
BC: Budd-Chiari
BFU-E: Burst Forming Unit-Erythroid
CD: Cluster de différenciation 34
CFU-E: Colony Forming Unit-Erythroid
CFU-S: Colony Forming Unit-Spleen
CO₂: dioxyde de carbone
CSH: Cellule Souche Hématopoïétique
CSM: Cellules Souches Mésenchymateuses
EI: Erythrocytoses Idiopathiques
Epo: Erythropoïétine
EpoR: Récepteur à l'Epo
gp130: glycoprotéine 130
HGF: Hepathocyte Growth Factor
HGFR ou cMet: Récepteur à l'HGF
HIF: Hypoxia Inducible Factor
IFN: Interférons
IL-3: Interleukine 3
IL-6Rs: Forme soluble du récepteur à l'IL-6
INSL4: gène Insulin-like 4
Jak2: Janus Kinase 2
JH: Domaine d'homologie
KO: Knock Out
LAM: Leucémies Aiguës Myéloïdes, ou Myéloblastiques
LMC: Leucémie Myéloïde Chronique
LOH: perte d'hétérozygosité
MFP: Myélofibrose Primitive
MIP-1,2: Macrophages Inflammatory Protein 1 et 2
MK: mégacaryocytes

O₂: Dioxygène
PHD: Propyl-Hydroxylases
Phi: Chromosome de Philadelphie
PNN: polynucléaires neutrophiles
PV: Polyglobulie de Vaquez
RE: réticulum endoplasmique
Shp2: Src homology phosphatase 2
SMP: Syndromes Myéloprolifératifs
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
Socs: Suppressor of cytokine signaling
TE: Thrombocytémie essentielle
TGF-β: Tumor Growth Factor
THPO: gène codant pour la Tpo
TNF-α: Tumor Necrosis Factor
TP: Thromboses de la veine Porte
Tpo: Thrombopoïétine
TpoR ou Mpl: Récepteur à la Tpo
Tyk2: Tyrosine Kinase 2
UPD: disomie uniparentale
VHL: facteur de Von Hippel-Lindau

I- Introduction

I-1- L'hématopoïèse humaine, généralités :

L'hématopoïèse correspond au processus physiologique qui assure la production et le remplacement continu et régulé des différentes lignées cellulaires sanguines. L'hématopoïèse débute dans la moelle rouge des os plats : sternum, crêtes iliaques et les têtes de fémur. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou progéniteurs précoces, qui représentent moins de 1% des cellules hématopoïétiques, sont à l'origine de ce processus. Ces CSH ne sont pas identifiables morphologiquement, mais sont caractérisées par un marqueur membranaire appelé CD34 (Cluster de différenciation 34). L'existence d'une CSH a été suggérée dans un premier temps par des expériences réalisées dans des modèles murins. Une greffe de moelle osseuse syngénique dans une souris irradiée à dose létale a permis la reconstitution de l'hématopoïèse et la survie de l'animal grâce à l'apparition dans la rate de colonies hématopoïétiques issues d'une cellule unique appelée CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen) (Till J. E., et McCulloch, EA., 1961 et 1964). En effet, les cellules souches CD34+, capables d'auto-renouvellement pour maintenir un stock constant de cellules souches, sont également capables de se différencier en progéniteurs pluripotents. Les progéniteurs pluripotents vont alors pouvoir s'engager dans deux processus différents, la détermination et la différenciation, qui assurent la production des cellules des trois grands linéages sanguins : l'érythropoïèse, la leucopoïèse et la mégacaryopoïèse (**Figure 1** page 7). Il a été montré que, mis en culture *in vitro*, les CSH CD34+ peuvent former, en se divisant, des CFU de cellules matures morphologiquement identifiables (Till *et al.*, 1963 PNAS; Bradley T.R., et Metcalf D., 1966 Aust J Exp Biol Med Sci.). Des progéniteurs myéloïdes communs ayant la capacité de se différencier en progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytaires, monocytaires et en progéniteurs granulocytaires ont été identifiés (Akashi *et al.*, 2000 Nature). Chez la souris, Bradley et Metcalf ont rapporté que la mise en culture de cellules de la moelle osseuse ou de la rate pouvaient aboutir à la formation de CFU en présence de certains autres types cellulaires tels que des cellules issues du rein indiquant la nécessité de l'apport de facteurs de croissance. Par contre, la mise en culture de cellules issues des ganglions lymphatiques ou du thymus ne donnait pas de CFU, suggérant ainsi la présence de CSH uniquement dans la moelle osseuse et la rate. Selon la taille et le type de colonies formés, on peut en déduire le type de CSH CD34+ mis en culture :

- cellules souches pluri- ou multi-potentes : générant des colonies contenant des cellules de plusieurs lignées ;
- cellules souches monopotentes : générant des colonies contenant un seul type de cellules.

L'hématopoïèse nécessite donc une régulation fine de la production des cellules sanguines (homéostasie), notamment par le microenvironnement médullaire, composée de cellules stromales (ou fibroblastes), des cellules endothéliales, des ostéoblastes, des adipocytes, des macrophages et des lymphocytes T sécrétant des facteurs solubles et d'une matrice extracellulaire.

Le rôle du microenvironnement est à la fois de soutenir physiquement l'hématopoïèse et de réguler l'auto-renouvellement, la survie et la différenciation des cellules hématopoïétiques. L'organisation spatiale particulière des cellules stromales permet une association physique étroite avec les cellules souches (communication par contact de cellule à cellule), ainsi qu'une sécrétion de molécules solubles (cytokines et chimiokines) positifs (facteurs de croissance) et négatifs (inhibiteurs) pour les progéniteurs hématopoïétiques. Ce modèle est appelé niche hématopoïétique. Dans ce modèle, les éléments constituant cette niche hématopoïétique contrôlent le développement et la détermination des CSH (*Schofield R.*, 1978 Blood Cells).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) constituent une population de cellules rares non hématopoïétiques de la moelle osseuse adulte, qui peuvent être définies par leurs capacités d'autorenouvellement et de différenciation en tissus d'origine mésodermique. Comme démontré *in vitro* et *in vivo*, ces cellules vont donner naissance à différents types cellulaires tels que les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes (cellules du cartilage osseux), les fibroblastes, les cellules endothéliales et les myoblastes (*Wang X. et al.*, 2006 Stem Cell; *Muguruma Y. et al.*, 2006 Blood). En plus de leur fonction génératrice de cellules différenciées, elles régulent, par leurs sécrétions et leurs interactions cellule/cellule, l'état des CSH (différenciation, autorenouvellement,...). Les CSM responsables de la formation du stroma médullaire jouent ainsi un rôle majeur pour soutenir l'hématopoïèse, en générant les ostéoblastes (*Calvi et al.*, 2003 Nature; *Zhang J. et al.*, 2003 Nature) et en fournissant aux progéniteurs hématopoïétiques les cytokines nécessaires à leur auto-renouvellement et leur différenciation dans un linéage précis en fonction des cytokines impliquées (*Dazzi F. et al.*, 2006 Blood Rev.). Au cours de ce processus, les progéniteurs perdent progressivement leur capacité d'auto-renouvellement. Les cytokines sont principalement produites par le micro-

environnement médullaire (les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les lymphocytes T activés). Cependant, l'érythropoïétine (Epo) et la thrombopoïétine (Tpo) sont produites à distance de la moelle osseuse par le rein (Epo) et le foie (Tpo).

On classe les cytokines en fonction de leur mode d'action sur l'hématopoïèse. Parmi les cytokines stimulant l'hématopoïèse, on distingue les facteurs de compétence (SCF, IL-6, IL-11 et le G-CSF) qui ont un rôle très précoce en provoquant l'entrée en cycle cellulaire des CSH quiescentes. Ces cytokines agissent en synergie avec l'IL-3 et le GM-CSF qui sont des facteurs multipotents qui vont stimuler la prolifération des progéniteurs multipotents. Enfin, de manière synergique également, des facteurs spécifiques de lignées vont entrer en jeu (Epo, M-CSF, G-CSF, IL-5 et Tpo). Leur action est tardive et spécifique sur une seule lignée cellulaire (**Figure 1**). On distingue également des facteurs inhibiteurs de l'hématopoïèse. Les inhibiteurs actuellement connus ne sont pas spécifiques de lignée et affectent les progéniteurs hématopoïétiques précoces et tardifs : le Tumor Necrosis Factor (TNF- α), le Tumor Growth Factor (TGF- β), les interférons (IFN) et certaines chimiokines telles que les Macrophages Inflammatory Protein 1 et 2 (MIP-1,2), l'IL-8 et le PF-4. Le TGF- β , le MIP-1 et L'IFN- γ bloquent les cellules en phase G1 du cycle cellulaire et agissent donc seulement contre les cytokines précoces (facteurs de compétence) en inhibant leur action d'induction d'entrée en cycle cellulaire.

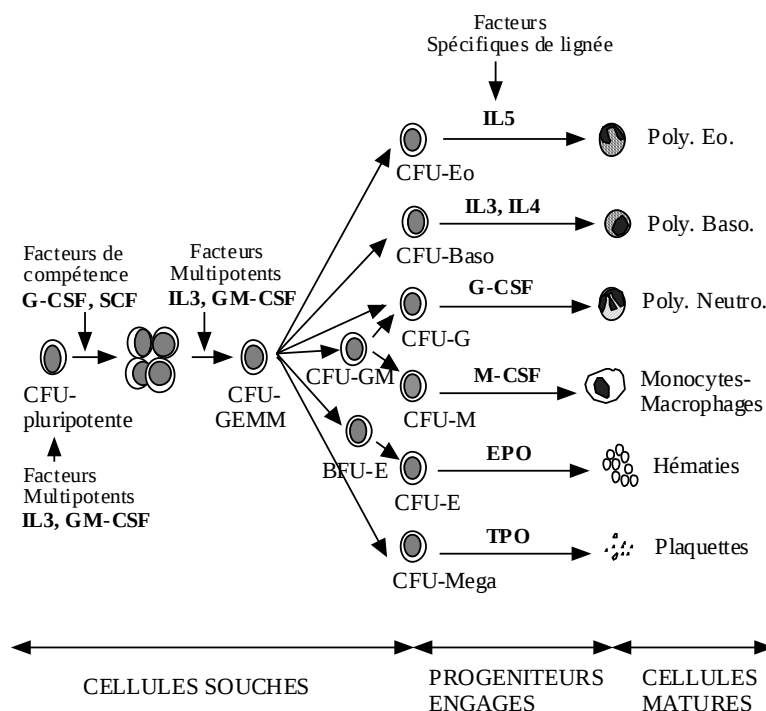


Figure 1 : Hématopoïèse et cytokines hématopoïétiques.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la détermination des CSH (*Kai et al.*, 2003 PNAS) (**Figure 2**).

Le premier modèle, dit "de lignage", est celui de division asymétrique des cellules souches. Les cellules souches, en se divisant, donnent naissance à deux cellules filles dont la destinée est différente. L'une des cellules filles conserve le caractère souche (en maintenant le contact avec la niche hématopoïétique), alors que la seconde va s'engager dans la voie de la différenciation.

Le second modèle, dit "de population", propose une division symétrique par laquelle une cellule souche en se divisant donnera naissance soit à deux cellules souches soit à deux cellules filles déterminées. Seul ce mécanisme peut expliquer l'amplification du compartiment des cellules souches observée dans des situations de stress à la suite d'agression de l'organisme.

Ces deux modèles coexistent probablement au sein d'un même compartiment de cellules souches.

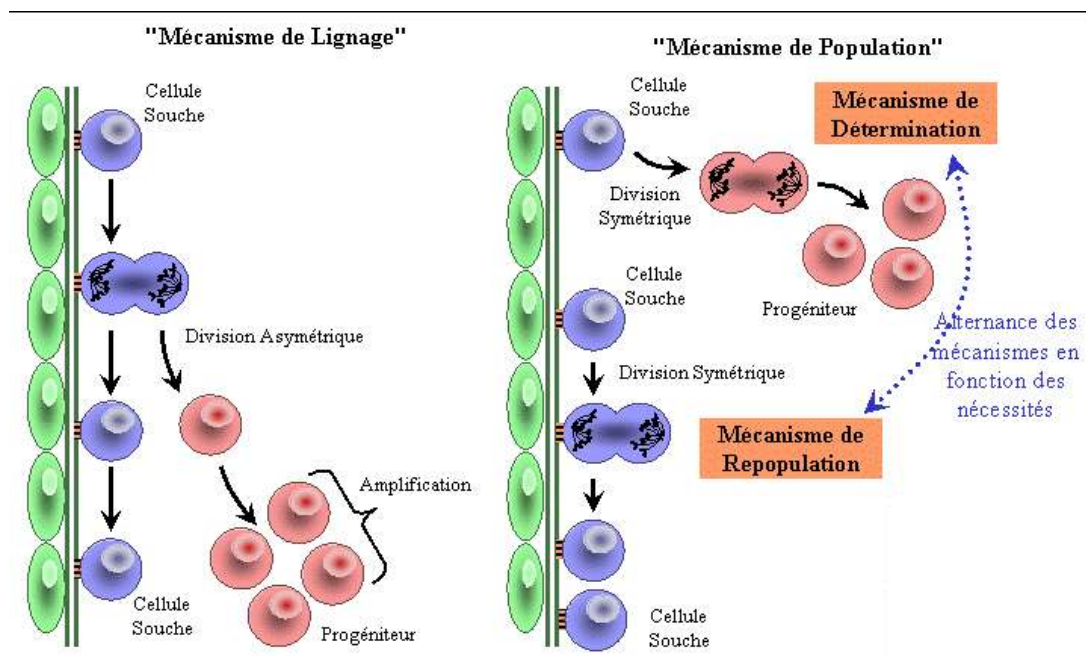


Figure 2 : Principes de la division asymétrique et symétrique des cellules souches
(*Spradling et al.*, 2001 Nature ;1;414(6859):98-104).

Les CSH sont connues pour être dépendantes des conditions d'oxygène rencontrées dans leur micro-environnement. En effet, il a été montré que la culture *in vitro* de cellules hématopoïétiques primitives donne de meilleurs résultats en termes de maintien de la population primitive sous une atmosphère à 1% de dioxygène (O₂), sans engagement dans la différenciation en progéniteurs (*Cipolleschi et al.*, 1993 Blood). Par la suite, d'autres travaux ont permis de mettre en évidence qu'une culture de CSH sous une atmosphère à 3% d'O₂ permet un maintien des CSH ainsi qu'une expansion des progéniteurs hématopoïétiques (*Ivanovic et al.*, 2004 Stem Cells). De même, la différenciation des différents progéniteurs hématopoïétiques en cellules matures est également oxygène dépendant et semble plus efficace sous une atmosphère à 5% d'O₂.

Toutes ces données semblent indiquer la nécessité d'un équilibre entre les CSH et la différenciation en progéniteurs hématopoïétiques, de contacts cellules/cellules, de concentration en oxygène et de production des cytokines et de leurs récepteurs pour avoir une hématopoïèse normale.

I-1-1 L'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus biologique de production des globules rouges ou hématies (ou encore érythrocytes). Elle a pour finalité d'assurer le maintien d'un stock d'hémoglobine constant en produisant à chaque instant un nombre de réticulocytes équivalent au nombre d'hématies phagocytées lors de l'hémolyse physiologique. Chez l'adulte, l'érythropoïèse a lieu essentiellement dans les cavités médullaires des os plats (sternum, os iliaques, côtes...).

Les cellules souches pluripotentes appelées « Colony Forming Unit »-GEMM (CFU-GEMM) sont à l'origine de ce processus qui permet la production d'environ 2,5 millions d'hématies par seconde. Les CFU-GEMM vont alors se différencier et perdre leur potentialité mégacaryocytaire et granulocytaire pour devenir des progéniteurs BFU-E (burst forming unit-erythroid, les plus immatures) et CFU-E (colony forming unit-erythroid, les plus matures). La prolifération et la différenciation des BFU-E est sous la dépendance de l'Interleukine 3 (IL-3) et du GM-CSF (facteurs multipotents). La prolifération et la différenciation des CFU-E est sous la dépendance de l'érythropoïétine (Epo, facteur spécifique de la lignée érythroïde). Puis, ces progéniteurs vont encore se différencier en proérythroblastes, en érythroblastes

basophiles, en érythroblastes polychromatophiles, en érythroblastes acidophiles, en réticulocytes et enfin en érythrocytes après éjection du noyau, pour donner des hématies matures (**Figure 3**). Toutes ces étapes sont caractérisées par une réduction du rapport Noyau/Cytoplasme et par une synthèse progressive d'hémoglobine. Ce processus prend de cinq à huit jours. Les hématies ont une durée de vie moyenne de cent vingt jours et une demi-vie moyenne de vingt-huit jours. La destruction des hématies se fait au niveau de la rate. L'érythropoïèse normale est régulée par le flux sanguin et la concentration en hémoglobine et dépend de la saturation de l'hémoglobine en oxygène.

Les érythrocytes ont pour rôle principal le transport des gaz O_2 et dioxyde de carbone (CO_2), mais également la régulation du pH sanguin (par l'anhydrase carbonique à la surface des hématies). Enfin, les hématies portent également à la surface cellulaire des antigènes des groupes sanguins tels que les antigènes ABO, Rhésus...

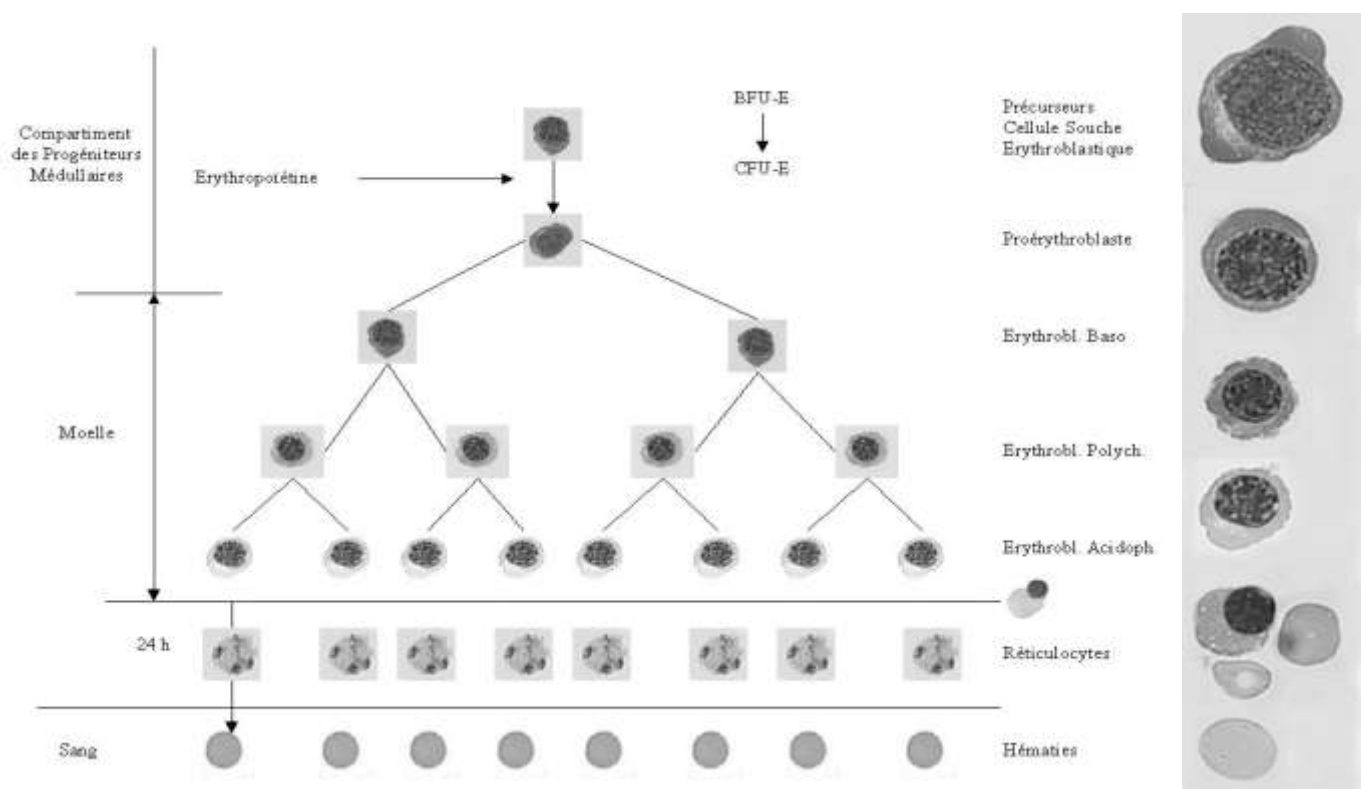


Figure 3 : Schéma de l'érythropoïèse.

I-1-2 La mégacaryopoïèse

Les plaquettes sanguines (ou thrombocytes) sont de petits fragments cellulaires anucléés à forte capacité d'adhésion aux structures endothéliales et qui ont un rôle essentiel dans l'hémostase primaire. En effet, les plaquettes vont permettre l'obturation initiale des brèches vasculaires avant la constitution d'un caillot de fibrine.

La première description des plaquettes fut réalisée en 1841 par Addison W. comme étant des petits granules du sang (*Addison W.*, 1841 *London Med Gaz.*). Le terme « plaquette » fut attribué par Bizzozero G. qui observa également pour la 1^{ère} fois leur capacité adhésive en cas de dommage vasculaire (*Bizzozero G.*, 1882 *Pathol Anat und Physiol.*; *De Gaetano G.*, 2001 *Thromb Haemost.*).

Les plaquettes proviennent de la fragmentation du cytoplasme de précurseurs médullaires (**Figure 4**) : les mégacaryocytes (MK) (*Wright JH*, 1910 *J Morphol.*; *Brown WH*, 1913 *J Exp Med.*). La fragmentation du cytoplasme provient d'invaginations tubulaires de la membrane plasmique des MK, via l'émission de longs pseudopodes dans la lumière des sinusoides médullaires. Les plaquettes sont ainsi libérées dans la circulation sanguine (*Italiano et al.*, 1999 *J Cell Biol.*; *Junt et al.*, 2007 *Science*).

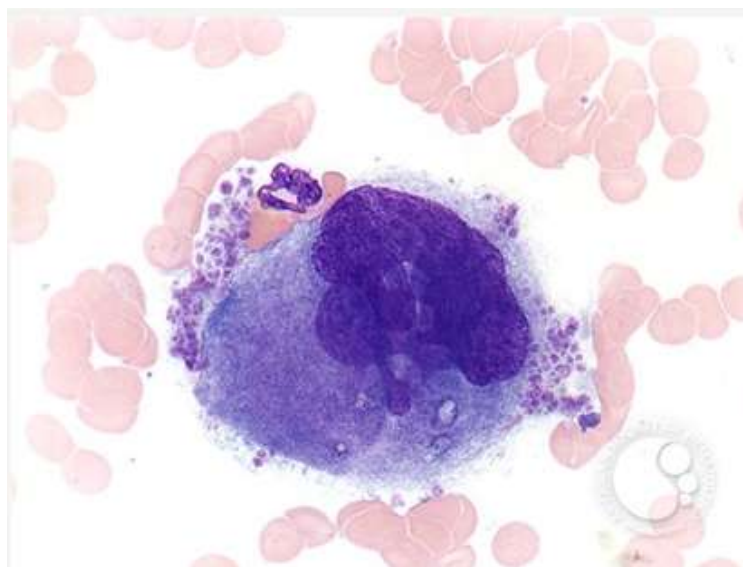


Figure 4 : Photo d'un mégacaryocyte normal lors de la fragmentation de son cytoplasme pour la production des plaquettes.

(<http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1186&AssetType=Asset>).

La mégacaryopoïèse débute avec une cellule pluripotente, qui se spécialise en progéniteur mégacaryocytaire (CFU-Meg). Il y a ensuite trois étapes majeures, en partie imbriquées et dépendantes de la Tpo (facteur spécifique de lignée): la prolifération, puis une succession d'endomitoses sans division cellulaire (conduisant à une polyploïdie des MK) et, finalement, la différenciation progressive par maturation cytoplasmique. En fin de maturation, le cytoplasme des MK se fragmente pour donner 2000 à 5000 plaquettes par MK. La prolifération et la différenciation des MK et de leurs progéniteurs se réalisent dans la moelle osseuse (**Figure 5**). Il a été émise l'hypothèse que la polyploïdie des noyaux des MK corresponde à une amplification génique nécessaire pour produire de grandes quantités de protéines pour former les plaquettes (*Corash L et Levin J*, 1990 Exp Hematol.; *Mattia et al.*, 2002 Blood ; *Raslova et al.*, 2003 Blood).

Les plaquettes sanguines ont une durée de vie de sept à dix jours dans le sang et leur nombre reste stable chez un même individu (entre 150 et 400.10⁹/L). Les plaquettes sont essentiellement détruites dans la rate.

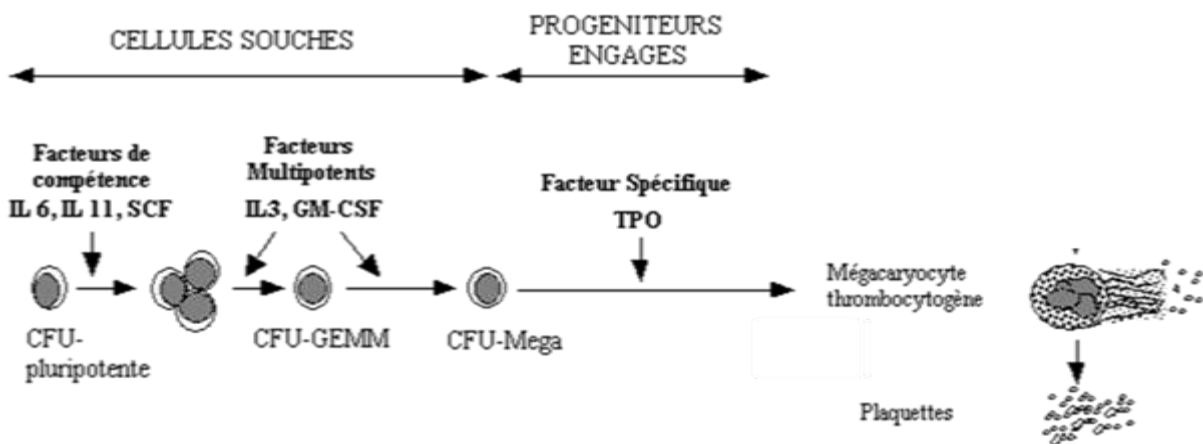


Figure 5 : Schéma de la mégacaryopoïèse et de la production de plaquettes.

La régulation de la thrombopoïèse (production de plaquettes) est dépendante de la production de Tpo. Le principal organe producteur de la Tpo est le foie mais elle semble également produite au niveau de la moelle osseuse et des poumons. La régulation de la concentration de Tpo dans le sang se fait par sa fixation à son récepteur membranaire (TpoR ou Mpl) à la surface des plaquettes et des mégacaryocytes. Une augmentation du nombre de plaquettes va diminuer la concentration de Tpo sérique. Par contre, un niveau bas de Tpo ne sera pas forcément compensé par une diminution du nombre de plaquettes. C'est pourquoi ce

mécanisme de régulation est encore mal connu. Il est également connu que la mégacaryopoïèse est positivement et négativement régulée par des facteurs de transcription tels que Runx1, Gata1, Fli1, and c-Myb.

I-1-3 La granulopoïèse et la monopoïèse

La granulopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation des granulocytes. Chez l'homme, elle s'effectue dans la moelle osseuse à partir du sixième mois de vie intra-utérine et surtout, à partir de la naissance.

Les progéniteurs de cette lignée sont les CFU-GM, CFU-Eo et CFU-Baso. Ils proviennent des cellules souches myéloïdes CFU-GEMM. Ils ne peuvent être visualisés et quantifiés que par des techniques de cultures de progéniteurs hématopoïétiques (**Figure 6** page 15). Les précurseurs comporte quatre stades cytologiques avant le polynucléaire : le myéloblaste, le promyélocyte, le myélocyte et le métamyélocyte.

La différenciation granulomonocytaire est régulée par le micro-environnement médullaire et par des cytokines. L'engagement dans la voie myéloïde se fait par la stimulation des CFU-pluripotentes par des facteurs multipotents (IL-3, GM-CSF) aboutissant à la différenciation en CFU-GEMM. Puis, l'action des facteurs spécifiques de lignées va permettre l'engagement des CFU-GEMM dans des lignées spécifiques aboutissant aux différents types de cellules granulocytaires matures.

Il existe trois catégories de granulocytes : les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Cette dénomination est basée sur leur affinité à absorber des colorants neutres, basiques, ou à base d'éosine (colorant MGG = le May-Grünwald Giemsa). Les neutrophiles représentent à eux seuls environ 65 % de l'ensemble des leucocytes du sang, et 99 % des granulocytes.

Les granulocytes neutrophiles ont un rôle important dans le système immunitaire en éliminant les cellules étrangères ou les cellules infectées par phagocytose. Les granulocytes basophiles sont impliqués dans les réactions allergiques et les granulocytes éosinophiles sont, eux, impliqués dans l'élimination des parasites.

A l'état normal tous ces précurseurs sont exclusivement localisés dans la moelle osseuse. Seuls les polynucléaires passent dans le sang. Lorsque la granulopoïèse est très augmentée ils peuvent être retrouvés dans le sang, définissant une myélémie.

La monopoïèse correspond à la formation des monocytes à partir de cellules progénitrices CFU-GM. Les cellules CFU-GM se différencient pour donner des CFU-G (granulocytes neutrophiles) et des CFU-Macro (monocytes et macrophages) (**Figure 6**). Les stades morphologiques de la monopoïèse sont le monoblaste, le promonocyte et enfin le monocyte. Les monocytes et les macrophages ont un rôle d'élimination des pathogènes et des débris cellulaires par des mécanismes de phagocytose.

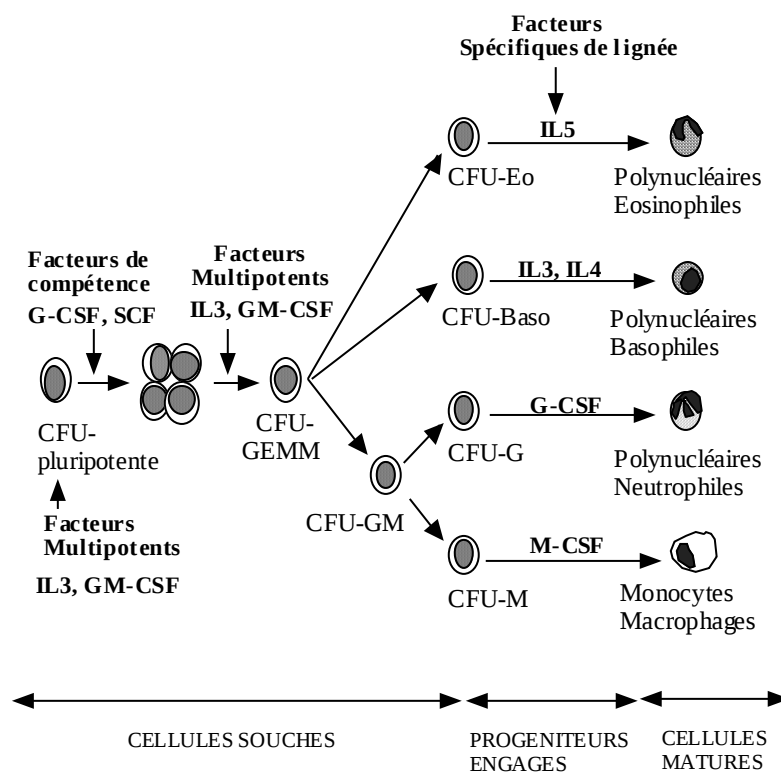


Figure 6 : Schéma de la granulopoïèse et de la monopoïèse.

I-2- Les Syndromes Myéloprolifératifs : Généralités

Les Syndromes Myéloprolifératifs (SMP) sont un groupe de pathologies hématologiques décrit pour la première fois par William Dameshek en 1951 (*Dameshek, 1951 Blood*). Il faut distinguer les SMP dit Phi+ des SMP dit Phi-. Cette annotation est liée à la présence ou à l'absence de la translocation chromosomique t (9 ; 22) appelé chromosome de Philadelphie (Phi+) aboutissant à un gène de fusion *BCR-ABL* présent chez environ 90% des patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) (voir paragraphe 2-7) (*Erikson et al., 1986 PNAS*). Les SMP Phi- regroupent la thrombocythémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MFP) et la polyglobulie de Vaquez (PV). Ces trois pathologies sont caractérisées par une prolifération clonale de cellules hématopoïétiques myéloïdes matures (*Adamson et al., 1976 NEJM; Fialkow et al., 1981 Blood*) (**Figure 7**). Il n'existe pas, pour le moment, de marqueur moléculaire permettant un diagnostic discriminant de ces différents SMP. La PV et la TE sont dites de « bon » pronostic tandis que la MFP est associée à un mauvais pronostic vital.

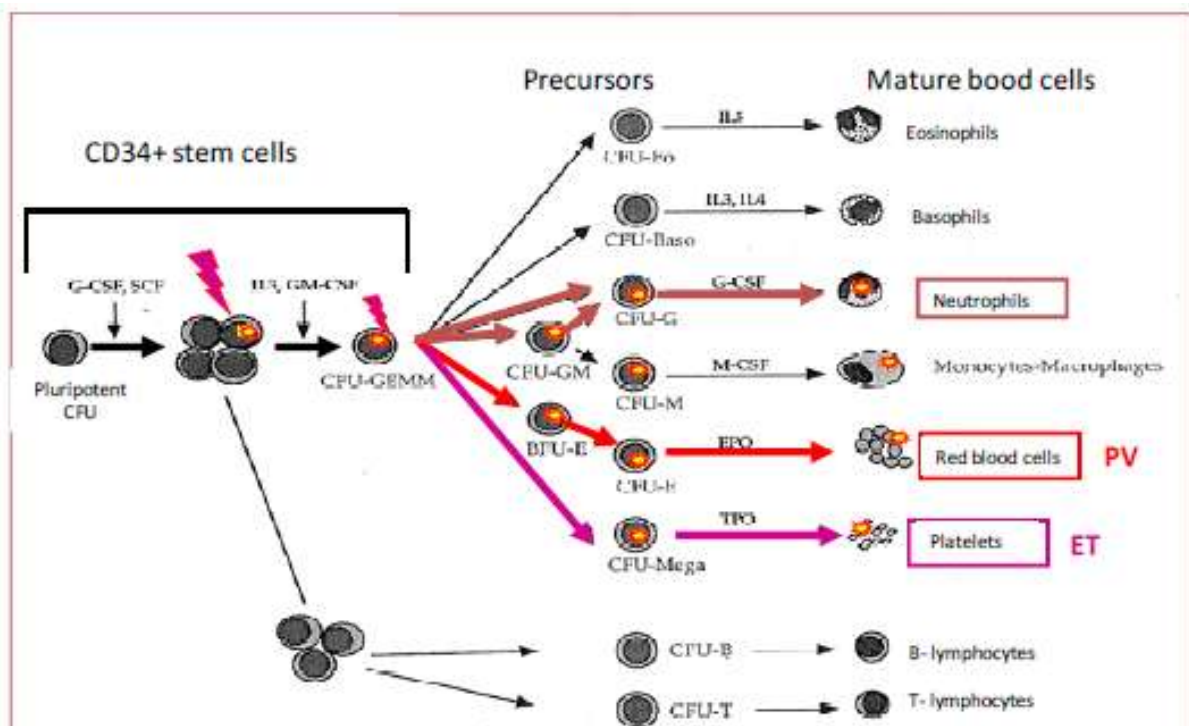


Figure 7 : Principales lignées cellulaires touchées dans les SMP.

I-2-1 La Leucémie Myéloïde Chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée par une prolifération granuleuse monoclonale (**Figure 8** page 17). Cette pathologie se distingue des autres SMP par la présence d'une translocation 9/22 (tr9-22 q34 ; q11). Cette translocation, appelée « Chromosome de Philadelphie » (Phi+), résulte en la production d'une protéine de fusion BCR-ABL. Cette maladie rare touche surtout l'adulte entre 30 et 50 ans et est favorisée par l'exposition au benzène et aux rayons ionisants. Les symptômes les plus fréquemment associés sont l'anémie, la susceptibilité aux infections, le risque hémorragique et la splénomégalie.

La LMC est longtemps restée une maladie de mauvais pronostic, se transformant inévitablement en leucémie aiguë échappant au traitement. Le seul traitement curatif disponible était alors la greffe allogénique de moelle osseuse, dépendant de la compatibilité des donneurs. Depuis le début des années 2000, une nouvelle thérapie, dite ciblée, permet de freiner la croissance anarchique des cellules cancéreuses, l'imatinib mésylate (Glyvec), inhibiteur compétitif de l'activité tyrosine-kinase BCR/ABL. De nouvelles molécules sont maintenant disponibles pour les sujets résistants au Glivec, telles le dasatinib et le nilotinib.

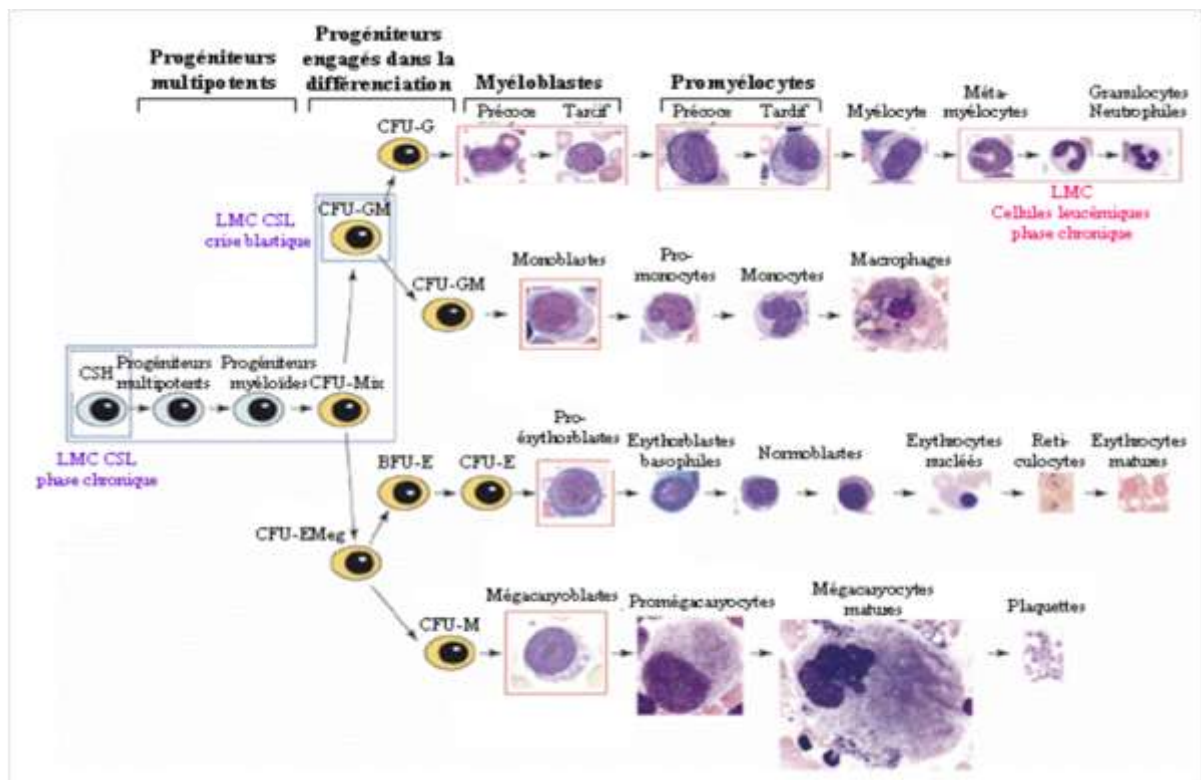


Figure 8: Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et des différents stades cellulaires impliqués dans la leucémie myéloïde chronique. (D'après Krause DS et Van Etten RA, 2007 Trends Mol Med.;13(11):470-81). Les progéniteurs clonogéniques sont en orange. Les cellules malignes de LMC en phase chronique encadrées en rouge correspondent aux granulocytes différenciés. Les cellules souches de LMC restreintes aux progéniteurs multipotents et aux progéniteurs engagés dans la différenciation sont encadrées en bleu.

I-2-2 La Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez (PV) est une maladie rare qui touche aussi bien les hommes que les femmes. La PV est le plus souvent diagnostiquée autour de 60 ans. Son incidence est de l'ordre de 1 à 1,5 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an.

La PV conduit à une forte expansion de la lignée érythroïde, mais aussi des lignées granuleuses et mégacaryocytaire (Vaquez H., 1892 C R Soc Biol.; Osler, 1903; Osler, 1908 Proc R Soc Med.; Butcher et D'andrea, 2000 Int J Mol Med.) résultant en un taux d'hématocrite élevé, une leucocytose et une thrombocytose variable (voir paragraphe I-2-5). Il est établi que la différenciation érythroïde normale dépend de l'érythropoïétine et de Jak2 qui

est la tyrosine kinase majoritairement impliquée dans cette voie de signalisation via le récepteur à l'Epo (EpoR).

La grande majorité des cas de PV est acquise et se distingue des polyglobulies dites secondaires ou réactionnelles par l'absence d'anomalie dans la voie dite de l'hypoxie ou d'hyperproduction d'Epo liée à une anomalie cardiaque ou respiratoire. La PV est caractérisée par une élévation des taux d'hématocrite et d'hémoglobine, une concentration d'Epo sérique basse ou normale, une pousse endogène des progéniteurs hématopoïétiques (BFU-E et CFU-E) en culture (*in vitro*) en absence de cytokines (*Prchal et al.*, 1974 NEJM) et par la présence de la mutation V617F de *JAK2* (voir paragraphe I-5-2-1) (*Tefferi et Vardiman*, 2008 Leukemia). La PV peut être associée à une splénomégalie liée à une migration de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ au niveau de la rate, traduisant ainsi un changement de compartiment cellulaire des cellules souches de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Le diagnostic se fait par la présence d'au moins deux critères majeurs et un ou deux critère(s) mineur(s). Le détail des critères de diagnostic de la PV est donné dans la **table 1** (voir paragraphe I-2-6).

I-2-3 La Thrombocythémie Essentielle

La Thrombocythémie Essentielle (TE) est une maladie peu fréquente puisque l'on recense de 1 à 2,5 nouveaux cas pour 100 000 habitants chaque année en France. Cependant, il s'agit du SMP le plus fréquent. La TE survient le plus souvent après 50 ans, touchant autant d'hommes que de femmes. On observe toutefois un pic de fréquence aux alentours de 30 ans, en particulier chez les femmes. La TE se différencie des autres thrombocythémies dites réactionnelles par l'absence de cause cardiaque, inflammatoire et de cancer. Il faut également distinguer une TE des autres SMP lorsqu'ils s'accompagnent d'une hyperplaquettose.

La TE, décrite pour la première fois en 1934, conduit à une hyperplasie mégacaryocytaire et à l'accumulation des plaquettes (*Epstein E. et Goedel A.*, 1934 Vich Arch (Pathol Anat)). La présentation clinique de ces patients est associée à un chiffre de plaquettes élevé ($>450.10^9/L$) souvent accompagné d'une élévation du nombre de granulocytes et d'une splénomégalie dans environ 50% des cas. Les mégacaryocytes sont géants et ont des lobulations de noyaux atypiques (noyaux en *corne de cerf*) (voir paragraphe I-2-5). Le diagnostic se fait par l'exclusion des autres critères de SMP (PV et MFP) et par l'exclusion des causes de thrombose réactionnelle (voir **table 1**, paragraphe I-2-6). La mise en culture des progéniteurs

hématopoïétiques de la moelle osseuse de patients atteints de TE a permis de mettre en évidence une pousse endogène des CFU-MK (dans environ 75% des cas) et des CFU-E (dans environ 50% des cas) (*Dobo et al.*, 2004 Haematologica).

On retrouve également la mutation V617F chez un nombre important de patients (dans 50-70% des cas). On retrouve également des mutations dans le gène codant le récepteur à la Tpo (*TPOR* ou *MPL*) qui joue un rôle majeur dans la mégacaryopoïèse (*Pikman et al.*, 2006 Plos One ; *Pardanani et al.*, 2006 Blood).

Les complications les plus fréquentes sont des accidents thrombotiques dus à une accumulation trop importante de plaquettes. Le diagnostic de TE reste un diagnostic d'élimination et est basé sur la présence de quatre critères majeurs (voir paragraphe I-2-6); il n'existe aucun marqueur spécifique pour le moment.

I-2-4 La Myélofibrose Primitive

La Myélofibrose Primitive (MFP) est une maladie très rare : chaque année, trois à sept nouveaux cas par million d'habitants sont diagnostiqués, soit 200 à 400 nouveaux malades pour la France entière. L'âge moyen au moment du diagnostic se situant entre 60 et 65 ans.

La MFP, décrite pour la première fois en 1879, est caractérisée par une hyperprolifération de cellules myéloïdes et mégacaryocytaires dans la moelle osseuse, accompagnée de la prolifération de fibroblastes qui produisent des fibres de réticuline et de collagène, provoquant ainsi une fibrose ostéo-médullaire, une disparition des niches hématopoïétiques et une hématopoïèse extramédullaire avec splénomégalie (voir paragraphe I-2-5) (*Heuck H.*, 1879 Arch Pathol Anat Physiol Virchows). Les mégacaryocytes des patients atteints de MFP sont souvent hyperplasiques et immatures ; ils produisent peu de plaquettes.

Comme dans la TE, on retrouve une proportion importante de patients présentant la mutation V617F de *JAK2* (50% des cas), ainsi que des mutations dans l'exon 10 de *MPL* (environ 10 à 15% des cas).

Pour le diagnostic de MFP, il faut que les trois critères majeurs et deux des quatre critères mineurs soient respectés (voir paragraphe I-2-6).

I-2-5 Morphologie de la moelle osseuse et paramètres biologiques des patients

Moelle normale :

On peut distinguer des mégacaryocytes polylobés, des adipocytes et les autres types cellulaires myéloïdes (granulocytes et autres monocytes).

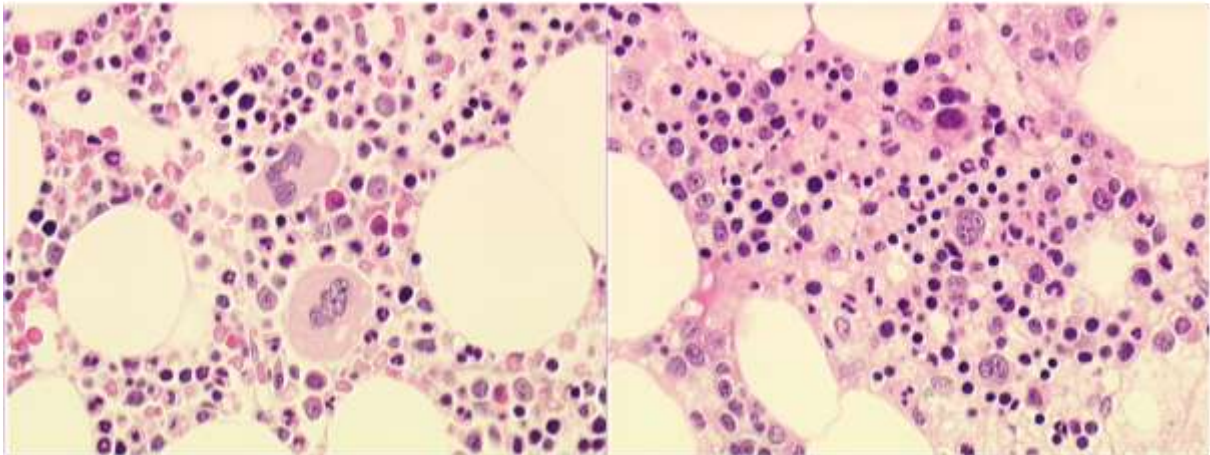
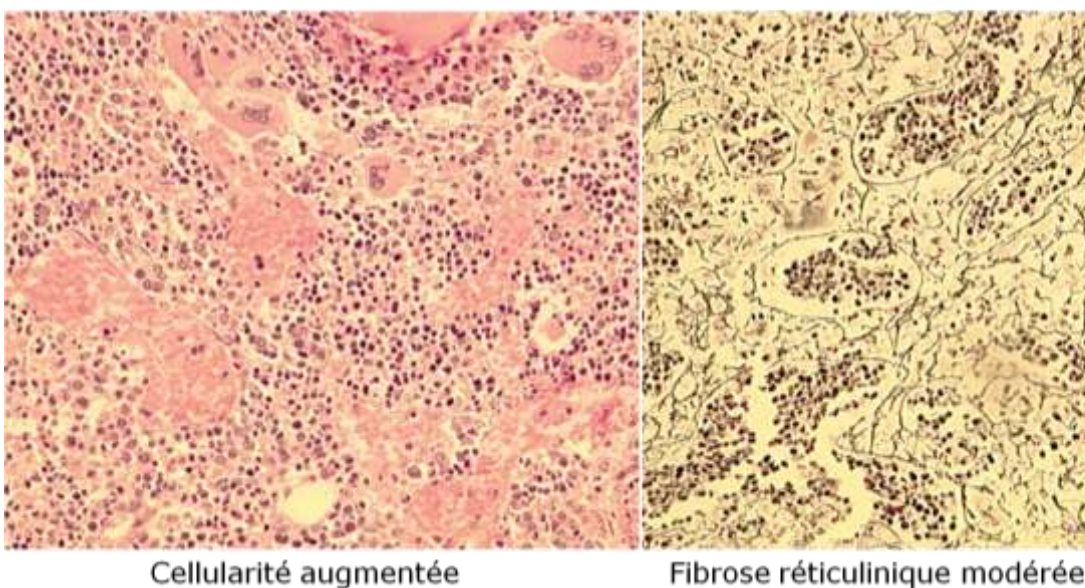


Photo de biopsie ostéo-médullaire (F. Leclair, laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Nantes).

Moelle de patient atteint de Polyglobulie de Vaquez :

On peut noter une augmentation importante des cellules myéloïdes associées à une fibrose réticulinique modérée (détectable en coloration argentique).



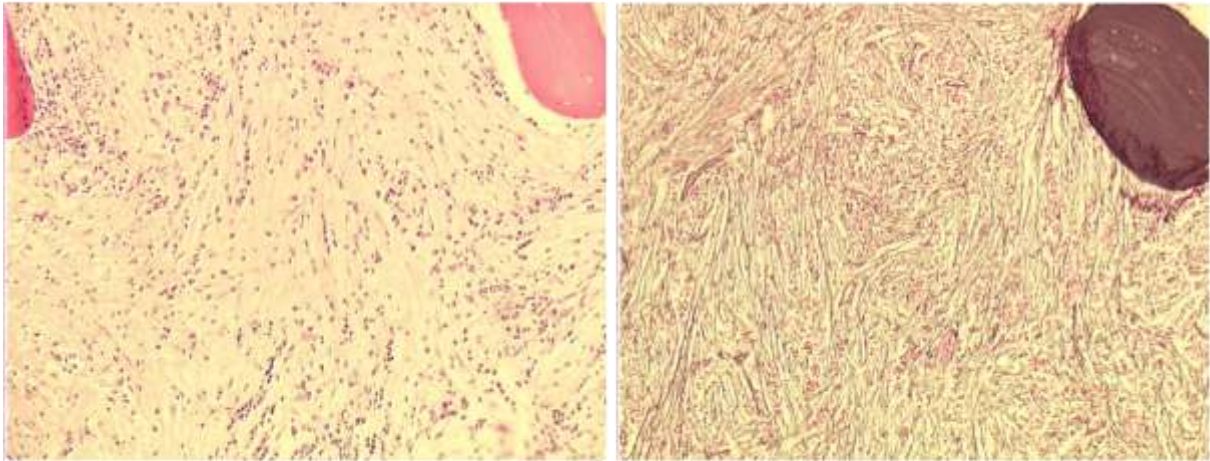
Cellularité augmentée

Fibrose réticulinique modérée

Photo de biopsie ostéo-médullaire (M. Imbert, Hôpital Henri Mondor, Créteil).

Moelle de patient atteint de myélofibrose primitive :

On peut noter une fibrose médullaire caractérisée par une accumulation des fibres réticuliniques et une diminution de la cellularité importante dans la moelle osseuse pouvant conduire à une hématopoïèse extramédullaire.

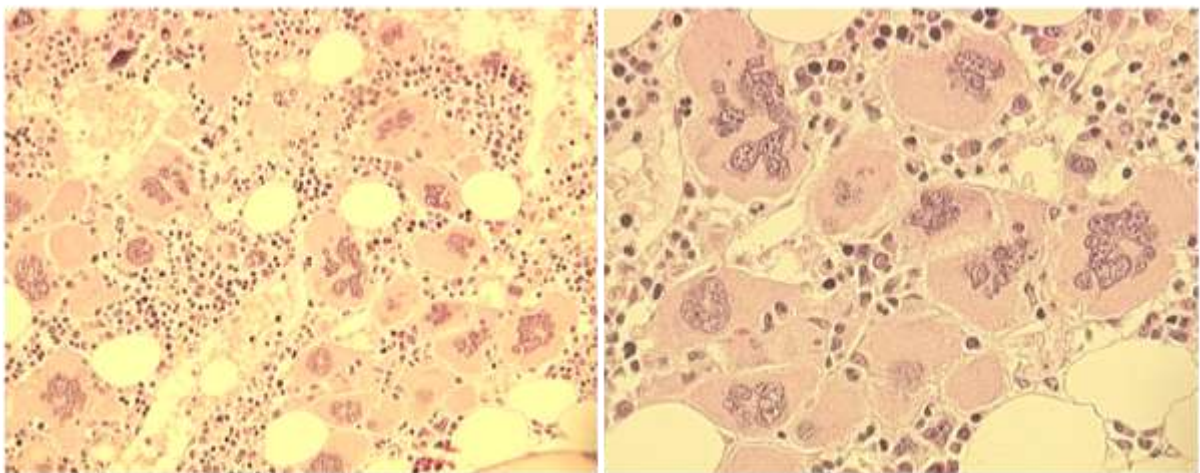


Fibrose réticulinique

Photo de biopsie ostéo-médullaire (F. Leclair, laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU Nantes).

Moelle de patient atteint de thrombocythémie essentielle :

On peut noter que les mégacaryocytes anormaux sont géants (hyperplasie mégacaryocytaire) et sont caractérisés par des noyaux en corne de cerf.



Hyperplasie mégacaryocytaire

Mégacaryocytes anormaux, géants

Photo de biopsie ostéo-médullaire (M. Imbert, Hôpital Henri Mondor, Créteil).

I-2-6 Les critères de diagnostic des SMP (OMS 2009)

	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocytémie Essentielle	Myélofibrose Primitive
Critères Majeurs	1- Hémoglobine : >18,5 g /dL (♂) >16.5 g/dL (♀) <i>Ou</i> Taux d'hémoglobine ou hématocrite >de 99% à la gamme de référence	1- Chiffre de plaquettes ≥ 450.10 ⁹ / L	1- Prolifération mégacaryocytaire atypique associée à une fibrose réticulinique et/ou collagénique <i>Ou</i> En absence de fibrose réticulinique, la prolifération doit être associée à une augmentation de la cellularité médullaire, d'une prolifération granulocytaire et fréquemment d'une baisse de l'érythropoïèse.
	2- Présence de <i>JAK2V617F</i>	2- Prolifération de mégacaryocytes de grande taille morphologiquement matures et regroupés en amas. Peu, ou pas, de prolifération érythroïde ou granulocytaire	2 Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, les syndromes myélodysplasiques et les autres SMP
		3 Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, la MFP, les syndromes myélodysplasiques et les autres SMP	3- Présence de <i>JAK2V617F</i> <i>Ou</i> d'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve de fibrose ostéo-médullaire réactionnelle
		4 Présence de <i>JAK2V617F</i> <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve d'une thrombocytose réactionnelle	
Critères Mineurs	1- Prolifération des trois lignées myéloïdes dans la moelle osseuse		1- Leuco-érythroblastose
	2- Concentration d'Epo sérique inférieure à la normale		2- Augmentation de la concentration de lactate déshydrogénase (LDH) sérique
	3 Pousse de colonies érythroïdes endogènes indépendante de l'Epo		3- Anémie
			4- Splénomégalie palpable
Le diagnostic requiert	Les 4 critères		

Table 1 : Critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour le diagnostic des SMP (Tefferi *et al.*, 2009 Cancer ; 1;115(17):3842-7).

I-2-7 Les traitements

Polyglobulie de Vaquez :

- Phlébotomie (prélèvement sanguin d'environ 300mL), pour stabiliser l'état du patient en faisant diminuer l'hématocrite ($< 47\%$ pour les femmes et $< 54\%$ pour les hommes).
- Aspirine pour les patients présentant des risques élevés de thrombose (chiffre de plaquettes élevé).
- Pour des patients jeunes (< 40 ans) et pour les patients pour lesquels la phlébotomie ne suffit pas, un traitement cytoréducteur peut être associé : administration d'hydroxyurée.

Thrombocytémie Essentielle :

- Administration d'aspirine (*Solberg et al.*, 2002 *Semin Onco.*).
- Ces patients sont souvent à forts risques d'accidents vasculaires. Les facteurs de risques associés sont l'âge (> 60 ans), la présence d'antécédent d'accident thrombotique, le tabagisme ou encore l'obésité.
- Hydroxyurée, anagrélide ou IFN- α (pour les femmes enceintes).

Myélofibrose Primitive :

Pour les cas les moins graves, l'utilisation des molécules cytoréductrices classiques est préconisée. Pour les cas critiques, l'allo-greffe de cellules souches hématopoïétiques est alors envisagée.

L'utilisation des molécules cytoréductrices du type hydroxyurée est largement répandue dans le traitement des SMP. Les molécules cytoréductrices agissent sur les cellules en prolifération active et donc, principalement sur les cellules malignes. En effet, l'hydroxyurée inhibe la synthèse de l'ADN sans altérer la synthèse de l'ARN. Son action est rapide et réversible et semble principalement agir au niveau des cellules de la moelle osseuse. Au cours du traitement, il a été montré que la thérapie cytoréductrice permettait, dans la majorité des cas, de réduire les chiffres de l'hémogramme, voire de rendre indétectable le clone muté *JAK2V617F* (*Girodon et al*, 2008 *Haematologica*).

I-3- Autres hémopathies associées aux SMP :

I-3-1 Les Thromboses Splanchniques

Les Thromboses Splanchniques regroupent les Syndromes de Budd-Chiari (BC) et les Thromboses de la veine Porte (TP). Le Syndrome de Budd-Chiari est une pathologie rare et est caractérisée par l'obstruction de la veine hépatique et/ou de la veine cave inférieure supra-hépatique. Les Thromboses de la veine Porte sont également des événements thrombotiques rares touchant le réseau vasculaire du foie. Pour les deux maladies, la pathogénèse est dépendante de la présence de facteurs pro-thrombotiques qui induisent la formation d'un thrombus dans les veines hépatiques. Dans 30 à 50% des cas, la cause principale conduisant à une Thrombose Splanchniques est un syndrome myéloprolifératif (*Janssen et al.*, 2003 J Hepatol.; *Valla D.C.*, 2009 J Hepatol.). La mutation V617F de *JAK2* est détectée dans environ 34% des cas de TP et 45% des BC (*Kiladjian et al.*, 2008 Blood).

I-3-2 Les Erythrocytoses Idiopathiques

Les Erythrocytoses Idiopathiques (EI) ont un phénotype caractérisé par une augmentation persistante des taux d'hématocrite et d'hémoglobine sans cause apparente, sans élévation de la concentration d'Epo sérique et sans mutation de *JAK2*. Ce diagnostic se fait par exclusion des autres causes possibles d'érythrocytoses (*Mc Mullin*, 2009 Hematology Am Soc Hematol Educ Program) à savoir :

- primaire :
 - congénitale avec des mutations du récepteur à l'Epo (*EPOR*) ;
 - Polyglobulie de Vaquez ;
- secondaire (ayant une concentration d'Epo élevée):
 - congénitale avec des mutations dans la voie de l'Oxygen-sensing (*VHL*, *PHD2*, *HIF α* ...) ;
 - acquise suite à un défaut cardiaque, pulmonaire ou à une tumeur solide.

I-3-3 La Leucémie Myéloïde Aiguë

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes, ou Myéloblastiques (LAM), sont des proliférations clonales de cellules malignes des lignages myéloïdes bloquées à différents stades de différenciation (**Figure 9** page 26). La LAM se développe dans la moelle osseuse, à partir de cellules immatures, dites cellules souches leucémiques, ou blastes, présentant un degré de maturation variable. Les cellules tumorales dérivant du clone leucémique envahissent la moelle, provoquant une altération de l'hématopoïèse et entraînant une insuffisance médullaire. L'accumulation de cellules leucémiques est due à la perte de la capacité de différenciation qui confère aux cellules tumorales un avantage de survie lié à un échappement à la mort cellulaire. La maladie peut être aggravée par une dissémination des blastes qui peuvent ensuite envahir d'autres organes hématopoïétiques (rate, ganglions, foie) ou non (peau, système nerveux central, testicules).

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes sont majoritairement des pathologies de l'adulte, avec une incidence globale de l'ordre de 3 pour 100 000 habitants par an en France. Leur fréquence augmente avec l'âge qui est un facteur aggravant. L'origine des LAM reste encore mal connue mais certains facteurs de risque leucémogène ont été identifiés. Plusieurs affections constitutionnelles comme la trisomie 21 ou l'anémie de Fanconi sont associées à un risque accru de LAM. Des facteurs de risque liés à l'exposition professionnelle à des produits toxiques augmentent la fréquence d'apparition des LAM. La maladie est alors dite "secondaire" bien que pouvant présenter les mêmes caractéristiques que les LAM de novo. En outre, des maladies pré-leucémiques ont été observées. Ainsi, certaines hémopathies peuvent évoluer en LAM (dans environ 5 à 10% des cas de SMP).

Les syndromes liés à une LAM peuvent être une conséquence de la cytopénie (anémie, infections, hémorragies) ou liés au type cellulaire impliqué ; par exemple, une LAM à composante monocyttaire est souvent associée à une splénomégalie (15-20% des LAM).

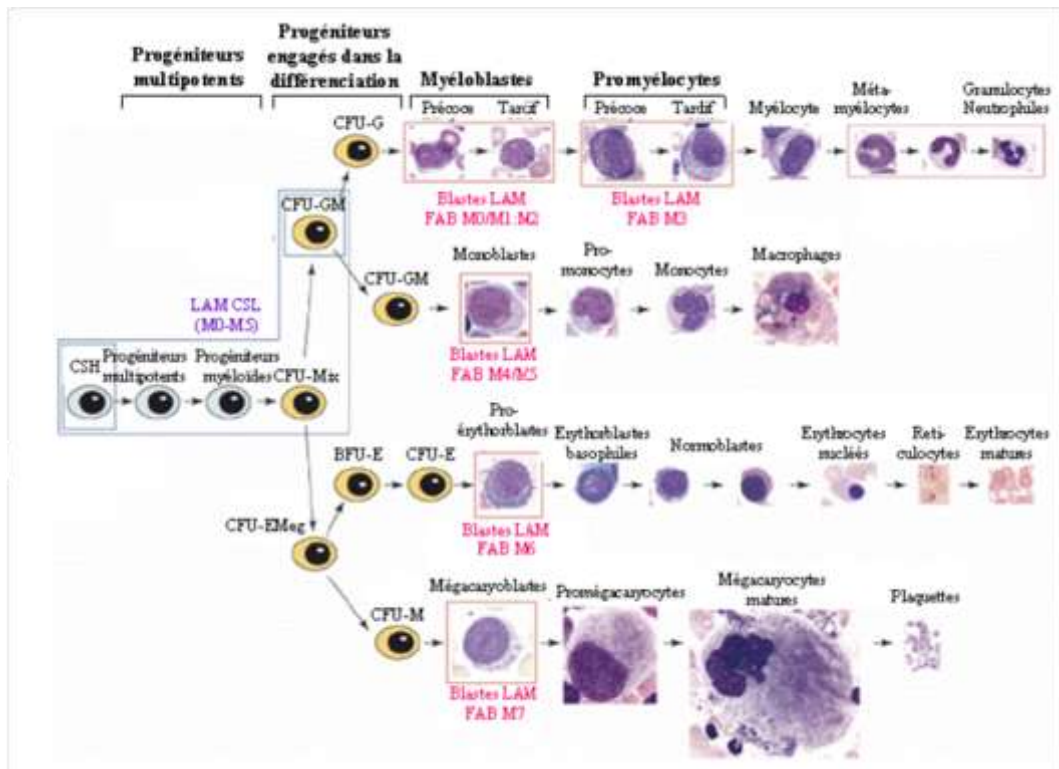


Figure 9: Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et des différents stades cellulaires impliqués dans la leucémie aiguë myéloïde. (D'après Krause DS et Van Etten RA, 2007 Trends Mol Med. ;13(11):470-81). Les progéniteurs clonogéniques sont en orange. Les cellules malignes de LAM sont encadrées rouges. Les blastes leucémiques des différentes classes de FAB (M0 à M7) correspondent approximativement aux différentes cellules de chaque lignage. Les cellules souches de LAM restreintes aux progéniteurs multipotents et aux progéniteurs engagés dans la différenciation, sont encadrées en bleu.

I-3-3-1 La classification des LAM (Classification FAB de 1972) et nouvelle classification OMS de 2001

Classification FAB 1972 :

LAM 0	= Indifférenciée Blastes indifférenciés, MPO-
LAM 1	= Myéloblastique peu différenciée Blastes > 90% des cellules myéloïdes ; corps d'Auer +/-, MPO +
LAM 2	= Myéloblastique avec différenciation Blastes 30-90% des cellules myéloïdes ; corps d'Auer ++, MPO +
LAM 3	= Promyélocytaire corps d'Auer en fagots +++, MPO + Hypergranuleux : blastes > 30% des cellules myéloïdes Microgranuleux : LAM3 « variant »
LAM 4	= Myélomonocytaire MPO + Blastes 30-90% des cellules myéloïdes Monocytes 20-80% des cellules myéloïdes LAM4 « éosinophiles » : éosinophiles > 5%
LAM 5	= Monoblastique MPO +/- Cellules monocytaires > 80% LAM5a : monoblastes LAM5b : monocytes/promonocytes
LAM 6	= Erythroblastique MPO + Blastes 30-90% des cellules myéloïdes Erythroblastes > 50% des cellules nucléées
LAM 7	= Mégacaryocytaire Mégacaryoblastes, MPO -

Classification OMS 2001 :

1^{er} groupe : LAM avec translocations chromosomiques récurrentes

- LAM avec t(8;21)(q22;q22), AML1(CBF-alpha)/ETO
- LAM avec t(15;17)(q22;q11-12), PML/RAR-alpha et variantes
- LAM avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22), CBF-bêta/MYH11)
- LAM avec anomalies 11q23 (MLL)

2^e groupe : LAM avec myélodysplasie « multilignée »

- Avec antécédent de SMD
- Sans antécédent de SMD

3^e groupe : LAM et SMD « secondaires » à des thérapeutiques

- Après agents alkylants
- Après épipodophyllotoxine

4^e groupe : LAM n'entrant pas dans les catégories précédentes

- LAM avec différenciation minimale (M0)
- LAM sans maturation (M1)
- LAM avec maturation (M2)
- LAM « promyélocytaire » (M3)
- LAM avec différenciation myélomonocytaire (M4)
- LAM monocytaire (M5)
- LAM avec différenciation érythroblastique (M6)
- LAM avec différenciation mégacaryocytaire (M7)
- LAM avec différenciation basophile
- LAM avec myélofibrose
- LA biphénotypique

I-4- Les cytokines et les récepteurs aux cytokines dans les Syndromes Myéloprolifératifs :

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hématopoïèse normale nécessite d'être finement régulée par différents facteurs dont les cytokines. La différenciation dans un lignage particulier est régulée par des cytokines spécifiques. Par exemple, la thrombopoïèse est dépendante d'une cytokine spécifique, la Tpo, pour la différenciation des mégacaryocytes.

Les cytokines sont des glycoprotéines à 4 hélices α solubles ou membranaires de faible poids moléculaire. Les cytokines sont souvent actives à de faibles concentrations du fait de leur mode d'action qui peut être soit autocrine et/ou paracrine. Les cytokines sont rarement produites de manière constitutive, mais, le plus souvent en réponse à une activation cellulaire (stress cellulaire, cascade de cytokines...). Elles sont capables de réguler positivement ou négativement la production des autres cytokines et, parfois même, leur propre production.

La présence des cytokines pour induire une différenciation et une prolifération normale des cellules sanguines est un élément primordial. Cependant, il est également important que leurs récepteurs soient correctement exprimés, activés et régulés.

Les récepteurs de cytokines hématopoïétiques, ou récepteurs de classe I, correspondent à des glycoprotéines membranaires ou solubles qui forment le groupe le plus important des récepteurs de cytokines. Ces récepteurs possèdent une architecture commune avec une extrémité NH_2 extracellulaire, un domaine transmembranaire et une extrémité COOH intracellulaire (**Figure 10** page 29).

Le domaine extracellulaire est variable d'un récepteur à l'autre mais possède deux domaines de type fibronectine III (*Bazan J.F.*, 1990 PNAS) :

- un domaine contenant quatre cystéines hautement conservées qui permettent la formation de ponts disulfures indispensables à la bonne conformation du récepteur (*Yawata et al.*, 1993 EMBO J.) ;
- un domaine contenant un motif également très conservé : le motif WSXWS indispensable à la fixation de la cytokine (*De Vos et al.*, 1992 Science).

Le domaine intracellulaire comporte lui aussi des motifs conservés, appelés BOX1 et 2, qui permettent la fixation de protéines kinases telles que les Jak (*Bazan et al.*, 1990 PNAS). Pour être fonctionnels, ces récepteurs aux cytokines hématopoïétiques nécessitent pour certains, la présence d'une deuxième chaîne capable de fixer une cytokine de manière spécifique (par exemple, le récepteur à l'IL-6 ou IL-6R α) et le signal est transduit par une chaîne commune (pour le récepteur à l'IL-6, la chaîne transductrice du signal est la gp130) formant ainsi un complexe hétéro-dimérique. D'autres récepteurs forment des récepteurs homo-dimériques, tels que l'EpoR ou le TpoR.

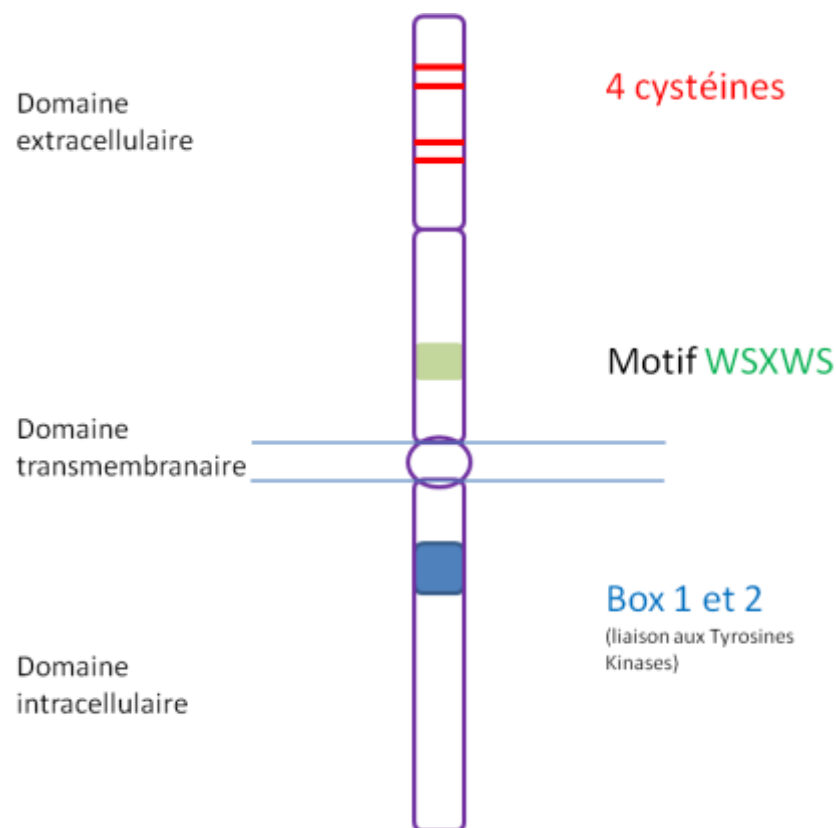


Figure 10 : Représentation schématique de la structure des récepteurs aux cytokines hématopoïétiques.

Dans les années 90, de nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation de la production de cytokines dans les SMP. En 1992, Le Bousse-Kerdilès et coll. ont montré une augmentation de la production d'IL-6, de G-CSF et de M-CSF dans le sérum d'un modèle murin infecté par le virus MPSV (Myeloproliférative Sarcoma Virus) qui donne un phénotype

proche de la myélofibrose primitive (*Le Bousse-Kerdilés et al.*, 1992 Blood). Dans ce même modèle, ce groupe a pu mettre en évidence également une augmentation de la production de TNF- α dans la rate des souris. L'IL-6, le G-CSF et le M-CSF sont des facteurs activateurs de l'hématopoïèse tandis que le TNF- α est connu pour être un inhibiteur de l'hématopoïèse précoce. De plus, ce même groupe a montré que les cellules CD34⁺ de patients atteints de MFP expriment moins de récepteur au TGF- β (*Le Bousse-Kerdilés et al.*, 1996 Blood). Plus récemment, en 2005, il a montré une augmentation de la production d'IL-8 chez des patients atteints de MFP. L'inactivation de la voie de l'IL-8 inhibe la prolifération des cellules CD34⁺ et la formation de colonie (*Hermouet et al.*, 2000 Leuk Lymphoma). Chez ces patients, les cellules CD34⁺, les cellules de la lignée granulo-monocytaire et les mégacaryocytes produisent des quantités normales d'IL-8. Cependant, l'augmentation importante du nombre de cellules chez ces patients pourrait expliquer l'augmentation des concentrations sériques d'IL-8 (*Hermouet et al.*, 2002 Cytokine). L'IL-8 est connue pour avoir un rôle dans la migration cellulaire et pourrait jouer un rôle chimio-attracteur pour les progéniteurs CD34⁺, induisant leurs migrations vers le foie et la rate, favorisant ainsi une hématopoïèse extra médullaire (*Laterveer et al.*, 1995 Blood ; *Laterveer et al.*, 1996 Blood). Il a également été montré un effet synergique de l'IL-11 et du SCF dans la migration des cellules érythroïdes de la moelle osseuse vers la rate (*Du X. et Williams D.A.*, 1997 Blood). Il a été établi que la réduction du clone malin (*JAK2V617F*) par des traitements de type anti-Jak2 diminue également la fibrose, indiquant un lien direct entre la prolifération du clone muté et le niveau de fibrose médullaire.

De plus, l'IL-8 semble jouer un rôle important dans les défauts de maturation observés dans les mégacaryocytes de patients atteints de MFP. En effet, des expériences de blocage du récepteur à l'IL-8 par des anticorps bloquants, ont montré un retour à une polyploïdie normale des mégacaryocytes (*Emadi et al.*, 2005 Blood). Tous ces résultats semblent indiquer un rôle majeur des cytokines dans la pathogénèse de la MFP par l'amplification de l'hématopoïèse et par un effet chimio-attracteur de l'IL-8 conduisant à une hématopoïèse extra médullaire. Une augmentation de l'expression du récepteur Flt3 à la surface des MK associée à une augmentation de la concentration plasmatique de son ligand FL a été mise en évidence chez des patients atteints de MFP. L'activation des voies de signalisation dépendante du couple Flt3/FL, notamment la voie des MAPK, semble induire une dysmégacaryopoïèse (*Desterke et al.*, 2011 Cancer Research). De plus, Flt3 est connue pour induire l'expression de l'IL-8 et les protéines AP-1 et NFATc4. L'IL-8 pourrait alors soutenir l'état inflammatoire observé chez

les patients atteints de MFP. AP-1 et NFATc4 sont connues pour être surexprimées durant la mégacaryopoïèse normale. Une étude plus récente du niveau d'expression des cytokines et de leurs récepteurs dans le plasma de patients atteints de MFP a permis de mettre en évidence l'augmentation des concentrations d'IL-2R soluble, d'IL-12, d'IL-15 et de confirmer l'importance de l'IL-8 (*Tefferi et al.*, 2011 JCO). Cette étude semble indiquer que l'IL-8 et l'IL-2R soluble ont un impact majeur sur la survie (durée de survie diminuée de plus de 50%) des patients atteints de MFP lorsque l'une de ces deux molécules au moins est augmentée dans le plasma.

Chez les patients atteints de TE, peu d'études sur la production des cytokines ont été réalisées. Cependant, il a été montré que ces patients présentent des concentrations basses ou normales de Tpo associés à une diminution fréquente de l'expression de leur récepteur (Mpl) à la surface des plaquettes (voir paragraphe I-4-3). La Tpo est connue pour être une cytokine stimulant la thrombopoïèse. De plus, il a été montré des concentrations élevées de VEGF chez les patients atteints de TE, de MFP et de PV. De manière intéressante, la concentration de VEGF, qui est corrélée au chiffre des plaquettes chez les patients atteints de TE, est augmentée chez les patients présentant des complications vasculaires de type thrombotique (*Musolino et al.*, 2002 Am J of Hemato.; *Ho et al.*, 2007 Leukemia Research). Le VEGF est connu pour avoir un effet sur la néo-angiogénèse et pourrait ainsi faciliter les complications vasculaires en induisant une organisation vasculaire anormale associée à un nombre de plaquettes plus élevé.

Chez les patients atteints de PV, notre groupe a montré une élévation des concentrations d'IL-11 et d'IL-8 dans leurs sérums (*Hermouet et al.*, 2002 Cytokine). L'IL-11 est connue pour stimuler l'érythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse.

Les premières observations *in vitro* de cellules mononuclées de moelle osseuse de patients atteints de PV et de TE ont pourtant montré, qu'en culture, ces cellules pouvaient donner des colonies érythroïdes ou mégacaryocytaires en l'absence d'ajout de cytokines contrairement aux cellules d'un donneur sain. Cependant, ces cellules de patients semblaient hypersensibles aux cytokines et seraient également dépendantes de leur micro-environnement médullaire. En effet, il a été montré que les CFU-Meg de patients atteints de TE sont plus sensibles à la Tpo que ceux des contrôles sains (*Kawasaki et al.*, 2001 Am J Hematol.). De même, pour la formation de colonies *in vitro*, les progéniteurs érythroïdes de patients atteints de PV sont dépendants des cytokines IL-11 et IL-8 en absence d'Epo (*Corre-Buscail et al.*, 2005

Experimental Hematology). De plus, leur pousse peut être inhibée par l'ajout d'IL-10 (Geissler *et al.*, 1998 Blood).

Plus récemment, Manshouri et coll. ont mis en évidence que le clone *JAK2V617F* est protégé par les cellules stromales. Ils ont ainsi pu montrer que ces cellules stromales produisent de l'IL-6 lorsque celles-ci sont mises en co-culture avec des cellules *JAK2V617F* et un inhibiteur de Jak2 (ici, l'*Atiprimod*). La production de cytokines protège les cellules *JAK2V617F* de l'apoptose induite par l'inhibiteur de Jak2 (Manshouri *et al.*, 2011 Cancer Research). Par ailleurs, le TNF α permet l'expansion préférentielle du clone *JAK2V617F* (Fleischman *et al.*, 2011 Blood). Ce mécanisme de protection du clone muté vis-à-vis du TNF α peut expliquer en partie le phénomène de sélection clonale des cellules résistantes aux molécules inflammatoires. En effet, le TNF α est connu pour être un régulateur négatif des cellules hématopoïétiques en cycle cellulaire en induisant la sénescence et l'instabilité génétique dans les cellules cibles (Murase *et al.*, 1987 Blood; Dybedal *et al.*, 2001 Blood; Beyne-Rauzy *et al.*, 2004 Oncogene).

Les nombreuses dérégulations de production des cytokines et de l'expression de leurs récepteurs suggèrent un rôle majeur des cytokines dans le développement des SMP. L'IL-6, l'IL-11 et l'Epo sont connues pour stimuler l'érythropoïèse, alors que la Tpo agit sur la maturation des mégacaryocytes et la thrombopoïèse. Ces cytokines et leurs récepteurs seront présentés dans les paragraphes suivants, ainsi que l'Hepatocyte Growth Factor (HGF) que nous avons récemment décrit comme impliqué dans une boucle autocrine de production d'IL-6 et d'IL-11 chez des patients atteints de PV (voir paragraphe IV-3).

I-4-1 Les récepteurs de la famille IL-6

Les récepteurs de la famille IL-6 ont en commun la chaîne glycoprotéine 130 (gp130). Cette chaîne gp130 a la capacité de se lier à différentes chaînes spécifiques de cytokines et permet de transduire le signal intracellulaire. Actuellement, huit cytokines ont été classées dans cette famille de l'IL-6 (**Figure 11** page 33) : l'IL-6, l'IL-11, le LIF (Leukemia Inhibitory Factor), le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), l'OSM (OncoStatin M), CT-1 (CardioTrophin 1), le NNT-1/BSF3 ou CLC (Cardiotrophin-like Cytokine) et l'IL-27. Ces huit cytokines ont une faible affinité pour la chaîne gp130 et nécessitent donc leur pré-association avec leur chaîne

spécifique afin de former un complexe stable avec la gp130 pour donner le récepteur fonctionnel capable de transduire le signal intracellulaire.

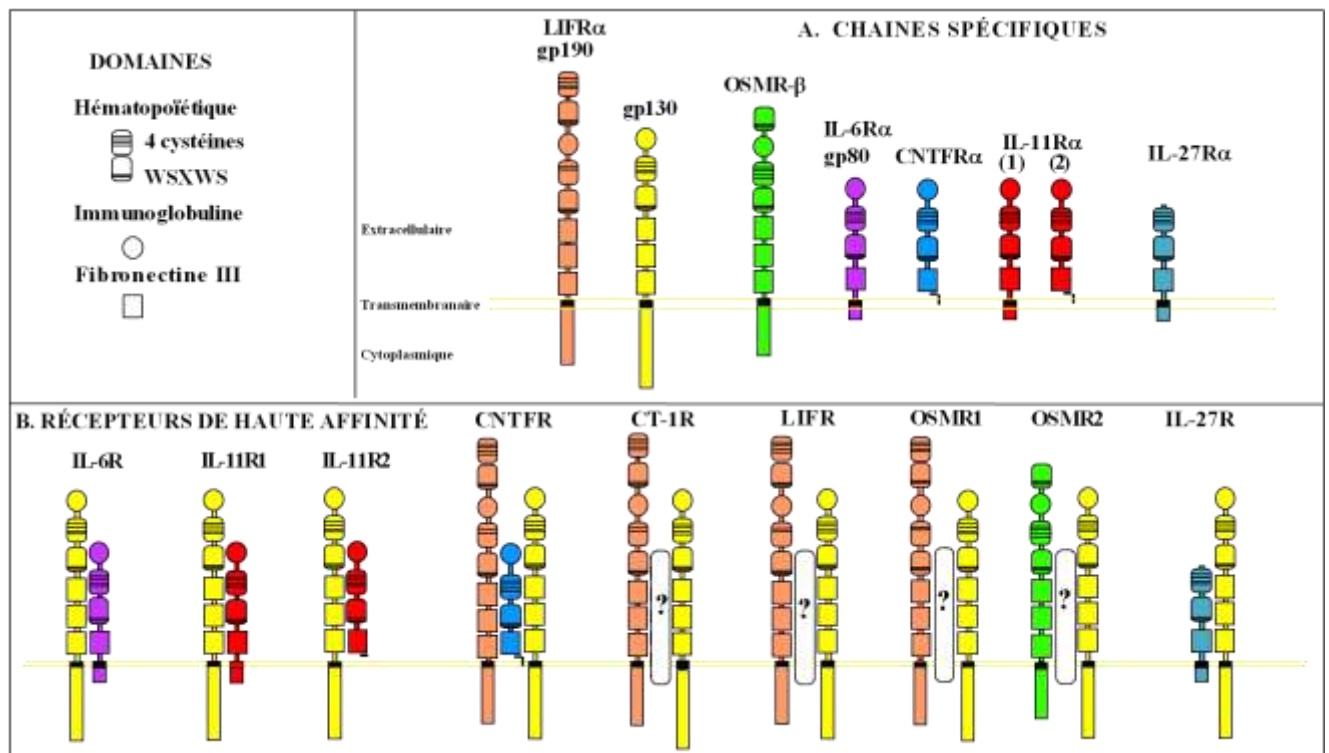


Figure 11 : Représentation schématique des récepteurs de la famille IL-6. A : représentation schématique des chaînes spécifiques des cytokines de la famille IL-6. **B :** représentation schématique des récepteurs de haute affinité.

Dans le travail qui suit, nous décrirons uniquement les complexes IL-6/IL-6R α /gp130 et IL-11/IL-11R α /gp130.

I-4-1-1 La chaîne gp130

La chaîne gp130 a été mise en évidence pour la première fois en 1989 comme étant la chaîne permettant la transduction du signal induit par la cytokine IL-6 (Taga *et al.*, 1989 Cell). La chaîne gp130 correspond à une glycoprotéine ubiquitaire dont le gène *GP130*, comprenant 17 exons, a été localisé sur le bras long du chromosome 5 (5q) (**Figure 12A** page 34) (Rodriguez *et al.*, 1995 Cytogenet Cell Genet. ; Hibi *et al.*, 1990 Cell). L'inactivation du gène *GP130* provoque de nombreuses altérations chez la souris. Les embryons de souris *GP130*^{-/-} meurent entre le douzième jour et le terme de la gestation et présentent des retards de croissance, une

hématopoïèse extrêmement réduite et des malformations cardiaques (*Yoshida et al.*, 1996 PNAS).

Il est intéressant de noter que le promoteur du gène *GP130* contient une séquence SBE (Stat Binding Element) sur laquelle peuvent se fixer des homo- ou des hétéro-dimères de Stat1/Stat3, activés notamment par les cytokines de la famille IL-6. Par exemple, la fixation de l'IL-6 sur son récepteur de haute affinité induit une augmentation de la transcription du gène codant la gp130 (*O'Brien C.A. et Manolagas S.C.*, 1997 J Biol Chem.).

Il existe également une forme soluble de la gp130 qui a été détectée de façon naturelle dans le sérum et les urines humains (*Müllberg et al.*, 1993 FEBS Lett.; *Narazaki et al.*, 1993 Blood; *Zhang et al.*, 1998 J Biol Chem.). Cette forme soluble de la gp130 joue un rôle antagoniste par sa capacité à se lier au complexe IL-6/IL-6R α (*Müller-Newen et al.*, 1998 J Immunol.). Cette forme soluble pourrait être issue de la coupure protéolytique de la gp130 par les caspases 3 et 8 (*Graf et al.*, 2008 Arch Biochem Biophys.).

Enfin, un pseudogène de la gp130 (*IL6STP*) a été identifié sur le bras court du chromosome 17 (17p) (*Rodriguez et al.*, 1995 Cytogenet Cell Genet.). Le pseudogène 17p ne comporte pas d'introns (**Figure 12B**). Le pseudogène contient le polymorphisme G442C dans l'exon 5, qui correspond au domaine extra-cellulaire du récepteur.

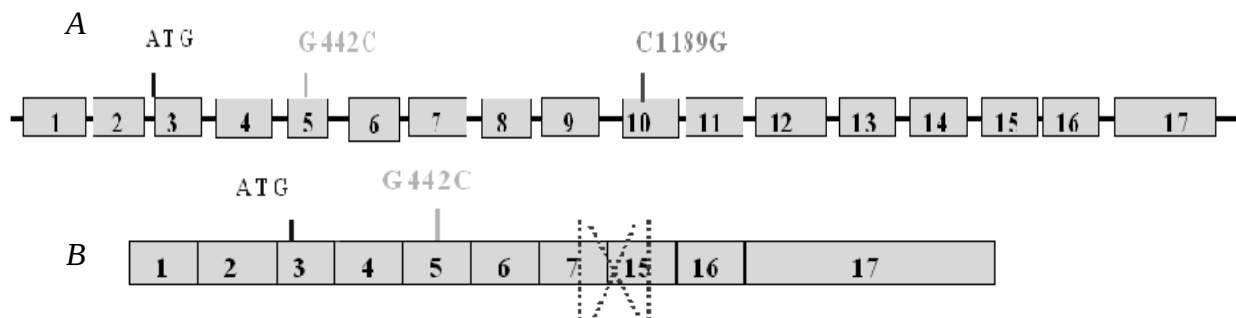


Figure 12 : Représentation schématique du gène *GP130* et du pseudogène *IL6STP*.
A : Représentation schématique du gène *GP130*, présent sur le chromosome 5q, de la position des polymorphismes G442C dans l'exon 5 et C1189G dans l'exon 10 (rs2228044, rs2228043). **B :** Représentation schématique du « pseudogène » gp130 (*IL6STP*), présent sur le chromosome 17p.

La chaîne gp130 a un poids moléculaire de 130 KDa et est fortement glycosylée. La gp130 n'a pas d'activité kinase intrasèque mais possède des séquences consensus appelées BOX 1 et

2 qui permettent la liaison des kinases qui transduiront le signal intracellulaire. Les protéines kinases Jak1 et 2 peuvent s'associer à la chaîne gp130 au niveau de la BOX 2.

Dans le domaine intracellulaire, il a été décrit un motif di-leucine qui semble être crucial pour le mécanisme d'internalisation par endocytose de gp130 (*Dittrich et al.*, 1996 J Biol Chem.). Cette internalisation est suivie de la dégradation de gp130 dans le compartiment lysosomal. Cependant, cette internalisation/dégradation ne fait pas intervenir la voie de signalisation Jak/Stat (*Thiel et al.*, 1998a Biochem J.). Il semblerait que cette internalisation soit dépendante du complexe protéique AP-2 qui se trouve associé à gp130 de manière constitutive (*Thiel et al.*, 1998b FEBS Lett.).

Le modèle murin gp130 ^{Y757F/Y757F} présente une dérégulation de l'hématopoïèse par augmentation de la survie et de la prolifération en réponse aux cytokines de la famille IL-6. L'activation des Jak conduit notamment à l'activation de Stat3. L'activation de Stat3 est un événement majeur de régulation de la survie et de la prolifération des cellules hématopoïétiques. Il a été montré qu'il existe un seuil d'activation du complexe gp130/Stat3, correspondant à l'équilibre entre l'activation normale et la suractivation de la voie Stat3 qui peut résulter en un excès ou déficit de production des cellules hématopoïétiques (*Jenkins et al.*, 2005 Blood).

Il est intéressant de noter que le gène codant la gp130 est porté par le chromosome 5q, souvent délété dans les maladies myéloïdes, prolifératives ou dysplasiques.

Deux polymorphismes non conservatifs ont été décrits dans le gène codant la gp130 : le rs2228044 (G442C de l'exon 5), remplaçant une glycine par une arginine au niveau du résidu 148 (G148R), et le rs2228043 (C1189G de l'exon 10), remplaçant d'une leucine par une valine au niveau du résidu 397 (L397V). Le polymorphisme rs2228044 a été décrit comme pouvant influencer négativement la signalisation dépendante de la gp130.

I-4-1-2 La chaîne IL-6R α (gp80) et l'interleukine 6 (IL-6)

La deuxième chaîne du récepteur à l'IL-6, codée par le gène gp80 comporte 10 exons (**Figure 13A** page 36). Ce gène est porté par le bras long du chromosome 1 (1q) (*Yamasaki et al.*, 1988 Science). La chaîne IL-6R α n'est exprimée que dans certains types cellulaires tels que

les lymphocytes B, les macrophages, les cellules CD34⁺ et les ostéoclastes (*Akashi et al.*, 1991 Blood; *Hilbert et al.*, 1995 J Exp Med.).

Il existe deux isoformes différents. Le premier correspond à la chaîne IL-6R α complète formant avec la gp130 le récepteur membranaire à l'IL-6. Le second est issu d'un changement de cadre de lecture en début d'exon 9 (**Figure 13B**). La séquence transcrite dans ce nouveau cadre de lecture contient un codon « stop » qui se situe 11 codons après le début de l'exon 9 aboutissant à la production d'IL-6R α soluble d'environ 55KDa (*Müllberg et al.*, 1993 Eur J of Immunology; *Horiuchi et al.*, 1994 Eur J of Immunology). Cette forme soluble du récepteur possède une activité agoniste à celle du récepteur membranaire.

Un pseudogène a également été décrit sur le bras long du chromosome 9 (9q) (*Snyers et al.*, 1995 DNA Seq.). Ce pseudogène, d'une taille de 2654 pb, a une homologie de séquence avec la forme soluble de l'IL-6R (**Figure 13C**). Ce fragment correspond à une séquence de 1328 pb l'ARNm de l'IL-6Rs déletée d'une partie de sa région 5' non traduite et du début de la séquence codante.

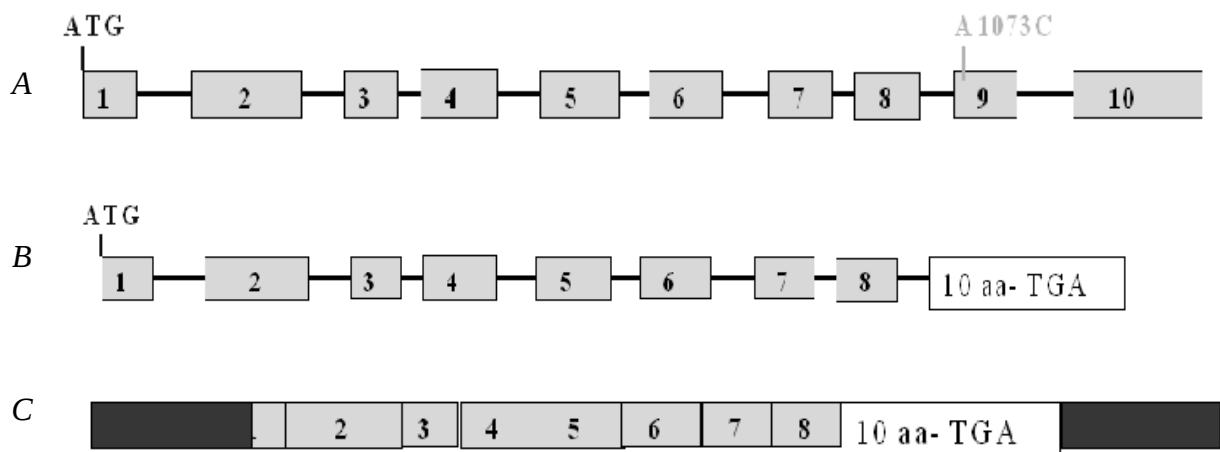


Figure 13 : Représentation schématique du gène GP80, de l'épissage alternatif donnant la forme soluble et de son pseudogène. A : Représentation schématique du gène GP80 (ou IL6R α), présent sur le chromosome 1q, et de la position du polymorphisme rs2228145 (A1073C) dans l'exon 9. **B :** Représentation schématique de l'isoforme 2 de la gp80. L'isoforme 2 code la forme soluble de la gp80 suite au décalage du cadre de lecture au début de l'exon 9 qui crée une nouvelle séquence C-terminale de 10 acides-aminés. **C :** Représentation schématique du « pseudogène » gp80 présent sur le chromosome 9q.

Le gène codant l'IL-6 est porté par le bras court du chromosome 7 (7p) (*Sehgal et al.*, 1986 PNAS; *Ferguson-Smith et al.*, 1988 Genomics). L'IL-6 joue un rôle important dans la

défense de l'hôte en participant à la régulation des réponses immunitaires et inflammatoires. L'IL-6 est connue pour être produite par de très nombreux types cellulaires : lymphocytes T, monocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes, progéniteurs hématopoïétiques, cellules mésenchymateuses et cellules stromales de la moelle osseuse.

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire qui se fixe d'abord sur sa chaîne spécifique, IL-6R- α (ou gp80). La chaîne α ne transduit pas de signal. Le complexe IL-6/IL-6R- α va ensuite être présenté à la gp130 dans une configuration géométrique permettant la formation d'un complexe trimérique de haute affinité (**Figure 14**). L'association de deux trimères va permettre la formation du récepteur sous sa forme active (*Boulanger et al., 2003 Science*).

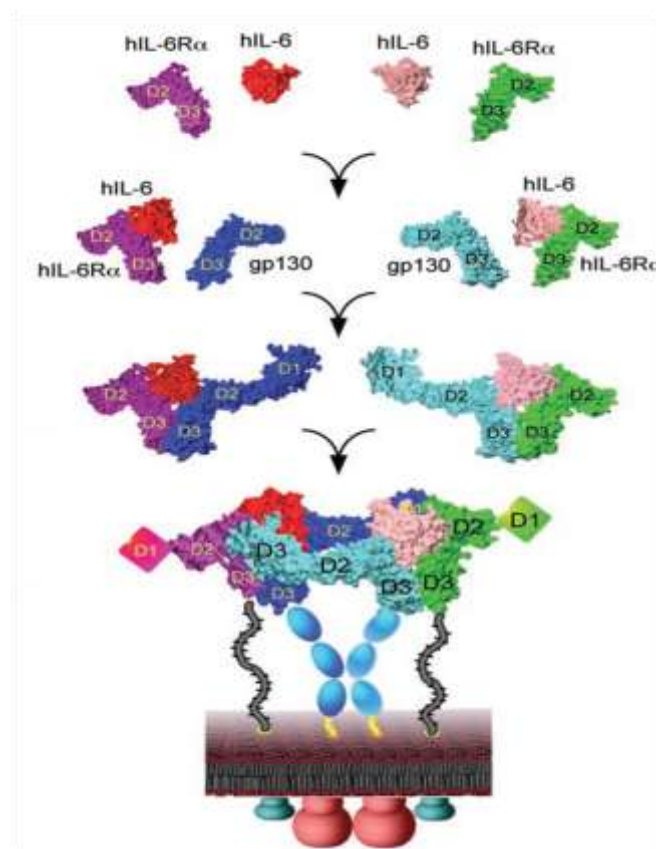


Figure 14 : Représentation schématique de la formation du complexe hexamérique du récepteur à l'IL-6 (*Boulanger et al., 2003 Science ; 27;300(5628):2101-4*).

La liaison de l'IL-6 induit une homodimérisation des chaînes gp130, ce qui active les Jak1 et 2 et par la suite, certains facteurs de transcription, en particulier Stat1, Stat3 et Stat5. L'activation de Stat3 est un événement majeur de régulation hématopoïétique, de la survie cellulaire et de la prolifération. Stat5 est critique pour la prolifération et la survie de la lignée

érythroïde et plaquettaire. Il existe un rétrocontrôle de ces voies de signalisation par l'intermédiaire des phosphatases Suppressor Of Cytokine Signaling (Socs3) et Src Homology Phosphatase 2 (Shp2).

Le polymorphisme non conservatif rs2228145 correspondant à la substitution D358A, décrit dans l'exon 9 du gène *GP80*, induit des changements majeurs du niveau d'IL-6 et d'IL-6Rs sérique de patients atteints de TE (*Rafiq et al.*, 2007 Genes Immuno.), mais également dans des cas d'arthrite rhumatoïde (*Marinou et al.*, 2009 Ann Rheum Dis.). Le niveau de récepteur soluble à l'IL-6 (IL-6Rs) est significativement plus élevé dans le plasma de patients atteints de TE (*Marta et al.*, 2004 Haematologica). Cette sur-production d'IL-6Rs semble due aux monocytes de patients atteints de TE (*Goette et al.*, 2010 Exp Hematol.).

De plus, la forme soluble de l'IL-6R α semble associée à une augmentation de la sécrétion d'IL-6 et des métalloprotéinases MMP1/2 par les cellules stromales de la moelle osseuse via probablement un système de transprésentation de l'IL-6/IL-6R α soluble (*Peters et al.*, 1996 Immunol Lett.; *Barillé et al.*, 2000 Cytokine). La forme soluble du récepteur à l'IL-6 sert non seulement à moduler la réponse systémique de l'IL-6 circulante, mais est aussi capable d'induire un signal par trans-signalisation via la gp130 pour les cellules n'exprimant pas d'IL-6R α (*Heinrich et al.*, 2003 The Biochemical Journal).

L'IL-6 possède des fonctions variées dont celle de stimuler, en synergie avec l'IL-3, le développement des mégacaryocytes et la production des plaquettes (*Imai et al.*, 1991 Blood). L'IL-6 active la prolifération des CSH en stimulant leur entrée en phase G1 du cycle cellulaire. Dans des conditions physiologiques, les concentrations sériques d'IL-6 sont basses, voire indétectables.

I-4-1-3 La chaîne IL-11R α et l'IL-11

La chaîne spécifique du récepteur à l'IL-11 est l'IL-11R α . Le gène codant pour l'IL-11R α comporte 13 exons (*Chérel et al.*, 1995 Blood). Le gène codant l'IL-11R α se situe sur le bras court du chromosome 9 (9p). Une forme soluble de l'IL-11R α a été décrite par un système d'épissage alternatif de l'exon 11 à 13 (*Chérel et al.*, 1995 Blood). Cette chaîne soluble a été

décrite comme étant capable, en présence d'IL-11, de se lier à la gp130 membranaire pour former un récepteur fonctionnel (Karow *et al.*, 1996 Biochem J.).

L'IL-11 a été mise en évidence en 1990 et son gène a été localisé sur le chromosome 19q (Paul *et al.*, 1990 PNAS). L'IL-11 se fixe sur la chaîne IL-11R α avec une faible affinité avant de se lier à la chaîne gp130 pour former un complexe hexamérique stable de haute affinité. La stimulation par l'IL-11 induit différentes voies de signalisations telles que l'activation des Jak, en particulier Jak2, la voie des MAPK et les Stat1 et 3.

L'IL-11 est notamment produite par les cellules stromales de moelle osseuse. L'IL-11 est un facteur important de l'hématopoïèse en agissant en synergie avec d'autres facteurs précoces et tardifs pour stimuler les progéniteurs à différents stades de l'hématopoïèse. L'IL-11 agit en stimulant l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et en diminuant la durée du cycle (Du X. *et Williams D.A.*, 1997 Blood). L'IL-11 augmente la réponse de progéniteurs de la moelle osseuse à l'érythropoïétine et leur capacité à survivre en absence d'Epo (Corre-Buscail *et al.*, 2005 Exp Hematol.). L'IL-11 stimule l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse (Quesniaux *et al.*, 1992 Blood ; De Haan *et al.*, 1995 Br J Haematol. ; Broudy *et al.*, 1995 Blood).

L'IL-11 possède également des propriétés anti-inflammatoires en diminuant la production de TNF α par les monocytes et macrophages (Du X. *et Williams D.A.*, 1997 Blood).

I-4-2 Le récepteur à l'hépatocyte growth factor c-Met (HGFR) et l'HGF

Le récepteur c-Met correspond au récepteur à l'hépatocyte growth factor (HGF). Le gène *HGFR* est identifié et localisé en 7q31 pour la première fois en 1984 (Cooper *et al.*, 1984 Nature ; Dean *et al.*, 1985 Nature). Par la suite, deux études ont conclu que le gène HGFR est un oncogène codant un récepteur à tyrosine kinase (Dean *et al.*, 1985 Nature; Park *et al.*, 1987 Proc. Nat. Acad. Sci.). Le récepteur à l'HGF est un récepteur homo-dimérique composé de deux sous-unités α de 50 KDa et β de 145 KDa (**Figure 15** page40). Lorsque c-Met est exprimé à la surface membranaire, la sous-unité α se trouve à l'extérieur de la cellule alors que la sous-unité β est composée de trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et

intracellulaire à tyrosine kinase. En 1991, l'étude de *Bottaro et coll.* a montré que le récepteur c-Met a pour ligand l'HGF (*Bottaro et al.*, 1991 Science).

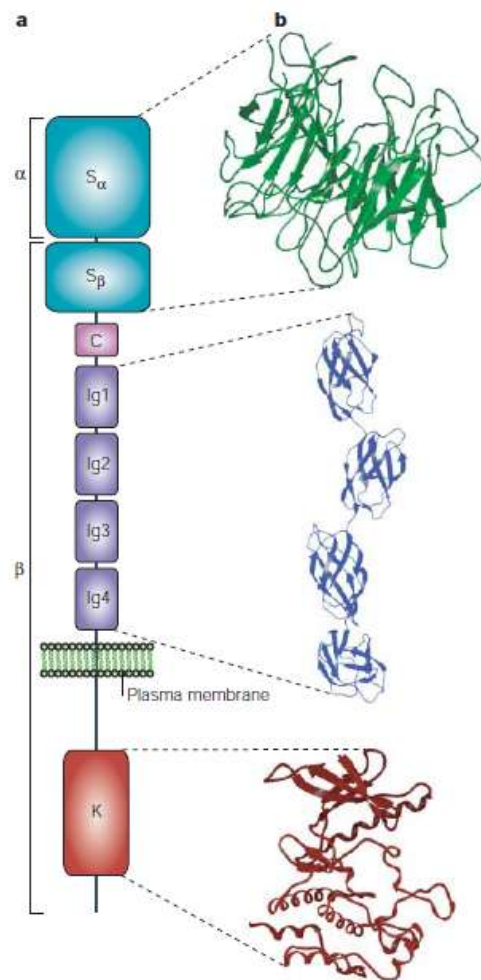


Figure 15 : Représentation schématisée et 3D du récepteur à l'HGF (HGFR) composé de 2 sous-unités α et β (*Birchmeier et al.*, 2003 Nat Rev mol cell biol. ; 4(12):915-25).

Le récepteur HGFR est un récepteur de haute affinité pour l'HGF et ne nécessite donc pas une deuxième chaîne différente pour induire une signalisation efficace (*Jeffers et al.*, 1996 Mol cell biol.).

L'HGF fait partie de la famille des facteurs de croissance. La forme biologiquement active est obtenue par clivage protéolytique et liaison des deux chaînes clivées α et β , par des ponts disulfure pour obtenir un hétérodimère fonctionnel (**Figure 16** page 41) (*Nakamura et al.*, 1989 Nature; *Kataoka et al.*, 2003 Cancer Metastas Rev.). Seule cette forme mature de l'HGF est

active sur le récepteur HGFR et est capable d'induire une signalisation (*Hartmann et al.*, 1992 PNAS).

L'HGF est connu pour induire la production d'IL-11 qui est une cytokine importante dans l'hématopoïèse et le contrôle de l'inflammation (*Hjertner et al.*, 1999 Blood). De plus, une stimulation par le G-CSF des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse induit une augmentation de l'expression de c-Met et de la signalisation dépendante de l'HGF (*Tesio et al.*, 2011 Blood).

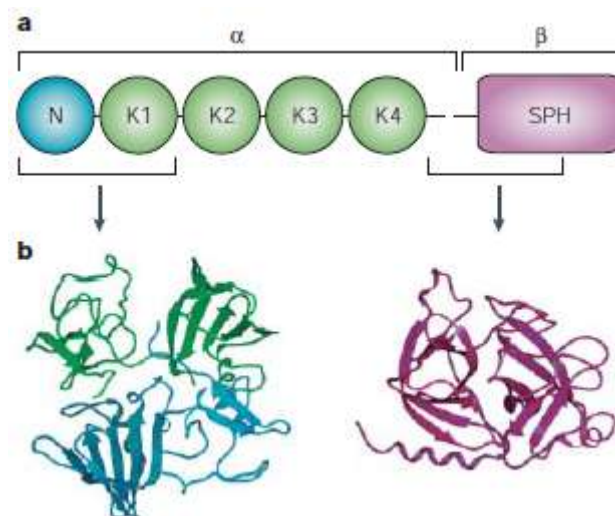


Figure 16 : Représentation schématique et 3D de la forme mature de l'HGF après formation des ponts di-sulfure entre les 2 sous-unités α et β (*Birchmeir et al.*, 2003 Nat Rev mol cell biol.; **4**(12):915-25).

I-4-3 Le récepteur à la Thrombopoïétine, Mpl (TpoR), et la Tpo

Mpl ou TpoR, le récepteur à la thrombopoïétine (Tpo) appartient à une sous-classe de récepteurs hématopoïétiques de type I. Mpl est exprimé par les plaquettes et les progéniteurs hématopoïétiques précoces (*Vigon et al.*, 1992 Proc. Nat. Acad. Sci.; *Debili et al.*, 1995a Blood). La première évidence de l'existence d'un facteur de croissance thrombopoïétique a été faite par l'étude du virus murin de leucémie myéloproliférative (MPLV) (*Wendling et al.*, 1986 Virology). L'oncogène viral, v-mpl, a alors été montré comme codant une protéine tronquée et comme étant un nouveau membre de la superfamille des récepteurs aux cytokines (*Souyri et al.*, 1990 Cell). Par la suite, des protéines homologues humaines et murines ont été

prises en évidence (*Vigon et al.*, 1992 Proc. Nat. Acad. Sci.; *Vigon et al.*, 1993 Oncogene; *Skoda et al.*, 1993 The Embo J.). Son ligand, la Tpo, a été cloné peu après (*Bartley et al.*, 1994 Cell ; *Debili et al.*, 1995b Blood ; *Drachman et al.*, 1995 JBC). La portion N-terminale de la Tpo a une forte homologie avec l'érythropoïétine et présente une structure en hélice typique des cytokines (*Kaushansky et al.*, 1993 Blood). Le gène codant pour le TpoR est localisé sur le chromosome 1p34 et est composé de 12 exons (*Mignotte et al.*, 1994 Genomics).

Le promoteur du gène *MPL* a été caractérisé en 1996 par Mignotte et coll.. Ce travail a permis d'identifier des sites critiques pour l'expression de la protéine Mpl notamment des sites de fixation pour les facteurs de transcription Gata1 et Ets (*Mignotte et al.*, 1996 Stem Cells; *Clausen et al.*, 1997 Leukemia). En effet, des mutations ponctuelles dans ces sites de fixation abrogent l'expression du transcript MPL de 15 à 85%. Chez l'homme, quatre ARNm différents, codant Mpl, ont pu être mis en évidence (**Figure 17** page 43). On retrouve tout d'abord l'ARNm « full length » codant le récepteur TpoR total, qui sera exprimé à la surface membranaire. Il existe un second ARNm qui code un récepteur soluble à la Tpo : Mpl-tr. Ce variant résulte de l'épissage alternatif de l'exon 8 directement sur l'exon 11, éliminant ainsi la partie juxtamembranaire et le domaine transmembranaire de la protéine Mpl. Du fait de cet épissage alternatif, un décalage de cadre de lecture crée un « stretch » d'acides aminés différents de la protéine entière (*Vigon et al.*, 1992 Proc. Nat. Acad. Sci.; *Vigon et al.*, 1993 Oncogene et *Skoda et al.*, 1993 The Embo J.). Le variant Mpl-tr a été décrit comme ayant un effet dominant négatif sur la prolifération et la survie cellulaire dans des modèles cellulaires transfectés stablement avec une construction codant la protéine Mpl-tr (*Coers et al.*, 2004 JBC). Mpl-tr serait produit sous forme d'une protéine tronquée avec une séquence de 30 acides aminés « inédits » qui jouent un rôle essentiel dans l'effet dominant négatif de Mpl-tr. Mpl-tr est décrit comme étant séquestré sous forme d'un stock intracellulaire dans des vésicules. Mpl-tr pourrait alors jouer son rôle de régulateur négatif en formant des hétérodimères avec Mpl et ainsi diriger Mpl vers un compartiment de dégradation protéique tel que les lysosomes. Il existe un second variant d'épissage, codant la protéine Mpl-K, qui est la conséquence du saut de lecture de l'ARN polymérase sur le site donneur d'épissage de l'exon 10 et qui aboutit à l'arrêt de la transcription dans l'intron 10 (*Vigon et al.*, 1992 PNAS). Enfin, il existe un quatrième variant qui est la conséquence d'un épissage alternatif de l'exon 8 sur l'exon 9 aboutissant à une protéine Mpl-Del tronquée de 24 acides aminés et ayant une fonction non déterminée à ce jour (*Li et al.*, 2000 Cytokine).

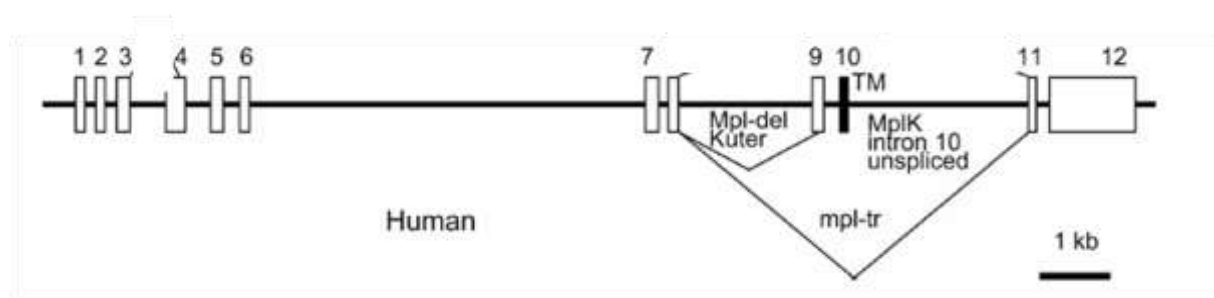


Figure 17 : Représentation schématique du gène *MPL* et des différents épissages possibles (D'après Coers *et al.*, 2004 J Biol Chem.;279(35):36397-404).

La transcription du gène *MPL* est connue pour être régulé positivement ou négativement, en fonction du type cellulaire et donc des partenaires protéiques présents, par des facteurs tels que Aml1 (= Runx1) (Sato *et al.*, 2008 J Biol Chem.). Dans un type cellulaire tel que les mégacaryocytes, exprimant les partenaires p300/CBP, MOZ et Plag2, la fixation du complexe protéique avec Aml1 induira la transcription du gène *MPL* (Kitabayashi *et al.*, 2001 Embo J.; Landrette *et al.*, 2011 Leukemia). Dans d'autres types cellulaires hématopoïétiques, n'exprimant pas Mpl, le partenaire protéique de Aml1 est plutôt mSin3A, qui aura alors un rôle de régulation négative de la transcription (Lutterbach *et al.*, 2000 J Biol Chem).

La transcription du gène *MPL* est également régulée par le micro-ARN miR-28 qui a été décrit comme ayant un effet inhibiteur de la synthèse de protéine Mpl ainsi que de d'autres protéines importantes pour la différenciation des mégacaryocytes (E2F6 et ERK2) (Girardot *et al.*, 2010 Blood).

Le gène *MPL* a pour produit final une protéine de 635 acides aminés. La protéine Mpl est composée d'un peptide signal de 25 acides aminés, d'un domaine extracellulaire de liaison à la Tpo (26-491), d'un domaine transmembranaire (492-513) et d'un domaine intracellulaire contenant deux motifs très conservés : la box1 (528-536) et la box 2 (565-574). La région distale de ce domaine intracellulaire aurait un rôle dans la régulation négative des voies de signalisation induite par la Tpo comme cela a été suggéré par la génération de Mpl tronqués (Sabath *et al.*, 1999 Blood). Le récepteur Mpl n'a pas d'activité kinase intrinsèque mais se lie à des kinases telles que Jak2 et à un moindre degré, la Tyrosine Kinase 2 (Tyk2), via son domaine box1 (Figure 18 page 44).

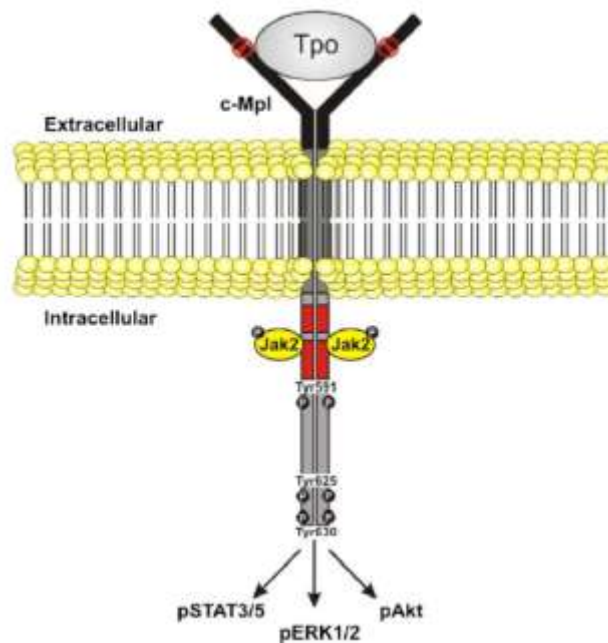


Figure 18 : Représentation schématique du récepteur Mpl dans la membrane plasmique et des domaines important dans la signalisation Tpo (*Geddis AE, 2010 Semin Hematol; 47(3):212-9*). Les domaines box1 et box2 sont représentés en rouge sur le schéma.

La première mise en évidence d'un facteur spécifique stimulant la mégacaryopoïèse et la production de plaquettes a été faite en 1958 (*Kelemen et al., 1958 Act Haematol.*). Ce n'est qu'en 1994 que la Tpo a été mise en évidence par l'isolation et le clonage du gène codant la Tpo (*Bartley et al., 1994 Cell; De Sauvage et al., 1994 Nature; Kuter et al., 1994 Blood; Lok et al., 1994 Nature*).

La protéine Mpl est impliquée dans la régulation de la concentration circulante de la Tpo et dans la régulation, la maturation des mégacaryocytes et dans la production de plaquettes (*Wendling et al., 1994 Nature; De Sauvage et al., 1994 Nature; Banu et al., 1995 Blood; Broudy et al., 1996 Blood*). Les modèles murins Knock-Out (KO) pour le gène codant soit la Tpo, soit Mpl, sont viables mais présentent une réduction d'environ 90% du nombre de plaquettes associé à une réduction du nombre des progéniteurs qui cause une thrombocytémie chez ces souris par rapport aux souris non transgéniques (*De Sauvage et al., 1996 J Exp Med.; Gurney et al., 1994 Science; Alexander et al., 1996 Blood*). Cependant, les mégacaryocytes et les plaquettes produites chez ces souris, en absence de Tpo ou de Mpl, semblent avoir une morphologie et une fonctionnalité normales, indiquant qu'*in vivo*, le principal rôle de la Tpo est le contrôle du nombre de ces cellules et non leur maturation.

En effet, le niveau de Tpo et la stimulation des mégacaryocytes sont finement régulés par un mécanisme de « feedback » qui consiste en la fixation de la Tpo sur le récepteur Mpl, présent dans la circulation sanguine, à la surface des plaquettes. Cette régulation dépend donc directement du nombre de plaquettes circulantes (*Stoffel et al.*, 1996 Blood). En plus de jouer sur la régulation de la production des plaquettes en stimulant les mégacaryocytes, la Tpo semble agir sur le compartiment des cellules souches hématopoïétiques comme le suggèrent les modèles murins Mpl-déficients qui ont une capacité de repopulation des cellules de la moelle osseuse réduite (*Solar et al.*, 1998 Blood; *Kaushansky K.*, 2003 Annals of the New York Academy Sciences).

La production et la régulation de l'expression du récepteur Mpl ne sont pas encore totalement élucidées. Cependant, il a été montré que la protéine Mpl est tout d'abord produite sous une forme immature non glycosylée d'environ 68 KDa dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans le RE, Mpl peut maturer de deux manières différentes :

- Mpl peut être associée à la protéine Jak2 qui va alors permettre le début de la glycosylation (*Tong et al.*, 2006 JBC). Puis, le complexe Mpl/Jak2 va être transporté dans le compartiment Golgien dans lequel Mpl va subir une succession de glycosylations. Dans un premier temps, Mpl est partiellement glycosylée (environ 74 Kda) et n'est pas exprimée à la membrane cellulaire. Puis dans un deuxième temps, Mpl se trouve transportée à la membrane sous une forme mature glycosylée de 84 KDa (*Moliterno et al.*, 1999 Blood; *Royer et al.*, 2005 JBC; *Hitchcock et al.*, 2008 Blood).

- Il existe un second mode de maturation indépendant de Jak2, probablement médié par une autre protéine telle que Tyk2 et qui suivrait le même circuit pour le transport à la membrane (*Tong et al.*, 2006 JBC). Cette forme mature de Mpl sera alors transportée à la membrane cellulaire via des vésicules d'exportation pour former des homodimères de protéines Mpl (= récepteur fonctionnel de la Tpo) (*Hitchcock et al.*, 2008 Blood).

Il est important de noter que le niveau d'expression à la surface des plaquettes est faible avec seulement 25 à 100 récepteurs (*Broudy et al.*, 1997 Blood). Cette faible expression du récepteur Mpl à la surface des cellules peut-être expliquée par la co-expression de la forme Mpl-tr qui semble pouvoir réguler l'expression de celui-ci (*Tiedt et al.*, 2009 Blood).

La stimulation du récepteur Mpl par la Tpo induit la phosphorylation de Jak2 et Tyk2 qui, à leur tour, induiront la phosphorylation de Stat1/3 et 5 (*Bacon et al.*, 1995 Febbs Letter;

Schulze et al., 2000 Exp Hematol.), mais également les voies des MAPK, de la PI3K et PKC (*Miyakawa et al.*, 2001 JBC). L'activation de ces voies de signalisation aboutit à des signaux de survie cellulaire et de prolifération dans les progéniteurs hématopoïétiques et à des signaux de différenciation et de maturation dans les mégacaryocytes (*Matsumura et al.*, 1997 Mol Cell Biol.; *Rouyez et al.*, 1997 Mol Cell Biol.; *Kirito et al.*, 2002 J Biol Chem.; *Geddis et al.*, 2001 J Biol Chem.). Il est critique pour la cellule de réguler la transduction du signal par la Tpo pour éviter toute prolifération anormale. Les protéines Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS), des phosphatases et des régulateurs négatifs tels Lnk et Lyn ont été montrés comme régulant négativement la signalisation induite par la Tpo (*Endo et al.*, 1997 Nature; *Tong et al.*, 2004 J Exp Med.). Cependant, le meilleur moyen pour la cellule de réguler cette réponse à la Tpo est de contrôler le niveau d'expression de Mpl à sa membrane plasmique. Cette régulation de l'expression de Mpl à la surface membranaire est critique pour la régulation du niveau Tpo circulante. Cette régulation se fait par différents modes :

- régulation du niveau de chaînes Mpl transportées à la surface cellulaire par des mécanismes méconnus tels que l'interaction avec l'isoforme Mpl-tr.
- suite à une stimulation par la Tpo, le récepteur va transmettre le signal via les tyrosines kinases Tyk2 et Jak2. Ces signaux de signalisation vont induire la phosphorylation du récepteur Mpl sur les tyrosines 591 et 625 (**Figure 18** page 45) ce qui va, en retour, permettre la reconnaissance de Mpl par des ubiquitine ligases telles que c-Cbl (*Drachman et al.*, 1997 PNAS; *Saur et al.*, 2010 Blood). L'internalisation du récepteur Mpl se fait par l'intermédiaire du complexe protéique AP2 qui reconnaît un site YRRL dans le domaine intracytoplasmique de Mpl. Ce complexe AP2 est également décrit comme jouant un rôle dans la régulation de l'endocytose du récepteur Mpl (*Dahlen et al.*, 2003 Blood; *Hitchcock et al.*, 2008 Blood). Ce complexe fait partie de la famille des adaptateurs à clathrine hétérotétramérique jouant un rôle central dans de nombreuses voies de trafic vésiculaire intracellulaire (*Collins et al.*, 2002 Cell). Puis, deux issues sont possibles :
 - la régulation par recyclage des chaînes Mpl par l'intermédiaire de la tyrosine Y591 ;
 - la dégradation du récepteur par le protéasome et le lysosome, suite à l'ubiquitination des lysines K553 et K573 (*Kaushansky K.*, 2009 J Thromb Haemost.; *Saur et al.*, 2010 Blood).

La Tpo est produite principalement par le foie et par les cellules du microenvironnement médullaire. Il a été montré qu'une augmentation de l'IL-6 pouvait stimuler la production de la Tpo.

Il a été montré que des mutations dans la région 5'UTR ou aux jonctions intron/exon du gène codant la Tpo (*THPO*) peuvent faciliter la transcription de l'ARNm de la Tpo, et ainsi induire l'augmentation de la concentration de Tpo sérique, provoquant ainsi une thrombocytose congénitale (Wiestner *et al.*, 1998 *Nature Genetics*; Ghilardi *et al.*, 1999 *Blood*; Liu *et al.*, 2008 *Haematologica*).

Chez des patients atteints de PV, il a été montré une diminution du nombre de Mpl à la surface des plaquettes ainsi qu'une altération du niveau de glycosylation associée à une diminution de la réponse des plaquettes suite à une stimulation par la Tpo (Moliterno *et al.*, 1998 *NEJM*; Moliterno *et al.*, 1999 *Blood* ; Kralovics *et al.*, 2003a *Blood*). Il est intéressant de noter que la majorité des patients atteints de SMP présentant une diminution de l'expression de Mpl dans les plaquettes a également la mutation V617F (Kralovics *et al.*, 2003a *Blood*; James *et al.*, 2005 *Nature*). Par ailleurs, le niveau d'expression de la forme partiellement glycosylée de Mpl (80 Kda) semble augmenter en fonction de la sévérité de la pathologie (Moliterno *et al.*, 1999 *Blood*). De plus, cette diminution de l'expression de Mpl n'est pas liée à une diminution de l'expression de l'ARNm de MPL (Kralovics *et al.*, 2003a *Blood*), suggérant ainsi que l'altération du niveau d'expression de Mpl se produit en aval de l'étape de transcription. Cependant, chez des patients atteints de TE, Horikawa et coll. ont trouvé une diminution d'expression de MPL aussi bien au niveau protéique qu'au niveau ARNm (Horikawa *et al.*, 1997 *Blood*).

I-4-4 Le récepteur à l'érythropoïétine (EpoR) et l'Epo

Le gène *EPOR* contient 8 exons et est localisé, chez l'homme, sur le chromosome 19p13 (Budarf *et al.*, 1990 *Genomics*). L'EpoR appartient à la superfamille des récepteurs aux cytokines de classe I. La protéine EpoR humaine a un poids moléculaire de 66 KDa (Jones *et al.*, 1990 *Blood*). Rapidement, un lien a été établi entre la phosphorylation de l'EpoR suite à une stimulation par l'Epo et l'activité mitotique de prolifération (Miura *et al.*, 1991 *Mol Cell Biol*). Le récepteur EpoR joue un rôle crucial dans l'érythropoïèse (Krantz S.B., 1991 *Blood*).

L'EpoR est connu pour transduire le signal via la fixation de son ligand Epo sur un homodimère d'EpoR, induisant l'activation de Jak2 (*Lodish et al.*, 1992 Cold Spring Harb Symp Quant Biol.; *Witthuhn et al.*, 1993 Cell; *Livnah et al.*, 1999 Science).

Le gène de l'Epo est localisé sur le chromosome 7q et a pour produit final une cytokine glycoprotéique de 34 KDa (*Law et al.*, 1986 PNAS). L'Epo, produite par les cellules fibroblastiques du cortex rénal chez l'adulte (*Sherwood et al.*, 1986 PNAS), est connue pour être une cytokine stimulatrice spécifique de l'érythropoïèse et de la synthèse d'hémoglobine (*Jacobson et al.*, 1957 Nature; *Jacobs et al.*, 1985 Nature; *Beru et al.*, 1986 Mol Cell Biol; *Krantz SB*, 1991 Blood; *Stopka et al.*, 1998 Blood). L'Epo induit la prolifération (*Watowich et al.*, 1992 Proc Natl Acad Sci USA; *Kirby et al.*, 1996 Proc Natl Acad Sci USA), la différenciation (*Liboi et al.*, 1993 Proc Natl Acad Sci USA; *Penta et Sawyer*, 1995 J Biol Chem) et inhibe l'apoptose (*Kelley et al.*, 1993 Blood) des cellules érythroïdes.

La production d'Epo est finement régulée par un système complexe de protéines Hypoxia Inducible Factor (HIF) α et β capable de détecter les variations de concentration en oxygène. Il est intéressant de noter que l'HGF peut également être régulé ainsi. Le gène codant l'Epo contient des séquences correspondant à des sites de liaisons pour l'Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α) (**Figure 19** page 49). En condition de normoxie, les deux sous-unités HIF sont ubiquitinylées, via les Propyl-Hydroxylases (PHD1 à 3) et le facteur de Von Hippel-Lindau (VHL), et dégradées par le protéasome. Par contre, en condition d'hypoxie, HIF1 α se trouve stabilisé et n'est plus dégradé et peut donc aller se fixer au niveau du gène de l'Epo et ainsi permettre la transcription et la production d'Epo (*Lacombe et al.*, 1998 Haematologica). Dans la circulation sanguine, la concentration en O₂ est comprise entre 4 et 14% alors que dans la moelle osseuse, la concentration en O₂ se situe entre 0.1 et 4%. Dans la moelle osseuse, il s'établit un gradient d'O₂ décroissant entre les sinus vasculaires (environ 4%) et l'endoste (couche de tissu qui tapisse la cavité médullaire des os longs et qui renferme la moelle) qui est très faiblement vascularisé et donc peu oxygéné, voire anoxique (aux alentours de 0.1%).

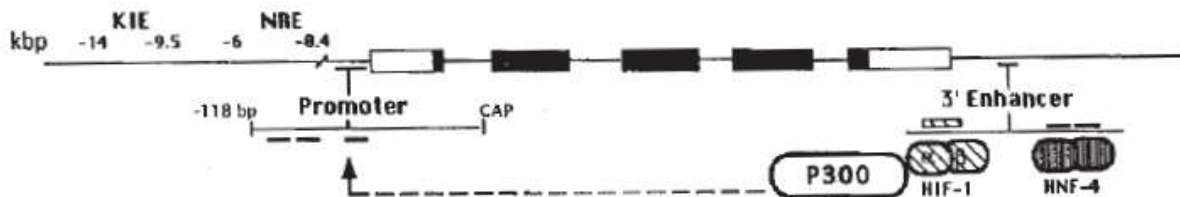


Figure 19 : Représentation schématique du gène *EPO* et des sites régulateurs de la transcription liés à l'hypoxie (Bunn *et al.*, 1996 *Physiol Rev*;76(3):839-85).

Par la suite, des cellules hématopoïétiques et des souris infectées par un virus intégratif, codant pour l'EpoR murin sauvage ou avec une mutation activatrice, ont montré qu'une mutation activatrice ou une surexpression de ce récepteur pouvait provoquer une érythrocytose associée à une splénomégalie (Hino *et al.*, 1991 *Mol Cell Biol* ; Longmore *et al.*, 1992 *Leukemia*) , suggérant un rôle potentiel dans les SMP, notamment dans la PV.

Il a été décrit 2 types d'ARNm chez l'homme issu de la transcription du gène *EPOR* :

- une forme d'ARNm « full length » codant l'EpoR total qui sera exprimé à la membrane plasmique (Maouche *et al.*, 1991 *Blood*; Noguchi *et al.*, 1991 *Blood*) ;
- une forme d'ARNm contenant l'intron 7 non épissé, ce qui abouti à un changement de cadre de lecture qui donnera, après traduction, une protéine EpoR tronquée (Nakamura *et al.*, 1992 *Science* et 1994 *Science*). Cette protéine tronquée possède un domaine cytoplasmique réduit et jouerait un rôle de dominant négatif vis-à-vis de la forme totale d'EpoR, probablement en interférant dans l'homo-dimérisation du récepteur (Chiba *et al.*, 1997 *Blood*).

L'expression de l'EpoR débute à la surface des progéniteurs érythroïdes au stade BFU-E matures. Son expression augmente au cours de la différenciation cellulaire et est maximale aux stades CFU-E et proérythroblaste. Elle diminue ensuite lors des étapes de maturation terminale. Les réticulocytes et les hématies sont dépourvus de sites de fixation spécifique pour l'Epo. Le nombre de récepteurs exprimés à la surface des progéniteurs est faible : environ 1000 récepteurs sur la surface des cellules érythroïdes (Constantinescu *et al.*, 1999 *Trends Endocrinol Metab.*). Ce nombre change selon l'étape de la différenciation érythroïde et est étroitement régulé. La majorité des chaînes EpoR synthétisées est dégradée dans le RE. Seule une faible fraction transite hors du RE et est exprimée à la membrane des cellules, suggérant que l'EpoR pourrait se replier inefficacement dans le RE (Hilton *et al.*, 1995 *PNAS*). Il a été

montré que Jak2, et plus particulièrement son domaine N-terminal, se lie à l'EpoR dans le RE et est essentiel pour son expression sur la membrane cellulaire (*Huang et al.*, 2001 Mol Cell) (**Figure 20**).

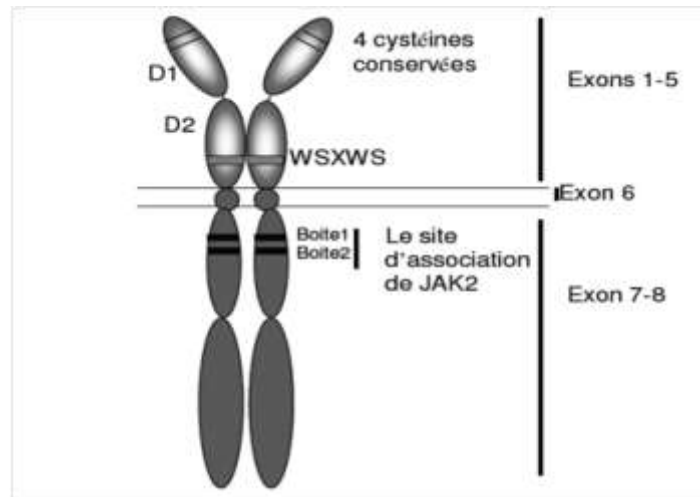


Figure 20 : Représentation schématique de la structure du récepteur à l'érythropoïétine (EpoR). Le domaine extracellulaire contient quatre résidus cystéines, très conservés dans la superfamille des récepteurs aux cytokines de classe I, dans le domaine D1 de liaison à la cytokine Epo et un motif WSXWS dans le domaine D2 qui a pour rôle de permettre la bonne conformation du dimère EpoR (*Hilton DJ et al*, 1996 J Biol Chem.). Ce domaine extracellulaire est codé par les exons 1 à 5 du gène *EPOR*. Le domaine transmembranaire de 21 acides aminés est codé par l'exon 6. Le domaine intracellulaire contient deux sites appelés boîte 1 et 2 qui permettent l'association avec la protéine Jak2. De plus, dans le domaine intracellulaire, on trouve neuf tyrosines qui permettent l'activation du récepteur et de ses effecteurs, ainsi que son internalisation (*Flint-Ashtamker G et al*, 2002 FEBS Let.). Ce domaine intracellulaire est codé par les exons 7 et 8 du gène *EPOR*.

Le récepteur à l'Epo ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, celle-ci est apportée par les protéines capables de se fixer aux domaines Box1 et 2 telles que Jak2 (*Constantinescu et al.*, 2001 Mol Cell) (**Figure 20**). La signalisation Epo-dépendante induit l'activation des voies Stat1, 3 et 5, la voie PI3K et la voie des MAPK qui sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes.

Des études *in vitro* ont montré que les effets de l'Epo durent environ 30 à 60 minutes (*Verdier et al*, 2000 J Biol Chem). La régulation du niveau d'expression de l'EpoR se fait à différent niveau. Comme de nombreux autres récepteurs aux cytokines, l'EpoR possède des lysines dans son domaine intracellulaire, qui, une fois ubiquitylées, permettent de diriger le récepteur

vers le protéasome pour y être dégradé (*Yosha et al*, 2011 Biochem J). L'internalisation et la dégradation d'EpoR sont probablement les mécanismes les plus efficaces pour diminuer l'activation d'EpoR par son effecteur. Les récepteurs activés par l'Epo sont rapidement dégradés après ubiquitination par deux systèmes protéolytiques qui procèdent successivement : le protéasome dégrade une partie du domaine intracellulaire, le reste du récepteur est éliminé dans les lysosomes. L'efficacité de ces processus explique probablement la durée courte de la signalisation intracellulaire activée par l'Epo (*Walrafen P et al*, 2005 Blood).

Chez des patients atteints de PV, il a été montré que l'expression de la forme protéique tronquée de l'EpoR pouvait être fortement réduite, cela induirait un nombre important d'EpoR fonctionnel à la membrane et donc augmenterait la réponse cellulaire à l'Epo (*Chiba et al.*, 1997 Blood). Par contre, il semble que le gène *EPOR* soit intact chez les patients atteints de SMP (*Mittelman et al.*, 1996 Leukemia Research).

Il est intéressant de noter que des mutations congénitales du gène *EPOR* ont été identifiées chez des patients atteints de polyglobulie congénitale ressemblant beaucoup à la PV (*Sokol et al.*, 1995 Blood; *Kralovics et al.*, 1997 Blood). Ces patients présentent une Epo basse et une pousse endogène des BFU-E.

I-5- Génétique des syndromes myéloprolifératifs :

Les premières tentatives de caractérisation génétique des SMP ont utilisé une approche cytogénétique. Dans les années 80, le gène de fusion *BCR/ABL* a été mis en évidence chez des patients atteints de LMC (*Erikson et al.*, 1986). Ce gène de fusion correspond à la translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11) : le chromosome dit de Philadelphie (Phi).

Il est admis que la mutation V617F de *JAK2* n'est pas l'événement primaire des SMP, mais constitue un élément majeur dans l'apparition du phénotype. En effet, la mutation V617F n'est pas présente chez tous les patients atteints de SMP et une seule mutation ne peut expliquer, à elle seule, trois phénotypes distincts (PV, TE et MFP) (*Baxter et al.*, 2005 Lancet; *Lippert et al.*, 2006 Blood; *Theocharides et al.*, 2007 Blood). Cependant, d'autres groupes ont tenté d'expliquer les trois SMP en étudiant l'effet-dose *JAK2*V617F chez l'animal. Les souris exprimant fortement *JAK2*V617F ont plutôt tendance à développer un phénotype de type PV (reproduisant ainsi le cas des patients homozygotes pour V617F) alors que les souris exprimant faiblement *JAK2*V617F développent plutôt une hyper-plaquettose (*Tiedt et al.*, 2008 Blood).

Un modèle de développement des SMP a été proposé en 2005 (*Kralovics et al.*, 2005 NEJM) : une cellule souche hématopoïétique subirait un événement primaire dans un gène non identifié. Cette cellule mutée serait prédisposée à d'autres mutations dont la mutation *JAK2*V617F qui conférerait alors un avantage de prolifération à la cellule (**Figure 21**).

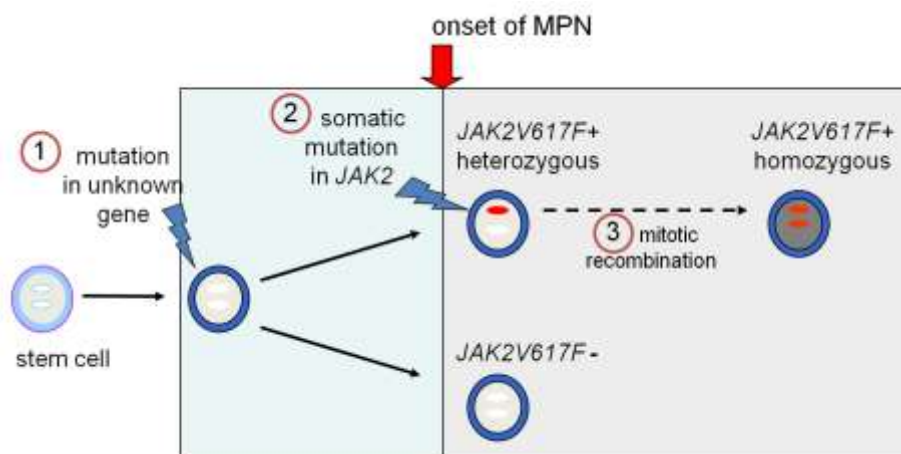


Figure 21 : Modèle de développement d'un SMP (d'après *Kralovics et al.*, 2005 NEJM;352(17):1779-90)

Par la suite, des études sur l'instabilité génétique dans les SMP ont été conduites afin de déterminer l'impact de *JAK2V617F* dans le développement et l'évolution de la pathologie mais également pour trouver d'autres anomalies génétiques pouvant expliquer l'apparition ou l'évolution d'un SMP.

L'impact de la mutation *JAK2V617F* a tout d'abord été étudié dans un modèle cellulaire classique de l'étude de l'effet de *Jak2V617F* : les Ba/F3-EpoR. Cette lignée cellulaire murine exprime de manière stable le récepteur à l'Epo qui est l'un des récepteurs majeurs de l'érythropoïèse. L'utilisation de cellules Ba/F3-EpoR transfectées avec *JAK2V617F* a permis de montrer une augmentation du nombre d'événements de recombinaison homologe associée à des foyers d'accumulation de protéines Rad51, impliquant une augmentation de plus de 50% des échanges de chromatides sœurs (*Plo et al.*, 2008 Blood). Dans cette même étude, des cellules CD34+ de patients atteints de PV et de MFP présentaient une augmentation de l'activité de recombinaison homologe caractérisée par l'augmentation des foyers de Rad51, par rapport aux échantillons témoins.

En 2008, les premiers travaux à l'aide de la technologie des SNP arrays ont été publiés. *Pardanani et coll.* ont été les premiers à mettre en évidence que des particularités génétiques telles que les « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP) pouvaient avoir une influence sur le phénotype des patients atteints de SMP (*Pardanani et al.*, 2008 Blood). Les auteurs ont ainsi montré un lien étroit entre un haplotype de *JAK2* avec la PV. Par la suite, de nombreuses études, à l'aide de la technologie des SNP arrays ont permis de mettre en évidence des remaniements chromosomiques assez fréquents chez les patients atteints de SMP (**Figure 22** page 54) (*Gondek et al.*, 2007 Plos One; *Kawamata et al.*, 2008 Exp Hematol.).

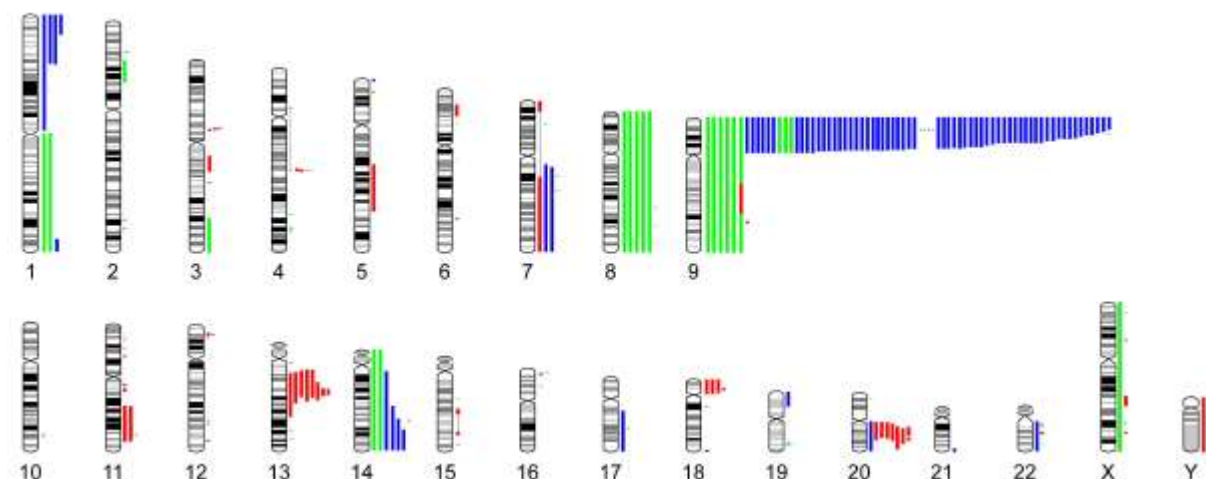


Figure 22 : Représentation karyotypique des différentes anomalies détectées par des analyses de SNP array. Les barres bleues représentent les UPD, les barres vertes les duplications et les barres rouges les délétions (d'après Klampfl et Harutyunyan et al., 2011 Blood;118(1):167-76).

I-5-1 L'haplotype 46/1

Le bloc haplotype 46/1 a une taille d'environ 280 Kb et contient la totalité du gène *JAK2* et deux autres gènes : *INSL6* et *INSL4* (Insulin-like gene) (**Figure 23** page 55). Sa fréquence dans la population générale est d'environ 52% : 6% d'homozygote et 46% d'hétérozygote.

En 2009, l'haplotype 46/1 a été décrit par trois groupes différents comme étant un facteur prédisposant à l'acquisition de la mutation *JAK2*V617F sur le même allèle que l'haplotype 46/1 (Olçaydu et al., 2009 Nature Genetics; Jones et al., 2009 Nature Genetics et Kilpivaara et al., 2009 Nature Genetics). Il est décrit que 85% des patients SMP hétérozygotes pour cet haplotype 46/1 sont porteurs de la mutation *JAK2*V617F sur le même allèle que le 46/1.

Il est connu que la majorité des mutations du gène *JAK2* est retrouvée dans la région dite « GGCC » qui va de l'intron 10 à l'intron 16. Cette région « GGCC » de *JAK2* est caractérisée par quatre polymorphismes introniques : le rs3780367 dans l'intron 10, le rs10974944 dans l'intron 12, le rs12343867 dans l'intron 14, et le rs1159782 dans l'intron 15.

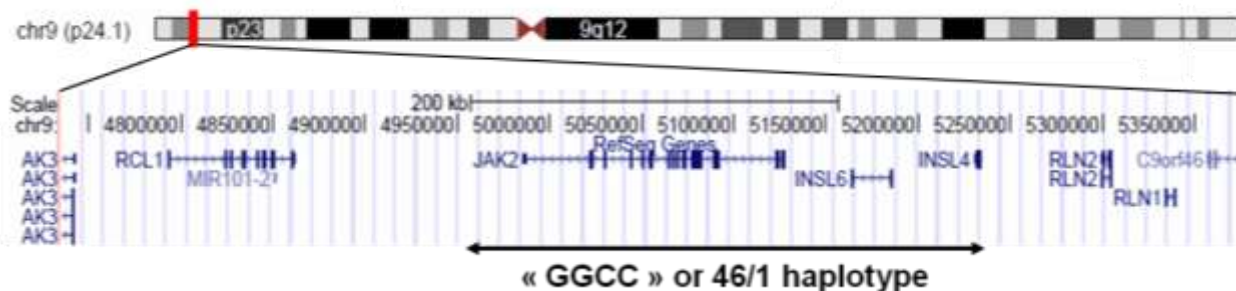


Figure 23 : Représentation schématique du chromosome 9 et zoom sur la zone contenant le gène *JAK2* et l’haplotype 46/1 (D’après le site internet <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

Les gènes *INSL6* et *INSL4* font partie de la superfamille des facteurs de croissances polypeptidiques stimulants des récepteurs membranaires à tyrosine kinase. Ces deux gènes sont décrits comme n’étant pas exprimés dans les cellules hématopoïétiques normales et malignes (Jones *et al.*, 2009 Nature Genetics). Il a été estimé que pour les cas de SMP sporadiques, 50% des risques attribuables à la population de développer un SMP sont liés à l’haplotype 46/1 (Jones *et al.*, 2009 Nature Genetics). Les fréquences de l’haplotype 46/1 et les corrélations cliniques sont résumées dans la **table 2** (page 59).

L’haplotype 46/1 est également associé aux mutations de l’exon 12 du gène *JAK2*, S505N et de l’exon 10 du gène *MPL* chez des patients atteints de SMP (Olcydu *et al.*, 2009 Leukemia; Jones *et al.*, 2010 Blood; Patnaik *et al.*, 2010 Leukemia). Pour le moment, l’association de l’haplotype 46/1 avec les mutations du gène *MPL* reste inexpliquée. L’impact de l’haplotype 46/1 (porté par le chromosome 9p) sur l’acquisition des mutations de *MPL* sur le chromosome 1q ne peut s’expliquer que par un effet indirect.

Deux hypothèses ont alors été émises pour expliquer que l’on retrouve plus souvent la mutation V617F sur l’allèle 46/1 :

- l’hypothèse de l’« hypermutabilité » pour laquelle l’haplotype 46/1 serait génétiquement plus instable que d’autres haplotypes, favorisant ainsi l’acquisition rapide de mutations telles que V617F sur ce même allèle (Olcydu *et al.*, 2009 Nature Genetics) ;
- l’hypothèse du « terrain fertile » pour laquelle les mutations peuvent être acquises à des fréquences équivalentes sur les différents haplotypes. Cependant, l’haplotype 46/1

posséderait un autre facteur génétique qui donnerait un avantage sélectif au clone V617F positif ou favoriserait l'augmentation anormale du nombre de cellules sanguines.

Pour le moment, aucune de ces deux hypothèses n'est favorisée. Pour expliquer l'association de l'haplotype 46/1 avec les mutations de *MPL*, on peut imaginer une différence de prolifération entre les cellules porteuses et non porteuses de l'haplotype 46/1. Récemment, lors du congrès 2012 de l'American Society of Hematology à San Diego (CA, USA), des travaux de l'équipe de Levine R. ont mis en évidence une différence de niveau de transcription entre les deux haplotypes. Il semblerait que l'allèle porteur du 46/1 produirait plus d'ARNm de *JAK2*. Cette différence se situerait dans le promoteur de *JAK2* avec la présence du polymorphisme rs1887428 dans un site de fixation d'un facteur de transcription c-Fos/c-Jun (Schram *et al.*, Abstract 124, Session 634). C-Fos/c-Jun se fixerait préférentiellement sur le promoteur de l'allèle 46/1. Cependant, l'étude de Jones *et coll.* a montré qu'il n'y avait pas de différence du niveau d'expression ou d'épissage alternatif de l'ARNm de *JAK2* chez les patients atteints de SMP et porteurs de l'haplotype 46/1 par rapport à des patients atteints de SMP non porteur de l'haplotype 46/1 ou par rapport à des donneurs sains. Par opposition, une étude publiée en 2006 avait montré que la charge allélique de la mutation V617F de *JAK2* était très similaire entre l'ADN génomique et l'ADNc dans les polynucléaires neutrophiles (PNN) de patients atteints de SMP. Cependant, pour un certain nombre de patients, la charge allélique de V617F est plus importante au niveau de l'ARNm que dans l'ADN génomique dans les PNN (Lippert *et al.*, 2006 Blood).

L'étude de Jones *et coll.* a permis de montrer que les patients porteurs de l'haplotype 46/1 avaient moins de pousse spontanée CFU-GM *in vitro* (Jones *et al.*, 2009 Nature Genetics). De même, Andrikovics *et coll.* ont mis en évidence une influence de l'haplotype 46/1 sur le caryotype observé chez les patients atteints de LAM (Andrikovics *et al.*, 2012 Leukemia). Plusieurs autres travaux ont également montré une survie plus importante pour les patients non porteurs de l'haplotype 46/1 et que la présence de l'haplotype 46/1 est associée à une augmentation du risque de mort par des infections (Tefferi *et al.*, 2010a Leukemia; Tefferi *et al.*, 2010b Leukemia; Nahajevszky *et al.*, 2011 Haematologica).

Dans les cas familiaux de SMP (très rare), la fréquence de l'haplotype 46/1 a également été retrouvée augmentée par rapport à la population générale, cependant, l'haplotype 46/1

n'explique pas le « clustering » des SMP familiaux. En effet, il a été montré qu'il n'y avait pas de différence de la fréquence de l'haplotype 46/1 entre les cas sporadiques et les cas familiaux de SMP (*Olcaydu et al.*, 2010 *Haematologica*).

D'autres études ont également permis de mettre en évidence le lien étroit entre la mutation *JAK2V617F* et l'haplotype 46/1. En effet, des génotypages du gène *JAK2* ont été réalisés sur de l'ADN de cellules de patients atteints de thrombose de la veine Porte et de Syndrome de Budd-Chiari, qui sont, toutes deux, des pathologies pouvant être associées avec un SMP et avec la mutation V617F de *JAK2* (*Smalberg et al.*, 2011 *Blood*; *Kouroupi et al.*, 2011 *Blood*). Ces études ont conclu que l'haplotype 46/1 était associé à la présence de la mutation V617F de *JAK2* mais pas en lien direct avec le développement d'une thrombose digestive profonde. Cependant, les résultats observés par l'étude de Kouroupi et coll. n'ont pas permis d'établir une fréquence significativement augmentée chez les patients *JAK2V617F* positifs atteints de thrombose digestive profonde comparés à ceux qui sont *JAK2V617F* négatifs, au contraire de l'étude de Smalberg et coll.. De plus, dans l'étude de Smalberg et coll., un lien a été établi entre l'haplotype 46/1 et une augmentation de l'hématocrite chez les patients atteints de TP *JAK2V617F*-négatifs. Cependant, cette différence peut s'expliquer par la disproportion importante de taille des cohortes de patients.

Il est intéressant de noter que le polymorphisme rs10758669 a été retrouvé associé à des pathologies présentant une inflammation chronique, notamment dans les maladies inflammatoires de l'intestin (*Ferguson et al.*, 2010 *Muta Research*). Chez les patients atteints de SMP, surtout chez ceux atteints de MFP, des signes d'inflammation chronique sont détectés, par exemple la surexpression de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et le VEGF (*Wickenhauser et al.*, 1999 *Leukemia*; *Le Bousse-Kerdiles and Martyré*, 1999 *Am Hematol.*; *Musolino et al.*, 2002 *Am J Hematol.*; *Panteli et al.*, 2005 *BR J Haematol.*). Ces symptômes inflammatoires ont longtemps été considérés comme étant une conséquence des mutations activatrices de *JAK2* mais récemment, des études cliniques ont montré que les drogues non spécifiques de Jak2 (présentant un effet anti-Jak1), étaient plus efficaces pour réduire les symptômes et les niveaux de cytokines inflammatoires (*Verstovsek et al.*, 2010 *NEJM*). Ceci indique que l'inflammation contribue de manière importante à la pathogénèse des SMP, indépendamment de Jak2, et donc que d'autres cibles moléculaires doivent être étudiées pour trouver la cause de cette inflammation.

Mutation studied	Reference	Disease type (N. of patients)	Mutation frequency	46/1-allele		Clinical correlation
				DNA origin	Frequency	
JAK2V617F	Jones et al. Nat Genet 2009;41(4):446-9	V617F+ PV (n=192) V617F+ ET (n=221) V617F- ET (n=136) V617F+ PMF (n=41) IE (n=76) Unclassified MPN (n=124)	100% 100% 0% 100% 0% 100%	PB	0.54* 0.46* 0.33 0.48* 0.27 0.56*	Less CFU-GM for 46/1 carriers
JAK2V617F	Olçaydu et al. Nat Genet 2009;41(4):450-4	MPN (n=333)	63.9%	Gra	N/A	Not studied
JAK2V617F	Kilpivaara et al. Nat Genet 2009;41(4):455-9	V617F+ MPN (n=245) V617F- MPN (n=74)	100% 0%	Gra	0.50* 0.34	Not studied
JAK2V617F	Colaizzo et al. J Thromb Haemost 2009;8(2):413-6	SVT (n=180)	N/A	N/A	0.30	No association with biological and clinical parameters
JAK2V617F	Pardanan et al. Leukemia 2010;24(1):110-4	V617F+ ET (n=118) V617F- ET (n=108)	100% 0%	BM	0.44* 0.38*	No association with biological and clinical parameters
JAK2V617F	Tefferi et al. Leukemia 2010; 24(1):105-9	V617F+ PMF (n=77) V617F- PMF (n=53)	100% 0%	BM	0.50* 0.36*	Reduced survival for 46/1 non-carriers
JAK2V617F	Tefferi et al. Leukemia 2010; 24(7):1302-9	PV (n=242) ET (n=412) PMF (n=277) V617F+ Post-PV MF (n=36) Post-ET MF (n=24) V617F+ Post-PV AML (n=11) Post-ET AML (n=5) Post-PMF AML (n=28)	N/A N/A N/A 100% N/A 100% 60.0% N/A	BM PB or Gra	22.7% NU* 38.1% NU 35.0% NU 2.8% NU* 29.2% NU 36.4% NU 20.0% NU 32.1% NU	Reduced survival for 46/1 non-carriers with chronic-phase or blast-phase PMF
JAK2V617F	Trifja et al. Ann Hematol 2010; 89(10):979-83	V617F+ MPN (n=107) V617F- MPN (n=42)	100% 0%	PB	0.49 0.32	Not studied
JAK2V617F	Andrikovics et al. Leukemia 2010;24(10):1809-13	MPN (n=312) V617F+ PV (n=153) V617F+ ET (n=78) V617F- ET (n=53) V617F+ PMF (n=20) V617F- PMF (n=8) AML with abnormal karyotype (n=188) with normal karyotype (n=129)	80.4% 100% 100% 0% 100% 0% 0% 0%	N/A	0.46* 0.48* 0.47* 0.33 0.55* 0.44 0.25 0.33	Increased risk of myelofibrosis for 46/1 HM PV patients Increased frequency of normal karyotype for AML 46/1 carriers
JAK2V617F	Guglielmelli et al. Leukemia 2010;24(8):1533-7	V617F+ PMF (n=133) V617F- PMF (n=69)	100% 0%	Gra	0.41* 0.33	No association with biological and clinical parameters
JAK2V617F	Hsiao et al. Leuk Lymphoma 2011;52(3):478-82	V617F+ ET (n=34) V617F- ET (n=27)	100% 0%	PB	0.48* 0.24	Not studied
JAK2V617F	Kouroupi et al. Blood 2011;117(21):5777-8	V617F+ SVT (n=75) V617F- SVT (n=95)	100% 0%	PB	0.27 0.28	Not studied
JAK2V617F	Olçaydu et al. Haematologica 2011;96(3):367-74	V617F+ familial MPN (n=61) V617F- familial MPN (n=27) V617F+ sporadic MPN (n=481) V617F- sporadic MPN (n=202)	100% 0% 100% 0%	Gra	0.48* 0.33 0.46* 0.31	Not studied
JAK2V617F	Rumi et al. Haematologica 2011;96(3):454-8	V617F+ MPN (n=442) V617F- MPN (n=236) V617F+ LPN-MPN (n=11)	100% 0% 100%	T-cells	0.44* N/A 0.41	Increased risk to develop lymphoid neoplasm for MPN patients not linked to 46/1 haplotype
JAK2V617F	Smalberg et al. Blood 2011;117(15):3968-73	SVT (n=199) V617F+ BCS (n=34) V617F- BCS (n=73) V617F+ SVT (n=20) V617F- SVT (n=72)	27.1% 100% 0% 100% 0%	Gra	0.32 0.44* 0.33 0.40 0.24	Increased levels of hemoglobin, hematocrit and red blood cell counts for 46/1 carriers
JAK2V617F	Villani et al. Leukemia Res 2011; [Epub ahead of print]	non MPN SVT (n=56) V617F+ MPN SVT (n=76) V617F- MPN SVT (n=32)	0% 100% 0%	Gra	0.24 0.51* 0.28	Not studied
JAK2V617F	Nahajevsky et al. Haematologica 2011; (this issue)	AML (n=176) AML with normal karyotype (n=81)	N/A N/A	N/A N/A	0.40 46/1 carriers: 58.1%	Increased frequency of myelomonocytic AML for 46/1 carriers Reduced survival and increased risk of death by infection for 46/1 carriers
JAK2 exon 12	Olçaydu et al. Leukemia 2009; 23(10):1924-6	PV (n=44)	100%	N/A	46/1 carriers: 64%	Not studied
JAK2 exon 12	Jones et al. Blood 2010;115 (22):4517-23	MPN (n=69)	100%	N/A	0.39*	
MPL exon 10		MPN (n=176)	W515L (n=110) W515K (n=58) other MPL variants (8)	PB or Gra	N/A	No association with biological and clinical parameters
MPL exon 10	Patnaik et al. Leukemia 2010;24(4):859-60	ET and PMF (n=22)	W515L (n=16) W515K (n=6)	BM	0.25	Not studied
	Spolverini et al. Ann Hematol 2011;90(3):365-6	CML (n=331)	N/A	N/A	0.29	Not studied
	Smith et al. Blood 2011;116(19):3923-32	CMML (n=16)	N/A	BM	0.28	Not studied

Table 2 : Fréquence de l'haplotype 46/1 et corrélations cliniques (Hermouet S. et Vilaine M., 2011 Haematologica;96(11):1575-9).

The mutation frequency is the percentage of patients carrying the mutation. The 46/1 allele frequency is the fraction of 46/1 alleles in total alleles of a cohort: for instance, the 46/1 allele frequency in the general population is 0.24 according to the Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), meaning that 45% of individuals are 46/1 carriers. The 46/1 haplotype is associated with predisposition to several types of disorders: reduced defense against infection, inflammatory disease, and myeloid malignancy including MPN, acute myelomonocytic leukemia, and NK-AML. * Results with p value <0.05. Abbreviations: MPN: myeloproliferative neoplasm; PV: polycythemia vera; ET: essential thrombocythemia; PMF: primary myelofibrosis; IE: idiopathic erythrocytosis; AML: acute myeloid leukemia; V617F+ and V617F-: positive or negative for the JAK2V617F mutation; SVT: splanchic vein thrombosis; post-PV MF: post-PV myelofibrosis; LPN: lymphoid neoplasm; BCS: Budd-Chiari syndrome; CML: chronic myelogenous leukemia; CMML: chronic myelomonocytic leukemia; PB: peripheral blood; Gra: granulocyte; BM: bone marrow; HM: homozygous; NU: nullizygosity; N/A: not available.

I-5-2 Mutations et anomalies génétiques spécifiques des SMP

I-5-2-1 La famille des Janus tyrosine-kinases et les mutations de *JAK2*

La famille des Janus tyrosine-kinases est composée de quatre membres : Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Ce sont de grandes protéines d'environ 1000 acides aminés ayant des poids moléculaires oscillant entre 120 et 130 kDa. Ces protéines sont associées à des récepteurs membranaires dont les récepteurs aux cytokines et se trouvent être essentielles pour les cellules immunitaires et hématopoïétiques. Lors d'une stimulation par une cytokine, les tyrosines kinases sont phosphorylées et activent alors la voie de signalisation en aval, spécifique de la cytokine. La tyrosine kinase Jak2 est la plus étudiée dans les SMP, notamment du fait de son importance dans les cellules myéloïdes.

Les différentes protéines Jak ont généralement des fonctions non-redondantes *in vivo*. Jak1 est abondamment exprimée dans les lymphocytes T et interagit avec des récepteurs aux interleukines et facteurs de croissance tels que ceux de l'IL-2, -4, -6, -11 et -13, du G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor). Jak1 se lie aussi aux récepteurs des trois types d'IFN (*Liu et al.*, 1998 *Curr Opin Immunol*). Jak2 est ubiquitaire et largement exprimée dans les cellules myéloïdes. Elle semble essentielle à la signalisation induite par l'érythropoïétine et la thrombopoïétine mais aussi l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5 et l'IFN γ (*Liu et al.*, 1998 *Curr Opin Immunol*; *O'Shea et al.*, 2002 *Cell*). Jak3 ne se lie qu'aux récepteurs de l'IL-2, -4, -7, -9 et -15 (*Liu et al.*, 1998 *Curr Opin Immunol*). Enfin, Tyk2 est impliquée dans la signalisation reliée aux IFN α/β , à l'IL-6, à l'IL-10 et à l'IL-12 et à la Tpo (*Liu et al.*, 1998 *Curr Opin Immunol*).

Le gène *JAK2* est porté par le bras court du chromosome 9 (Chr.9p23-24) (*Dalal et al.*, 1998 *Blood*). Le gène *JAK2* est composé de 25 exons. Quatre ARNm de tailles différentes ont été décrit chez l'homme : les formes de 7.6 kb, 5.8 kb et 4.8 kb dans tous les tissus et 7.6 kb, 4.8 kb et 3.9 kb dans le muscle et le coeur (*Dalal et al.*, 1998 *Blood*; *Saltzman et al.*, 1998 *Biochem Biophys Res Commun.*). Tous ces ARNm codent une protéine de même taille de 130 KDa.

La protéine Jak2 est exprimée dans les cellules hématopoïétiques, et se retrouve associée aux récepteurs à l'Epo, à la Tpo, au G-CSF et aux récepteurs de la famille IL-6. Trois de ces récepteurs aux cytokines sont importants pour la production des cellules sanguines myéloïdes

matures : les récepteurs de l'érythropoïétine (EpoR), de la thrombopoïétine (TpoR) et du Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSFR). Ces récepteurs utilisent Jak2 pour leur signalisation. Les récepteurs EpoR et TpoR se lient à Jak2 avant d'atteindre la surface cellulaire, Jak2 jouant le rôle de chaperone en stabilisant les formes matures de ces récepteurs à la surface cellulaire (Royer *et al.*, 2005 JBC; Huang *et al.*, 2001 Mol Cell).

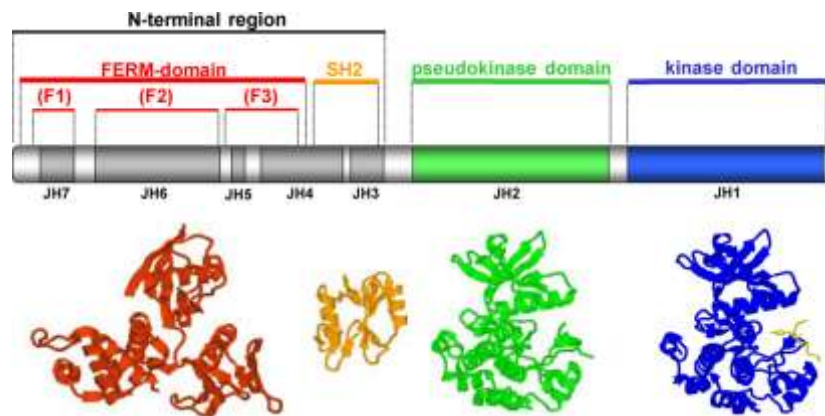


Figure 24 : Représentation schématique et structure 3D des différents domaines caractéristiques des tyrosines kinases de la famille JAK (Haan *et al.*, 2006 Biochemical Pharmacology;72(11):1538-46).

Sept domaines distincts d'homologie (notés JH1 à JH7) entre les différentes protéines Jak ont été identifiés ; ils forment la structure commune des membres de la famille Jak (**Figure 24**). Le domaine JH1 correspond au domaine à activité kinase et se situe à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine Jak ; il est directement suivi par le domaine pseudokinase (JH2). Le domaine JH1 a une activité kinase qui lui permet de phosphoryler de nombreuses protéines impliquées dans diverses voies de signalisation (Leonard et O'Shea, 1998 Annu Rev Immunol). Pour la protéine Jak2, les résidus phosphorylés lors de l'activation de la protéine, suite à une stimulation cytokinique, sont : les Tyr1007 et Tyr1008; la phosphorylation des résidus Tyr637, Tyr813, Tyr868, Tyr966 et Tyr972 potentialise l'activité de Jak2, alors que la phosphorylation des Tyr119, Tyr221, Tyr317 et Tyr913 régule négativement Jak2 (**Figures 25 et 26** pages 62 et 63) (Argetsinger *et al.*, 2004 Mol Cel Biol; Feener *et al.*, 2004 Mol Cel Biol; Matsuda *et al.*, 2004 Biochem. Biophys. Res. Commun; Ishida-Takahashi *et al.*, 2006 Mol Cel Biol; Mazurkiewicz-Munoz *et al.*, 2006 Mol Cel Biol; Robertson *et al.*, 2009 Mol Cel Biol; Argetsinger *et al.*, 2010 Mol Endocrinol). Le domaine JH2 possède un rôle primordial

dans la régulation de l'activité des protéines Jak puisqu'il permet l'inactivation de la protéine (*Saharinen et al.*, 2000 Mol Cell Biol.; *Saharinen et al.*, 2003 Mol Biol Cell.).

En effet, le domaine JH2 de Jak2 a une activité kinase intrinsèque qui lui permet de phosphoryler, en l'absence de stimulation par une cytokine, la Ser523 et la Tyr570 ce qui induit une régulation négative de l'activité kinase de Jak2 (*Ungureanu et al.*, 2011 Nature structural and Molecular Biology).

L'extrémité N-terminale des protéines Jak est composée du domaine FERM (pour 4.1, ezrin, radixin, moesin ; JH4 à JH7) et d'un domaine SH2 (JH3 et JH4). Le domaine FERM est essentiel pour la liaison des protéines Jak à leur récepteur (*Hilkens et al.*, 2001 FEBS Lett; *Zhou et al.*, 2001 Mol Cell). Le domaine SH2, lui, semble avoir une activité de régulation de l'activité kinase mais pas de liaison au récepteur (*O'Shea et al.*, 2002 Cell).

La tyrosine Y913 de Jak2 est un autre exemple de régulation négative de l'activité de Jak2. En effet, la signalisation Epo va induire la phosphorylation du résidu Y913, qui est localisé dans le domaine JH1 de Jak2, et limite l'activité kinase de Jak2 et la signalisation Stat5 qui en découle (*Funakoshi-Tago et al.*, 2008 Cell Signaling). L'autophosphorylation du résidu Y119, dans le domaine FERM de Jak2, induit la dissociation de la protéine avec son récepteur à l'Epo et une dégradation de la kinase (*Funakoshi-Tago et al.*, 2006 EMBO J).

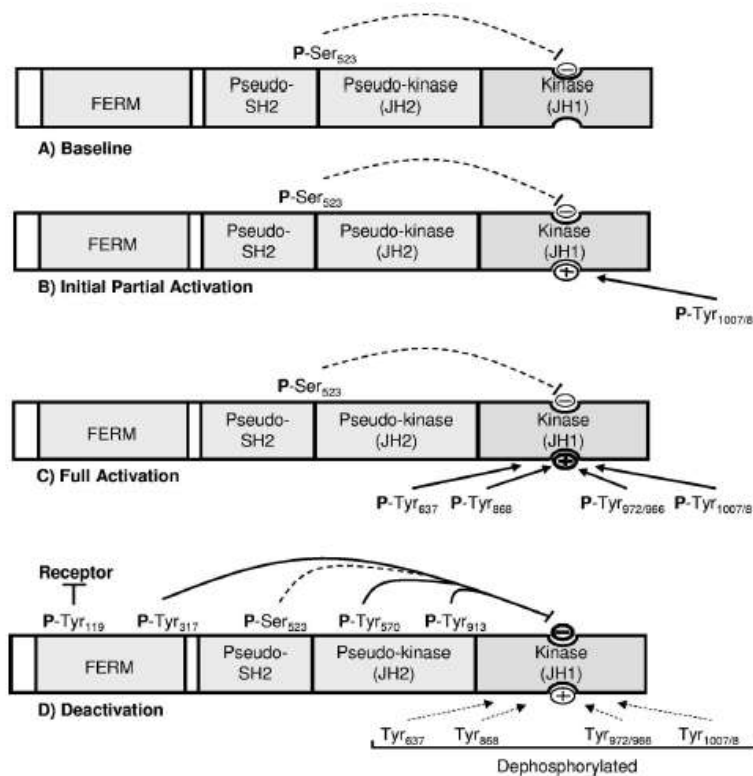


Figure 25 : Modèle de régulation par phosphorylation de l'activité de Jak2 (d'après Robertson *et al.*, 2009 Mol Cel Biol). **(A)** En absence de stimulation, Jak2 est essentiellement non phosphorylée sur la majorité des sites, sauf la Ser523 qui est constitutivement phosphorylée, permettant une régulation négative de base à l'activité du bloc kinase. **(B)** Lors d'une stimulation par une cytokine, les Tyr1007/8 (sites dans la boucle d'activation de Jak2) sont rapidement phosphorylés pour permettre une activation partielle du domaine kinase. **(C)** La phosphorylation des Tyr1007/1008 permet la phosphorylation de sites d'activation additionnels, incluant la Tyr637, comme d'autres sites du domaine kinase, conduisant à l'activation totale de Jak2. **(D)** Après la phase d'activation totale, les sites de phosphorylation sont fortement inhibés par la phosphorylation des Tyr317, Tyr570, Tyr913, et Tyr119 qui, ainsi, limitent l'activité de Jak2, en même temps que les sites d'activation sont déphosphorylés.

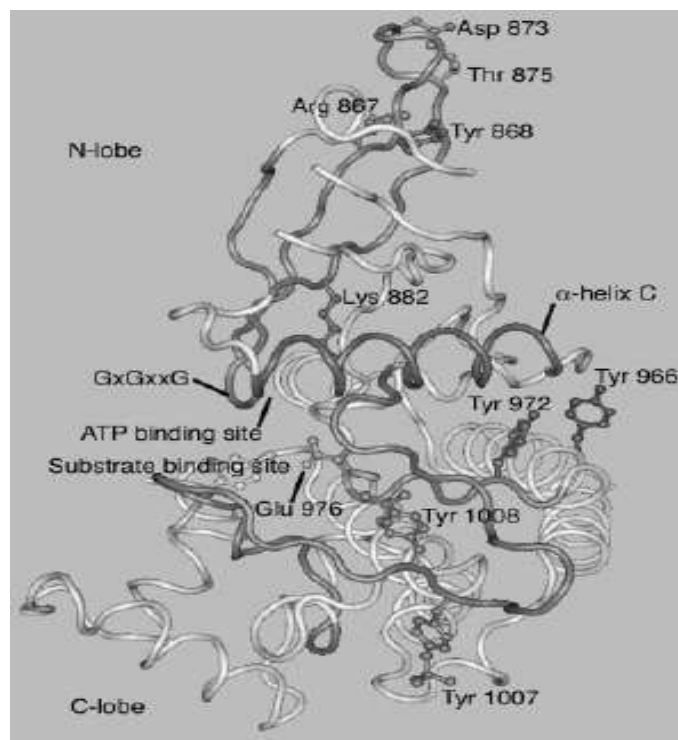


Figure 26 : Structure 3D et positions des différents sites importants pour la régulation de l'activité de la protéine Jak2 [2B7A] (d'après *Argetsinger et al.*, 2010 Mol Endocrinol;24(5):1062-76).

Kralovics et coll. ont montré la présence d'une hématoïèse clonale dans un cas de Polyglobulie de Vaquez familial, suggérant de multiples événements mutationnels pouvant entrer en jeu dans la pathogénèse de la maladie (*Kralovics et al.*, 2003b Blood). En 2005, une mutation de la valine 617 en phénylalanine (V617F) a été identifiée dans le gène codant la protéine Janus Kinase 2 (JAK2) par le groupe de William Vainchenker (*James et al.*, 2005 Nature), confirmée par trois autres groupes (*Kralovics et al.*, 2005 NEJM; *Baxter et al.*, 2005 Lancet; *Levine et al.*, 2005 Cancer Cell). La tyrosine kinase Jak2 entre en jeu dans la signalisation de nombreux récepteurs membranaires cytokiniques. En présence de faible quantité de ligand, la mutation V617F conduit à l'activation constitutive ou, au moins, à une sensibilité accrue des récepteurs aux cytokines dont l'EpoR. Cette cascade de signalisation aboutit à l'activation de nombreux gènes codant notamment des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL, ce qui favorise la survie cellulaire.

Mais, la mutation V617F n'est pas présente chez tous les patients atteints de SMP. En effet, il a été montré que la mutation V617F est détectée dans 95 % des PV et dans 50% des TE et des MFP (*Baxter et al.*, 2005 Lancet ; *Lippert et al.*, 2006 Blood). La mutation JAK2V617F est mise en évidence par différentes techniques telles que la PCR quantitative allèle spécifique

qui permet de définir la charge allélique du patient étudié. La charge allélique correspond au nombre d'allèles mutés présents dans une population cellulaire. Par ailleurs, le pourcentage de charge allélique varie en fonction de la pathologie : > 50% de *JAK2V617F* pour les PV et < 50% de *JAK2V617F* pour les TE et MFP. De plus, le pourcentage de cellules clonales porteuses de *JAK2V617F* est très variable selon les patients et les LAM survenant chez des patients atteints de SMP sont généralement négatives pour *JAK2 V617F* (*Theocharides et al.*, 2007 Blood; *Beer et al.*, 2010a Blood). Ces observations sont en faveur de la survenue tardive de la mutation *JAK2 V617F*.

Il a également été détecté chez certains patients la présence de plusieurs clones porteurs de la mutation *V617F* (*Lambert et al.*, 2009 Blood; *Beer et al.*, 2010b Blood). Dans certains cas de PV et de MFP, Delhommeau et coll. ont montré que l'on peut détecter la mutation *V617F* dans l'ADN de plusieurs classes de lymphocytes, suggérant ainsi qu'un progéniteur commun à la lignée myéloïde et à la lignée lymphoïde est porteur de la mutation *V617F* (*Delhommeau et al.*, 2007 Blood). Chez des patients atteints de SMP familial, la mutation *V617F* peut être détectée avant la déclaration d'un SMP (*Bellanné-Chantelot et al.*, 2008 Leukemia).

D'autres mutations dans le gène *JAK2* ont également été décrites (**Table 3** page 62). Dans environ 50% des cas des PV *JAK2V617F* négatives, on retrouve des mutations acquises (substitution, délétion, insertion ou duplication) dans l'exon 12 de *JAK2*, couvrant une zone allant du nucléotide 1606 au 1641 (*Scott et al.*, 2007 NEJM). La présentation biologique des patients portant ces mutations est un hémocrite élevé (> 61,5%) et une concentration d'Epo faible et le plus souvent, un nombre normal de leucocytes et de plaquettes, pas de splénomégalie.

Des mutations additionnelles à *V617F* ont également été décrites, telles que le double mutant *V617F/L611V* (*Cleyrat et al.*, 2010 Leukemia). Ces doubles mutants sont rares (moins de 3% des patients atteints de PV) et ont une présentation clinique proche des patients porteurs d'une mutation de l'exon 12 de *JAK2*. Des études de signalisation ont montré que le double mutant *L611V/V617F* possède une phosphorylation constitutive plus importante que le mutant *V617F* seul. Un cas de mutations *V617F/C618R* dans le gène *JAK2* chez un chien atteint de polyglobulie a été également identifié (*Beurlet et al.*, 2011 Exp Hematology).

Une étude de Ohnishi et coll., publiée en 2009, a montré le cas d'un épissage alternatif des exons 15 et 16 de *JAK2* dans un cas de syndrome myéloprolifératif néonatal accompagné d'anomalies congénitales (*Ohnishi et al.*, 2009 BJH). Mais, le lien entre ce mutant de *JAK2* et

le SMP n'a pas été établi. Dans une étude au niveau du transcrit JAK2, un ARNm tronqué Δexon 14 a été mis en évidence chez des patients atteints de SMP JAK2V617F positifs et négatifs (Ma et al., 2009 J Mol Diag; Ma et al., 2010 PloS One). Cet ARNm tronqué aboutirait à une protéine Jak2 tronquée de 75 Kda qui pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse des SMP.

De nombreuses autres mutations ont été identifiées dans le gène JAK2 depuis 2009, notamment dans les exons 12 à 19 (Siemiakowska et al., 2010 Leukemia research; Ma et al., 2009 J Mol Diag).

Mutants JAK2	Pathologie	Référence
Exon 12		
H538-K539delinsL	PV	Williams et al, 2007
H538Q/K539L	PV	Scott et al, 2007
K539L	PV	Scott et al, 2007
I540-E543delinsMK	PV	Pietra et al, 2008
R541-E543delinsK	PV	Williams et al, 2007
N542-E543del	PV	Scott et al, 2007
E543-D544del	PV	Wang et al, 2008
Exon 14		
V617F	PV	Baxter et al, 2005; James et al, 2005; Kralovics et al, 2005; Levine et al, 2005; Zhao et al, 2005
L611V	PV	Cleyrat et al, 2010
L611V/V617F	PV	Cleyrat et al, 2010
L611S	LAL-B	Kratz et al, 2006
L611S/V617F	PV	MPN&MPNr-EuroNet
C616Y/V617F	PV	Zhang et al, 2007
V617F/C618R	PV	Yoo et al, 2009
V617F/D620E	PV	Grunebach et al, 2006
D620E	PV	Schnittger et al, 2006
Exon 16		
R683G	LAL-B	Bercovich et al, 2008

Table 3 : Liste non-exhaustive des mutations du gène *JAK2* mises en évidence et publiées chez des patients atteints d'hémopathies.

Les mutations de *JAK2*, aussi bien dans l'exon 12, 14 ou 16 induisent une diminution de l'activité du domaine pseudokinase de Jak2. En effet, il a été observé une diminution de la phosphorylation des résidus Ser523 et Tyr570 dans des modèles de transfections de différents mutants de Jak2, ainsi que dans les plaquettes de patients atteints de PV *JAK2*V617F positifs avec une corrélation entre le niveau de phosphorylation de ces deux résidus régulant l'activité du domaine pseudokinase et le taux de mutant V617F chez ces patients (*Ungureanu et al.*, 2011 *Nature structural and Molecular Biology*).

Des études de la structure moléculaire de Jak2 ont montré que les résidus V617 et E621 de la boucle connectant le lobe N-terminal du domaine pseudokinase avec le résidu C618 entrent en contact avec la boucle d'activation du domaine kinase. Il a été postulé que V617, C618 et d'autres résidus proches pourraient inhiber les mouvements de la boucle d'activation de la conformation inactive à la conformation active, comme le suggère les résultats de signalisation Jak2V617F/EpoR (*Lindauer et al.*, 2001 *Protein Eng*). Ainsi, la présence de la mutation V617F induirait un changement conformationnel du domaine pseudokinase aboutissant à une activation constitutive de la protéine Jak2.

Plusieurs études ont également tenté de déterminer la localisation de Jak2 sauvage et du mutant V617F. Cependant, jusqu'à présent, des résultats contradictoires ont été publiés soit dans le sens d'une localisation nucléaire d'une fraction de Jak2, soit d'une localisation cytoplasmique proche de la membrane plasmique. Par exemple, Dawson et coll. ont conclu en 2009 que Jak2 pouvait être localisée dans le noyau et permettre ainsi la phosphorylation de l'histone H3Y41 (*Dawson et al.*, 2009 *Nature*; *Rinaldi et al.*, 2010 *Blood*). Dans cette étude, la localisation de Jak2 a été déterminée à l'aide d'anticorps fluorescents. Une étude récente réalisée par notre groupe en collaboration avec le laboratoire du docteur B. Wilson (Albuquerque, New Mexico, USA) a permis d'établir clairement que Jak2WT et V617F ont une localisation uniquement cytoplasmique dans les cellules érythroïdes. Il est important de noter que cette étude est la première utilisant des constructions *JAK2* directement couplés à des fluorochromes contrairement aux autres études réalisées avec des anticorps qui peuvent être plus ou moins spécifiques (*Girodon et al.*, 2011 *Blood*).

En 2006, il a été montré que Jak2V617F permet l'entrée en phase G1/S des cellules mutées (*Walz et al.*, 2006 *JBC*). Nakatake et coll. ont montré que Jak2V617F peut également diminuer la réponse de la protéine p53 à la suite de dommage à l'ADN via l'accumulation de

la protéine Mdm2 (*Nakatake et al.*, 2012 Oncogene). En effet, Mdm2 est une Ubiquitine Ligase E3 qui est connue pour se lier à p53 et pour induire sa dégradation protéosomale (*Freedman et al.*, 1999 CMLS).

L'étude de l'impact de la mutation V617F dans des modèles murins n'a pour le moment pas permis d'élucider le problème de redondance de cette mutation dans trois pathologies distinctes. La mutation *JAK2V617F* est associée à un phénotype de PV uniquement lorsque celui-ci est exprimé à un niveau élevé (> 50% d'allèles *JAK2V617F*) alors qu'une proportion non négligeable de patients atteints de PV présentent des taux de mutants inférieurs à 50% d'allèles mutés (*Lacout et al.*, 2006 Blood; *Lippert et al.*, 2006 Blood; *Wernig et al.*, 2006 Blood; *Tiedt et al.*, 2008 Blood). Il est maintenant clairement établi que la mutation V617F est fréquemment associée à d'autres anomalies génétiques et que la mutation V617F de *JAK2* peut survenir plusieurs fois, chez certains patients, dans des clones différents. De plus, il a été démontré que la mutation *JAK2V617F* ne pouvait, à elle seule, expliquer l'expansion des clones mutés (*Nussenzveig et al.*, 2007 Exp Hematol; *Kralovics R.*, 2008 Leukemia; *Lambert et al.*, 2009 Blood; *Schaub et al.*, 2009 Blood; *Cleyrat et al.*, 2010 Leukemia).

Enfin, il semblerait que la fibrose médullaire réactionnelle, qui survient avec l'évolution de la pathologie chez les patients atteints de TE ou de PV, puisse être réduite lorsque le clone *JAK2V617F*-positif est diminué par un traitement cytoréducteur.

I-5-2-2 Le mécanisme de disomie uniparentale

La disomie correspond à la présence de deux copies identiques d'un même chromosome. La disomie uniparentale (UPD) survient entre deux chromosomes homologues lors de la mitose. Le concept de UPD a été décrit pour la première fois dans des cas de méiose aboutissant à des zygotes présentant des séries d'allèles identiques (= fragment de chromosome) par échanges de matériel génétique entre deux chromosomes issus d'un seul parent (*Engel E.*, 1980 J. Genet. Hum; *Niikawa et Kajii*, 1984 Am J Hum Genet). Ce type d'erreur aboutit à une situation proche de celle observée dans les cas de consanguinité avec la présence d'un seul type d'allèle de plusieurs gènes (homozygotie), ce qui augmente le risque de développer une maladie génétique (*Engel E.*, 1980 J. Genet. Hum). La première évidence de ce mécanisme a été faite par l'étude d'un cas clinique d'une patiente présentant une mucoviscidose et une

petite stature. Les auteurs ont alors cherché à comprendre ce phénotype qui combinait ces deux anomalies. L'analyse des marqueurs polymorphiques de l'ADN des parents et de la patiente a révélé la présence de deux copies provenant de la mère sans délétion (*Spence et al.*, 1988 Am J Hum Genet).

La disomie uniparentale (UPD) correspond à une région d'ADN recombinée associée à une perte d'hétérozygotie (Loss of heterozygosity ou LOH). Une UPD est toujours reliée à la présence d'une mutation dans la région recombinée. La UPD survient entre deux chromosomes homologues lors de la mitose et aboutit à la génération de deux cellules filles dont l'une sera homozygote pour la mutation incriminée. La UPD semble être un mécanisme qui aboutit à l'amplification d'une mutation (**Figure 27**).

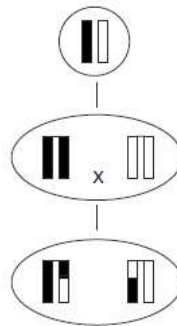


Figure 27 : Modèle de UPD segmentale (*Kotzot D.*, 2001 J Med Genet;38(8):497-507)

En 2002, la Disomie Uniparentale du chromosome 9p a été mise en évidence (*Kralovics et al.*, 2002). La 9pUPD est décrite comme étant facilitée par la présence de la mutation V617F sur le gène *JAK2*. La 9pUPD est caractérisée par une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 9p chez des patients atteints de PV et positifs pour la mutation *JAK2*V617F et donc par l'apparition de cellules homozygotes pour la mutation V617F (**Figure 28** page 69) (*Kralovics et al.*, 2005 NEJM; *Jones et al.*, 2005 Blood). Cette LOH est due à une recombinaison mitotique et non à une délétion d'un fragment du chromosome 9p. La 9pUPD a été détectée dans 68% des cas de PV *JAK2*V617F positive et dans quelques cas de MFP, mais pas dans les cas de TE (*Klampfl et Harutyunyan et al.*, 2011 Blood).

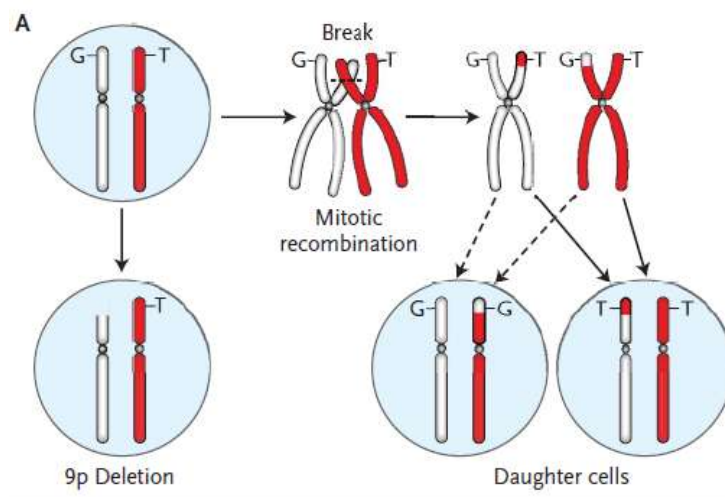


Figure 28 : Représentation schématique des deux mécanismes possibles aboutissant à une mutation homozygote de *JAK2V617F* (Kralovics *et al.*, 2005 NEJM;28;352(17):1779-90).

Des 1pUPD ont également été mises en évidence par des études de SNP array. La majorité de ces 1pUPD est liée à la présence de mutation de *MPL* de type W515L/K (Szpurka *et al.*, 2009 Leukemia; Klampf *et al.*, 2011 Blood). Cependant, certains patients présentent des 1pUPD n'incluant pas le gène *MPL* dans la région recombinée. Pour ces derniers cas, la mutation facilitant la UPD reste à identifier.

D'autres types de UPD ont également été identifiés dans des cas de SMP et sont décrits dans la **table 4**.

Chromosome	Gènes mutés	Références
4q	<i>TET2</i>	<i>Delhommeau et al.</i> , NEJM 2009 ; <i>Jankowska et al.</i> , Blood 2009
7q	<i>EZH2/CUX1</i>	<i>Ernst et al.</i> , Nature Genetics 2010 ; <i>Nikoloski et al.</i> , Nature 2010
9p	<i>JAK2</i>	<i>Kralovics et al.</i> , NEJM 2005
1q	<i>MPL</i>	<i>Szpurka et al.</i> , Leukemia 2009
11q	<i>CBL</i>	<i>Makishima et al.</i> , JCO 2009

Table 4 : Liste des différents types de UPD identifiés dans les SMP avec les gènes cibles identifiés.

Une des pistes possibles pour la compréhension de ce mécanisme pourrait être l'étude des gènes et des protéines du type histone H3 qui ont un rôle important dans la compaction de l'ADN au moment de la mitose. Les plantes sont des organismes connus pour muter très fréquemment. En effet, les mutations sont indispensables à des organismes immobiles pour leur évolution et permettent aux plantes de se protéger des agressions extérieures. Une étude sur des cellules de plantes hybrides a récemment mis en évidence que la perte des histones H3 du centromère précède la disomie uniparentale (*Sanei et al.*, 2011 PNAS). Cette perte d'histone H3 centromérique pourrait être liée soit à une inactivation des histones H3 d'un chromosome, soit à la diminution de la quantité d'histone H3 centromérique sur celui-ci.

I-5-2-3 Mutations de *MPL*

Du fait de son rôle primordial dans la mégacaryopoïèse et dans la maturation des précurseurs précoces, les anomalies du gène *MPL* conduisent à différents types d'hyperplaquettose. Des cas de thrombocytose congénitale ont été associés avec une mutation germinale S505N de *MPL* dans lesquels il a été rapporté que les patients porteurs de la mutation S505N avaient un risque important de développer une splénomégalie et une fibrose médullaire (*Beer et al.*, 2008 Blood; *Liu et al.*, 2009 Haematologica; *Teofili et al.*, 2010 Haematologica). Dans l'étude de Beer et coll., il est intéressant de noter que la mutation S505N a également été retrouvée dans quelques cas sporadiques de TE (*Beer et al.*, 2008 Blood).

Le polymorphisme K39N (Mpl « Baltimore ») de *MPL* a également été relié à des cas de thrombocytose dans la population d'origine africaine (*Molitero et al.*, 2004 PNAS).

Des mutations dans le gène codant *MPL* ont été rapportées chez des patients atteints de TE et de MFP négatifs pour la mutation V617F de *JAK2* (environ 15% des cas) (*Pikman et al.*, 2006 Plos Medicine; *Pardanani et al.*, 2006 Blood). On retrouve la plupart de ces mutations dans l'exon10 (voir **Table 5** page 71).

La mutation la plus fréquemment retrouvée dans l'exon10 de *MPL* est la mutation W515L (67% des mutations), suivie de W515K et W515A (15% des cas) et enfin W515R (3% des cas) (*Pikman et al.*, 2006 Plos Medicine; *Pardanani et al.*, 2006 Blood ; *Chaligné et al.*, 2008 Leukemia; *Schnittger et al.*, 2009 Haematologica; *Pietra et al.*, 2011 Haematologica). Dans cette même étude, un cas de mutation de *MPL* concomitante à une mutation V617F de *JAK2* a

été mis en évidence. De plus, cette étude a permis de mettre pour la première fois en évidence l'existence de double mutants *MPL*. Dans les trois cas répertoriés, les doubles mutations étaient acquises en cis, c'est-à-dire sur le même allèle, et avec des pourcentages similaires suggérant une survenue simultanée : S505C/W515L, V505A/W515L et V505A/W515R.

Jones et coll. ont recherché un haplotype qui pourrait favoriser l'acquisition de mutation sur le gène *MPL*, comme l'haplotype 46/1 avec le gène *JAK2*, cependant, ils n'ont pas pu mettre en évidence un lien entre les haplotypes de *MPL* présents chez les patients et une fréquence augmentée des mutations de *MPL* (Jones et al., 2010 Blood). Comme pour les mutations de *JAK2*, les mutations de *MPL* sont détectées de nombreux types cellulaires hématopoïétiques et dans les cellules souches hématopoïétiques (Chaligné et al., 2007 Blood).

L'étude des mutants W515L et W515K a révélé que ces mutations induisent une activation constitutive des voies de signalisation Jak2/Tyk2/Stat3/5/Erk/MAPK (Pikman et al., 2006 Plos Medicine). Les conséquences, au niveau signalisation, induisent également une activation de la transition entre les phases G1 et S, ce qui implique donc une prolifération cellulaire augmentée (Chaligné et al., 2008 Leukemia). De plus, l'injection de cellules murines Ba/F3 exprimant de manière stable les mutants de Mpl W515K ou W515L ont permis de montrer un effet tumorigène avec une augmentation significative de la taille du foie des souris (Pikman et al., 2006 Plos Medicine ; Chaligné et al., 2008 Leukemia). De plus, le modèle murin W515L présente un tableau phénotypique similaire à une myélofibrose humaine dont une hématopoïèse extra médullaire, une splénomégalie et une prolifération mégacaryocytaire (Pikman et al., 2006 Plos Medicine).

Mutants <i>MPL</i>	Pathologie	Référence
Exon 10		
S505N	Thrombocytose héréditaire	Beer et al. , 2008
W515L	TE et MFP	Pikman et al., 2006
W515K	TE et MFP	Pardanani et al., 2006
W515A	TE et MFP	Chaligné et al., 2008
W515R	TE et MFP	Schnittger et al., 2009

Table 5 : Liste des mutations du gène *MPL* mises en évidence chez des patients atteints de SMP.

D'autres mutations de MPL ont également été détectées chez des patients atteints de SMP mais sont extrêmement rare (*Ma et al.*, 2011 Diag Mol Pathol). Aucune mutations W515 de MPL n'a été identifiée dans les cas familiaux de SMP (*Olcaydu et al.*, 2011 Haematologica).

I-5-3 Mutations non spécifiques des SMP

De nombreuses autres mutations ont été découvertes depuis 2005, mais elles ne sont pas spécifiques des SMP. Ces mutations peuvent influencer sur l'évolution de la maladie.

Un résumé des différents gènes touchés et les principales mutations et conséquences fonctionnelles est présentés dans la **table 6** (page 73) et la **figure 29**.

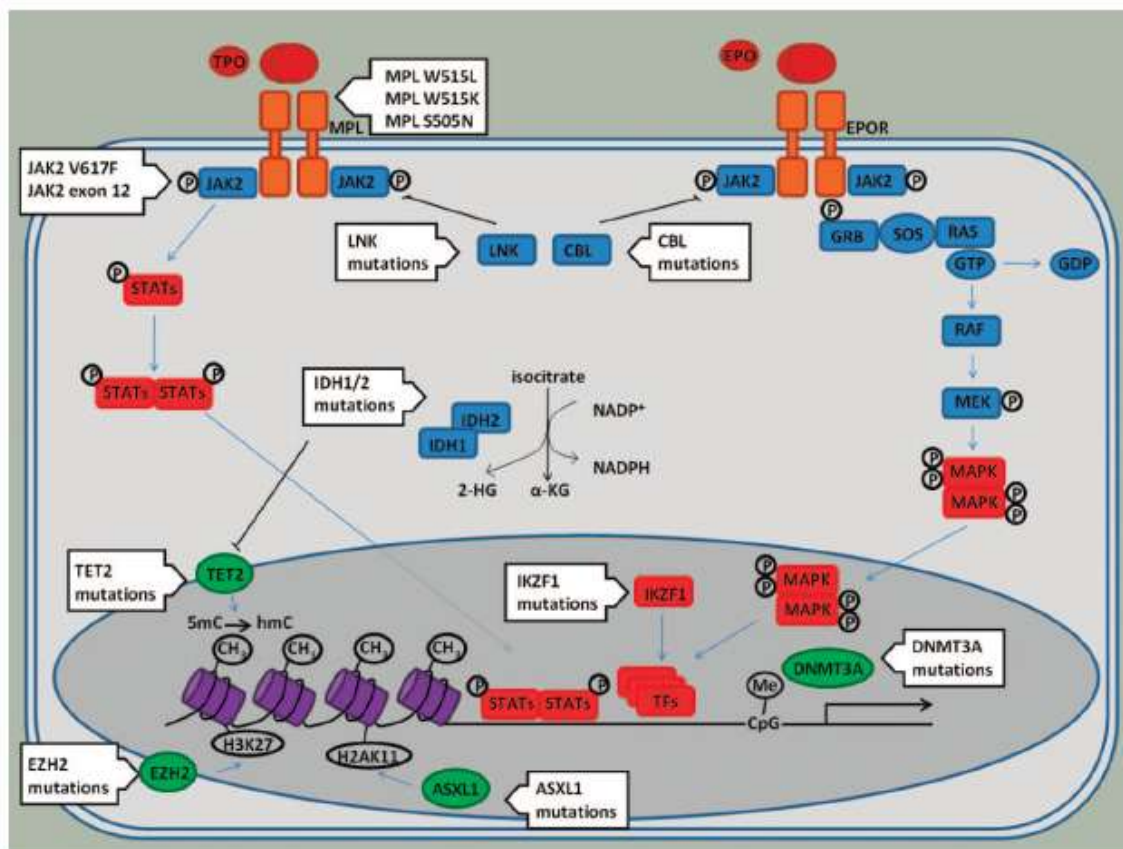


Figure 29 : Représentation schématique de l'effet des différentes mutations détectées chez des patients atteints de SMP (*Cross NC*, 2011 Hematology Am Soc Hematol Educ Program. ; 2011:208-14).

Les différentes mutations semblent impliquées dans une même voie de signalisation générale. Les mutations de MPL (exon 10) et de JAK2 (exon 13 à 15) sont exclusives. Les mutations de MPL sont connues pour activer constitutivement les mêmes voies de signalisation que celles induites par les mutants JAK2. De plus, les mutants *Lnk* (régulateur négatif des signalisations Tpo et Epo) et *Cbl* (impliquée dans l'internalisation de Mpl ou d'EpoR) peuvent également induire les mêmes effets en jouant sur le niveau d'expression de Mpl ou d'EpoR et donc influencer sur le niveau de réponse des cellules mutées pour ces deux gènes. Les autres mutations sont davantage impliquées dans la régulation de l'expression des gènes au niveau épigénétique (mutations de *TET2*, *EZH2*, *IKZF1*, *ASXL1* et *DNMT3A*). Des mutations dans ces gènes peuvent induire une décompaction de l'ADN et donc favoriser la transcription de certains gènes qui peuvent être impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

Gènes	Fonctions physiologiques	Anomalies génétiques	Effets	Pathologies	Références
<i>P53</i>	Contrôle de la copie de l'ADN génomique	Mutations inactivatrices associées parfois à une 17pUPD	Perte de fonction de p53 provoquant une augmentation des erreurs sur l'ADN	Transformation d'un SMP en LAM	<i>Harutyunyan et al., 2011</i>
<i>TET2</i>	hydroxylation des méthylcytosines de l'ADN	des délétions chromosomiques, des mutations non sens	diminution de l'hydroxylation de l'ADN	Dans < 10% des SMP, 20% des MDS, 40% des LMC, 15% des LAM et dans la population générale	<i>Delhommeau et al., 2009</i>
<i>SH2B3</i> (Cbl)	U3 ubiquitine ligase Internalisation Mpl, Kit et Flt3	mutations « missense » dans les exons 8 et 9	perte de fonction U3 ligase avantage prolifératif aux cellules mutées	Rare dans la PV et la TE, 5% des MFP et des LAM post-MFP	<i>Dunbar et al., 2008 ; Grand et al., 2009 ; Makishima et al., 2009</i>
<i>LNK</i>	régulateur négatif de plusieurs récepteurs de cytokine tels que Mpl, EpoR et Kit	délétion, missense et non sens dans les exons 2 et 5	Perte de la fonction de Lnk et donc activation de la voie Jak/Stat et augmentation de la prolifération cellulaire	Rare dans la PV, environ 3% des TE et des MFP et 10% des phases blastiques	<i>Oh et al., 2010</i>
<i>ASXL1</i>	double activité de répression transcriptionnelle et de co-activateur de facteurs de transcription	mutation non sens (STOP) de l'exon 12	Perte de fonction d'Asx11	3% des PV et des TE, 15% des MFP et de LAM post-SMP	<i>Cho et al., 2006</i>
<i>EZH2</i>	méthyl-transférase sur l'histone H3, impliquée dans la compaction de l'ADN	Mutations inactivatrices	Perte de fonction d'Ezh2, diminution de la compaction de l'ADN = augmentation de la transcription	Rare dans la PV et la TE, 5% des PMF	<i>Ernst et al., 2010</i>
<i>IDH1</i> et <i>IDH2</i>	« NADP+ dépendent isocitrate dehydrogenases »	exon 2 d' <i>IDH1</i> et exon 4 de l' <i>IDH2</i>	contribue à la progression leucémique	LAM, MDS 0.8% des TE, 1.9% des PV, 4% des MFP et dans 8 à 31% des SMP en phase blastique	<i>Abdel-Wahab et al., 2010 ; Green et Beer et al., 2010 ; Pardadani et al., 2010 ; Tefferi et al., 2010</i>
<i>DnMT3A</i>	transfert d'un groupement méthyl sur des cytosines de l'ADN et contribue ainsi aux mécanismes de « gene silencing »	Mutations inactivatrices	Altération de la méthylation de l'ADN et donc effet sur l'expression de certains gènes	14 à 20% des cas de LAM, 3 à 5% des cas de MDS, 6% des MFP et 3% des PV	<i>Ley et al., 2010 ; Yan et al., 2010 ; Ewalt et al., 2011 ; Walter et al., 2011</i>
<i>IKZF1</i> (Ikaros)	Facteur de transcription via le remodelage de la chromatine	Délétion du gène	Favorise l'instabilité génomique	21% des cas de LAM post-SMP	<i>Jäger et al, 2010</i>

Table 6 : Autres anomalies génétiques détectées chez des patients atteints de SMP.

I-6- Signalisation intracellulaire dans les SMP :

L'étude des voies de signalisation intracellulaire s'est avérée cruciale pour la compréhension des SMP. En effet, la prolifération clonale anormale des cellules myéloïdes chez ces patients a très vite suggéré une possible dérégulation d'une ou plusieurs voies de signalisation impliquée dans la prolifération. La difficulté était de déterminer la ou les voies touchées et quel(s) élément(s) provoque(nt) cette dérégulation. En 2005, la découverte d'une mutation G1849T (V617F) dans le gène codant pour la protéine à tyrosine kinase Jak2 est venue révolutionner la compréhension des SMP. Par la suite, d'autres mutations ont pu être mises en évidence dans les gènes *JAK2* et *MPL*.

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence une activité différentielle entre les mutants de Jak2 et les mutants de Mpl vis à vis de leur forme sauvage. Pour cela, plusieurs approches ont été utilisées : des infections virales de lignées cellulaires, des transfections transitoires et l'étude de cellules de patients atteints de SMP.

Suite à la découverte de la mutation *JAK2V617F* en 2005, des études sur les cellules des patients et des études d'expression du mutant Jak2V617F dans des lignées cellulaires ont été réalisées. Certaines lignées cellulaires présentent la mutation *JAK2V617F* : la lignée HEL qui présente plus de 8 copies de *JAK2V617F*, les lignées UKE-1, MUTZ-8 et MB-02 qui sont homozygotes pour *JAK2V617F* et la lignée SET-2 qui est hétérozygote (*Fiedler et al.*, 2000 American Cancer Society; *Quentmeier et al.*, 2006 Leukemia). Ces études ont permis de montrer que la mutation V617F induit une phosphorylation constitutive de Jak2 et donc, apparemment, une stimulation basale importante des voies de signalisation dépendantes de Jak2. Cependant, le degré d'activation de la protéine Jak2 induit par la mutation V617F reste à déterminer : certains groupes parlent d'une sensibilité accrue aux stimulations cytokiniques. En effet, celui-ci dépend des acides-aminés qui se trouvent phosphorylés par la mutation V617F. Des études *in silico* ont été menées afin d'évaluer l'effet des mutations de Jak2. Ces études ont permis de montrer que la mutation V617F, qui se situe dans le domaine pseudo-kinase, interférait dans l'efficacité d'interaction avec le domaine kinase de Jak2 (*Lee et al.*, 2009 BMC Structural Biology; *Gnanasambandan et al.*, 2010 Biochemistry).

Les voies de signalisation majoritairement activées par Jak2, suite à une stimulation cytokinique, sont les Stat3/Stat5, PI3K/Akt et la voie des MAPK aboutissant ainsi à une augmentation de la synthèse protéique, de la prolifération et de la survie des cellules (**Figure 30** page 75).

Il a également été montré que la signalisation induites par Jak2V617F pouvait être contrebalancée par l'action des protéines Socs3 (Haan *et al.*, 2009 Oncogene). Il existe un équilibre entre l'activation par Jak2 et la régulation négative par Socs3 qui serait rompu chez les patients atteints de SMP. Ainsi, les niveaux d'expression de Jak2V617F et de Socs3 pourraient être importants. En effet, chez certains patients, un faible niveau d'expression de Jak2V617F pourrait être contrebalancé par une forte expression de Socs3.

Les voies de signalisation majoritairement induites par Mpl sont les voies Jak2/1 et Tyk2, Stat1, Stat3 et Stat5, PI3K/Akt et la voie des MAPK (Pikman *et al.*, 2006 Plos Medecine).

Toutes ces voies de signalisation sont activées de manière basale en présence des protéines Jak2V617F ou Mpl W515K/L/A.

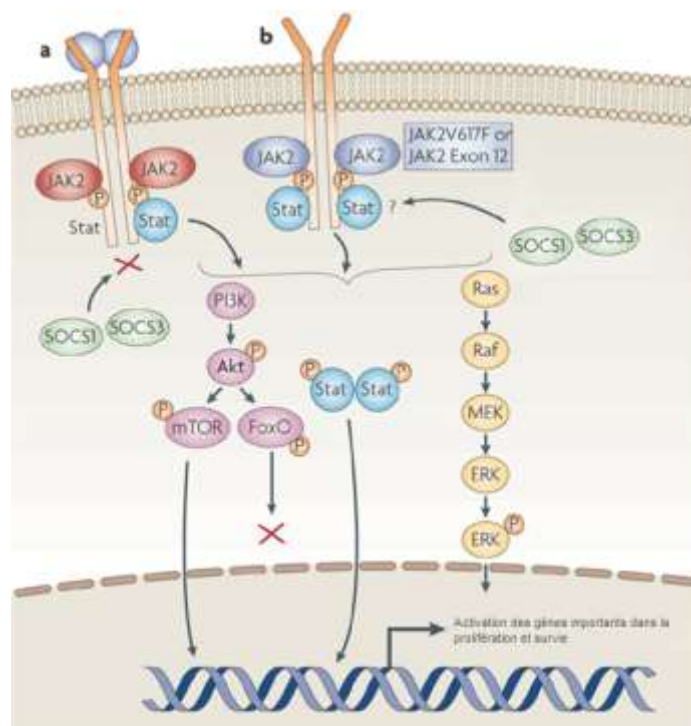


Figure 30 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation induite par Jak2 et Mpl (Pikman Y. et Levine R., 2007 Curr Opin Oncol;19(6):628-34).

Il a été montré que les précurseurs érythroïdes de patients atteints de PV présentent une augmentation de la résistance à l'apoptose et une prolifération accrue liées à une activation des voies de signalisation RAS et PI3K (Laubach *et al.*, 2009 Exp Hematol).

Les récepteurs majoritairement impliqués dans le développement des SMP semblent être l'EpoR, Mpl et le G-CSFR de par leurs rôles critiques dans l'hématopoïèse et plus particulièrement dans l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse. En effet, en 2005, peu de temps

après la découverte de la mutation V617F de *JAK2*, il a été montré que les récepteurs homo-dimériques de type I (EpoR, Mpl et G-CSFR) sont nécessaires pour induire la transformation des cellules par Jak2V617F (Lu *et al.*, 2005 PNAS). Cependant, Pradhan et coll. ont montrés que la protéine Jak2V617F a la capacité de se lier à des récepteurs hétéro-dimériques tels que l'IL27R α ou l'IL3R α dans des cellules murines Ba/F3. De plus, il est connu que ces cellules Ba/F3 n'expriment pas la chaîne gp130 qui se lie normalement à l'IL27R α pour former le récepteur de haute affinité fonctionnel. Ces résultats semblent donc indiquer qu'en absence de récepteur EpoR ou Mpl, Jak2V617F a la capacité à s'associer à d'autres récepteurs aux cytokines, même de basse affinité, et induire une homo-dimérisation du récepteur qui permettrait une transformation des cellules via les voies de signalisation Stat1/5 et Erk1/2 (Pradhan *et al.*, 2007 PNAS; Pradhan *et al.*, 2010 JBC) (**Figure 31**).

Il est intéressant de noter qu'une homo- ou une hétéro-dimérisation forcée de certains récepteurs, et notamment de la chaîne gp130, peut induire une signalisation constitutive en absence de ligand et une prolifération indépendante des cytokines (Suthaus *et al.*, 2010 Mol Cell Biol).

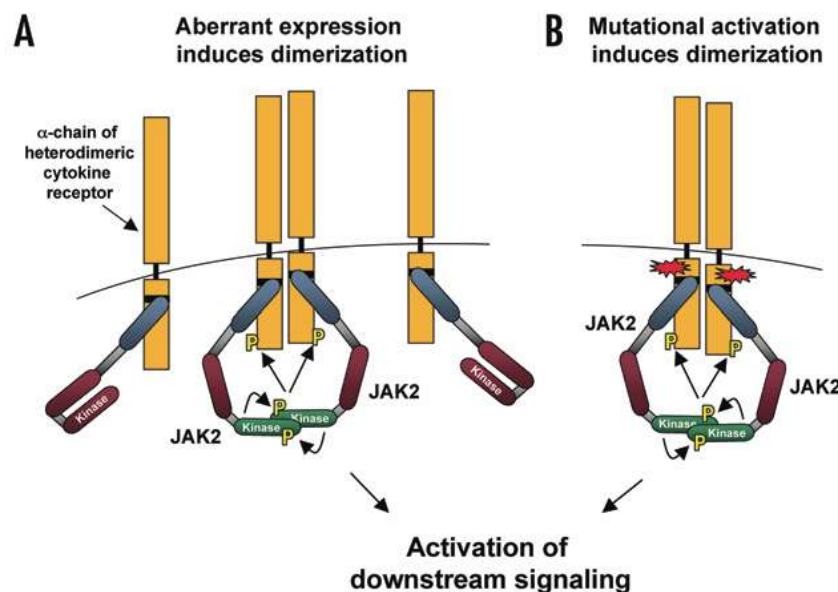


Figure 31 : Hypothèses pouvant expliquer l'effet de transformation cellulaire par Jak2V617F en l'absence de récepteur homo-dimérique (Reuther G.W., 2008 Cell Cycle;7(6):714-9). **A :** Une expression aberrante des chaînes de récepteur hétéro-dimérique pourrait induire une homo-dimérisation et la signalisation anormale de Jak2V617F. **B :** La présence de Jak2V617F pourrait induire une homo-dimérisation spontanée des chaînes de récepteur homo-dimérique résultant en une signalisation aberrante indépendante des cytokines.

PROJET DE RECHERCHE

II- Présentation du projet de recherche

Contexte scientifique

Les SMP sont des maladies rares mais leur originalité rend leur étude primordiale. En effet, l'évolution lente des SMP, l'acquisition de nombreuses mutations et la possibilité d'étudier leur transformation en leucémie myéloïde aigüe en font un modèle très intéressant d'étude du développement des cancers.

Comme nous l'avons vu tout au long de l'introduction de ce travail, les dérégulations conduisant au développement d'un SMP, ou tout du moins favorisant son développement, sont multiples. Il a été observé, à la fois, une importante dérégulation de nombreuses cytokines liées à l'inflammation, de l'expression de certains récepteurs tels que Mpl et une forte pression de sélection des clones malins aboutissant à de multiples anomalies génétiques (mutations, délétion, duplication de fragment chromosomique...). Cependant, ces éléments ne sont pas forcément tous présents chez les tous patients atteints de SMP.

Les niveaux élevés de cytokines sont considérés comme une conséquence de la prolifération anormale de certaines cellules hématopoïétiques, favorisant ainsi l'expansion du clone malin.

De même, **la dérégulation du niveau d'expression de Mpl à la surface des plaquettes de patients atteints de SMP est considérée comme étant une conséquence de la présence de la mutation V617F de JAK2.** L'hypothèse alors émise était que Jak2V617F ne pouvait pas correctement interagir avec Mpl et induisait ainsi la dégradation de Mpl. Cependant, cette hypothèse n'a jamais réellement été vérifiée.

Au niveau de l'hématopoïèse, trois types de récepteurs semblent critiques pour les trois lignées majoritairement impliquées dans les SMP (les granulocytes, les érythrocytes et les mégacaryocytes) : le récepteur au G-CSF (G-CSFR), le récepteur à l'Epo (EpoR) et le récepteur à la Tpo (TpoR ou Mpl) respectivement. Il apparaît clair que la dérégulation de leur expression ou des protéines de signalisation peut induire une prolifération anormale de certains progéniteurs hématopoïétiques. Une prolifération anormale et rapide pourrait alors augmenter le risque de mutation(s) ou d'anomalie(s) génétique(s). L'acquisition de

mutation(s) pourrait alors être suivie par la sélection d'un ou de plusieurs clones hyper-prolifératif ou hyper-résistant à la mort cellulaire.

L'objectif de ce travail de thèse a été de mieux comprendre le rôle du couple Mpl / Jak2 dans les SMP. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord intéressés à caractériser une cohorte de patients atteints de PV pour l'haplotype 46/1 et essayer de déterminer des possibles conséquences de la présence de cet haplotype sur l'expression de JAK2 au niveau ARNm.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de Mpl dans les SMP. Comme nous l'avons vu précédemment, Jak2 est fortement impliquée dans les mécanismes de production, de glycosylation, d'expression membranaire et de dégradation de Mpl. Nous avons donc cherché à mieux comprendre le lien entre la dérégulation de l'expression de Jak2, avec ou sans la mutation V617F, et le faible niveau d'expression de Mpl. Enfin, nous avons cherché à déterminer le rôle de certaines cytokines inflammatoires telles que l'IL-11 et l'HGF et le lien éventuel avec la présence de Jak2V617F.

Projet 1 : Etude de l'expression de l'ARNm de *JAK2* dans la Polyglobulie de Vaquez.

Nous avons vu dans l'introduction que l'haplotype 46/1 consiste en un allèle prédisposant à l'acquisition de mutation de *MPL* et de *JAK2* sur le même allèle que le 46/1 (Article 3, Editorial, page 150). La fréquence de l'haplotype 46/1 se retrouve augmentée dans les cas de SMP positifs pour *JAK2V617F*.

Deux hypothèses ont alors été données pour tenter d'expliquer cette observation :

- l'hypothèse de l'« hypermutabilité » pour laquelle l'haplotype 46/1 serait génétiquement plus instable que d'autres haplotypes, favorisant ainsi l'acquisition rapide de mutations de *JAK2* telles que V617F sur ce même allèle (*Olcaýdu et al.*, 2009 Nature Genetics) ;
- l'hypothèse du « terrain fertile » pour laquelle les mutations peuvent être acquises à des fréquences équivalentes sur les différents haplotypes. Cependant, l'haplotype 46/1 posséderait un autre facteur génétique qui donnerait un avantage sélectif au clone V617F positif ou favoriserait l'augmentation anormale du nombre de cellules sanguines.

Dans la PV, il est connu que la charge allélique de *JAK2V617F* est modifiée de manière importante par la présence de 9pUPD qui aboutit à la formation d'un clone homozygote pour la mutation. De ce fait, l'augmentation de la fréquence de l'haplotype 46/1 peut être due, de la même manière, au mécanisme de 9pUPD.

Le récepteur Mpl est l'un des récepteurs aux cytokines les mieux caractérisés dans les SMP. En effet, depuis 1998, il est connu que les patients atteints de SMP expriment des niveaux faibles de Mpl (*Moliterno et al.*, 1998 NEJM). Ce niveau d'expression de Mpl semble être lié à la présence de la protéine Jak2V617F. Cependant, tous les patients ne présentent pas la mutation V617F. L'importance du couple Mpl/Jak2 dans les SMP et de manière plus générale, dans l'hématopoïèse, a poussé notre équipe à s'intéresser à leur devenir chez les patients.

Nous avons étudié une cohorte de 36 patients atteints de PV afin de déterminer la fréquence congénitale de l'haplotype 46/1 et les conséquences au niveau de la production de l'ARNm de *JAK2* suite aux recombinaisons de type 9pUPD. Cette étude nous a permis de décrire deux cas présentant une recombinaison homologue du gène *JAK2* avant l'acquisition de la mutation V617F (Article 1, page 94). De plus, cette étude nous a permis de mettre en évidence la variabilité d'expression d'ARNm de *JAK2* dans la PV, d'étudier des causes de cette dérégulation et d'établir une conséquence liée à l'expression de l'ARNm de *JAK2* sur le niveau d'expression de Mpl (Article 2, page 109). Par la suite, nous avons également essayé de déterminer les mécanismes permettant d'expliquer la diminution d'expression de Mpl dans les SMP par des études *in vitro* (Article 4, page 156).

Projet 2 : Etude fonctionnelle de Mpl et rôle des cytokines inflammatoires dans les SMP

Nous nous sommes intéressés au cas d'une famille nantaise présentant une hyperplaquettose chronique bénigne sans phénotype de SMP. Cependant, une mutation T1588C de l'exon 10 (W515R) de *MPL* a été identifiée. Cette mutation a, pour le moment, toujours été détectée dans un contexte de SMP (TE ou MFP). De plus, d'autres mutations de Mpl touchant le même

résidu W515A/K et L ont été détectées dans des cas de TE ou de MFP. Nous avons donc cherché à explorer et décrire les caractéristiques clinico-biologiques des patients et à explorer les conséquences fonctionnelles *in vitro* de cette mutation afin de mieux comprendre pourquoi ces patients n'ont pas développé de SMP (Article 5, page 183).

Nous avons également étudié le rôle des cytokines dans la pathogénèse des SMP. A ce jour, leur production et leur importance dans l'évolution de la pathologie ne sont pas encore totalement comprises. Il est évident que la production importante de cytokines inflammatoires favorise à la fois l'hématopoïèse et donc la croissance du clone malin mais également la survie des cellules malignes par un effet anti-apoptotique de certaines cytokines telles que l'IL-6. Notre groupe a recherché l'existence d'une boucle autocrine de cytokines capables de stimuler les érythroblastes de patients atteints de PV de manière indépendante à la mutation V617F de *JAK2*. Plusieurs cytokines liées à l'hypoxie et à l'inflammation ont été ainsi identifiées (Article 6, page 205).

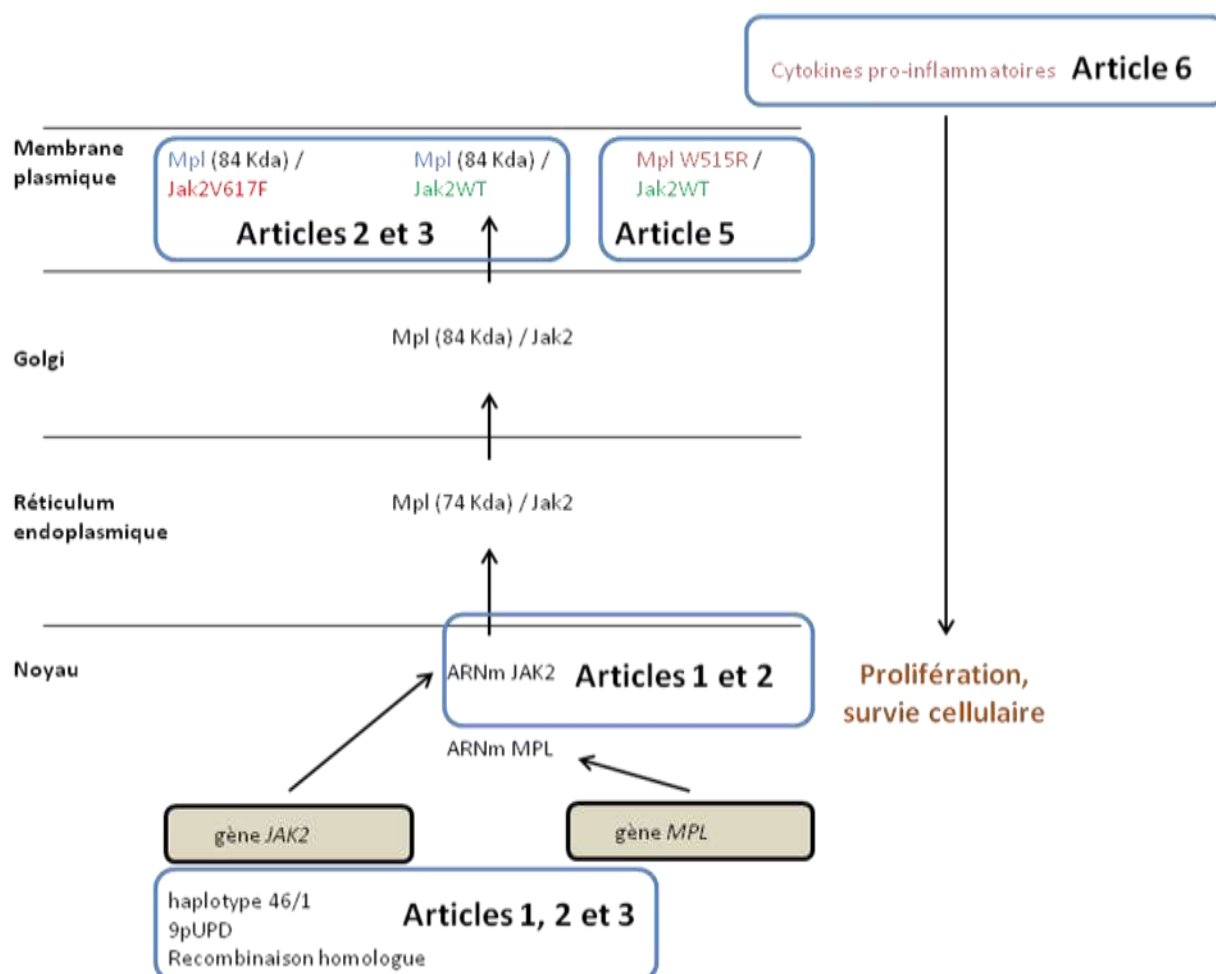


Figure 32 : Représentation schématique des différents axes d'étude du projet de recherche.

METHODOLOGIE

III- Matériels et méthodes

III-1 Echantillons de patients

Les patients inclus dans ces travaux ont tous été diagnostiqués à l'aide des critères 2008 de l'organisation mondiale de la santé (Tefferi *et al.*, 2009 Cancer;115(17):3842-7). Les consentements informés des patients ont été obtenus en accord avec la déclaration d'Helsinki.

III-2 Techniques de culture cellulaire et séparation des cellules

III-2-1 Cultures cellulaires

Les lignées cellulaires HEL (cellules érythroïdes leucémiques), UKE-1 (Leucémie myéloïde aigüe, dérivée d'une TE), K562 (cellules humaines lymphoblastiques dérivées d'une leucémie myéloïde chronique), TF-1 (érythroblastes humains, issus de leucémie érythroïde), Ba/F3-EpoR (Lymphome à cellules pro-B murin) et HepG2 (Hépatocarcinome humain) ont été utilisées pour ce travail. Les lignées cellulaires HEL et UKE-1 sont décrites comme étant des lignées homozygotes pour JAK2V617F (8/9 copies de JAK2V617F pour HEL et 2 copies pour UKE-1). La lignée K562 est connue pour exprimer la protéine de fusion Bcr-Abl caractéristique de la LMC et du Jak2 sauvage. La lignée TF-1 exprime la forme sauvage de Jak2. Ces lignées ont été utilisées pour étudier l'expression de Mpl en fonction de la présence ou non de Jak2V617F.

La lignée Ba/F3-EpoR est une lignée murine exprimant de manière stable le récepteur de l'Epo. Cette lignée exprime la forme sauvage de Jak2.

La lignée HEL est cultivée dans du milieu RPMI 1640 (31870, Gibco, Life Technologies, Frederick, MD, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (A15-101, PAA, Laboratories GmbH, Autriche), 1% de Pénicilline-Streptomycine (15140, Gibco, Life Technologies, Frederick, MD, USA) et 1% de L-glutamine 200mM (25030, Gibco, Life Technologies, Frederick, MD, USA).

La lignée UKE-1 est cultivée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 10% de sérum de cheval de Nouvelle Zélande (16050, Gibco, Life Technologies, Frederick, MD, USA) 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de L-glutamine et 1 μ M d'hydrocortisone.

La lignée K562 est cultivée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 1% de Pénicilline-Streptomycine.

La lignée Ba/F3-EpoR est cultivée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de L-glutamine et 1U/mL d'Epo.

La lignée TF-1 est cultivée dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 1% de Pénicilline-Streptomycine, 1% de L-glutamine et 2ng/mL de GM-CSF (Human recombinant GM-CSF, 300-03, Peprotech EC, London, Royaume Uni).

La lignée HepG2 est cultivée dans du milieu DMEM-Glutamax supplémenté avec 10% de SVF, 1% de Pénicilline-Streptomycine.

Toutes ces lignées cellulaires sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂.

III-2-2 Transfections transitoires

Les cellules HepG2 ont été transfectées à l'aide d'un agent polycationique appelé Polyéthylèneimine (PEI) (24765, Polysciences Inc., PA, USA) permettant l'entrée de l'ADN plasmidique dans la cellule et son relargage par lyse des endosomes. Trois millions de cellules ont été ensemencés dans des plaques 6 puits (353046, Dominique Dutscher SAS, France). Les solutions de transfection sont préparées en deux étapes :

- préparation d'une solution d'ADN plasmidique (12 ou 25µg) repris dans 500µL de NaCl 150mM ;
- préparation d'une solution PEI (solution stock à 1mg/mL) : 100µL de PEI dans 400µL de NaCl 150mM.

Les deux solutions sont alors mélangées, vortexées pendant 10 secondes puis incubées 10 minutes à température ambiante. La solution est alors ajoutée dans le puit correspondant. Les cellules sont incubées pendant 24h avec le mélange PEI/ADN à 37°C. Les cellules sont alors lavées deux fois avec 4mL de PBS1x à température ambiante puis on ajoute du DMEM 0.1% SVF pour l'étape de sevrage des cellules (pendant 16h) à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées dans 4mL de milieu contenant ou non de l'IL-6 humaine (Recombinant human IL-6, 200-06, Peprotech EC, London, Royaume Uni) à 5ng/mL pendant 15 à 60min à 37°C. L'action de la cytokine est bloquée par l'ajout de 400µL de PBS1x à 4°C. Les cellules culotées sont lysées dans 70µL de tampon RIPA (Tris 50mM pH 7.4, NP-40 1%, NaCl 150mM, NaF 1mM, Deoxycholate 0.25%, Na₃VO₄ 1mM, Pefablock 0.4mM, Aprotinin 1µg/mL, Leupeptine 1µg/mL).

Les cellules HEL, UKE-1, TF-1, Ba/F3-EpoR et K562 ont été transfectées à l'aide du système Amaxa (Lonza, Amaxa Inc., Cologne, Allemagne).

Dix millions de cellules HEL ou Ba/F3-EpoR sont reprises dans 100µL de solution V (Lonza, Amaxa Inc., Cologne, Allemagne) puis incubées 30 secondes avec 25µg d'ADN plasmidique. Cinq millions de cellules UKE-1 sont reprises dans 100µL de solution V (Lonza, Amaxa Inc., Cologne, Allemagne) puis incubées 30 secondes avec 12µg d'ADN plasmidique. Pour ces trois lignées cellulaires, le programme de nucléofection correspond au X-01.

Trois millions de cellules TF-1 sont reprises dans 100µL de solution T (Lonza, Amaxa Inc., Cologne, Allemagne) puis incubées 30 secondes avec 2µg d'ADN plasmidique. Le programme de nucléofection correspond au T-01.

Cinq millions de cellules K562 sont reprises dans 100µL de solution V (Lonza, Amaxa Inc., Cologne, Allemagne) puis incubées 30 secondes avec 12µg d'ADN plasmidique. Le programme de nucléofection correspond au T-16.

Les cellules sont alors incubées 24h à 37°C.

Pour les études de signalisation, les cellules sont alors sevrées en cytokine ou en sérum pendant 4h. Puis, les cellules sont stimulées par de l'Epo (25U/mL), de la Tpo (20ng/mL) ou de l'IL-6 (5ng/mL) pendant 10 à 20 minutes à 37°C. Puis, l'action de la cytokine est bloquée par l'ajout de 400µL de PBS1x à 4°C. Les cellules culotées sont lysées dans 50 à 70µL de tampon RIPA (Tris 50mM pH 7.4, NP-40 1%, NaCl 150mM, NaF 1mM, Deoxycholate 0.25%, Na₃VO₄ 1mM, Pefablock 0.4mM, Aprotinin 1µg/mL, Leupeptine 1µg/mL). Le lysat cellulaire est incubé sur glace pendant 20 minutes en vortexant régulièrement, puis centrifugé à 4°C à 12 000 rpm. Puis, le surnageant est récupéré et dosé. Le surnageant contenant les protéines est alors dilué dans du tampon Laemli 4X (Tris 1M pH 6.8 6%, Glycérol 40%, SDS 1.6%, β-mercapto éthanol 20% et du bleu de bromophénol) et chauffé à 95°C pendant 5 minutes pour réduire les protéines de l'échantillon.

III-2-3 Tri cellulaire

Les neutrophiles, les cellules mononucléées et les plaquettes ont été isolées par ficoll (Lymphocyte Separation Medium, LSM1077, PAA Laboratories GmbH, Autriche) comme décrit précédemment (*Dobo et al.*, 2004 Haematologica; *Lippert et al.*, 2006 Blood).

Les lymphocytes T CD3⁺ ont été isolés à partir des cellules mononucléées à l'aide du kit *Easy Sep CD3⁺ 10e9 cells* (18051, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) selon les recommandations du fabricant.

III-3 Techniques de Biochimie

III-3-1 Dosage protéique

Les dosages protéiques ont été réalisés à l'aide du kit *BC Assay* (FT-UP40840, Uptima) utilisant la méthode de l'acide bicinchoninique. Les dosages sont réalisés en duplicat et à deux concentrations différentes (1/5 et 1/10^{ème}).

III-3-2 Western Blotting

Les gels d'acrylamide-SDS sont composés d'une partie « running gel » à 10% et d'une partie « stacking gel » à 6%. La migration des protéines se fait dans du tampon Tris Glycine SDS 1X (1610772, Biorad, CA, USA). Les transferts sont réalisés sur des membranes PDVF (IPVH 00010, Immobilon-P, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) dans un mélange Tris Glycine (1610771, Biorad, CA, USA), 20% méthanol et H₂O qsq à 30 volts sur la nuit à 4°C.

Après transfert, les membranes de nitrocellulose sont saturées par incubation dans du PBS 1x lait 5% pendant 2h à température ambiante. Puis, les membranes sont lavées trois fois dans du PBS 1x Tween 0.01%. Ensuite, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dans une solution de Tris Buffer Saline 1X (NaCl 8%, KCl 0.2%, Tris-HCl 1M 1%, pH ajusté à 7.4), 5% BSA et 0.1% Tween sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont lavées trois fois dans du PBS 1x Tween 0.01%. Puis, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires dans une solution de PBS 1x lait 1%. Les membranes sont lavées trois fois dans du PBS 1x Tween 0.01%.

Les membranes sont alors révélées en les incubant dans des solutions BM Chemiluminescence Blotting Substrate (11 500694001, Roche, Mannheim, Allemagne) ou Super Signal West Pico (34080, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Liste des anticorps et des dilutions utilisés dans ce travail :

- anti-gp130 (C-20), sc-655, Santa Cruz (au 1/1000^{ème})
- anti-Mpl, 06-944, Millipore (au 1/2000^{ème})
- anti-IL-6R α (H-300), sc-13947, Santa Cruz (au 1/1000^{ème})
- anti-IL-11R α (N-20), sc-993, Santa Cruz (au 1/1000^{ème})

- anti-IL-15R α (N-20), sc-5526, Santa Cruz (au 1/1000^{ème})
- anti-IL-27R α (TCCR C-terminal), T-5823, Invitrogen (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Jak2 (Tyr1007/1008), 3776S, Cell Signalling, Danvers, MA, USA (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Jak2 (Tyr221), 3774, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Jak2 (C-20), sc-294, Santa Cruz (au 1/1000^{ème})
- anti-Jak2, 06-255, Upstate (Millipore) (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Tyk2 (Tyr1054-1055), 9321, Cell signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Tyk2 (C-20), sc-169, Santa Cruz (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Stat1(Y701), 9167, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Stat1, 9175, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Stat3 (Y705), 9131, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Stat3 (Y727), 9134, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Stat3, 610190, BD Bioscience, San Jose, CA, USA (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Stat5 (Tyr694), 9351, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Stat5, 610191, BD Bioscience, San Jose, CA, USA
- anti-phospho-Akt (S473), 9271, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Akt, 9272, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-phospho-Erk1/2 (T-202/204), 9106, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti-Erk1/2, 9102, Cell Signalling (au 1/1000^{ème})
- anti- β -Actine, MAB1501R, Millipore (au 1/1000^{ème})

III-3-3 Extraction des protéines des plaquettes

Les culots de plaquettes sont conservés à -80°C. Les culots sont mis à décongeler sur glace. Les culots de plaquettes sont alors lysés dans 100 μ L de tampon de lyse des plaquettes : Tris 20mM pH 7.5, NP-40 1%, NaCl 150mM, Glycérol 10%, EDTA 1mM, NaF 50mM, MgCl₂ 5mM, Na₃VO₄ 2mM, Pefablock 0.8mM, Aprotinine 2 μ g/mL, Leupeptine 2 μ g/mL. Les lysats sont incubés sur glace pendant 20 minutes en vortexant régulièrement, puis centrifugés à 4°C à 12 000 rpm. Puis, le surnageant est récupéré et dosé. Le surnageant contenant les protéines est alors dilué dans du tampon Lamli 4X (Tris 1M pH 6.8 6%, Glycérol 40%, SDS 1.6%, β -mercapto éthanol 20% et du bleu de bromophénol) et chauffé à 95°C pendant 5 minutes pour réduire les protéines de l'échantillon.

III-3-4 Dosages cytokiniques

Les dosages des cytokines IL-6, IL-11, HGF et Tpo ont été réalisés selon la technique Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) à l'aide des kits *Quantikine* (R&D Systems Inc., Abingdon, Royaume Uni) : Human IL-6 S6050, Human IL-11 D1100, Human HGF SHG00 et Human Tpo DTP00B. Les dosages ont été réalisés en duplicat ou triplicat sur des milieux de culture cellulaire ou des plasmas médullaires de patients.

III-4 Techniques de biologie moléculaire

III-4-1 Préparation des ADN, des ARN et des ADNc

Les ADN génomiques ont été préparés à partir de sang total ou de culots cellulaires obtenus après tri cellulaire à l'aide du kit *QIAamp DNA Blood* (51185, Qiagen, Valencia, CA, USA).

Les ARN totaux ont été préparés à partir de culots de cellules primaires ou transfectées congelés à -80°C. L'extraction a été réalisée à l'aide du kit NucleoSpin RNA II (740609.50, Macherey Nagel GmbH and Co., Neumann, Allemagne). Les ARN totaux des patients étudiés ont été préparés à partir de culot de granulocytes congelés dans 500µL de Trizol Reagent (15596-018, Invitrogen, Frederick, MD, USA) en suivant les recommandations du fabricant. Tous les ARN sont congelés à -80°C.

Les ADNc ont été obtenus par transcription inverse à partir de 500 ng d'ARN totaux, en présence de 150µM d'amorces (N8080127, Random Hexamer 50µM, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 7.5mM de dNTP, 48U de RNase Out (10777, Invitrogen, Frederick, MD, USA) et 120U de SuperScript II (18064-014, Invitrogen, Frederick, MD, USA) qsq 27µL d'H₂O stérile. Les ADNc sont congelés à -80°C.

III-4-2 PCR et RT-PCR quantitatives

Les PCR et RT-PCR quantitatives, les PCR et RT-PCR quantitatives spécifiques d'allèle ont été réalisés sur un appareil Rotorgene 6000 (Qiagen, Corbett Research, Mortlake, NSW (Inner

West), Australie). Ces techniques de PCR quantitatives sont basées sur l'utilisation de sondes de type Taqman composé d'une extrémité fluorescente et une extrémité quencher permettant l'extinction de la fluorescence. L'amplification lors des cycles de PCR provoque la dégradation de la sonde Taqman libérant ainsi la libération de la partie fluorescente. Ainsi, la fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle de PCR, permettant ainsi le suivi en temps réel de la fluorescence et donc de la quantité de cible présent dans la réaction (**Figure 33**).

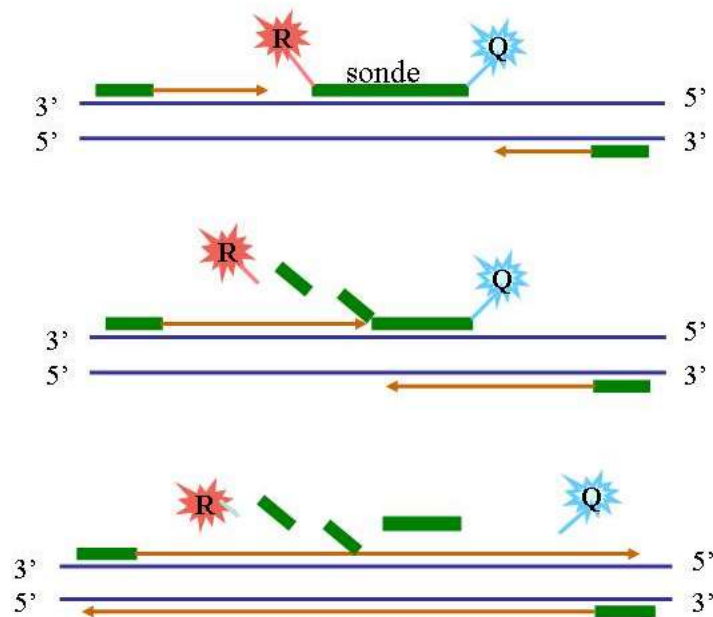


Figure 33 : Principe de la PCR quantitative de type Taqman (D'après <http://www.sesep.uvsq.fr/formation/methodes.html>).

Le programme de PCR quantitative est le suivant : 10 minutes à 95°C puis 45 cycles de 15 secondes à 95°C et 90 secondes à la température d'hybridation des amorces.

La réaction de PCR quantitative se fait dans un mélange contenant 50% de qPCR Master MIX (qPCR Mastermix No ROX, RT-QP2X-03NR, Eurogentec, Liège, Belgique), 6µM d'amorces sens et anti-sens, 4µM de sonde Taqman (5'FAM, 3'TAMRA) et 12ng d'ADN génomique dans 20µL final d'H₂O ppi.

III-4-3 High Resolution Melting curve analysis (HRM)

Les techniques de HRM ont été réalisées sur un appareil Rotorgene 6000 (Qiagen, Corbett Research, Mortlake, NSW (Inner West), Australie). La technique de HRM est basée sur la différence de température d'hybridation des fragments d'ADN. La présence d'un polymorphisme ou d'une mutation sera détectable du fait de la modification de la séquence en nucléotide et donc de la température d'hybridation des fragments d'ADN (**Figure 34**).

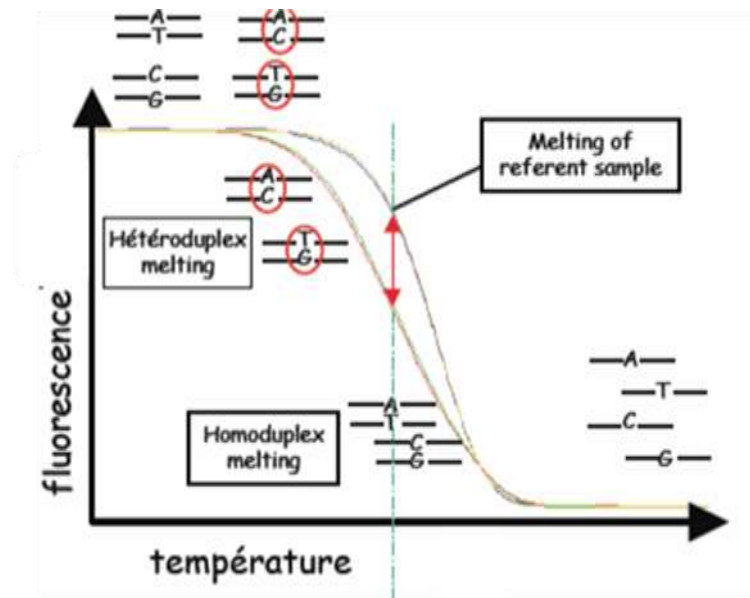


Figure 34 : Principe de la HRM.

Le programme de HRM est le suivant : tout d'abord une étape de PCR, 5 minutes à 95°C puis 40 cycles 10 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C et 10 secondes à 72°C. La deuxième étape correspond à la HRM, augmentation de la température de 0.1°C toute les 2 secondes de 65 à 95°C. La réaction de HRM se fait dans un mélange contenant 50% de 2x HRM PCR Master MIX (Type-it HRM PCR Kit, 206542, Qiagen, Valencia, CA, USA), les amorces sens et anti-sens à 17.5µM et 10ng d'ADN génomique dans 25µL final d'H₂O RNase.

III-4-4 Clonages et séquençages

Les clonages ont été réalisés à partir de produits de PCR ou de RT-PCR dans des vecteurs pCR2.1 (K450001, Invitrogen, Frederick, MD, USA) ou pcDNA3.1 (K490001, Invitrogen, Frederick, MD, USA) en suivant les recommandations du fabricant.

Les séquençages ont été réalisés à partir de produits de PCR, de RT-PCR. La réaction de séquençage se fait selon la méthode de Sanger et est réalisée grâce au kit BigDyeR Terminator v3.1 (4336699, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ce kit contient non seulement les tampons, les dNTPs, la Taq Polymerase nécessaires à la synthèse des brins d'ADN, mais aussi les 4 ddNTPs essentiels au séquençage, chacun étant couplé à un fluorochrome différent. Ce couplage va permettre la détection des fragments synthétisés en électrophorèse capillaire et ainsi de connaître l'enchaînement des nucléotides composant la séquence d'ADN. Nous remercions l'Axe Génomique de Biogenouest® pour sa contribution dans la réalisation des présents travaux.

III-4-5 SNP arrays

Afin de détecter des disomies uniparentales, nous avons utilisé des puces Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays en suivant les instructions du fabricant (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Cette technologie permet la détection de 1.8 millions de marqueurs génétiques répartis sur l'ensemble du génome humain, ce qui permet ainsi de détecter des anomalies génétiques telles que des délétions, des duplications, des disomies uniparentales...

La partie technique des SNP arrays a été réalisée en collaboration dans le laboratoire du Docteur Robert Kralovics (CeMM, Vienna, Autriche). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Genotyping Console version 3.0.2.

La 9pUPD se distingue d'un profil normal par la présence de deux copies de chaque gène, associé à une diminution de la fréquence des polymorphismes à l'état hétérozygote dans la zone étudiée (**Figure 35** page 92).

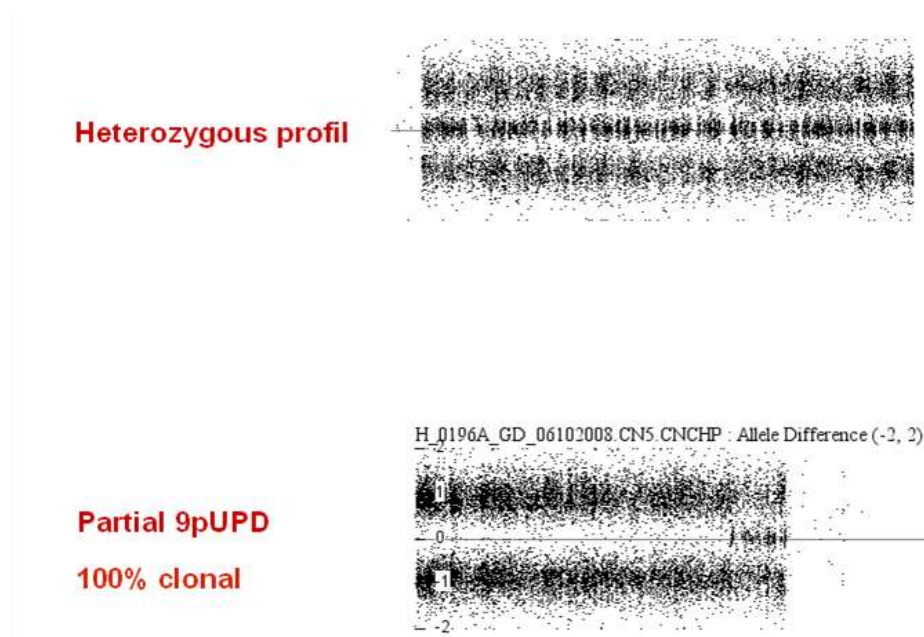


Figure 35 : Exemple de profil obtenu sur des puces Affymetrix Genome-wide human SNP array Nsp/Sty 6.0. Chaque point représente un polymorphisme. L'axe horizontal central représente une fréquence de 50/50 pour un polymorphisme hétérozygote. Les polymorphismes présents à l'état forme homozygote se retrouvent en périphérie. Une zone de 9pUPD correspond à l'appauvrissement de la fréquence d'un allèle par rapport à un autre et donc à l'éloignement des points par rapport à l'axe central (50/50) correspondant à des polymorphismes à l'état hétérozygote.

III-5 Techniques d'immunofluorescences

Pour déterminer la localisation cellulaire des protéines Mpl et Jak2, nous avons utilisé une approche basée sur les protéines de fusion avec une partie fluorescente. Des transfections transitoires à l'aide du système Amaxa (voir paragraphe 9-2-2) de cellules HEL (*JAK2V617F*) et de cellules K562 (*JAK2V617*) avec des constructions pcDNA3.1 MPL-mOrange2 et/ou pcDNA3.1 *JAK2V617/V617F*-mCitrine ont été réalisées. Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide d'un microscope confocal *LSM 510 META Zeiss* en collaboration avec le laboratoire du Docteur Bridget Wilson (Albuquerque, New Mexico, USA). Les différentes images ont été acquises à l'aide d'un laser à 405nm, un laser à argon et à HeNe1 à 543nm avec des objectifs 40xDIC à huile ou 63xDIC à huile.

RESULTATS

IV- Résultats

IV-1 Etude de l'expression de *JAK2* dans la Polyglobulie de Vaquez

IV-1-1 Article 1 : Mise en évidence de recombinaison pré- et post-*JAK2*V617F chez 2 patients atteints de Polyglobulie de Vaquez (*Vilaine et al.*, Blood 2011 ; 118: 6468-6470)

Nous présentons ici le cas de deux patients présentant un hémocrite supérieur à 63 L/L, une légère augmentation du nombre des leucocytes ($11.8 \times 10^9/L$ pour Na1061 et $10.1 \times 10^9/L$ pour Na1253), un chiffre des plaquettes normal ($276 \times 10^9/L$, Na1061) ou élevé ($593 \times 10^9/L$, Na1253), un pruritus acquagénique et une absence de splénomégalie. Ces deux patients ont une charge allélique inférieure ou égale à 30% de *JAK2*V617F (La charge allélique correspond au nombre d'allèle muté présent dans une population cellulaire). Ces éléments ont permis d'établir le diagnostic de Polyglobulie de Vaquez pour les deux patients.

Lors de l'investigation de ces deux patients par qPCR allèle spécifique et séquençage direct, nous avons pu mettre en évidence une discordance importante entre la charge allélique de *JAK2*V617F et le ratio des allèles 46/1 et sauvage dans l'ADN génomique des granulocytes (%*JAK2*V617F supérieur dans l'ADNc que dans l'ADNg). De plus, l'ADNg des lymphocytes CD3+ de ces deux patients sont hétérozygotes pour différents polymorphismes de l'haplotype 46/1, dont le rs12343867 (voir paragraphe I-5-1 de l'introduction). Ces observations suggèrent un événement de recombinaison homologue, incluant au moins une partie du gène *JAK2*, survenu avant l'acquisition de la mutation V617F (**Figure 36** page 95). Nous avons alors entrepris de séquencer la totalité du gène et de l'ADNc de *JAK2* afin d'exclure la présence d'une éventuelle mutation additionnelle, et réalisé des études de SNP arrays afin de documenter les recombinaisons du chromosome 9p chez ces deux patients (notamment les recombinaisons homologues consécutives à l'acquisition de la mutation *JAK2*V617F : 9pUPD, voir paragraphe I-5-2-2 de l'introduction et le paragraphe III-4-5 du matériels et méthodes). De plus, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de l'ARNm de *JAK2* comme possible conséquence des recombinaisons observées.

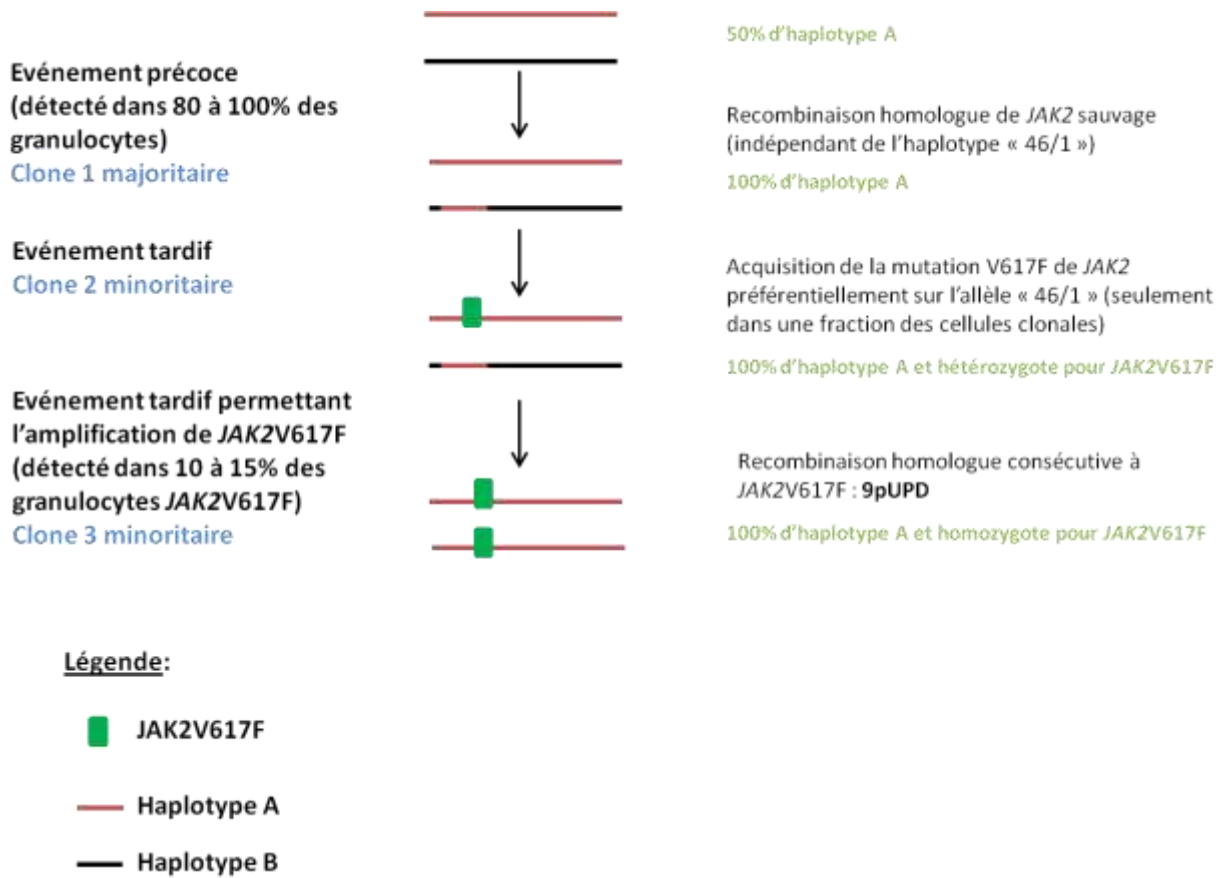


Figure 36 : Résumé de la séquence des événements mis en évidence dans les deux cas de PV décrit ci-dessous.

David S. Ritchie

Hematology Immunology Translational Research Laboratory,
Department of Hematology and Medical Oncology,
Peter MacCallum Cancer Centre,
University of Melbourne,
Melbourne, Australia

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Paul Neeson, Cancer Immunology Program, Peter MacCallum Cancer Centre, East Melbourne, Victoria 3002, Australia; e-mail: paul.neeson@petermac.org.

References

1. Carter CL, Feyler S, Smalle N, et al. Effect of combined dexamethasone/lenalidomide therapy on NK cell-receptor levels in myeloma patients. *Blood*. 2011; 118(24):6465-6466.
2. Hsu AK, Quach H, Tai T, et al. The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. *Blood*. 2011;117(5):1605-1613.
3. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res*. 2007;67(18):8444-8449.
4. Jinushi M, Vanneman M, Munshi NC, et al. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1285-1290.
5. Mitsiades CS. How "immunomodulatory" are IMiDs? *Blood*. 2011;117(5):1440-1441.

To the editor:

Homologous recombination of wild-type *JAK2*, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm

Transformation of hematopoietic cells depends on the acquisition of genetic events leading to cytokine independence, typically associated with acquisition of an autocrine cytokine loop or/and increased expression or/and mutation of *JAK* genes.¹ Rearrangement of the *JAK2* gene, which presumably alters *JAK2* transcription, is reported in hematopoietic cells.² Murine models of myeloproliferative neoplasms (MPN) demonstrated that the polycythemia vera (PV) phenotype requires the combination of high expression and activation of Jak2.³ Indeed, expression of both wild-type (WT) and mutant *JAK2* transcripts can be high in PV.⁴ PV is characterized by a high frequency of the *JAK2* 46/1 (GGCC) haplotype (represented in Figure 1A) predisposing to the *JAK2*V617F mutation.^{5,6} The *JAK2*V617F mutation facilitates the acquisition of homozygous status for the *JAK2*V617F by mitotic homologous recombination (HR) occurring between the *JAK2*WT and *JAK2*V617F alleles, resulting in chromosome 9p uniparental disomy (9pUPD).^{7,8} Here we report 2 cases where high *JAK2* mRNA expression was associated with a novel early step in MPN development, HR preceding *JAK2* mutation.

Patients Na1061 and Na1253 presented with a high hematocrit, slightly elevated leukocyte counts, normal (Na1061) or elevated (Na1253) platelet counts, aquagenic pruritus, absence of splenomegaly, and presence of *JAK2*V617F (20.7% for Na1061, 30.0% for Na1253), and were diagnosed with PV (see supplemental Table 1, available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Sequencing and allele-specific qPCR analysis in granulocyte DNA of marker rs12343867 (C/T) in intron 14 of *JAK2*, characteristic of the 46/1 haplotype, revealed rs12343867 ratios sharply different from *JAK2*V617F ratios: 80% C-alleles for Na1061 and 100% T-alleles for Na1253 (Figure 1B-C). For both patients, CD3⁺ lymphocytes were unambiguously heterozygous for rs12343867 (Figure 1C). This indicated granulocyte acquisition of homozygosity for rs12343867 but not for the V617F mutation. In other words, the acquisition of homozygosity for rs12343867 must have preceded *JAK2* mutation in these patients. This was confirmed by further analysis of *JAK2* in granulocytes and CD3⁺ lymphocytes (Figure 1C), and of chromosome 9p using SNP arrays (Figure 1D). These studies showed that the DNA regions recombined involved *JAK2* exons 6-25 for Na1061, and the complete 46/1 haplotype for Na1253. Moreover, SNP array studies revealed the presence of 1 subclone for Na1253 (28.24 Mb) or 2 subclones for Na1061 (5.7 and 24.54 Mb) with partial 9pUPD (supplemental Figures

2-3 and Figure 1E). Sequencing of the complete *JAK2* cDNA excluded any mutation other than V617F.

These first cases of HR of *JAK2*WT led us to propose a new model for MPN: the 46/1 haplotype may predispose carriers to diverse alteration of *JAK2* including early HR of wild-type *JAK2*, associated or not with mutation in *JAK2* or other genes important for myelopoiesis, the V617F mutation facilitating additional HR involving the *JAK2*V617F-mutated allele, leading to 9pUPD and *JAK2*V617F homozygosity (Figure 1E-F). The new model allows that a nonidentified somatic genetic event may facilitate *JAK2* recombination and subsequent genetic alterations eventually leading to PV phenotype (Figure 1F).

In the context of inherited gene mutations, meiotic HR can increase expression of the gene involved.⁹ In the case of *JAK2*, mitotic HR could result in a configuration that amplifies *JAK2* expression and subsequently cell growth after activation of Jak2 by cytokine receptors. This is of importance because MPN progenitors produce Jak2-activating cytokines.¹⁰ For both patients, cDNA quantitative analysis revealed high *JAK2* mRNA levels with > 96% *JAK2*V617F (see supplemental Table 2), implying an mRNA expression almost 100-fold higher for recombined alleles in V617F/V617F cells than for alleles in WT/WT cells. Finally, finding recurrent *JAK2* recombination associated with high mRNA expression suggests that residual *JAK2*V617F disease may be best assessed in cDNA.

Mathias Vilaine

InsERM U892, Institut de Recherche Thérapeutique,
Université de Nantes,
Nantes, France

Damia Olcaydu

Center for Molecular Medicine (CeMM) of the Austrian Academy of Sciences,
Vienna, Austria

Ashot Harutyunyan

Center for Molecular Medicine (CeMM) of the Austrian Academy of Sciences,
Vienna, Austria

Jonathan Bergeman

InsERM U892, Institut de Recherche Thérapeutique,
Université de Nantes,
Nantes, France

Mourad Tiab

Centre Hospitalier Départemental de Vendée,
La Roche sur Yon, France

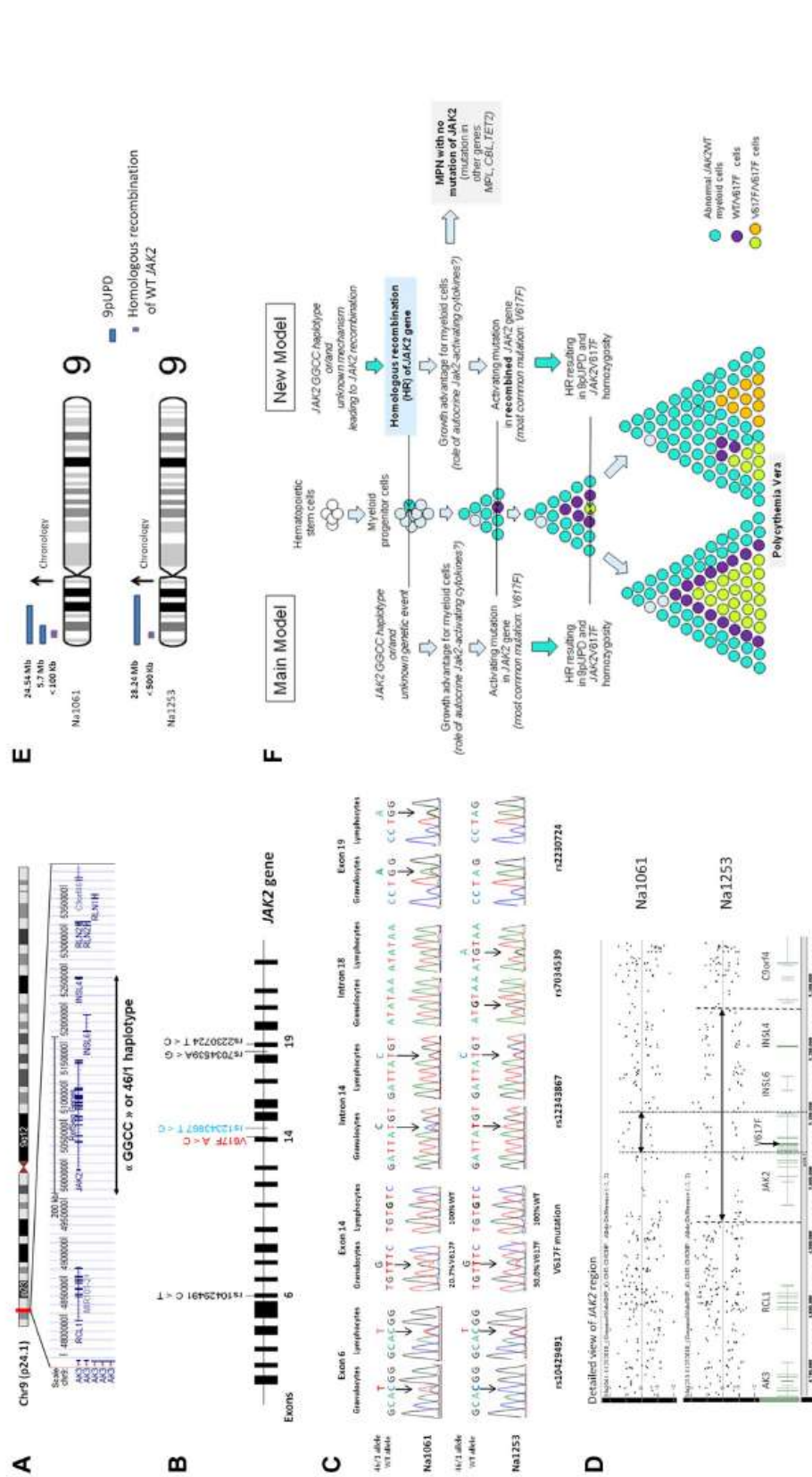


Figure 1. Analysis of the JAK2 gene in patients Nat061 and Nat1253 and proposition of a new pathogenic model for polycythemia vera. (A) Representation of the 46V1 haplotype. The 46V1 haplotype is an approximately 280 kb-long region of chromosome 9p that includes the entire JAK2, INSL6 and INSL4 genes. JAK2 exons are represented by black boxes. JAK2 SNP rs7034539 (in intron 18) and rs22303724 (in exon 19) positions are indicated with black bars. (B) Schematic representation of the JAK2 gene. JAK2 exons are represented by black boxes. JAK2 SNPs and JAK2V617F allelic ratios in gDNA of granulocytes and CD3⁺ lymphocytes (used as a control, healthy controls) and Nat1253 (see primers in supplemental Table 3 and supplemental Figure 1). Black arrows indicate the different SNPs and JAK2V617F. Both patients were heterozygous for SNPs in CD3⁺ lymphocytes yet had SNP rs12343867 C-allele ratio in granulocyte gDNA (80% and 100%) compatible with homologous recombination of JAK2. (C) Detailed view of the JAK2 region. Results of the distortion of SNP allelic frequencies showed HR of part of JAK2 (exons 6–25) for Nat061 and of the whole 46V1 haplotype for Nat1253. Regions of JAK2V617F-homologous recombination, not readily visible unless one looks for them, are indicated by double black arrows. Bars depict the physical position and size of the aberration (purple, homologous recombination; blue, uniparental disomy events). Black arrows indicate the chronology of events, as deduced from the rs12343867 and V617F allelic ratios. For both patients the distortion of SNP allelic differences because of homologous recombination was higher at the telomeric end than in the centromeric region of chromosome 9p indicating 2 distinct partial 9pUPDs for Nat061 and 1 partial 9pUPD for Nat1253. For both patients, SNP allelic distortion revealed pre-JAK2 homologous recombination (in purple). (D) Main and new pathogenic models for polycythemia vera and/or other MPN. The current model states that MPN patients carry or acquire a predisposition to MPN and mutation in the JAK2 gene; the JAK2 GGGC haplotype is one such genetic predisposition. In other patients, another genetic abnormality, presumably in a myeloid progenitor, is responsible for cellular growth advantage and eventually, acquisition of JAK2 mutation -V617F being the most frequent – and MPN phenotype. Because high JAK2V617F loads are usually acquired via 9pUPD and most frequent in PV, acquisition of the PV phenotype is assumed to result from 9pUPD facilitated by JAK2V617F. Both JAK2 mutations and 9pUPD may occur more than once, leading to the development of one of several JAK2V617F-homozygous subclones. Disease phenotype and evolution, and occurrence of 9pUPD, may vary depending on parallel genetic events (eg, TE/T2 mutations) and the type of JAK2 mutation (eg, high mutant loads and 9pUPD are rare in patients with JAK2 exon 12 mutations). The new model adds an early step to the conventional model, stating that subsets of patients carrying the JAK2 GGGC haplotype may be predisposed to homologous recombination (HR) of JAK2 associated with growth advantage followed or not by mutation in the JAK2 gene on the recombinational allele and high JAK2 mRNA expression. Early JAK2 HR is compatible with all of the latter steps leading to MPN according to the conventional pathogenic model. JAK2 mutation, 9pUPD, acquisition of parallel events in genes other than JAK2. The new model allows that a non-identified genetic event may facilitate JAK2 recombination and subsequent genetic alterations eventually leading to PV phenotype.

Jean-François Ramée
Clinique Catherine de Sienne,
Nantes, France

Jian-Min Chen
Inserm U613 and EFS-Bretagne,
Brest, France

Robert Kralovics
Center for Molecular Medicine (CeMM) of the Austrian Academy of Sciences,
Vienna, Austria

Sylvie Hermouet
Inserm U892, Institut de Recherche Thérapeutique,
Université de Nantes,
Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire,
Nantes, France

The online version of this article contains a data supplement.

Acknowledgments: The authors thank Dr Ariane Plet (Nantes, France), Dr Eric Lippert (Bordeaux, France), and Dr Richard Redon (Nantes, France) for reading the manuscript.

This study was performed thanks to grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Comités Morbihan and Ille-et-Vilaine of the Ligue Nationale contre le Cancer to S.H. and the MPN Research Foundation to R.K. M.V. is recipient of a scholarship from the French Ministry of Research (2009-2012) and benefited from a scholarship for short term scientific missions (November 2010) from MPN & MPN-EuroNet (COST Action BM0902). M.V., J.B., and S.H. are members of MPN & MPN-EuroNet.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Contribution: S.H. designed the research, analyzed data, and wrote the paper; R.K. designed the research and analyzed data; M.V. performed research, analyzed data, and wrote the paper; D.O., A.H., and J.B. performed research and analyzed data; M.T. and J.-F.R. contributed patient samples and

clinical data; and J.-M.C. contributed with scientific and technical advice and helped write the paper.

Correspondence: Sylvie Hermouet, Inserm U892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France; e-mail: sylvie.hermouet@univ-nantes.fr.

References

- Homakova T, Springuel L, Devreux J, et al. Oncogenic JAK1 and JAK2-activating mutations resistant to ATP-competitive inhibitors. *Haematologica*. 2011;96(6):845-853.
- Van Roosbroeck K, Cox L, Tousseyn T, et al. JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011;117(15):4056-4064.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111(8):3931-3940.
- 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(6):1865-1867.
- Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):450-454.
- James C, Ugo V, Le Couëdic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.
- Kralovics R, Guan Y, Pichal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30(3):229-236.
- Klampff T, Harutyunyan A, Berg T, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*. 2011;118(1):167-76.
- Lupski JR, Stankiewicz P. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*. 2005;1(6):e49.
- Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. 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. *Oncogene*. 2011;30(8):990-1001.

To the editor:

Differential expression of MMP-2 and MMP-9 activity in megakaryocytes and platelets

In the May 31, 2011 online issue of *Blood*, Cecchetti et al presented a transcriptome analysis of matrix metalloproteinase (MMP) expression in megakaryocytes and platelets.¹ Their results demonstrate that megakaryocytes and platelets differentially express mRNAs and proteins for MMPs. The authors found that platelets constitutively expressed MMP-2 protein and released it on thrombin activation, although platelets lacked mRNA for MMP-2. On the other hand, they did not detect pro-MMP-9 protein in both inactivated and thrombin-stimulated platelet lysates, even though MMP-9 mRNA was present; moreover, the authors also detected MMP activity in megakaryocyte releasates but not in their lysates.

The data are incongruent with previous quantitative studies and the peculiar subcellular localization in platelets of both zymogen and activated forms of MMP-9 (also named Gelatinase B).²⁻⁵ Cecchetti et al suggested several hypothesis for this unclear discrepancy/variance: (1) MMP-9 protein is secreted during pro-platelet formation in lieu of being retained in mature platelets, (2) the lack of MMP-9 proenzyme is due to more efficient platelet preparations (clearing CD45⁺ leukocytes and thus limiting the MMP-9 contamination).

Although no MMP zymogram was displayed by the authors, we believe that there could be a simpler explanation for the incongruence with the literature data, evidencing a neglected methodologic aspect. Cecchetti et al performed all cell lysates with a buffer containing 1mM of EDTA and Na₃VO₄, chemicals with well-

known inhibitory effects on MMP activity. In fact, the Ca/Zn-dependent gelatinases are sensitive to and partially inhibited by the EDTA chelation activity,^{6,7} whereas orthovanadate (classic phosphotyrosine phosphatase inhibitor) has also been characterized as an MMP inhibitor (eg, for gelatinase B⁸ and collagenase⁹).

To reveal the possible partial inhibitory effect of EDTA and Na₃VO₄ on platelet gelatinases, in Figure 1 we show all gelatinolytic MMP forms present in whole cord blood¹⁰ and in purified mature platelets according to Cecchetti et al's procedure.¹ Whole cord blood contained both MMP-2 proenzyme (at 72 kDa) and pro-MMP-9 forms (monomer at 92 kDa, and complexed forms at 130 and 225 kDa; lane standard); proforms are activable by 1mM APMA (lane 2). The EDTA/Na₃VO₄ treatment is able to partially inhibit MMP-9 in platelets lysates; in particular, both the proenzyme and APMA-activated MMP-9 forms showed a significant reduction of gelatinolytic activity (lane 3). Our observations may at least in part explain both the incongruent "absence" of MMP-9 activity in platelet lysates (similar to collagenase inhibition, like for MMP-3), as well as the presence of MMP-9 activity in only megakaryocyte releasates or untreated culture media (but not in their lysates with EDTA/Na₃VO₄).

To avoid misinterpretation and possible technical pitfalls (possibly because of the neglected peculiar MMP inhibition by EDTA/Na₃VO₄), we believe that a more careful MMP analysis in

Supplemental data

Materials and Methods

Patient samples and quantification of *JAK2* 46/1 rs12343867 SNP and *JAK2*V617F allelic ratios: Blood samples were obtained after informed consent, granulocytes and CD3+ lymphocytes were purified using the EasySep Human CD3+ kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada). Genomic DNA (gDNA) and cDNA were prepared with Nucleospin Tissue XS (Macherey-Nagel GmbH, Neumann, Germany). For cDNA preparations, cell pellets were kept in 500 µl Trizol (Invitrogen, Frederick, MD, USA) and stored at -80°C until mRNA extraction. After RNA extraction, reverse transcription was performed with 50 µM random hexamers (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) and the SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Frederick, MD, USA). To quantify the wild-type and 46/1 haplotype, we designed an allele-specific quantitative PCRs (AS-qPCRs) using rs12343867, marker of the 46/1 haplotype in *JAK2* intron 14. The rs12343867 AS-qPCR assay was performed on gDNA in two reactions using primers (see Supplemental Table 3). The *JAK2*V617F mutation was quantified on gDNA and cDNA using sense and anti-sense AS-qPCR assays.⁴ The rs12343867 and the V617F allelic ratios were determined by comparison to dilutions of plasmids and expressed as percentages (%) of total *JAK2*.

Microarray analysis: To detect UPD in gDNA, we used the Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays according to the manufacturer's instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). The raw data were analyzed using the Genotyping Console version 3.0.2 software.

Supplemental Table 1

	Na1061		Na1253
Sex	Male		Male
	At diagnosis	With HU	At diagnosis
Age (years)	54	65	71
Blood cell counts			
<i>Leukocytes</i> ($\times 10^9/L$)	11.8	3.1	10.1
<i>Neutrophils</i> ($\times 10^9/L$)	9.1	2.1	4.0
<i>Lymphocytes</i> ($\times 10^9/L$)	1.8	0.8	4.4
<i>Monocytes</i> ($\times 10^9/L$)	0.53	0.17	1.50
<i>Hemoglobin</i> (g/dL)	22.3	13.7	20.5
<i>Hematocrit</i> (%)	69.1	44.4	63.1
<i>Platelets</i> ($\times 10^9/L$)	276	195	593
Red Cell Mass (ml/kg) (%)	Not done	-	Not done
Splenomegaly	No	No	No
Other clinical symptoms	Plethoric facies Aquagenic pruritus	Aquagenic pruritus Dry skin	Aquagenic pruritus
% <i>JAK2</i> rs12343867 C-alleles in lymphocyte gDNA	Not done	55.5%	57.6%
% <i>JAK2</i> rs12343867 C-alleles in granulocyte gDNA	Not done	80%	100%
% <i>JAK2</i> V617F-mutated alleles in granulocyte gDNA	Not done	20.7%	30.0%
% <i>JAK2</i> V617F-mutated alleles in granulocyte cDNA	Not done	96.3%	96.4%
<i>JAK2</i> allele carrying V617F	Not done	C-allele	T-allele
<i>JAK2</i> mRNA copies			
<i>JAK2</i> V617F/100 ABL	Not done	3212	3571
Total <i>JAK2</i> /100 ABL	Not done	3333	3703
Familial history	None	None	- Patient: CLL - Sister: MCL - Mother: NHL

Supplemental Table 1: Clinical and biological characteristics of patients Na1061 and Na1253

For both patients, the biological and clinical information presented above were collected at the time of diagnosis. For Na1061, biological and clinical information was available after 11 years of disease evolution with hydroxyurea (HU) treatment. Regarding Na1253, it is likely that this family presents a germ-line abnormality pre-disposing to B-cell malignant transformation, in addition to the *JAK2* GGCC haplotype pre-disposing to *JAK2* alteration and MPN. Ratios of *JAK2* rs12343867 C-alleles and *JAK2*V617F were measured using AS-qPCR assays. (*) Contamination by granulocytes is possible. gDNA: genomic DNA; cDNA: complementary DNA; CLL: chronic lymphocytic leukemia; MCL: mantle cell lymphoma; NHL: Non-Hodgkin lymphoma.

Supplemental Table 2

<i>JAK2</i> mRNA copies	Na1061	Na1253	PV patients N=62	Healthy Donors N=40
<i>JAK2</i> WT/100 copies <i>ABL</i>				
mean $\pm$ SD	121	133	294 $\pm$ 265	230 $\pm$ 197
median (min-max)			197 (9-1021)	130 (84-657)
<i>JAK2</i> V617F/100 copies <i>ABL</i>				
mean $\pm$ SD	3212	3571	548 $\pm$ 552	0
median (min-max)			464 (0-2529)	0
Total <i>JAK2</i> /100 copies <i>ABL</i>				
mean $\pm$ SD	3333	3704	842 $\pm$ 660	230 $\pm$ 197
median (min-max)			680 (30-3048)	130 (84-657)
<i>JAK2</i> WT/1000 copies <i>RPLP0</i>				
	4	7	No data	No data
<i>JAK2</i> V617F/1000 copies <i>RPLP0</i>				
	104	188	No data	No data
Total <i>JAK2</i> /1000 copies <i>RPLP0</i>				
mean $\pm$ SD	108	195	41 $\pm$ 19	No data

Supplemental Table 2: *JAK2* mRNA expression in granulocytes of patients Na1061 and Pt Na1253

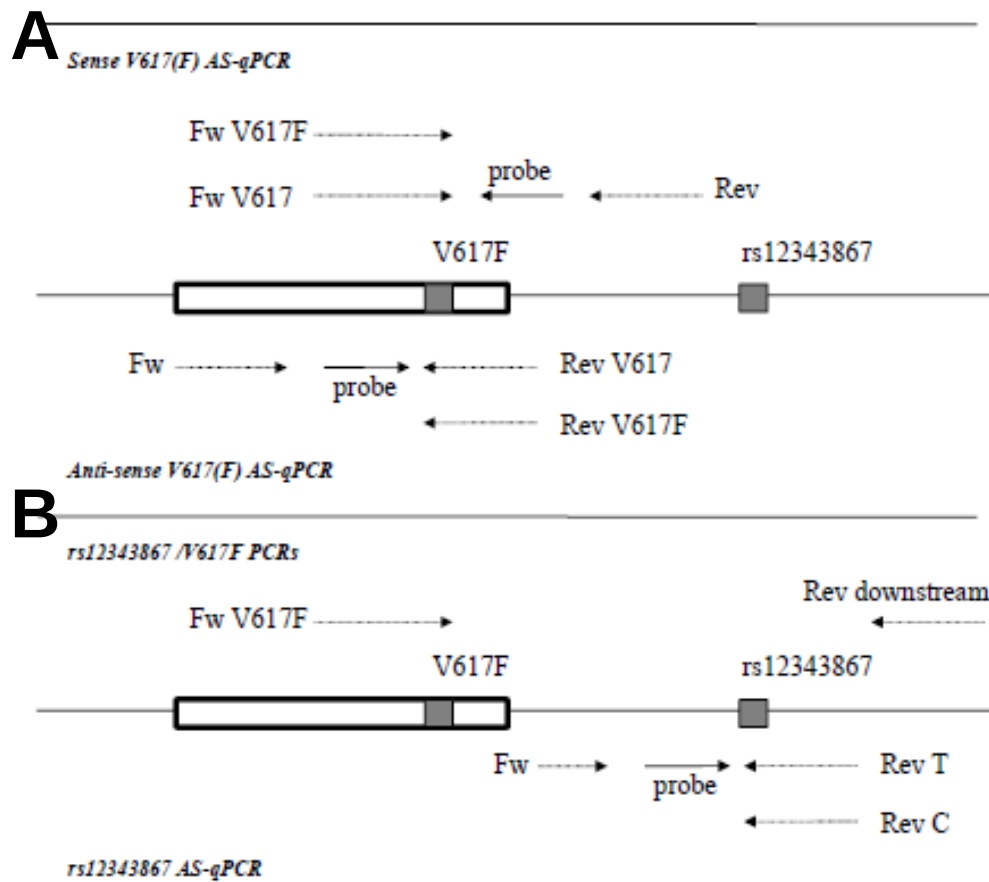
Pellets of purified granulocytes kept in Trizol were submitted to mRNA extraction. After DNase treatment and reverse transcription (RT), cDNAs were kept frozen at -80°C . qPCRs for *JAK2* wild-type, *JAK2*V617F and rs12343867, as well as *ABL* and *RPLP0*, used as control genes, were performed with specific primers and probes (Supplementary Table 3) on Rotorgene 6000 (Corbett Research, Australia) in duplicate (patients Na1061 and Na1253) or in triplicate (cohorts of healthy donors and PV patients). 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. *JAK2*WT and *JAK2*V617F mRNA levels in granulocytes of Na1061 and Na1253 were compared to those obtained in granulocytes of 62 PV patients and in 40 healthy donors, as published.⁴ Given that for both patients about 10-15% of granulocytes were homozygous for *JAK2*V617F and at least 60% of granulocytes carried only *JAK2* wild-type, the discrepancy between *JAK2*V617F allelic ratios in gDNA ($\neq$ 1:4 in favor of WT alleles) and cDNA (1:24 in favor of V617F alleles) implied a mRNA expression at least 96-fold ($\neq$ 4 x 24) higher for recombinant *JAK2*V617F alleles in V617F/V617F cells than for *JAK2* wild-type alleles in WT/WT cells. Of note, a high *JAK2* expression may not be rare in the context of myeloid stimulation: up to 3000 *JAK2* mRNA copies/100 *ABL* mRNA copies have been observed both in MPN and in reactive states.⁴

Supplemental Table 3. Sequences of primers used for AS-qPCRs and sequencing.

	Primer sequence (5' → 3')
<i>rs12343867 AS-qPCR primers/probe (JAK2 intron 14)</i>	
Forward primer	GCGGAGATTATGGCAGGTTCAACATAA
Reverse (T)	CGCGGCGGATCTAGTATCATATCAAC <u>A</u>
Reverse (C)	CGCGGCGGATCTAGTATCATATCAAC <u>G</u>
Probe	CTGGCCTTTTCAGTACAAACTTATCTGGAA
<i>Primers (JAK2 rs12343867 intron 14)</i>	
Forward JAK2 V617F	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGT <u>T</u>
Forward JAK2 (L611)	CGGCGTTTCTCACAAGCATTGGTTT
Reverse (C)	CGCGGCGGATCTAGTATCATATCAAC <u>G</u>
Reverse down stream rs12343867	CAAGGTGCAATAAAATGAGGCATGCC
<i>JAK2V617(F) AS-qPCR primers/probe (exon 14)</i>	
Forward JAK2 V617 sense	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGT <u>G</u>
Forward JAK2 V617F sense	GCGCGGTTTTAAATTATGGAGTATGT <u>T</u>
Reverse JAK2 V617(F)	GCGGTGATCCTGAAACTGAATTTTC
Probe	TGGAGAGGAGAGTAAGTAAACTACAGGCT
<i>ABL qPCR primers/probe</i>	
FwABL	TCTCAGGTGAAAAGCTCCGG
RevABL	GATGTAGTGTCTGGGACCCA
Probe	CATTTTGGTTTGGGCTTCA CACCATT
<i>RPLP0 qPCR primers/probe</i>	
FwRPLP0	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACTGG
RevRPLP0	GGACACCAAGCCAAAGGAGA
Probe	GACAAAGTGGGAGCCAGCG
<i>Primers for JAK2 genotyping and sequencing (exons 13 to 15)</i>	
Forward ex14 int14	CCTTAGTCTTTCTTTGAAGCAGCAAG
Reverse ex14 int14	CATGGGGTACGATTATCTTTTAGTAGTTTC
Fw in13in14	GTG TTA TGG GTC AAG CCT GTT T
Rev in13in14	GCA ATA AAA TGA GGC ATG CCT G
Fwin12in13	GTC AGA TAT TCT GCC TCT GCA G
Revin12in13	CAT GCT TAG TGA AAT CTA GAT GCC T
Fwin14in15	GGA GCT AGA ACT CAA ATT CTC CTT T
Revin14in15	TCT TCT CTG TCA ACA CCG C
SeqFwint12	GTG TGC TAG TAG GAA AGG C
SeqRevint13	CTG TGT AAC CCA TAA AGC TC
SeqFwint13	CCT GTA CCA CTC TTG CTC TC
SeqRevint14	AGT AGT TTC TGT GAA CAC C
SeqFwint14	CTT CAG GAA GGT TTG AAT G
SeqRevint15	GCC CAA AAA TAC AGA AGC AC
<i>Primers for GNE genotyping</i>	
Fw rs1887522 / rs6476541	GAC AAG GAT TTG AAG GCA TTT GGA TG
Rev rs1887522 / rs6476541	CAG TTG TTG AGA ACC ACT GAT CTA GTT C
Fw rs4878646	ATC TCT GAG CCT CAG TTT CCT CAT
Rev rs4878646	CCA ACT TTC ACT TTT TAA ATG TAG CCT GTG A
<i>Primers for entire JAK2 cDNA sequencing</i>	
Fw cDNA 1	ATGGGAATGGCCTGCCTTACGATGA
Rev cDNA 1	GCCATCCCAAGACATCTTCCTGTGTTCA
Fw cDNA 2	TCGAGGTGCTGAAGCTCCTCTTCTTGATGA
Rev cDNA 2	CCTCACCTGAAGGACCACTTCCAGGTT

Fw cDNA 3	AGCCAATGCAAAGCCACTGCCAG
Rev cDNA 3	CAAGCACGGCTGGAGGTGCTACTTC
Fw cDNA 4	CTCATTAAGGGAAGCTTTGTCTTTCGTGTC
Rev cDNA 4	GTACATCAGAAACACCATTCGTTCTGAAGAC
Fw cDNA 5	TACCAGATGGAACTGTTTCGCTCAG
Rev cDNA 5	CTAGTGATCCAAATTTTACAACTCCTGAACCA
Fw cDNA 6	GAAGCAGCAAGTATGATGAGCAAGC
Rev cDNA 6	GGCCTGAAATCTGGTTCATAATCCATATCAAT
Fw cDNA 7	GGGAAATCTGCAGTGGAGGAGAT
Rev cDNA 7	CACTGTAGCACACTCCCTTGTACTTTAC
Fw cDNA 8	TTCAGCATAGTACTGAAGAGCACCTAAGAG
Rev cDNA 8	CGCTGGTGGACTTTTACTCTTCTCAAT
Fw cDNA 9	CCAGAATCACTGACAGAGAGCAAG
Rev cDNA 9	TCATCCAGCCATGTTATCCCTTATTTGAT
<i>Primers for JAK2 gene sequencing</i>	
Fw exon3	CTCCAATTCTGGGCTCAAG
Rev exon3	CATGTGAAAACACACACGCC
Fw exon4	TCGACTGCTATTACATTTTGTTC
Rev exon4	GTGCTAACTAATTGGTTCAGGTATC
Fw exon5	AGTGTTATCCACATATCCTTTTGTC
Rev exon5	CAAGACAGAACTGCAATTTTCC
Fw exon6	TGGCCAATTTGTATCTTGTAATG
Rev exon6	CAAAAGGCATGGGTAAACAC
Fw exon7	TTGGCCACTGTGTGTAAGG
Rev exon7	GGAGAAGTGCAATACCATGTTG
Fw exon10	CCCTTGAAGTGGTTTGAACCTAC
Rev exon10	TTGTACAGAATCTCTGAGGAAATTAAG
Fw exon15	TTCTTTAAAGTTGTGAGTTTGCC
Rev exon15	GACTATTTTACATGAATTGGCATCC
Fw exon18	TGCTCTGGATCTCAAAGAGTAAG
Rev exon18	AGGGCCCAAATGACATCAAG
Fw exon19	AACTCACGATTATTTTGGTCAAC
Rev exon19	CAAGCACTCCTTAAATGTTGTAG
Fw exon20	GACAGTCTGCTAATTCAGCTAC
Rev exon20	CATTGGCATAAGTCCAGATCG
Fw exon22	TGCTGTAGATGAAGCAACCG
Rev exon22	AGCATATGCCATTTTCCAC
Fw exon23	GCCTGCTGTGATAACTCTTTTCTC
Rev exon23	GGTGGATACCCTAAAAGCTCTG
Fw exon25	CATGGTTATGACATGTGCCC
Rev exon25	TCATTAATGTCTTTTACTGGTGGC

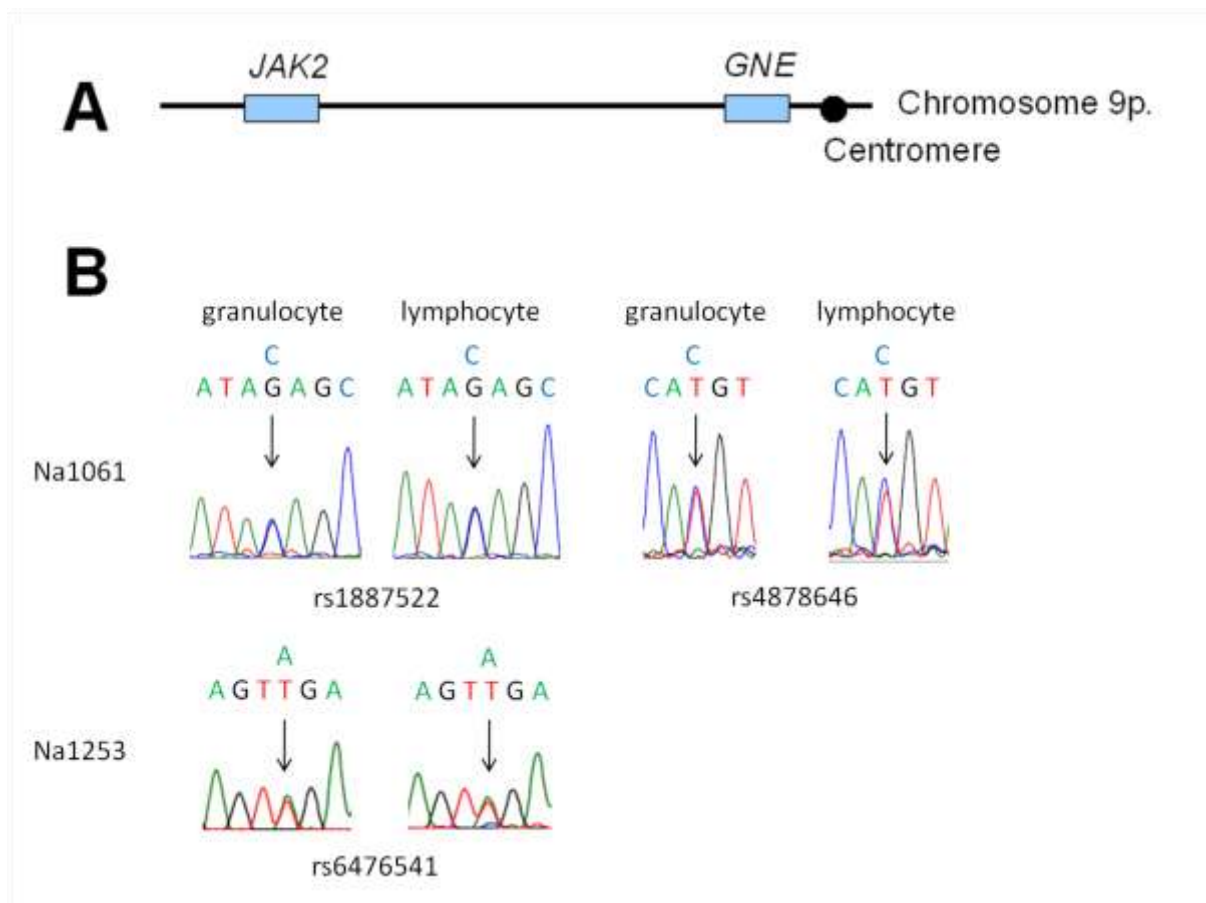
Supplemental Figure 1.



Supplemental Figure 1. Sense and anti-sense *JAK2*V617(F) allele-specific quantitative PCR (AS-qPCR) assays and rs12343867(C/T) PCR assays.

A: The sense and anti-sense *JAK2*V617(F) AS-qPCR assays were performed as described earlier.⁴ 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*. These AS-qPCR assays are specific, reproducible and sensitive, detecting 0.5% of V617F 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 *JAK2*; WT and rs12343867 reverse primers; and a common probe, was designed to characterize patients as WT, heterozygous or homozygous for the rs12343867 polymorphism characteristic of the 46/1 or “GGCC” haplotype of chromosome 9p.⁵ To determine whether V617F was *in cis* with the rs12343867 polymorphism, we used PCR with the sense *JAK2*V617F-specific forward primer and a reverse primer in intron 14 down-stream of rs12343867. PCR products were genotyped using AS-qPCRs specific for rs12343867. AS-qPCR results showed that $\geq 99.8\%$ of the V617F mutations were on C-alleles for Na1061, whereas $\geq 97\%$ of V617F mutations were found on T-alleles for Na1253. Sequences of primers and probes are provided in Supplemental Table 3.

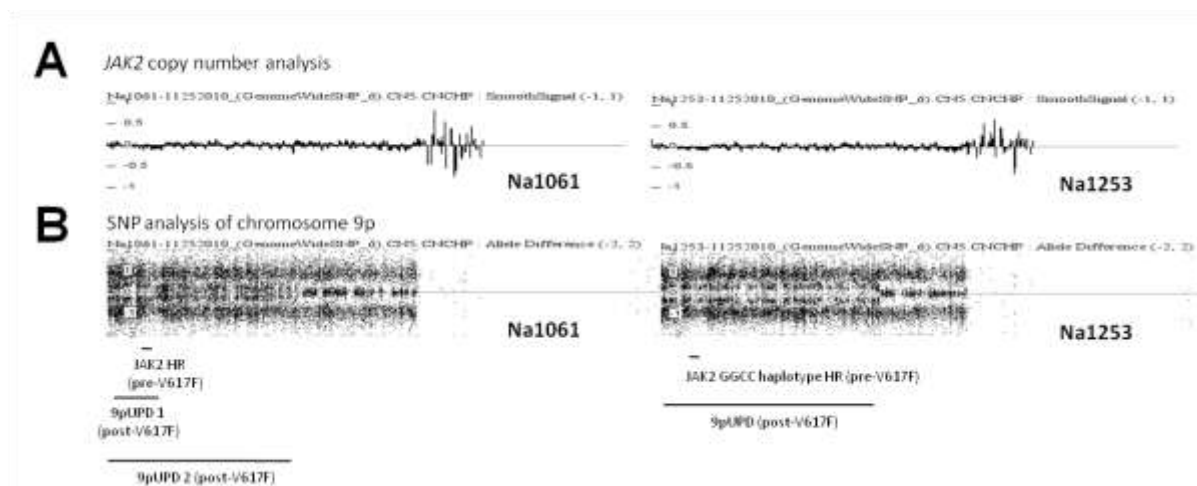
Supplemental Figure 2.



Supplemental Figure 2. Genotyping of the *GNE* gene by direct sequencing of three *GNE* SNPs

A: Schematic representation of chromosome 9p: The *JAK2* and *GNE* genes are represented by blue boxes. The *GNE* gene is close to the centromere of chromosome 9 and thus is expected not recombined in case of partial 9pUPD. **B:** Results of analyses by direct sequencing of *GNE* SNP *rs1887522*, *rs6476541* and *rs4878646* allelic ratio in granulocyte and lymphocyte gDNA of patients Na1061 and Na1253. CD3+ lymphocytes are used as a control healthy (non-PV) cells. Black arrows indicate the different SNPs. Both patients were found heterozygous for SNP in both granulocytes and CD3+ lymphocytes, thus confirming absence of recombination of the *GNE* gene.

Supplemental Figure 3.



Supplemental Figure 3. Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 array analysis of granulocyte gDNA of patients Na1061 and Na1253.

A: JAK2 copy number analysis: Copy number analysis showed no duplication or deletion on chromosome 9p for both patients. **B:** Representation of SNP allelic differences: SNP array analysis of chromosome 9p revealed 2 partial 9pUPDs for Na1061 and 1 partial 9pUPD for Na1253, represented by black lines, according to the distortion of SNP allelic differences. For both patients the distortion of SNP allelic differences due to homologous recombination was higher at the telomeric end than in the centromeric region of chr. 9p. For Na1061, 9pUPD was observed for two distinct subclones with a cumulative 9pUPD region where both clones overlapped. The first 9pUPD is 5.7 Mb long and includes the JAK2 gene (9pUPD 1); the second 9pUPD is 24.54 Mb long (9pUPD 2). For Na1253, the 9pUPD is 28.24 Mb long. Pre-JAK2 homologous recombination is represented by a black line noted JAK2 HR.

Conclusions :

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois, chez deux patients atteints de PV, la présence d'une recombinaison homologue de *JAK2*WT survenant avant l'acquisition de la mutation *JAK2*V617F. L'acquisition de la mutation V617F a été suivie d'une seconde recombinaison homologue plus large (9pUPD) chez ces deux patients. Il semble que la répétition des recombinaisons homologues conduit à une dérégulation de l'expression de *JAK2*. En effet, nous avons pu noter une augmentation importante de l'expression de *JAK2* au niveau ARNm (> 3000 copies de *JAK2* / 100 ABL ; moyenne d'expression de *JAK2* dans la PV : 300 copies de *JAK2* / 100 ABL). Les deux patients étudiés dans ce travail correspondent à des cas atypiques de PV dans le sens où leur charge allélique de *JAK2*V617F est inférieure à 30%. De plus, ces deux patients présentent des clones ayant subi une recombinaison de type 9pUPD (par des études de SNP array, deux clones ont pu être mis en évidence pour Na1061, un clone pour Na1253). Pour le moment, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autres cas similaires.

Ce mécanisme de recombinaison homologue du gène *JAK2*WT correspond donc soit à un mécanisme rare ne concernant que quelques patients atteints de PV, soit à un mécanisme difficile à mettre en évidence avec les techniques dont nous disposons actuellement. En effet, pour que l'étude soit possible, il faut avoir à disposition des échantillons d'ADN génomique de granuleux (cellules malignes) et de cellules témoins non malignes (lymphocytes CD3+, cellules non hématopoïétiques...), de préférence au moment du diagnostic. De plus, il faut trouver des patients ayant une PV avec une charge allélique « faible » (<40%) et être en présence d'un clone recombiné en *JAK2*WT détectable.

Ce travail met en évidence l'importance de la mesure du taux de *JAK2* total et *JAK2*V617F au niveau du cDNA. En effet, la charge allélique peut être radicalement différente entre l'ADN génomique et l'ADN complémentaire comme nous avons pu le mettre en évidence dans une autre étude (voir [paragraphe IV-1-2](#)). Il apparaît donc clairement que plusieurs processus pathologiques peuvent aboutir à une PV. En effet, de nombreuses mutations de *JAK2* sont décrites, notamment dans les exons 12 et 14, alors que d'autres cas de PV ne présentent aucune mutation de *JAK2*. De plus, il semble que toutes ces mutations n'ont pas exactement les mêmes effets sur les voies de signalisation intracellulaire Jak2 dépendantes. Cependant, la constante observée reste la nécessité de déréguler l'expression et la fonction de *JAK2* (niveau d'ARNm, niveau d'expression protéique, niveau de phosphorylation de la protéine). Une autre possibilité d'altérer l'activité de Jak2 peut se faire par l'intermédiaire de ses cibles telles

que les récepteurs aux cytokines et notamment le niveau d'expression de Mpl, diminué chez une partie des patients atteints de SMP (voir paragraphe IV-1-2).

IV-1-2 Article 2: *JAK2* mRNA expression levels reflect Mpl/Jak2 function in myeloproliferative neoplasms better than the *JAK2*V617F allelic ratio.
(Vilaine et al., en préparation)

La mesure d'une charge allélique supérieure à 50% de *JAK2*V617F est un marqueur classique de la Polyglobulie de Vaquez (*Theocharides et al.*, 2007 Blood; *Beer et al.*, 2010a Blood). Ce pourcentage de mutant est expliqué par la présence d'un clone malin homozygote pour *JAK2*V617F chez plus de 60% des patients atteints de PV (*Klampft et al.*, 2011 Blood). L'existence de ce clone homozygote est liée à un évènement de recombinaison homologue de type disomie uniparentale qui abouti à la formation de deux cellules filles, l'une homozygote pour *JAK2*V617F et l'autre homozygote *JAK2* sauvage. Ce mécanisme de disomie uniparentale permet ainsi l'amplification de la mutation V617F dans une cellule maligne. Classiquement, ce clone devient alors majoritaire par rapport aux autres cellules. L'haplotype 46/1 a été rapporté en 2009 comme prédisposant à l'acquisition de mutation de *JAK2* sur le même allèle que l'haplotype 46/1. De plus, la fréquence observée de l'haplotype 46/1 se trouve augmentée dans la PV, probablement due à la fréquence élevée de la 9pUPD.

Nous avons entrepris de déterminer la fréquence congénitale de l'haplotype 46/1 dans une cohorte de patients atteints de SMP. Afin de déterminer la fréquence congénitale de l'haplotype 46/1 chez 34 patients atteints de PV, nous avons étudié en parallèle les granulocytes (cellules malignes) et les lymphocytes (cellules saines). Nous avons mis au point des PCR quantitatives spécifiques d'allèles pour deux polymorphismes caractéristiques de l'haplotype 46/1 (rs10974944 pour l'intron 12, rs12343867 pour l'intron 14) afin de déterminer le génotype des cellules des patients. De plus, pour 15 des 34 patients, nous avons réalisé des études de SNP array pour confirmer la présence et la taille des 9pUPD des clones malins.

En nous basant sur une première étude réalisée par notre équipe qui a montré que l'on pouvait observer des variations entre les charges alléliques mesurés dans l'ADNg et l'ADNc (*Lippert et al.*, 2006 Blood), sur l'étude des deux cas de PV ayant une charge allélique plus élevée dans l'ADNc que dans l'ADNg suite à deux recombinaisons homologues consécutives de *JAK2* (une première recombinaison homologue de *JAK2* sauvage précédant l'acquisition de la mutation *JAK2*V617F, suivie d'une seconde recombinaison de type 9pUPD) (Vilaine et al., 2011 Blood) et sur la communication orale lors de l'ASH 2011 sur l'influence de l'allèle 46/1

sur le niveau d'expression de *JAK2* (l'allèle porteur de l'haplotype 46/1 serait plus exprimé que l'allèle sauvage) (Schram et al., Abstract 124, Session 634), nous avons également essayé de déterminer le niveau d'expression de *JAK2* au niveau ARNm pour voir l'impact de l'haplotype 46/1 et des recombinaisons post-V617F (9pUPD).

Enfin, nous nous sommes intéressé au couple Mpl/Jak2 qui est très important dans l'hématopoïèse myéloïde. En effet, Jak2 est connue pour être une protéine chaperonne de Mpl permettant ainsi, sa maturation et son expression à la membrane (*Tong et al.*, 2006 JBC). Nous avons tout d'abord analysé des lysats de plaquettes de patients afin de déterminer les niveaux d'expression des deux formes de Mpl (voir paragraphe I-4-3 de l'introduction). Nous avons également corrélié ces niveaux d'expression au niveau d'expression de *JAK2* sauvage, muté et total au niveau ARNm. Pour les études *in vitro*, nous avons choisi de travailler dans des lignées cellulaires hématopoïétiques humaines afin de nous rapprocher du contexte protéique des patients. Nous avons sélectionné différentes lignées exprimant soit la forme sauvage de Jak2 (les cellules TF-1), soit la forme muté Jak2V617F (les cellules HEL et UKE-1) (*Fiedler et al.*, 2000 American Cancer Society; *Quentmeier et al.*, 2006 Leukemia). De plus, ces cellules permettent l'expression du récepteur Mpl endogène. Cela sous-entend que toute la machinerie protéique nécessaire à la production, l'expression à la membrane et au bon fonctionnement de Mpl est disponible dans ces lignées cellulaires (*Clausen et al.*, 1997 Leukemia; *Mignotte et al.*, 1996 Stem Cells). En effet, les facteurs de transcription Gata1 et Ets sont connus pour être exprimés dans les cellules HEL et sont indispensable à l'initiation de la transcription de l'ARNm de *MPL*.

JAK2 mRNA expression levels, reflection of Mpl/Jak2 function

Mathias Vilaine¹, Ashot Harutyunyan², Cédric Cleyrat^{1,3*}, François Girodon⁴, Marjorie Boissinot^{1**}, Eric Lippert⁵, Victor Gourain¹, Irène Dobo⁶, Bridget Wilson³, Robert Kralovics², Isabelle Corre¹, Sylvie Hermouet^{1,7}

¹INSERM UMR 892, CNRS UMR 6299, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, Nantes, France; ²Center for Molecular Medicine (CeMM) of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria; ³Department of Pathology and Cancer Center, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM, 87131 USA; ⁴Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France; ⁵Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Bordeaux, France; ⁶Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France; ⁷Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.

*Present address: Department of Pathology and Cancer Center, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM, USA; **Present address: Section of Oncology and Clinical Research, Leeds Institute of Molecular Medicine University of Leeds, St James' Hospital, Leeds, United Kingdom.

Correspondance to : Sylvie Hermouet, INSERM UMR892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France.

Phone : +33 (0)2 28 08 03 30 ; Fax : +33 (0)2 28 08 02 04; E-mail : sylvie.hermouet@univ-nantes.fr

Keywords: *JAK2*V617F burden/myeloproliferative neoplasms/mRNA expression/cDNA/homologous recombination/46/1 haplotype of *JAK2*/9pUPD

Abstract

The level of activity of the Mpl/Jak2 “pair” is critical for myeloid cell proliferation, which raises the issue of the level of expression of mutant *JAK2* and *MPL* genes in myeloproliferative neoplasms (MPNs). The present study confirmed variability in *JAK2* mRNA expression, revealing >30% discordance between DNA and cDNA *JAK2*V617F allelic burdens for 19/54 (35.2%) MPN patients tested. The impact on *JAK2* mRNA expression of 46/1 haplotype status and 9p uniparental disomy (9pUPD), a post-V617F recombination of *JAK2*, was investigated using purified granulocytes and T-lymphocytes from 34 polycythemia vera patients. T-lymphocyte homozygosity for the 46/1 haplotype was found in 8/34 (23.5%) patients, a high proportion compared to controls (1/38 (2.6%), $p=0.0074$). However, *JAK2* mRNA expression was not affected by 46/1 haplotype status, nor by 9pUPD. *JAK2*WT mRNA levels >200/100 *ABL* mRNA copies were associated with presence of the long (84 kDa), mature, functional form of Mpl. In *JAK2*V617F-homozygous HEL and UKE-1 cell lines, which express mainly immature (74 kDa) Mpl, transfection of *JAK2*WT augmented the ratio of mature:immature Mpl. Transfection of *JAK2*V617F also increased levels of mature Mpl but less efficiently. In summary, *JAK2* (WT±V617F) mRNA expression levels may reflect Mpl/Jak2 function better than *JAK2*V617F allelic ratios measured in DNA.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) consist of three distinct clonal diseases, polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). They are characterized by the presence of activating mutations in genes encoding for two molecules critical for myelopoiesis: the tyrosine kinase Jak2, mutated in >60% MPNs, and Mpl, the Jak2-coupled receptor for thrombopoietin (Tpo), mutated in 5-10% ET and PMF.¹⁻⁵ Adequate function of the Mpl/Jak2 “pair” is required for the maintenance of normal myelopoiesis, and alteration of Mpl/Jak2 function via changes in expression or activity leads to deficient or excessive production of myeloid cells. There is evidence of congenital predisposition to dysfunction of the Mpl/Jak2 pair due to mutation acquisition. A common haplotype of *JAK2*, the 46/1 haplotype of chromosome 9p (chr. 9p), was found associated with a predisposition to MPNs and to the acquisition of activating mutations in the *JAK2* gene on the same allele; with pre-disposition to MPNs independently of *JAK2* mutation; to MPNs with activating *MPL* mutations; to splanchnic vein thrombosis (SVT); and to inflammatory bowel disease (IBD).⁶⁻¹¹

Whereas the 46/1 haplotype is common, with a proportion of heterozygous and homozygous individuals of 46.0% and 6.0% respectively (HapMap ss18834954, European population), MPNs, SVT and IBD are all rare diseases, which implies that other, undetermined factors or genetic events are required for individuals carrying the 46/1 haplotype to develop these diseases.

Obviously, adequate Mpl/Jak2 function requires sufficient expression of both proteins. Surprisingly, Mpl levels are frequently low in MPNs.¹²⁻¹⁴ The Mpl receptor is first produced as an unglycosylated form (around 68 KDa) bound to Jak2. Then Mpl is partially glycosylated in the endoplasmic reticulum (ER) before transfer in the Golgi apparatus (immature form of Mpl of 74 KDa). After Golgi processing, Mpl is expressed as a mature form (84 KDa) and exported to the cell surface membrane. Tpo, the ligand of Mpl, is a critical regulator of early hematopoiesis and of megakaryocytopoiesis.^{15,16} A chronically high expression of Mpl and Jak2 would enhance hematopoietic progenitor survival and growth in response to Tpo and other hematopoietic cytokines, subsequently facilitating the acquisition of additional genetic events, resulting in turn in further increased cell growth. The molecular diagnostic work-up of MPNs includes the detection of mutations in the *JAK2* and *MPL* genes but for technical reasons, Jak2 and Mpl protein expression is not studied in a clinical context. The allelic burden in the activating *JAK2*V617F mutation (%*JAK2*V617F) in gDNA is often measured, typically in genomic DNA (gDNA). It is established that the %*JAK2*V617F correlates with leukocyte and neutrophil counts.¹⁷ In contrast, clinical studies reported opposite conclusions

on the presence or absence of correlations between %*JAK2V617F* and platelet counts, hematocrit, arterial and venous thrombotic events, or leukemic transformation.¹⁸⁻²⁴ Thus, eight years after the discovery of *JAK2V617F*, the interest for prognostic purposes of %*JAK2V617F* assessed in gDNA remains controversial.

Moreover, *JAK2V617F* may be present in only a fraction of MPN clonal cells, and *JAK2V617F*-mutated clones do not necessarily expand, which implies that the presence of *JAK2V617F* is not always sufficient to induce a MPN phenotype.²⁵⁻²⁷ One possibility is that the level of expression of the mutated *JAK2* (or *MPL*) alleles might be low for subsets of MPN patients.

As established for *Mpl* proteins, there is evidence in MPNs of variable expression of wild type and *V617F*-mutated *JAK2* at the mRNA level, and we recently reported two PV cases with %*JAK2V617F* much higher in cDNA than in DNA.^{17,28} Both cases were associated with two consecutive homologous recombinations involving the *JAK2* gene, including pre-*V617F* homologous recombination and uniparental disomy of chromosome 9p (9pUPD). 9pUPD is a post-*V617F* mutation homologous recombination of chromosome 9p that involves the *JAK2* gene; it is frequent in PV and in PMF and leads to homozygous *JAK2V617F* status, hereby facilitating clonal expansion and resulting in a high *JAK2V617F* burden.²⁹⁻³¹ However, MPN cells could also achieve *JAK2V617F* homozygous status via congenital homozygosity for the 46/1 haplotype and mutation in each *JAK2* allele. As *Jak2* is the main regulator of *Mpl* expression, up-regulation of the expression of *JAK2* genes is one mechanism potentially responsible for increased function of the *Mpl/Jak2* pair and expansion of *JAK2V617F*- or *MPL*-mutated progenitors.^{32,33} Recently, a high mRNA expression of *JAK2* genes located on 46/1 alleles has been suggested.³⁴

In the present study, our aim was to find new ways to estimate *Mpl/Jak2* function in MPNs. We selected MPN patients with a wide range of expression of both *Mpl* proteins and *JAK2V617F* burdens measured in gDNA, and analyzed %*JAK2V617F* in gDNA and in cDNA. We then investigated the underlying mechanisms that may regulate *JAK2* and *Mpl* expression in MPNs, such as the 46/1 haplotype and DNA recombination involving the *JAK2* locus (9pUPD).

Materials and Methods

Patients. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. One hundred and seventy-eight MPN patients (94 PV, 58 ET, and 26 PMF) and 34 SVT (8/34 with MPN) diagnosed according to the 2008 World Health Organization criteria, 57 controls with secondary erythrocytosis (SE), idiopathic erythrocytosis (IE) or reactive thrombocytosis (RT), as well as 40 healthy donors (HD) were examined. Patient characteristics are presented in Supplemental Table S1.

Cell lines. Human HEL and murine Ba/F3-EpoR cells were grown in RPMI and 10% foetal calf serum (FCS). Human UKE-1 cells (kindly provided by Dr. Walter Fiedler (Hamburg, Germany)) were grown in RPMI, 10% FCS, 10% horse serum and 10 μ M hydrocortisone. The human TF-1 cell line was grown in RPMI, 10% FCS and 2 ng/mL GM-CSF.

Cell, gDNA and cDNA preparations. Blood granulocytes were isolated from the lower interphase of a Ficoll density gradient and CD3⁺ T-lymphocytes were purified as previously described.^{17,28} Cells pellets were kept in 500 μ l Trizol (Invitrogen, Frederick, MD) and stored at -80°C until mRNA extraction. Genomic DNA and complementary DNA (cDNA) were prepared using QiaAmp DNA mini-kit (Qiagen, Valencia, CA) and Trizol reagent (Invitrogen).^{17,28}

cDNA constructions. Construction of plasmids coding for human, wild type *JAK2* (*JAK2WT*) and *JAK2V617F* have been described.^{27,35,36} Human *MPL* cDNA construction was a gift from Dr. Radek Skoda (Basel, Switzerland). All constructions were checked by sequencing.

Transient transfections. Transient transfections of HEL, UKE-1, Ba/F3-EpoR and TF-1 cells were performed using pcDNA3.1 constructions containing *JAK2WT*, *JAK2V617F* or *MPL* cDNA, and the Amaxa Nucleofector device (Amaxa, Cologne, Germany).

JAK2 allele-specific quantitative PCR (AS-qPCR) assays. In a first series of experiments, AS-qPCR assays specific of rs12343867, a marker of the 46/1 haplotype located in intron 14, were performed on granulocyte gDNA to assess the 46/1 status of patients.²⁸ In parallel, the *JAK2V617F* mutation was quantified in gDNA and in cDNA using *JAK2V617F* AS-qPCR assays, as described elsewhere.^{18,26,28} For *JAK2* mRNA expression analyses, qPCR assays specific for *JAK2V617F* and *ABL* cDNA were used.^{17,28} 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: $r=0.77$, $p=0.04$). JAK2 mRNA levels were measured in blood granulocytes of all patients.

Detection of 9pUPD. We used the Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) in gDNA samples according to the manufacturer's instructions. The raw data were analyzed using the Genotyping Console version 4.1.2 software (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Preparation of platelet and lysates. Platelet-rich plasma, obtained after centrifugation of blood samples at 100g for 10 min, was diluted in PBS, 1% EDTA and centrifuged at 800g for 10 min at room temperature. Platelet pellets were then frozen at -80°C . After thawing on ice, platelet and cell pellets were lysed in lysis buffer consisting of Tris 20 mM pH 7.5, NP-40 1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, MgCl_2 5 mM, Na_3VO_4 2 mM, PMSF 1 mM, aprotinin 2 $\mu\text{g/ml}$, leupeptin 2 $\mu\text{g/ml}$. Detergent-insoluble material was removed by centrifugation (4°C , 30 min, 12 000 rpm). Proteins concentration was determined using the BCA method (Pierce, New York, NY, USA).

Immunoblotting. 200 μg of platelet and 20 μg of cell lines proteins were subjected to a 7.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred onto a PVDF membrane (Immobilon, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). After membrane blocking in PBS, 5% dry non-fat milk, Mpl expression was studied using antibody (Ab) raised against the C-terminus of human Mpl. Detection was by chemiluminescence according to the manufacturer (ECL detection Kit, Roche, Meylan, France). Membranes were then stripped with Restore Buffer (Pierce, France) and re-incubated with anti-gpIIb antibody to normalize for protein platelet loading.

Antibodies. Polyclonal anti-thrombopoietin receptor c-Mpl Ab, raised against the C-terminus of human c-Mpl (Amino Acid 615-628), was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Monoclonal anti-human CD36 and monoclonal anti-human gpIIb (CD41) Ab were from Serotec (Oxford, UK) and Immunotech (Coulter, Marseille, France), respectively. Anti-phospho-Jak2 (Tyr1007/1008) (3776) Ab was purchased from Cell Signalling (Danvers, MA, USA). Anti-Jak2 (sc-294) Ab was from Santa Cruz. Anti- β -actin (MAB1501R) Ab was from Millipore.

Statistical analysis. We used the Mann-Whitney test, the Student's *t*-test and the Chi-2 square test to investigate differences in parameters or groups of patients, and Pearson's rank correlation test to analyze potential relationship between JAK2 mRNA levels, %JAK2V617F and blood cell counts. All statistical analyses were performed with Prism 4 (GraphPad software Inc, CA, USA). $P<0.05$ was statistically significant.

Results

Discordance between %*JAK2*V617F measured in gDNA and in cDNA in polycythemia vera

We described PV cases with two consecutive recombinations of the *JAK2* gene, high *JAK2* mRNA expression (3333 and 3744 total *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies), and higher %*JAK2*V617F in cDNA (>96%) than in gDNA (20.7-30.0%).²⁸ Other previous studies had indicated that for some patients, the %*JAK2*V617F was different in gDNA and cDNA.¹⁷ We measured %*JAK2*V617F in parallel in gDNA and cDNA of granulocytes purified from blood of 54 patients using AS-qPCRs (Figure 1): gDNA %*JAK2*V617F and cDNA %*JAK2*V617F correlated well ($n=54$, $r^2=0.816$, $p=0.0073$) (Figure 1A), as previously reported.¹⁷ However, 19/54 (35.2%) patients showed a variation >30% between the %*JAK2*V617F measured in gDNA and the %*JAK2*V617F measured in cDNA (Figure 1B). For 13/19 (68.4%) patients, the %*JAK2*V617F was higher in cDNA than in gDNA. Among these 13 patients, only 1 had >50% *JAK2*V617F in gDNA, 8 (61.5%) had 20-50% *JAK2*V617F in gDNA, and 4 (30.8%) had <20% *JAK2*V617F in gDNA. Thus, it is not rare for PV patients to have a higher *JAK2*V617F burden in cDNA than in gDNA; the patients concerned are mostly those with <50% *JAK2*V617F in gDNA.

Variability in *JAK2* mRNA expression in polycythemia vera

In our previous studies, the range of *JAK2* copy numbers found in purified granulocytes of PV and ET patients varied from 4 to 2800 for wild type *JAK2*, from 0 to 3571 for *JAK2* V617F, and from 4 to 3744 for total *JAK2*.^{17,28} For instance, 39/200 (19.5%) patients had >1000 total (WT+V617F) *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies in granulocytes, and 17/200 (8.5%) had >1000 *JAK2*V617F/100 *ABL* mRNA copies while 10/200 (5%) had >1000 wild type *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies. Inversely, 47/200 (23.5%) patients had <200 total *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies in granulocytes. We measured WT and V617F-mutated *JAK2* mRNA levels in 21 additional PV patients (Table 1). In this new series, no patient had >1000 *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies, whereas 9/21 (42.8%) patients expressed <200 *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies. For PV patients with >50% *JAK2*V617F in gDNA, 4/7 (57.1%) expressed total *JAK2* at low levels (<200 total *JAK2*/100 *ABL* mRNA copies). Thus, patients with high %*JAK2*V617F in gDNA may present low *JAK2* mRNA levels, while others with low %*JAK2*V617F in gDNA express *JAK2* mRNA at very high levels.

Impact of 46/1 haplotype status on *JAK2* mRNA expression and blood parameters

Supplemental Tables S2 and S3 show the frequency of the rs12343867 (C instead of T) allele, a marker of 46/1 haplotype, as assessed in granulocyte (clonal) gDNA from groups of patients examined at the time of diagnosis. In our cohorts, the frequency of the 46/1 haplotype was determined to be 58.8% for ET, 57.7% for PMF, and 44.1% for SVT, thus not significantly different than the frequency found in controls (44.7%) or reported in healthy individuals (52.0%). In contrast, the frequency of rs12343867 was significantly high for PV patients: 67.9%, $p=0.0001$ vs controls and $p=0.0001$ vs healthy individuals. The frequency of rs12343867 homozygosity was also high in the PV group: 41.1%, $p<0.0001$ vs controls. Homozygosity for rs12343867 was moderately elevated in the PMF group (15.4%) but the difference was not significant ($p=0.1547$). We investigated whether homozygosity for rs12343867 and rs10974944, another marker of the 46/1 haplotype located in intron 12, was congenital or due to 9pUPD, a frequent occurrence in PV. We were able to study in parallel purified T-lymphocytes and granulocytes from 34 PV patients (Table 1). We found similarly high allelic ratios ($>70\%$) for both rs12343867 and rs10974944 in granulocytes, whereas T-lymphocytes from 12 patients carried only 50% of alleles with the rs12343867 and rs10974944, suggesting recombination in granulocytes for 12/34 (35.3%) cases, very likely 9pUPD. Of note, T-lymphocyte homozygosity for the 46/1 haplotype was not rare in our PV cohort: 8/34 PV patients (23.5%) were homozygous for rs12343867 and rs10974944 both in lymphocyte and granulocyte ($p=0.0074$). In our cohort, T-lymphocyte 46/1 homozygosity likely reflects congenital homozygosity for the 46/1 haplotype. In gDNA the mean *JAK2*V617F allelic ratios of PV patients found homozygous (C/C), heterozygous (C/T) or negative (T/T) for rs12343867 were $66.3\% \pm 23.0$, $27.6\% \pm 16.2$ ($p=0.0002$ vs C/C patients) and $35.2\% \pm 24.0$ ($p=0.0014$ vs C/C patients, $p=0.3861$ vs C/T patients), respectively. In cDNA, *JAK2*V617F allelic ratios were $72.4\% \pm 25.8$ for C/C patients ($n=10$) vs $15.5\% \pm 12.8$ for C/T patients ($n=10$, $p=0.0011$). Thus, PV patients found homozygous for rs12343867 in lymphocyte or/and granulocyte DNA were more likely to carry a high *JAK2*V617F allelic ratio in granulocytes, in both gDNA and cDNA.

We then investigated whether the 46/1 haplotype influenced *JAK2* mRNA expression on 21 PV patients with samples available for cDNA study. Comparison of wild type, V617F-mutated and total *JAK2* mRNA levels of C/C, C/T and T/T individuals, expressed as *JAK2*/100 *ABL* mRNA copy numbers, revealed no significant difference. We then studied the biological parameters of PV patients from the C/T and T/T groups, who had similar *JAK2*V617F loads. Hematocrit (Ht) and hemoglobin (Hgb) were higher in the C/T group than in the T/T group:

59.9 vs 53.0 L/L, $p=0.0057$ for Ht, and 19.3 vs 17.2 g/L, $p=0.0060$ for Hgb, respectively. White blood cell (WBC) and neutrophil counts were elevated only for PV patients with C/C genotype in granulocytes, compared to those with T/T genotype: 12.9 vs $8.0 \times 10^{12}/L$, $p=0.0063$ and 10.1 vs $5.4 \times 10^9/L$, $p=0.0047$, respectively (Supplemental Table S4).

Impact of 9pUPD on *JAK2V617F* mRNA expression

Using AS-qPCRs for the rs12343867 and rs10974944 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), we investigated the presence in clonal granulocytes of 9pUPD, a frequent occurrence in PV. We studied purified T-lymphocytes and granulocytes from 34 PV (Table 1). We found high (>70%) and similar ratios of rs12343867 and rs10974944 in granulocyte gDNA for all 34 patients, and 50% rs12343867 and rs10974944 ratios in T-lymphocyte gDNA for 12/34 patients (35.3%), indicating recombination in granulocytes in these patients. 9pUPD was also analyzed using Genome-Wide Human SNP 6.0 arrays. 9pUPD was observed for 13/15 (86.7%) patients examined, and the V617F allelic in cDNA was $\geq 20\%$. These studies confirmed 9pUPD in the 7 patients first tested by ASq-PCR and detected 9pUPD in 5 additional patients (Table 1, Supplemental Figure S1). Altogether the frequency of 9pUPD was 18/34 (52.9%) in our PV cohort, close to the frequency reported for *JAK2V617F*-positive PV patients (68.0%).³¹ Of note, 9pUPD was detectable for 13/17 (76.4%) of PV patients with %*JAK2V617F* in gDNA ≥ 50 , and 5/17 (29.4%) of patients with low (<50) %*JAK2V617F* in gDNA. The latter findings confirm that *JAK2V617F* and 9pUPD do not always ensure clone expansion.

For the purpose of analyzing the effect of 9pUPD on *JAK2* mRNA expression, PV patients were separated in 2 groups, with or without 9pUPD (Table 2, Figure 2). Of note, *JAK2V617F* mutation and 9pUPD occurred in 2 individuals without the 46/1 haplotype (T/T phenotype). As expected, the %*JAK2V617F* was significantly higher in patients with 9pUPD (65 ± 28) than in those without (22 ± 18 , $p < 0.0001$). However, WT, V617F and total *JAK2* mRNA levels were similar in groups of patients with and without 9pUPD.

Correlation analyses of biological parameters of PV patients and %*JAK2V617F* measured in DNA and in cDNA

JAK2 mRNA expression having been found independent of the *JAK2V617F* allelic ratio, whether the %*JAK2V617F* measured in gDNA is the most appropriate marker of MPN disease for clinical purposes becomes debatable. To address this issue, we analyzed correlations between blood parameters of our cohort of PV patients and %*JAK2V617F* in gDNA and in cDNA, WT, V617F and total *JAK2* mRNA levels, 46/1 haplotype status, and

presence or absence of 9pUPD. The only correlations found were between leukocytes and neutrophils and %JAK2V617F, as previously reported.¹⁷ Correlations between leukocytes and neutrophils and %JAK2V617F measured in gDNA and cDNA were comparable: leukocyte and neutrophil counts and %JAK2V617F measured in gDNA, n=22 r=0.5172 p=0.0137, and r=0.5677 p=0.0073, respectively; leukocyte and neutrophil counts and %JAK2V617F measured in cDNA, n=20 r=0.4599 p=0.0413, and r=0.5267, p=0.0205, respectively (Supplemental Tables S4, S5 and S6).

Analysis of Mpl expression in MPN patients in relation to JAK2 expression levels

Four Mpl expression patterns in MPN patients. We assessed the status of Mpl proteins in HD platelets after SDS-PAGE and immunoblotting (Figure 3A). This study confirmed that only 50% of Mpl proteins are typically present in the mature, Golgi-processed, functional form (84 kDa band in lanes for HD). This 50-50 distribution of mature and immature Mpl became our standard for comparison to proteins isolated from platelets from 81 MPN patients and 19 patients diagnosed as reactive states (SE, RT); we refer to it as Pattern 1. As shown in Figure 3, we detected three other distinct patterns related to the levels of mature and immature Mpl protein in these patient groups. In Pattern 2, the mature Mpl form was predominant or solely detected. Pattern 2 was typical of reactive states, and observed in a minority of PV and ET. In Pattern 3, we observed only immature form (74kDa) and in Pattern 4 we failed to detect any Mpl by immunoblotting. Patterns 3 and 4 were found only in MPNs. The majority of patients (63%) expressed predominantly the mature Mpl isoform, although the detection was typically at low levels. Rare cases (lane 2, ET group) had exceptionally robust mature Mpl. Notably Mpl was absent or immature in 49% of PV and 46% of ET, including JAK2V617F-negative ET. With the caveat that western blotting is semi-quantitative, we observed that mature Mpl was decreased or absent in platelets from the majority (66.5%) of MPN patients tested. Results of these analyses of Mpl expression in patients are reported in Table 3. Additional data are provided in the Supplement.

Mpl maturation is linked to JAK2WT mRNA levels. We sought an explanation for these widely varying Mpl protein expression patterns, taking into account recent evidence that Jak2 is an Mpl chaperone.^{32,33,37} Previous studies had estimated that the average JAK2WT mRNA expression level in healthy donors was 230±130 mRNA copies per 100 ABL mRNA copies.¹⁷ Thus, we next evaluated the relative levels of mRNA for JAK2WT or JAK2V617F in patient samples using quantitative PCRs. Data in Figure 3B-C-D and in Table 3 report the results, grouped according to the healthy or disease status of donors. Compared to healthy donors, total JAK2 expression was significantly elevated in all groups studied except surgery patients

(SP) and reactive thrombocytosis (RT) (Figure 3D, Table 3). It is notable that *JAK2WT* expression was significantly elevated in patients with SE and IE, whereas *JAK2WT* expression was variable to low in the MPN groups (PV and ET) (Figure 3B). Samples from RT patients, considered a secondary reaction to trauma or other health conditions, also had variable *JAK2WT* expression. Importantly, Table 3 reports the statistical analysis of *JAK2* expression levels for each subset of patients, with respect to the *Mpl* protein expression pattern. The data suggest that a threshold of *JAK2WT* (~300 *JAK2WT*/100 *ABL*) is required to support *Mpl* maturation and surface expression. Below this threshold, platelets have essentially no *Mpl* or accumulate the immature form.

Jak2WT, and to a lesser extent, Jak2V617F, promote an increase in ratio of mature/immature Mpl forms

The role of Jak2 in maturation of *Mpl* was evaluated in hematopoietic cell lines that expressed either exclusively *Jak2WT* (TF-1 and murine Ba/F3-EpoR cell lines) or *Jak2V617F*. For *Jak2V617F*, the HEL and UKE-1 cell lines were chosen based upon homozygous expression of *JAK2V617F*. As shown in Figure 4A (lane 1), the immature form is the major endogenous *Mpl* band in lysates from HEL cells transfected with empty vector. Additional lanes in Figure 4A report the distribution of the mature and immature forms of *Mpl* in a representative experiment after transient transfection with vectors for expression for *MPL*, *JAK2WT* or *JAK2V617F*. In cell lines expressing only *JAK2V617F*, *Mpl* expression and maturation were possible, implying that *Mpl* and *Jak2V617F* can interact. Co-transfection of human *MPL* and human *JAK2V617F* resulted in reduced expression of *Mpl* and *Jak2V617F* compared to cells co-transfected with *JAK2WT* and *MPL* (Figure 4A, lanes 3 and 4). In UKE-1, over-expression of *MPL* decreased the quantity of *Jak2V617F*, consistent with a degradation of the *Mpl*/*Jak2V617F* pair (Figure 4B, lane 4).

To represent a hematopoietic cell line expressing modest levels of endogenous *JAK2WT*, we focused on TF-1 and Ba/F3-EpoR cells. TF-1 leukemic cells share characteristics of early erythroid lineage and show no mature *Mpl*. Ba/F3-EpoR do not express *Mpl*. Figure 4C and 4D report western blotting results obtained in TF-1 and Ba/F3-EpoR cells after transient transfection of *MPL*, with and without *JAK2WT* or *JAK2V617F* co-transfection. HEL cells could be driven to Pattern 1 by expression of *JAK2WT*, thus faithfully recapitulating the platelet data from patients. However, in the background of endogenous *JAK2WT*, over-expression of *JAK2WT* or *JAK2V617F* increased expression levels of both immature and mature *Mpl*. Of note, *JAK2V617F* was less efficient than *JAK2WT* in increasing expression

of mature Mpl in human cells. For the studies described here, TF-1 cells served as controls for Mpl behaviour in human cells with endogenous Jak2WT.

DISCUSSION

Our study highlights the key roles played by the Mpl/Jak2 pair in myeloid disease, and provides evidence that evaluating Mpl and Jak2 together should improve understanding of MPNs. The main findings of our study are that expression of the wild-type and mutated *JAK2* genes varies in MPNs, and that expression of wild-type *JAK2* mRNA and mature, functional Mpl are linked, thus providing a way to estimate expression and function of the Mpl/Jak2 pair. Regarding *JAK2*, studying mRNA rather than protein expression levels seemed most appropriate given the current techniques: quantification of Mpl and Jak2 proteins using immunoblotting assays lacks precision; moreover, anti-Jak2 antibodies typically also recognize Jak1. Another reason to select mRNA analysis for *JAK2* was that mRNA preparations and RT-PCRs are easily performed by most diagnostic laboratories, which is not true for protein studies.

Firstly, our study showed that it is not rare to find *JAK2V617F* burdens assessed in cDNA to be significantly higher than the *JAK2V617F* burdens measured in gDNA, notably for PV patients. The patients concerned are mostly those with <50% *JAK2V617F* in gDNA. An important feature of PV highlighted by our study is that the %*JAK2V617F* and *JAK2* mRNA expression levels are independent parameters, and certain subsets of patients may express *JAK2* mRNA at very low or very high levels. In consequence, patients with a high *JAK2V617F* burden in gDNA may poorly express *JAK2V617F* mRNA, whereas subsets of patients with low *JAK2V617F* burden in gDNA may express high levels of *JAK2* mRNA, V617F or/and wild-type. Such patients appear to be a minority -about one third of patients in our series- yet on an individual basis the discrepancy between %*JAK2V617F* in gDNA and *JAK2V617F* expression level may hint to particular clinical presentation or evolution. Moreover, variable expression of the *JAK2* genes likely contributes to the discrepancies observed between the many studies that correlated %*JAK2V617F* in DNA and various clinical complications and disease outcome.¹⁸⁻²⁴ Regarding response to treatment, our data imply that measuring the %*JAK2V617F* in cDNA should be systematic before to declaring that a patient achieved complete molecular remission (became *JAK2V617F*-negative) during or after treatment with interferon alpha or Jak inhibitors. Altogether, for a better understanding of myeloid pathology, clinical evolution and studies of the response to treatment, the

%*JAK2*V617F and *JAK2* mRNA expression levels should be analyzed in parallel for complete clinical correlation studies.

Secondly, the study investigated two of the mechanisms potentially capable of altering expression of *JAK2* in one allele: the 46/1 haplotype and occurrence of homologous recombination involving one of the two copies of the *JAK2* gene. In our cohort of PV patients, neither the 46/1 haplotype nor post-V617F homologous recombination involving *JAK2* (9pUPD) had significant effect on *JAK2* mRNA expression levels. However, it remains possible that pre-V617F recombination of the *JAK2* gene leads to high *JAK2* expression for subsets of patients expressing *JAK2* at very high levels, as recently described for PV patients.²⁸ Unfortunately current technology does not allow detection of pre-V617F recombination of *JAK2* in patients with high %*JAK2*V617F in gDNA. Interestingly, the frequency of lymphocyte homozygosity for the 46/1 haplotype (C/C genotype) was found high in the PV cohort (23.5%), and the C/C genotype was found associated with a high *JAK2*V617F allelic ratio in both gDNA and cDNA. Importantly, results of the analyses of blood parameters of PV patients with similar %*JAK2*V617F according to 46/1 status suggest that the 46/1 allele status may differentially pre-dispose individuals to over-stimulate either erythropoiesis only (heterozygous 46/1 status) or granulopoiesis and erythropoiesis, less efficiently (homozygous 46/1 status), independently of the V617F mutation load. These findings need to be validated with future studies of large cohorts of patients, yet the present data are consistent with the 46/1 haplotype being associated with a pre-disposition to chronic over-response of myeloid cells to stimulation, as proposed earlier.³⁸ Chronic over-response to myeloid cell stimulation can explain the increased risk of 46/1 haplotype carriers to acquire mutations in the *JAK2* and *MPL* genes.⁶⁻¹⁰

Thirdly, we investigated links between *JAK2* mRNA levels and expression of mature Mpl. Jak2 is the main Mpl signal transducer, and it is established that for cell transformation, Jak2V617F needs to interact with homodimeric receptors such as EpoR, G-CSF-R or Mpl, and possibly with heterodimeric receptors (IL27R for example).^{32,33,37,39,40} In MPN patients, low/absent platelet expression of mature Mpl was not associated with higher platelet counts (Table 3). In MPNs, decreased expression of Mpl has been linked to post-transcriptional defects, although Horikawa et al¹⁴ described ET cases that presented an alteration of *MPL* at both the mRNA and protein level.^{14,41} In murine models of Mpl expression, low platelet levels of mature Mpl are associated with high circulating Tpo, leading to enhanced stimulation of early hematopoietic progenitors and megakaryopoiesis.^{42,43} A major difference with these models is that the majority of MPN patients simultaneously presents with low Mpl protein

levels and the *JAK2V617F* mutation, whereas mouse models of Mpl expression carry only wild type Jak2. Moreover, expression of *JAK2V617F* induces thrombocytosis in mice but in PV and ET, *JAK2V617F* is associated with lowered platelet numbers, compared to non *JAK2*-mutated patients. Hence, patient platelet counts likely reflect the combined “platelet-reducing” effect of *JAK2V617F* and “platelet-enhancing” effect of low levels of mature Mpl. Consistent with Jak2’s established role in Golgi-processing and stabilization of the mature form of cytokine receptors, we found levels of mature Mpl linked not to *JAK2V617F* but to *JAK2WT* expression levels. This confirms that Mpl and *JAK2* expression are tightly regulated.

After Tpo binding, negative regulators like Lnk or c-cbl can interact with Mpl to stop the signalling or induce its proteasomal or lysosomal degradation.⁴⁴⁻⁴⁶ Recently, Pecquet et al³⁷, who used murine *JAK2* and *MPL* constructs and stable expression of a murine cell line, showed that Jak2V617F induced the degradation of Mpl via the proteasome. In the present study, Jak2V617F clearly induced the expression of Mpl in human cells, though to a lesser extent than Jak2WT. Moreover, we confirmed in a cell line context (Ba/F3-EpoR) similar to the one used by Pecquet et al³⁷ that human Jak2V617F allows maturation of human Mpl. The differences in human/murine models and in expression systems suggest that human and murine Jak2 and Mpl proteins may not interact similarly, or that expression systems may influence the level of Mpl expression in presence of Jak2V617F. In fact, like other cytokine receptors, Mpl proteins are normally typically expressed at low to modest levels.⁴⁷ Presence of immature forms may represent cellular control methods to limit the levels of surface receptors by imposing constraints on the transit to the cell surface. A fine balance of receptor recycling and degradation of course provides another level of control, imposed upon receptors that do reach the cell surface.⁴⁸⁻⁵⁰ Finally, another regulatory way could be via the Mpl-tr protein, a natural truncated isoform of Mpl that seems to negatively regulate Mpl expression via unidentified mechanisms but potentially via the formation of Mpl/Mpl-tr heterodimers, to trigger Mpl degradation.⁵¹

In summary, expression of both Mpl and wild type and mutated *JAK2* varies in MPNs, and mRNA levels of wild type *JAK2* and mature Mpl are linked, which provides a way to estimate expression and function of Mpl and Jak2 together. The 46/1 haplotype and 9pUPD do not appear to influence *JAK2* expression. Elucidating the mechanisms that influence the tightly regulated expression of the Mpl/Jak2 pair, and describing the consequences of chronically low or high Mpl/Jak2 expression should help understand the pathogenesis of MPNs.

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. This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (comités des Départements de Vendée, du Morbihan, d'Ille-et-Vilaine, et des Charentes) and Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) to SH, Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Région Bourgogne) to FG and NIH P50GM065794 to BSW. MV, CC and MB benefited from scholarships from the French Ministry of Research (MV: 2009-2012; CC: 2007-2010; MB: 2004-2007).

Authorship: SH and IC designed research and analysed data. MV, AH, CC, MB, VG, RK, BW and IC performed research and analysed data. FG, EL and ID provided crucial patient samples. SH, MV, IC and BW wrote the paper, and CC, MB and ID helped write the paper.

References.

1. James C, Ugo V, Le Couédic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037):1144-1148.
2. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352(17):1779-1790.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464):1054-1061.
4. Levine RL, Wadleigh M, Cools J et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005; 7(4):387-397.
5. 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.
6. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009; 41(4): 450-454.
7. Jones AV, Chase A, Silver RT et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009; 41(4): 446-449.
8. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009; 41(4): 455-459.

9. Jones AV, Campbell PJ, Beer PA et al. The *JAK2* 46/1 haplotype predisposes to *MPL*-mutated myelo-proliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(22):4517-4523.
10. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM et al. The *JAK2* 46/1 haplotype confers susceptibility to essential thrombocythemia regardless of *JAK2*V617F mutational status-clinical correlates in a study of 226 consecutive patients. *Leukemia*. 2010; 24(1): 110-114.
11. Ferguson LR, Han DY, Fraser AG et al. 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*. 2010; 690(1-2):108-115.
12. 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(9):572-580.
13. Kralovics R, Buser AS, Teo SS et al. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2003; 102(5):1869-1871.
14. Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K et al. Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood*. 1997; 90(10):4031-4038.
15. 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(2): 651-656.
16. Tong W, Ibarra YM, Lodish HF. Signals emanating from the membrane proximal region of the thrombopoietin receptor (mpl) support hematopoietic stem cell self-renewal. *Exp Hematol*. 2007 Sep; 35(9):1447-1455.
17. 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(6):1865-1867.
18. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on *JAK2*(V617F) allele burden. *Leukemia*. 2007; 21(9):1952-1959.

19. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pardanani A, Tefferi A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia*. 2008 Jul; 22(7):1299-1307.
20. Antonioli E, Guglielmelli P, Poli G et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2008; 93(1):41-48.
21. 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(10):2210-2212.
22. Kittur J, Knudson RA, Lasho TL et al. Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. *Cancer*. 2007; 109(11):2279-2284.
23. Tefferi A, Gangat N, Wolanskyj A. The interaction between leukocytosis and other risk factors for thrombosis in essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;109(9):4105.
24. Passamonti F, Rumi E, Pietra D 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(9):3676-3682.
25. Kralovics R, Teo SS, Li S et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006; 108(4):1377-1380.
26. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood*. 2006; 108(5):1781-1782.
27. 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*. 2011; 24(5):1069-1073.
28. Vilaine M, Olcaydu D, Harutyunyan A et al. Homologous recombination of wild-type JAK2, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2011; 118(24):6468-6470.

29. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2002; 30(3):229-236.
30. Jones AV, Kreil S, Zoi K et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood.* 2005; 106(6):2162-2168.
31. Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood.* 2011; 118(1):167-176.
32. 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(29):27251-27261.
33. Tong W, Sulahian R, Gross AW, Hendon N, Lodish HF, Huang LJ. The membrane-proximal region of the thrombopoietin receptor confers its high surface expression by JAK2-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2006; 281(50):38930-38940.
34. Schram AM, Xu X, Kilpivaara O et al. Genetic and Functional Investigation of Germline JAK2 Alleles That Predispose to Myeloproliferative Neoplasms. *Blood* 2011 ; Abstr. 124. Myeloproliferative Syndromes: Biological Advances I. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting.
35. Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. 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. *Oncogene.* 2011; 30(8):990-1001.
36. Girodon F, Steinkamp MP, Cleyrat C, Hermouet S, Wilson BS. Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood.* 2011; 118(9):2633-2634
37. Pecquet C, Diaconu CC, Staerk J et al. Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood.* 2012; 119(20):4625-4635.

38. Hermouet S, Vilaine M. The *JAK2* 46/1 haplotype: a marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection? *Haematologica*. 2011; 96:1575-1579.
39. Lu X, Levine R, Tong W et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for *JAK2*V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(52):18962-18967.
40. Pradhan A, Lambert QT, Reuther GW. Transformation of hematopoietic cells and activation of *JAK2*-V617F by IL-27R, a component of a heterodimeric type I cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(47):18502-18507.
41. Moliterno AR, Spivak JL. Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood*. 1999; 94(8):2555-2561.
42. Tiedt R, Coers J, Ziegler S et al. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood*. 2009; 113(8):1768-1777.
43. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA et al. Ratio of mutant *JAK2*-V617F to wild-type *Jak2* determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008; 111(8):3931-3940.
44. Tong W, Lodish HF. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med*. 2004; 200(5):569-580.
45. Drachman JG, Kaushansky K. Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(6):2350-2355.
46. Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K, Hitchcock IS. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood*. 2010; 115(6):1254-1263.
47. Broudy VC, Lin NL, Sabath DF, Papayannopoulou T, Kaushansky K. Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin. *Blood*. 1997; 89(6):1896-1904.
48. Dahlen DD, Broudy VC, Drachman JG. Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs. *Blood*. 2003; 102(1):102-108.

49. Hitchcock IS, Chen MM, King JR, Kaushansky K. YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood*. 2008; 112(6):2222-2231.
50. Kaban K, Kantarjian H, Talpaz M et al. Expression of thrombopoietin and its receptor (c-mpl) in chronic myelogenous leukemia: correlation with disease progression and response to therapy. *Cancer*. 2000; 88(3):570-576.
51. Coers J, Ranft C, Skoda RC. A truncated isoform of c-Mpl with an essential C-terminal peptide targets the full-length receptor for degradation. *J Biol Chem*. 2004; 279(35):36397-36404.

Patient Id	% of JAK2 V617F allele burden			mRNA level Gra cDNA / 100 Abl			rs10974944 (intron 12)	rs12343867 (intron 14)		9pUPD	
	Gra gDNA	LT CD3+ gDNA	Gra cDNA	total JAK2	JAK2WT	JAK2V617F	% of G-allele (46/1)		% of C-allele (46/1)		
							Gra	LT CD3+	Gra		LT CD3+
Na 1242	1,6	0,5	0,9	216,1	214.1	2.0	nd	53,1	55,6	44,2	nd
Dij 1826	4,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,0	0,3	0,1	nd
Dij 1507	11,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,0	0,2	0,0	nd
Na 964	13,4	nd	8,6	349,2	319.2	30.0	nd	0,0	0,0	0,0	nd
Na 1112	14,0	nd	15,8	613,1	516.2	96.9	nd	0,0	0,0	0,0	nd
Na 991	15,0	nd	16,3	256,1	214.4	41.7	59,1	64,5	51,6	57,0	nd
Na 1007	17,0	nd	13,0	31,9	27.8	4.1	48,3	49,4	41,0	49,0	nd
Na 993	23,6	nd	31,9	180,6	123.0	57.6	55,0	55,0	51,3	44,3	nd
Na 896	19,0	nd	28,2	573,0	412.6	160.4	nd	100,0	100,0	96,6	1-28400000
Na 942	22,0	nd	41,9	102,2	59.4	42.8	nd	0,0	0,0	0,0	1-36000000
Dij 1721	24,87	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100,0	99,9	100,0	nd
Na 562	26,0	0,0	21,7	146,0	114.3	31.7	nd	0,0	0,0	0,0	not detectable
Na 890	26,0	nd	95,4	260,7	12.0	248.7	38,0	58,0	35,4	43,6	1-31500000
Na 801	28,0	nd	50,7	87,1	43.0	44.1	71,0	59,8	65,1	46,6	1-36700000
Na 783	29,0	0,0	29,4	199,4	140.8	58.6	nd	0,0	0,0	0,0	not detectable
Na 370	34,0	4,4	36,8	90,0	56.9	33.1	nd	100,0	100,0	100,0	1-28240000
Dij 1670	38,87	nd	nd	nd	nd	nd	nd	100,0	99,7	99,9	nd
Dij 1557	51,21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,0	0,1	0,0	nd
Na 737	54,0	2,7	nd	nd	nd	nd	100,0	100,0	99,8	100,0	nd
Dij 2206	57,7	nd	nd	nd	nd	nd	89,8	59,4	86,0	46,4	nd
Dij 1725	63,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,0	0,3	0,0	nd
Dij 2144	66,2	nd	nd	nd	nd	nd	86,5	58,7	92,8	65,5	nd
Na 239	67,0	11,6	85,2	582,5	86.2	496.3	84,5	70,0	90,0	36,8	1-37000000
Na 364	69,1	4,9	80,9	196,7	37.6	159.1	84,5	38,0	90,0	54,0	1-36620000
Dij 1298	69,76	nd	nd	nd	nd	nd	92,9	51,6	97,7	61,0	nd
Dij 2157	78,3	nd	nd	nd	nd	nd	93,2	39,3	97,5	30,8	nd
Na 360	84,3	15,4	86,7	197,3	26.3	171.0	6,5	35,1	5,0	43,2	1-20450000-34000000 (2 clones)
Na 1173	88,3	0,2	84,0	70,8	11.3	59.5	92,8	55,1	91,9	51,2	1-38762000 (centromer)
Na 312	89,8	5,0	86,9	Low copy	Low copy	Low copy	90,0	50,3	87,6	46,5	1-34380000
Na 1152	90,0	8,1	94,2	86,5	5.0	81.5	0,0	0,0	0,7	0,1	1-38762000 (centromer)
Na 1145	92,0	3,3	93,4	39,6	2.6	37.0	100,0	100,0	99,8	99,9	1-33400000
Na 373	94,0	4,0	nd	nd	nd	nd	99,1	99,8	97,3	97,2	nd
Na 334	96,0	4,9	99,8	67,0	0.1	66.9	99,3	61,3	97,7	55,8	nd
Na 1287	98,8	2,4	nd	nd	nd	nd	100,0	100,0	99,9	99,2	1-6480000

Table 1. Details of the results obtained on 34 patients analyzed with AS-qPCR for *JAK2V617F*, rs12343867, rs10774944 and SNP 6.0 array. The *JAK2V617F* allele burden was determine by AS-qPCR on genomic DNA or on cDNA from granulocytes at the time of diagnosis. Genotyping of rs12343867 and rs10974944 was performed in parallel on genomic DNA from granulocyte and T-lymphocyte by AS-qPCR. SNP array were performed on genomic DNA from granulocyte. Abbreviations: gDNA: genomic DNA; Gra: Granulocyte; LTCD3+: T-lymphocyte; 9pUPD: Uniparental Disomy of chromosome 9p; nd: not done; 46/1: haplotype 46/1.

	T-Lymphocyte status		
	Homozygous for CT-allele (wild type)	Heterozygous for GC-allele (46/1 haplotype)	Homozygous for GC-allele (46/1 haplotype)
% <i>JAK2</i> V617F (mean $\pm$ SD) in granulocytes	32 $\pm$ 27 (n = 10)	55 $\pm$ 31 (n = 16)	61 $\pm$ 40 (n = 4)
<i>JAK2</i> WT/100 ABL (mean $\pm$ SD) in granulocytes	192 $\pm$ 191 (n = 6)	72 $\pm$ 79 (n = 11)	157 $\pm$ 223 (n = 3)
<i>JAK2</i> V617F/100 ABL (mean $\pm$ SD) in granulocytes	57 $\pm$ 27 (n = 6)	123 $\pm$ 145 (n = 11)	77 $\pm$ 72 (n = 3)
Total <i>JAK2</i> /100 ABL (mean $\pm$ SD) in granulocytes	249 $\pm$ 202 (n = 6)	195 $\pm$ 151 (n = 11)	234 $\pm$ 294 (n = 3)

Table 2. Influence of 46/1 haplotype on *JAK2* mRNA expression. Patients were classified in 3 groups according to their 46/1 status in T-lymphocytes (congenital status). *JAK2*V617F allele-burden and *JAK2* mRNA level were measured, in gDNA and cDNA respectively, of granulocytes at the time of diagnosis using AS-qPCR. No significant difference was found in groups of patients between homozygous, heterozygous and wild-type status for 46/1 haplotype.

	SE + IE + RT	JAK2V617F-positive PV		JAK2V617F-positive ET		JAK2V617F-negative ET	
Number 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 form	mature	mature	Immature/ absent	mature	Immature/ absent	mature	Immature/ absent
JAK2WT/100 ABL	482 ± 424	307 ± 242	201 ± 243 ^a	733 ± 422	174 ± 96 ^a	507 ± 478	280 ± 220
JAK2V617F/100 ABL	0	953 ± 972	481 ± 479 ^b	262 ± 255	56 ± 54 ^b	0	0
Total JAK2/100 ABL	482 ± 424	1243 ± 972 ^c	683 ± 599 ^b	995 ± 642 ^c	230 ± 148 ^b	507 ± 478	280 ± 220
Percentage of JAK2V617F (gDNA)	0	67 ± 26	68 ± 21	23 ± 10	20 ± 11	0	0
Leukocytes (x 10 ⁹ /L)	8.9 ± 2.9	14.3 ± 6.5	12.2 ± 4.8	10.9 ± 4.6	11.0 ± 3.1	9.1 ± 1.3	7.2 ± 1.2
Hematocrit (L/L)	47 ± 12	57 ± 6	56 ± 5	43 ± 6	42 ± 5	37 ± 6	36 ± 10
Hemoglobin (g/L)	153 ± 39	185 ± 19	182 ± 19	143 ± 18	137 ± 14	120 ± 22	117 ± 34
Platelets (x 10 ⁹ /L)	385 ± 298	448 ± 160	564 ± 294	775 ± 185	743 ± 159	887 ± 302	754 ± 45

Table 3. Expression of Mpl isoforms, JAK2 mRNA levels and blood cell counts in patients. 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 (see materials and methods). 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 ± standard deviations. (^a) p < 0.05 vs. sub-groups with pattern 1 or 2, including reactive states; (^b) p < 0.05 vs. corresponding sub-group with pattern 1 or 2; (^c) p < 0.05 vs. reactive states, Mann-Whitney rank sum test. NA: not available.

Figure legends.

Figure 1. Comparison of *JAK2V617F* allele-burden between gDNA and cDNA of 54 PV patients at the time of diagnosis. (A) Correlation between %*JAK2V617F* in gDNA and in cDNA. There was a positive correlation between *JAK2V617F* allele-burden in gDNA and in cDNA ($n=54$, $p=0.0073$, $r^2=0.816$) (B) Individual representation of %*JAK2V617F*, as measured in gDNA and cDNA for each patient. The %*JAK2V617F* measured in gDNA and cDNA varied by >30% for 19/54 (35.2%) of the PV patients tested. Percentages of *JAK2V617F* in gDNA and in cDNA were determined by AS-qPCR assays (see materials and methods).

Figure 2. Analysis of *JAK2* mRNA expression in 30 PV patients with and without 9pUPD. Presence of 9pUPD was determined by AS-qPCR for rs12343867 and rs10974944 (2 SNPs characteristic of the 46/1 haplotype) for all the patients and by SNP array for 15 patients. For 12 patients, we found no evidence of 9pUPD (AS-qPCR and SNP array not sufficiently sensitive, or SNP array not done). Eight of the 12 PV patients without 9pUPD had a wild-type status for 46/1 haplotype in T-lymphocytes. The mean %*JAK2V617F* in granulocytes for PV patients without 9pUPD was 22 ± 18 . We detected 9pUPD in 18/30 PV patients. Twelve of the 18 patients were heterozygous for the 46/1 haplotype in T-lymphocyte, 4 were homozygous and only 2 were wild-type. The mean %*JAK2V617F* in granulocytes for PV patients with 9pUPD was 65 ± 28 . There was no significant difference in *JAK2* mRNA levels between the 2 groups.

Figure 3. Mpl patterns observed in platelets of healthy donors, reactive states, PV and ET patients. Prior experiments with anti-proteases established that the 74 kDa Mpl isoform is not a product of degradation of the 84 kDa isoform (not shown). (A) typical Mpl patterns, and percentages of individuals with a given Mpl pattern, observed in healthy donors (HD), surgery patients (SP), secondary erythrocytosis (SE), idiopathic erythrocytosis (IE), reactive (post-surgery) thrombocytosis (RT), PV and ET (mutated on non-mutated), diagnosed according to WHO criteria. CD41 was used for load control. Each panel was obtained from independent SDS-PAGE migrations containing positive controls prepared from HD. 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-D) mRNA expression levels of wild type (B), V617F-mutated (C) and total (wild type + V617F-mutated) (D). Man-Whitney rank sum test was applied to compare mRNA level between the different groups of patients. (*) $p<0.05$, (**) $p<0.005$, and (***) $p<0.0001$.

Figure 4. Analysis of Mpl expression in HEL, UKE-1, TF-1 and Ba/F3-EpoR hematopoietic cell lines. Transient transfection of human MPL and JAK2WT or JAK2V617F constructs were performed as described in Materials and Methods in three human cell lines: HEL (A), UKE-1 (B), both homozygous for *JAK2V617F*; TF-1, which expresses only wild type JAK2 (C) and in murine Ba/F3-EpoR, which also only express only wild type JAK2 (D). Co-transfection of MPL and JAK2WT increased the quantity of Mpl, particularly the mature form (84 KDa). Two different exposures were used for anti-Mpl antibody revelation because of the high Mpl expression in cells transiently transfected, so as to reveal endogenous Mpl. β -actin was used for load control. Co-transfection of MPL and JAK2V617F in the HEL cell line resulted in decreased total amount of Mpl. A decrease in total amount of Jak2 proteins was observed, suggesting degradation of the Mpl/Jak2 pair. In TF-1 and Ba/F3-EpoR cell lines, which have a *JAK2WT* background, co-transfection of MPL and JAK2V617F increased the

total amount of Mpl as much as JAK2WT (panel C and D). Transfection of MPL in UKE-1 cells (homozygous for *JAK2V617F*) induced a decrease in total amount of Jak2.

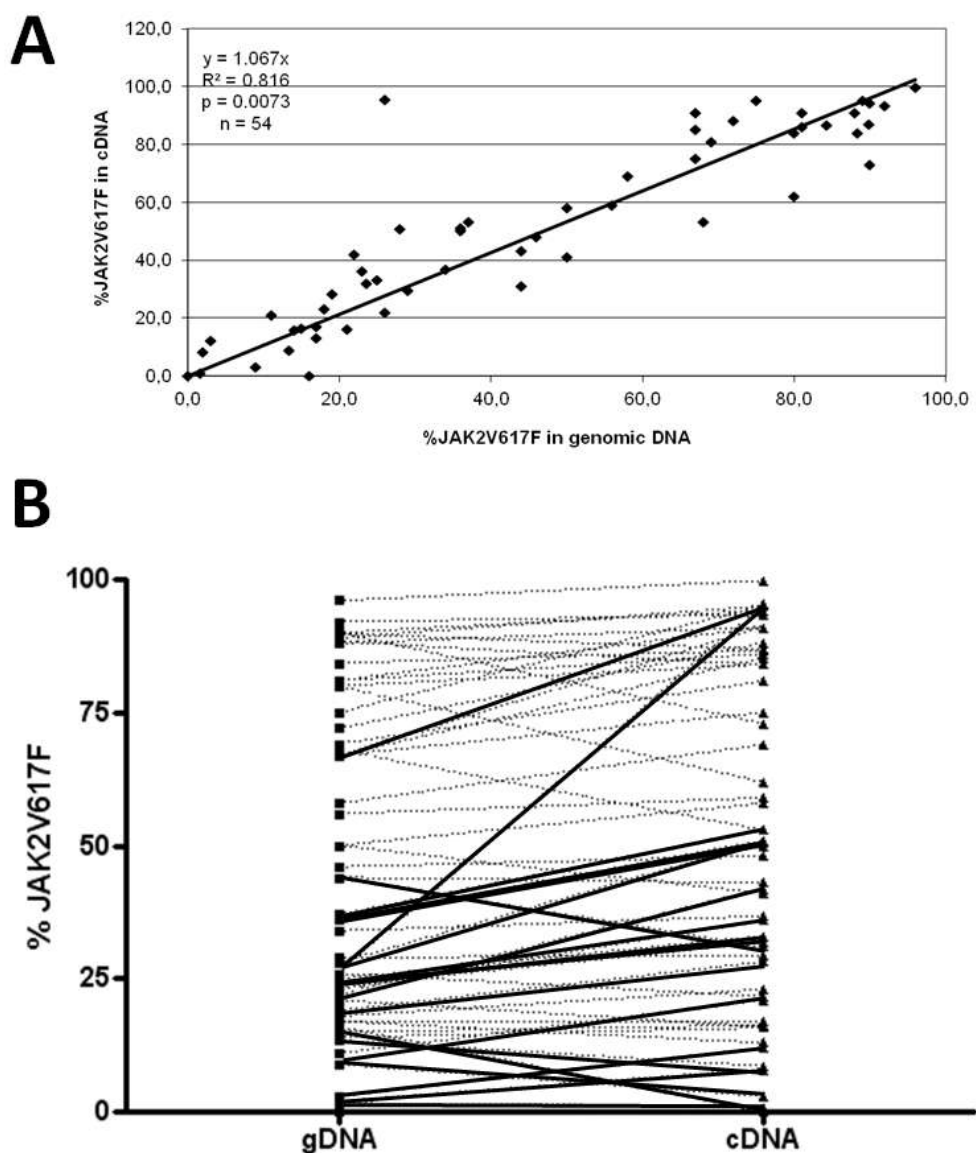


Figure 1. Vilaine et al.

JAK2V617F positive PV n = 30					
Granulocytes	No evidence of 9pUPD n = 12		Presence of 9pUPD n = 18		
	GC-allele: 4/12		GC-allele: 16/18		
T-lymphocytes GC-allele status	Wild type n = 8	Heterozygous for GC-allele n = 4	Wild type n = 2	Heterozygous for GC-allele n = 12	Homozygous for GC-allele n = 4
	27 ± 21	14 ± 9	56 ± 48	63 ± 22	61 ± 40
%JAK2V617F (mean ± SD) in granulocytes	22 ± 18 (p<0.0001)		65 ± 28		
Total JAK2/100 ABL (mean ± SD) in granulocytes	327 ± 209 (n = 4)	171 ± 98	94 ± 11	209 ± 181 (n = 7)	234 ± 295 (n = 3)
	249 ± 173 (n = 8, p=0.535)		196 ± 190 (n = 12)		

Figure 2. Vilaine et al.

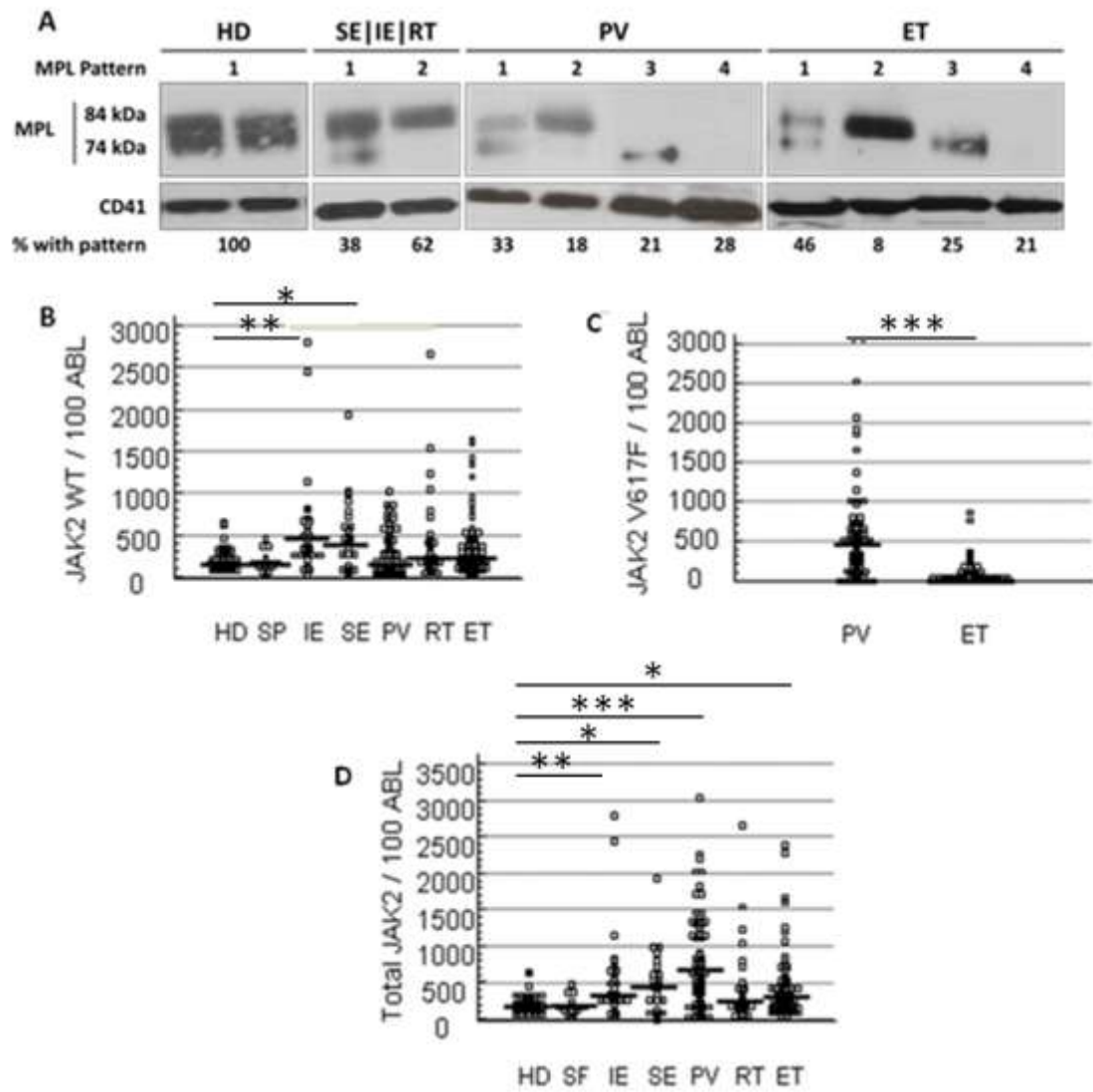


Figure 3. Vilaine et al.

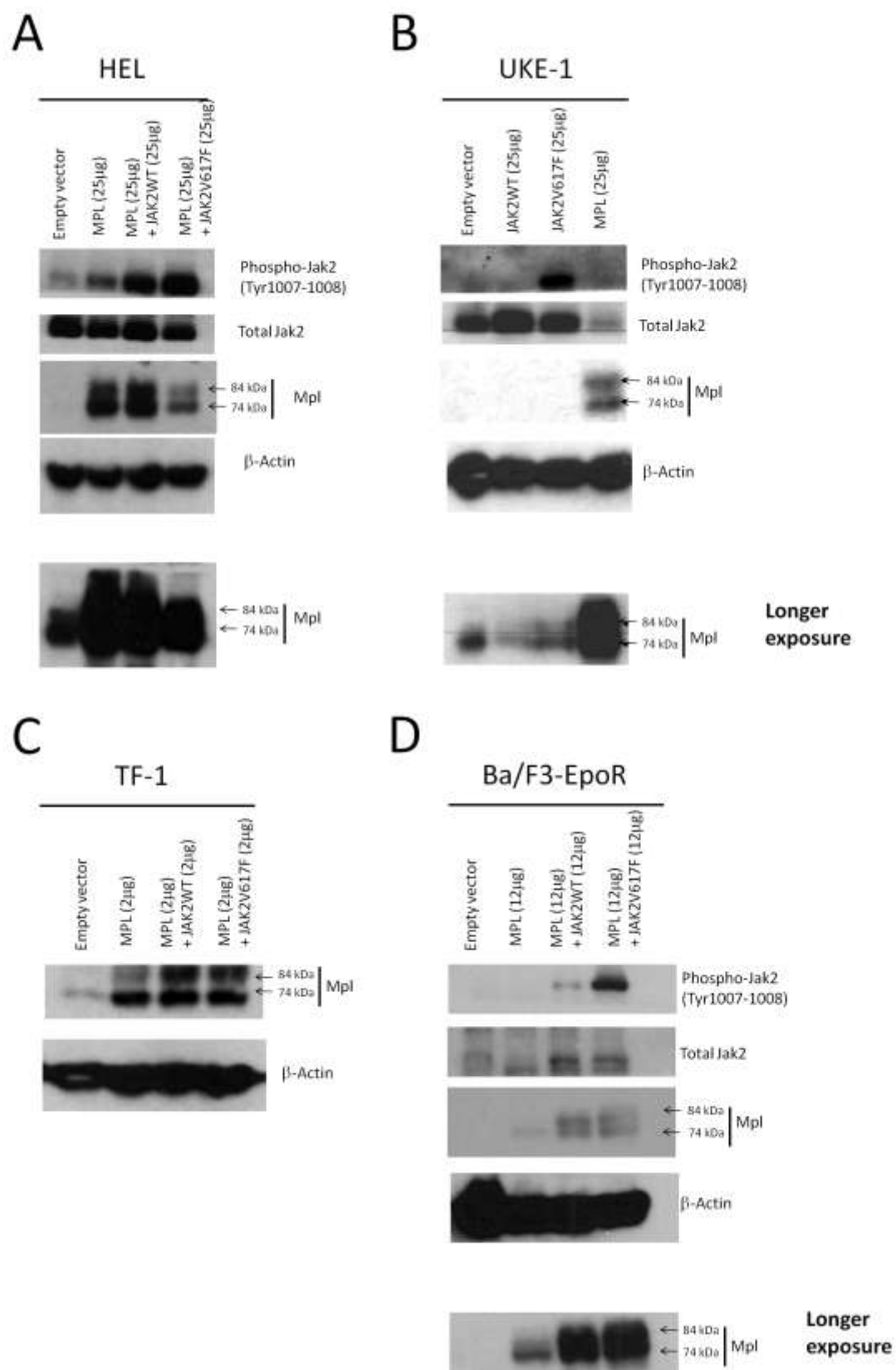


Figure 4. Vilaine et al.

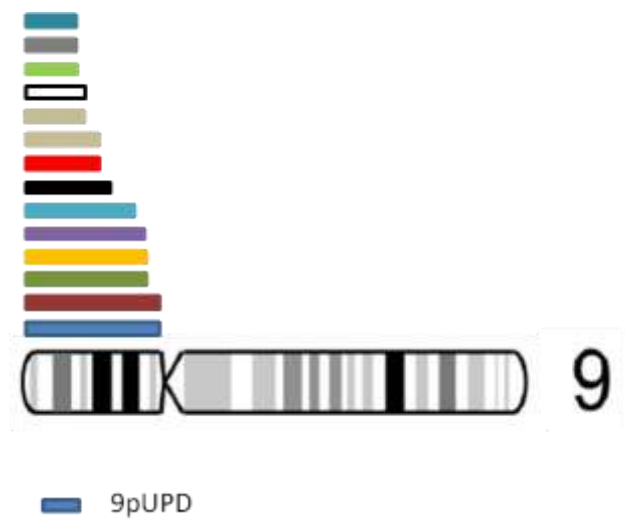


Figure S1. Karyoview of chromosomal aberrations on chromosome 9 of the 15 analyzed patients by Affymetrix 6.0 SNP array. Bars depict the physical position and size of the aberration. Each color represents one patient with 9pUPD. 9pUPD was detectable in 13 of 15 PV patients tested. One patient (Na360, in grey) has 2 different sub-clones. The size of the 9pUPD varies between 20,45Mb and the entire 9p arm.

<i>Diagnosis</i>	<i>MPN</i>			<i>SVT</i>	<i>Controls</i>
	<i>PV</i>	<i>ET</i>	<i>PMF</i>		<i>SE/IE</i>
N	44	23	21	28	34
Age in years: Median (range)	70 (24 - 94)	69 (32 - 85)	66 (45 - 78)	49 (31 - 70)	60 (27 - 74)
Male/Female	19/25	15/8	12/9	21/7	32/2
%JAK2V617F in granulocyte DNA (SD)	40.4 ($\pm$ 28.6)	15.0 ($\pm$ 12.8)	15.7 ($\pm$ 19.2)	2.6 ($\pm$ 6.1)	0.0 ($\pm$ 0.0)
Ht (L per liter) (median - SD)	56.2 (55.2 $\pm$ 6.2)	42.5 (43.3 $\pm$ 5.4)	34.4 (33.6 $\pm$ 6.0)	42.9 (43.5 $\pm$ 5.1)	52.1 (51.5 $\pm$ 4.1)
Hgb (g per liter) (median – SD)	18.1 (17.6 $\pm$ 2.0)	13.6 (14.1 $\pm$ 2.2)	10.6 (10.5 $\pm$ 1.8)	14.0 (14.5 $\pm$ 1.5)	17.3 (17.3 $\pm$ 1.0)
WBC (x 10 ¹² per liter) (median – SD)	9.7 (8.5 $\pm$ 4.8)	7.7 (7.3 $\pm$ 2.3)	9.2 (7.1 $\pm$ 6.1)	6.1 (6.1 $\pm$ 1.8)	7.6 (7.4 $\pm$ 1.9)
Plt (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)	397.1 (378.0 $\pm$ 198.2)	657.9 (625.5 $\pm$ 156.2)	156.7 (72.0 $\pm$ 172.9)	272.6 (269.5 $\pm$ 109.1)	195.3 (192.5 $\pm$ 45.7)
Lymphocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)	1.6 (1.5 $\pm$ 0.7)	1.5 (1.4 $\pm$ 0.6)	1.5 (1.4 $\pm$ 0.8)	1.6 (1.6 $\pm$ 0.6)	1.8 (1.7 $\pm$ 0.5)
Neutrophils (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)	7.3 (6.0 $\pm$ 4.2)	5.3 (5.4 $\pm$ 1.7)	5.6 (3.8 $\pm$ 4.5)	3.8 (3.6 $\pm$ 1.4)	5.0 (4.7 $\pm$ 1.7)
Monocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)	0.61 (0.54 $\pm$ 0.25)	0.57 (0.46 $\pm$ 0.38)	0.64 (0.48 $\pm$ 0.55)	0.48 (0.44 $\pm$ 0.22)	0.60 (0.60 $\pm$ 0.19)

Table S1. Patient characteristics at the time of diagnosis. Abbreviations : N : number of patient ; Ht : Hematocrit ; Hgb :Hemoglobin ; WBC : Whole Blood Count ; Plt :Platelets count.

<i>Diagnosis</i>	<i>N</i>	<i>rs12343867 genotype</i>			<i>C-allele frequency (%)</i>	<i>P1*</i>	<i>P2*</i>	<i>P3*</i>
		<i>TT N (%)</i>	<i>TC N (%)</i>	<i>CC N (%)</i>				
Local controls	38	21 (55.3)	16 (42.1)	1 (2.6)	23.7			
MPN								
overall MPN	116	43 (37.1)	46 (39.6)	27 (23.3)	43.1	0.0109	0.0044	<0.0001
PV	56	18 (32.1)	15 (26.8)	23 (41.1)	54.5	<0.0001	<0.0001	<0.0001
ET	34	14 (41.2)	20 (58.8)	0 (0.0)	29.4	0.2684	0.4363	0.3084
PMF	26	11 (42.3)	11 (42.3)	4 (15.4)	36.5	0.1547	0.1151	0.0385
SVT	34	19 (55.9)	12 (35.3)	3 (8.8)	26.5	0.4834	0.6999	0.6413

Table S2. Genotype and C-allele frequencies for *JAK2* rs12343867 comparison of 38 local controls with 116 MPN (56 PV, 34 ET and 26 PMF) and 34 SVT. N: Number of patient. *P1**, P-value for genotype (TT/TC/CC) comparisons; *P2**, for C-allele frequency comparisons; *P3**, P-value for comparison of C-allele frequency with that of control population (Wellcome Trust Case Control Consortium controls in which the C-allele frequency was reported at 24%; n=1500) P-values were obtained by Khi2 test with GraphPad Prism4 software.

Diagnosis	N	rs12343867 genotype				C-allele frequency (%)	P1*	P2*	P3*	P4*
		TT N (%)	TC N (%)	CC N (%)	TC + CC N (%)					
MPN										
overall MPN N (%)	116	43 (37.1)	46 (39.6)	27 (23.3)						
Jak2 V617F negative N (%)	27	14 (51.8)	11 (40.7)	2 (7.5)	13 (48.1)	27.8	0.0525	0.0094	0.5238	0.6929
Jak2 V617F positive N (%)	89	29 (32.6)	35 (39.3)	25 (28.1)	60 (67.4)	47.7			<0.0001	<0.0001
Mean % Jak2 V617F (±SD)		28.3 (± 19.0)	30.3 (± 16.2)	66.9 (± 30.2)						<0.0001
PV N (%)	56	18 (32.1)	15 (26.8)	23 (41.1)	38 (67.9)					
Jak2 V617F negative N (%)	5	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	10.0	0.0437	0.0031	0.3009	0.5425
Jak2 V617F positive N (%)	51	14 (27.5)	14 (27.5)	23 (45.0)	37 (72.5)	58.8			<0.0001	0.0007
Mean % Jak2 V617F (±SD)		35.2 (± 24.0)	27.6 (± 16.2)	66.3 (± 23.0)						0.0002
ET N (%)	34	14 (41.2)	20 (58.8)	0 (0.0)	20 (58.8)					
Jak2 V617F negative N (%)	9	5 (55.5)	4 (44.4)	0 (0.0)	4 (44.4)	22.2	0.3067	0.4350	0.8606	0.2733
Jak2 V617F positive N (%)	25	9 (36.0)	16 (64.0)	0 (0.0)	16 (64.0)	32.0			0.1942	
Mean % Jak2 V617F (±SD)		17.3 (± 9.4)	22.2 (± 10.6)	-						
PMF N (%)	26	11 (42.3)	11 (42.3)	4 (15.4)	15 (57.7)					
Jak2 V617F negative N (%)	13	5 (38.5)	6 (46.1)	2 (15.4)	8 (61.5)	38.5	0.9131	0.7734	0.0880	0.2430
Jak2 V617F positive N (%)	13	6 (46.1)	5 (38.5)	2 (15.4)	7 (53.8)	34.6			0.2101	0.0130
Mean % Jak2 V617F (±SD)		33.5 (± 6.7)	45.0 (± 21.5)	71.5 (± 29.0)						0.2306
SVT N (%)	34	19 (55.9)	12 (35.3)	3 (8.8)	15 (44.1)					
Jak2 V617F negative N (%)	26	15 (57.7)	10 (38.5)	1 (3.8)	11 (42.3)	23.1	0.1754	0.2528	0.8782	0.9699
Jak2 V617F positive N (%)	8	4 (50.0)	2 (25.0)	2 (25.0)	4 (50.0)	37.5			0.2094	0.2585
Mean % Jak2 V617F (±SD)		11.1 (± 9.9)	11.5 (± 10.6)	41.0 (± 49.5)						0.4965

Table S3. Genotype and C-allele frequencies for JAK2 rs12343867 comparison of 116 MPN (56 PV, 34 ET and 26 PMF) and 34 SVT according to JAK2V617F status. N: Number of patient. P1*, P-value for genotype (TT/TC/CC) comparisons; P2*, for C-allele frequency comparisons; P3*, P-value for comparison of C-allele frequency with that of control population (Wellcome Trust Case Control Consortium controls in which the C-allele frequency was reported at 24%; n=1500); P4*, P-value for

mean % Jak2 V617F comparisons (TT vs TC; TT vs CC and TC vs CC). P-values were obtained by Khi2 and t-test with GraphPad Prism4 software. Means of % Jak2V617F were calculated with % Jak2 V617F allele burden of V617F positive patients.

Characteristic	Overall N	rs12343867 genotype			P1 *	P2 *
		TT N(%)	TC N(%)	CC N(%)		
PS/EP	34	20 (58.9)	13 (38.2)	1 (2.9)		
Age in years: Median (range)		59.5 (17 – 80)	58.0 (36 – 74)	67.0		
Male / Female		19/1	12/1	1/0		
Ht (L per liter) (median - SD)		52.08 (51.4 – 4.34)	52.18 (51.6 – 3.84)	48.2	0.9415	-
Hgb (g per liter) (median – SD)		17.29 (17.4 – 0.95)	17.36 (17.1 – 0.99)	17.2	0.8360	-
WBC (x 10 ¹² per liter) (median – SD)		7.54 (7.6 – 1.94)	7.7 (7.5 – 1.78)	6.9	0.8212	-
Plt (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		201.5 (195.5 – 47.7)	193.1 (187 – 41.1)	150.0	0.6088	-
Lymphocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		1.85 (1.75 – 0.56)	1.71 (1.7 – 0.4)	1.6	0.4469	-
Neutrophils (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		4.87 (4.45 – 1.74)	5.2 (5.1 – 1.6)	4.5	0.5281	-
Monocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		0.61 (0.6 – 0.18)	0.59 (0.6 – 0.21)	0.6	0.7559	-
PV	44	17 (38.6)	11 (25.0)	16 (36.4)		
Age in years: Median (range)		70.0 (24 – 84)	70.0 (35 – 80)	71.0 (37 – 94)		
Male / Female		6/11	4/7	9/7		
Ht (L per liter) (median - SD)		53.05 (52.20 – 6.06)	59.88 (60.70 – 5.64)	57.06 (55.90 – 5.25)	0.0057**	0.0614
Hgb (g per liter) (median – SD)		17.19 (16.90 – 1.91)	19.34 (19.70 – 1.72)	18.14 (17.70 – 1.97)	0.0060**	0.1882
WBC (x 10 ¹² per liter) (median – SD)		7.97 (7.30 – 2.56)	8.25 (8.50 – 2.98)	12.94 (9.80 – 6.38)	0.7967	0.0063**
Plt (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		469.5 (389.0 – 243.6)	354.9 (371.0 – 185.8)	342.4 (362.5 – 112.5)	0.1960	0.0828
Lymphocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		1.62 (1.50 – 0.55)	1.64 (1.70 – 0.63)	1.66 (1.60 – 0.86)	0.9550	0.8957
Neutrophils (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		5.44 (5.00 – 2.04)	6.45 (6.00 – 1.76)	10.12 (7.70 – 5.91)	0.1432	0.0047**
Monocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		0.56 (0.50 – 0.21)	0.54 (0.50 – 0.25)	0.71 (0.60 – 0.29)	0.7514	0.1203
PMF	21	10 (47.6)	8 (38.1)	3 (14.3)		
Age in years: Median (range)		65.5 (45 – 78)	60.5 (45 – 86)	69.0 (59 – 78)		
Male / Female		6/4	3/5	3/0		
Ht (L per liter) (median - SD)		34.19 (33.65 – 5.3)	35.34 (34.85 – 6.83)	28.97 (25.1 – 8.21)	0.693	0.2085
Hgb (g per liter) (median – SD)		10.49 (10.25 – 1.5)	11.03 (11.25 – 2.21)	8.7 (7.9 – 2.21)	0.5485	0.1274
WBC (x 10 ¹² per liter) (median – SD)		10.63 (6.7 – 7.58)	6.84 (6.45 – 3.94)	8.8 (10.2 – 4.28)	0.2195	0.7028
Plt (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		131.6 (72 – 149.2)	178.7 (51.5 – 224.5)	268.4 (224 – 132.1)	0.6003	0.183

Lymphocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		1.61 (1.5 – 0.79)	1.5 (1.2 – 0.96)	1.17 (1.1 – 0.5)	0.793	0.385
Neutrophils (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		7.19 (4.65 – 5.4)	3.46 (2.95 – 2.45)	5.2 (3.0 – 4.25)	0.0906	0.5735
Monocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		0.83 (0.48 – 0.7)	0.4 (0.48 – 0.25)	0.64 (0.72 – 0.22)	0.121	0.6675
ET	23	8 (34.8)	15 (65.2)	0 (0.0)		
Age in years: Median (range)		74.0 (42 – 85)	68.0 (32 – 84)	-		
Male / Female		4/4	11/4	-		
Ht (L per liter) (median - SD)		43.88 (43.55 – 3.98)	41.85 (43.1 – 5.92)	-	0.3963	-
Hgb (g per liter) (median – SD)		14.18 (14.15 – 1.57)	13.38 (14.3 – 2.38)	-	0.4067	-
WBC (x 10 ¹² per liter) (median – SD)		6.6 (6.3 – 1.36)	8.46 (7.8 – 2.37)	-	0.0546	-
Plt (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		604.7 (536 – 159.6)	697.7 (641 – 150.5)	-	0.1814	-
Lymphocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		1.43 (1.4 – 0.33)	1.59 (1.6 – 0.73)	-	0.5475	-
Neutrophils (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		4.49 (4.1 – 1.05)	5.82 (5.89 – 1.78)	-	0.0665	-
Monocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		0.44 (0.37 – 0.18)	0.64 (0.55 – 0.43)	-	0.2292	-
SVT	28	16 (57.1)	11 (39.3)	1 (3.6)		
Age in years: Median (range)		48.5 (23 – 69)	53.0 (32 – 64)	32		
Male / Female		13/3	8/3	0/1		
Ht (L per liter) (median - SD)		44.05 (44.1 – 3.48)	40.52 (39 – 6.12)	50.4	0.0674	-
Hgb (g per liter) (median – SD)		14.41 (14.6 – 0.96)	13.37 (13.3 – 1.93)	15.5	0.0754	-
WBC (x 10 ¹² per liter) (median – SD)		6.33 (6.5 – 1.87)	5.77 (5.7 – 1.74)	5.8	0.4412	-
Plt (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		266.9 (280.5 – 94.5)	266.7 (258 – 127.2)	430.0	0.9973	-
Lymphocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		1.66 (1.6 – 0.62)	1.48 (1.5 – 0.5)	1.7	0.4462	-
Neutrophils (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		3.92 (3.6 – 1.46)	3.68 (3.9 – 1.42)	3.5	0.6695	-
Monocytes (x 10 ⁹ per liter) (median – SD)		0.51 (0.47 – 0.23)	0.45 (0.4 – 0.22)	0.5	0.5244	-

Table S4. Comparison of biological parameters of patients according to diagnosis and 46/1 haplotype status. Biological parameters were collected at the time of diagnosis. Genotyping for rs12343867 (marker of 46/1 haplotype) was determine on gDNA prepared from granulocytes collected at the time of diagnosis.

Correlations with	%JAK2V617F	
	gDNA	cDNA
Hematocrit	n=22 , p=0.8024 , $r^2=0.0032$	n=20 , p=0.8385 , $r^2=0.0023$
Hemoglobin	n=21 , p=0.9028 , $r^2=0.0008$	n=20 , p=0.9523 , $r^2=0.0002$
White Blood Cells count	n=22 , p=0.0137* , $r^2=0.2675$	n=20 , p=0.0413* , $r^2=0.2116$
Neutrophils count	n=21 , p=0.0073** , $r^2=0.3223$	n=19 , p=0.0205* , $r^2=0.2774$
Platelets count	n=22 , p=0.3408 , $r^2=0.0454$	n=20 , p=0.2107 , $r^2=0.0855$

Table S5. Correlations between %JAK2V617F (gDNA and cDNA) with biological parameters. P-values were obtained by correlation test with GraphPad Prism4 software.

Correlations with	Copies of total JAK2 / 100ABL	Copies of JAK2V617F / 100ABL	Copies of JAK2WT / 100ABL
		cDNA	
Hematocrit	n=19 , p=0.5013 , $r^2=0.0270$	n=19 , p=0.4466 , $r^2=0.0344$	n=19 , p=0.1432 , $r^2=0.1217$
Hemoglobin	n=19 , p=0.5776 , $r^2=0.0186$	n=19 , p=0.5474 , $r^2=0.0216$	n=19 , p=0.2382 , $r^2=0.0808$
White Blood Cells count	n=19 , p=0.2924 , $r^2=0.0649$	n=19 , p=0.7675 , $r^2=0.0052$	n=19 , p=0.1138 , $r^2=0.1406$
Neutrophils count	n=18 , p=0.5106 , $r^2=0.0275$	n=18 , p=0.4826 , $r^2=0.0312$	n=18 , p=0.1658 , $r^2=0.1164$
Platelets count	n=19 , p=0.4357 , $r^2=0.0361$	n=19 , p=0.6123 , $r^2=0.0154$	n=19 , p=0.1627 , $r^2=0.1113$

Table S6. Correlations between total JAK2, JAK2WT and JAK2V617F measured in cDNA with biological parameters. P-values were obtained by correlation test with GraphPad Prism4 software.

Conclusions :

Dans ce travail, nous avons étudié une cohorte de 34 patients atteints de PV que nous avons caractérisés pour la présence de l'haplotype 46/1 à la fois dans les granulocytes (cellules malignes) et dans les lymphocytes CD3⁺ (cellules saines). Nous avons également réalisé une étude de SNP array sur 15 de ces patients pour confirmer la présence de 9pUPD. Enfin, nous avons quantifié le niveau d'expression de *JAK2* au niveau ARNm afin de déterminer l'influence de l'haplotype 46/1 et des 9pUPD sur les niveaux de *JAK2* total, *JAK2*WT et *JAK2*V617F.

Nous avons ainsi pu montrer que la charge allélique *JAK2*V617F mesuré par qPCR allèle-spécifique varie entre l'ADN génomique et l'ADN complémentaire de patients atteints de PV (n= 54 patients). En effet, nous avons pu mesurer des variations supérieures à 50% pour 9/54 patients et supérieures à 30% pour 19/54 patients.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'haplotype 46/1 sur les niveaux d'expression de *JAK2* total, *JAK2*WT et *JAK2*V617F. Kiplivaara et coll. ont montré en 2009 que l'ARNm de *JAK2* n'est pas exprimé différemment chez des patients hétérozygotes pour l'haplotype 46/1 en fonction de l'allèle porteur ou non de l'haplotype 46/1 (Kiplivaara et al., 2009 Nature Genetics). Nous avons confirmé les observations de Kiplivaara. Enfin, nous avons voulu savoir si la disomie uniparentale du chromosome 9p peut influencer ces niveaux d'expression de *JAK2*. Nous n'avons pas vu de différence significative entre les niveaux d'ARNm *JAK2* total, *JAK2*WT et *JAK2*V617F entre les patients recombines et ceux non recombines.

Lorsque nous nous intéressé au niveau d'expression de Mpl, nous avons étudié des lysats de plaquettes issues de patients atteints de SMP et de personnes saines, pour l'expression de Mpl ainsi que les niveaux d'ARNm de *JAK2* total, WT et V617F. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'il existe quatre profils différents d'expression de Mpl dans les plaquettes: un premier profil où l'on retrouve les formes mature et immature de Mpl, exprimés à des niveaux comparables, correspondant au profil typique des donneurs sains. On observe également ce profil dans 37% des SMP testés. Le deuxième profil, où l'on ne retrouve que la forme mature de Mpl, est typique des états inflammatoires, et est associé à un niveau élevé d'ARNm *JAK2*WT, est observé dans 15% des SMP. On retrouve également un troisième profil dans lequel on ne peut détecter que la forme immature de Mpl et enfin un quatrième profil pour lequel on ne détecte pas de Mpl en western blot. Nous avons pu ainsi établir une relation entre les profils d'expression de Mpl et le niveau d'expression de *JAK2*WT au niveau ARNm. En

effet, les profils 1 et 2 (où la forme mature de Mpl est détectable) sont liés à des niveaux d'expression de *JAK2*WT supérieur à 300 copies / 100 ABL alors que les profils 3 et 4 (où on n'observe que la forme immature ou pas du tout de Mpl) sont associés à des quantités faibles de *JAK2*WT (< à 300 copies de *JAK2*WT / 100 ABL).

A l'aide de transfections transitoires, nous avons pu confirmer que Jak2 jouait un rôle de chaperonne pour Mpl facilitant sa maturation et son expression à la membrane. Il est intéressant de noter que Jak2V617F est capable de permettre la maturation et l'expression de Mpl, mais de manière moins efficace que Jak2WT. Il semble également que le couple Mpl/Jak2V617F soit plus rapidement dirigé vers les systèmes de dégradation protéique, conformant ainsi les observations de Pecquet et coll. (*Pecquet et al.*, 2012 Blood).

En conclusion, le niveau d'expression de *JAK2* varie chez les patients atteints de SMP, les % de *JAK2*V617F mesurés dans l'ARN et l'ADN diffèrent chez 35.2% des patients, les variations d'expression de *JAK2* restent inexplicables, n'étant pas liées ni à l'haplotype 46/1, ni à la recombinaison homologue post-mutation V617F. Dans deux cas, une forte expression de *JAK2* a été retrouvée associée à une recombinaison homologue de *JAK2* antérieure à toute mutation. Ce niveau d'expression de *JAK2* au niveau de l'ARNm est important. En effet, une expression d'au moins 300 copies de *JAK2* / 100 ABL semble nécessaire pour avoir une expression des deux formes de Mpl (mature et immature). Il semble donc que la mesure des niveaux d'ARNm de *JAK2* reflète le niveau d'expression et de fonctionnalité du couple Mpl/Jak2.

IV-1-3 Article 3 : Point des connaissances sur l'haplotype 46/1 et de son influence sur le phénotype des patients (*Hermouet S. et Vilaine M.*, *Haematologica*, 2011 ; 96(11): 1575-9).

Suite à ces travaux, un éditorial a été rédigé traitant de l'haplotype 46/1 et de ses possibles conséquences sur le phénotype des patients notamment au niveau du processus inflammatoire.

- are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. *Blood*. 1992;80(3):816-24.
17. Garner C, Silver N, Best S, Menzel S, Martin C, Spector TD, et al. Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult hemoglobin. *Blood*. 2004;104(7):2184-6.
 18. Menzel S, Thein SL. Genetic architecture of hemoglobin F control. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(3):179-86.
 19. Badens C, Jily P, Agouti I, Thuret I, Gonnat K, Fattoum S, et al. Variants in genetic modifiers of (beta)-thalassaemia can help to predict the major or intermediate type of the disease. *Haematologica*. 2011 Jul 26. [Epub ahead of print]
 20. Farrell JJ, Sherva RM, Chen Z-Y, Luo H-Y, Chu BF, Ha SY, et al. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*. 2011;117(16):4935-45.

The JAK2 46/1 haplotype: a marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection?

Sylvie Hermouet^{1,2} and Mathias Vilaine¹

¹Inserm UMR 892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, Nantes; ²Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

E-mail: sylvie.hermouet@univ-nantes.fr doi:10.3324/haematol.2011.055392

(Related Original Article on page 1613)

The 46/1 haplotype of chromosome 9p, present in about 45% of the general population, is associated with a predisposition to mutations in the Janus Kinase 2 (JAK2) gene on the same allele and to chronic myeloproliferative neoplasms (MPN): polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis.^{1,4} The 46/1 haplotype is also associated with a predisposition to MPN with no mutation of JAK2, and with MPN with mutation in MPL, a gene located on a different chromosome (1p).^{5,6} An increased frequency of the 46/1 haplotype in patients with splanchnic vein thrombosis has also been reported but these findings remain controversial.^{7,8} The 46/1 haplotype has been studied in chronic myelogenous leukemia and in chronic myelomonocytic leukemia; no significant increase in frequency was noted (Table 1). Last year Andrikovics et al. reported that patients with acute myeloid leukemia (AML) with the 46/1 haplotype had a higher frequency of normal karyotype (NK).⁹ In the present issue of *Haematologica*, the same group found that the JAK2 46/1 haplotype is associated with an increased frequency of acute myelomonocytic leukemia and a tendency to reduced survival because of death from infection in patients with NK-AML.¹⁰ The latter findings need confirmation by other studies, for it is of great interest to establish whether the JAK2 46/1 haplotype is in fact a marker of myelomonocytic dysfunction and subsequently an unfavorable risk factor in NK-AML, as Nahajevsky et al. suggest, and/or in other disease categories.¹⁰ In fact, although the majority of studies have failed to detect any association of the 46/1 haplotype with hematologic and clinical parameters (Table 1), Tefferi et al. found that the 46/1 haplotype status influenced survival in primary myelofibrosis, and evolution toward myelofibrosis in polycythemia vera.⁵ Moreover, it has been reported that the frequency of the JAK2 46/1 haplotype is increased in the context of severe inflammation, for instance Crohn's disease.^{11,12} Altogether, the literature (reviewed in Table 1) shows that the common 46/1 haplotype is associated with predisposition to several types of disorders of variable severity: rare myeloid malignancies with or without JAK2/MPL mutation, including MPN and perhaps also acute myelomonocytic leukemia and NK-AML; inflamma-

tory diseases; and possibly, reduced defense against infection. The mechanisms that underlie the increased risk of acquisition of MPN and JAK2/MPL mutation in carriers of the 46/1 haplotype are not understood. Additionally, the mechanisms that make the V617F mutation occur preferentially in the JAK2 gene of the 46/1 allele remain largely unknown.

A haplotype (contraction of "haploid genotype") is a set of closely linked genetic markers present on the same chromosome, which are not easily separable by recombination and thus tend to be inherited together, and can be identified by patterns of single nucleotide polymorphisms. The 46/1 haplotype, represented in Figure 1, is a 280 Kb-long region of chromosome 9p that includes three genes in their entirety: JAK2, INSL6 (Insulin-like 6) and INSL4. Of the three genes, only JAK2 is expressed in hematopoietic cells. The so-called "GGCC" part of the 46/1 haplotype begins in intron 10 and finishes in intron 15 of the JAK2 gene and is characterized by four single nucleotide polymorphisms located in introns 10, 12, 14 and 15. The four single nucleotide polymorphisms are in complete linkage disequilibrium, meaning that they are always inherited together. The four single nucleotide polymorphisms replace three thymidines (T) and one cytosine (C) by two guanines (G) and two cytosines, resulting in a G G C C pattern, hence the phrase JAK2 "GGCC" haplotype (not to be confused with "GC-rich"). The "GGCC" part of the 46/1 haplotype is not "GC-rich" but it includes sequences frequently mutated in MPN: JAK2 exons 14 and 12, and to a lesser degree, exons 13 and 15. A plausible explanation for the high frequency of mutations in JAK2 exons 14 and 12 and in MPL exon 10 in association with MPN combines the presence of flanking DNA repeat elements (represented in Figure 1) and the fact that the three exons encode for protein domains critical for the function of the JAK2/MPL couple. Activating mutations in these exons are likely to be detected as they confer growth advantages to the mutated clone, whereas silent mutations typically remain below the detection level of most diagnostic assays.¹³ DNA repeat elements include GC- or AT-rich sequences; they can be mutation "hot spots", cause mismatching during DNA replication, or form fragile chromosomal break

Table 1. JAK2 46/1 allele frequencies and clinical correlations reported in the literature.

Mutation studied	Reference	Disease type (N of patients)	Mutation frequency	46/1 allele		Clinical correlation
				DNA origin	Frequency	
JAK2V617F	Jones et al. <i>Nat Genet</i> 2009;41(4):446-9	V617F+ PV (n=192) V617F+ ET (n=221) V617F+ PMF (n=136) V617F+ RMF (n=41) IE (n=76) Unclassified MPN (n=124)	100% 100% 0% 100% 0% 100%	FB	0.54* 0.46* 0.33 0.48* 0.27 0.55*	Less CFU-GM for 46/1 carriers
JAK2V617F	Ciccydu et al. <i>Nat Genet</i> 2009;41(4):450-4	MPN (n=333)	63.9%	Gra	NA	Not studied
JAK2V617F	Kilpivaara et al. <i>Nat Genet</i> 2009;41(4):456-9	V617F+ MPN (n=245) V617F- MPN (n=74)	100% 0%	Gra	0.50* 0.34	Not studied
JAK2V617F	Colazzo et al. <i>J Thromb Haemost</i> 2009;8(2):413-6	S/T (n=180)	N/A	NA	0.30	No association with biological and clinical parameters
JAK2V617F	Pardanani et al. <i>Leukemia</i> 2010;24(1):110-4	V617F+ ET (n=118) V617F- ET (n=108)	100% 0%	BM	0.44* 0.38*	No association with biological and clinical parameters
JAK2V617F	Tefteri et al. <i>Leukemia</i> 2010;24(1):105-9	V617F+ PMF (n=77) V617F- PMF (n=53)	100% 0%	BM	0.50* 0.35*	Reduced survival for 46/1 non-carriers
JAK2V617F	Tefteri et al. <i>Leukemia</i> 2010;24(7):1302-9	PV (n=242) ET (n=412) PMF (n=277) V617F+ Post-PV/PMF (n=36) Post-ET/PMF (n=24) V617F+ Post-PV/AML (n=11) Post-ET/AML (n=5) Post-PMF/AML (n=28)	N/A N/A N/A 100% N/A 100% 60.0% N/A	BM FB or Gra	22.7%NU* 38.1%NU 35.0%NU 2.8%NU* 29.2%NU 35.4%NU 20.0%NU 32.1%NU	Reduced survival for 46/1 non-carriers with chronic-phase or blast-phase PMF
JAK2V617F	Trifiro et al. <i>Ann Hematol</i> 2010;89(10):979-83	V617F+ MPN (n=107) V617F- MPN (n=42)	100% 0%	FB	0.49 0.32	Not studied
JAK2V617F	Andrikou et al. <i>Leukemia</i> 2010;24(10):1809-13	MPN (n=312) V617F+ PV (n=153) V617F+ ET (n=78) V617F- ET (n=53) V617F+ PMF (n=20) V617F- PMF (n=8) AML with abnormal karyotype (n=188) with normal karyotype (n=129)	80.4% 100% 100% 0% 100% 0% 0% 0%	NA	0.46* 0.48* 0.47* 0.33 0.55* 0.44 0.25 0.33	Increased risk of myelofibrosis for 46/1 HMPV patients Increased frequency of normal karyotype for AML 46/1 carriers
JAK2V617F	Guglielmelli et al. <i>Leukemia</i> 2010;24(8):1533-7	V617F+ PMF (n=133) V617F- PMF (n=69)	100% 0%	Gra	0.41* 0.33	No association with biological and clinical parameters
JAK2V617F	Hsiao et al. <i>Leuk Lymphoma</i> 2011;52(3):478-82	V617F+ ET (n=34) V617F- ET (n=27)	100% 0%	FB	0.48* 0.24	Not studied
JAK2V617F	Kouroupi et al. <i>Blood</i> 2011;117(21):5777-8	V617F+ S/T (n=75) V617F- S/T (n=95)	100% 0%	FB	0.27 0.28	Not studied
JAK2V617F	Ciccydu et al. <i>Haematologica</i> 2011;96(3):367-74	V617F+ familial MPN (n=61) V617F- familial MPN (n=27) V617F+ sporadic MPN (n=481) V617F- sporadic MPN (n=202)	100% 0% 100% 0%	Gra	0.48* 0.33 0.46*	0.31 Not studied
JAK2V617F	Rumi et al. <i>Haematologica</i> 2011;96(3):454-8	V617F+ MPN (n=442) V617F- MPN (n=235) V617F+ LPM-MPN (n=11)	100% 0% 100%	T-cells	0.44* NA 0.41	Increased risk of developing lymphoid neoplasm not linked to 46/1 haplotype, for MPN patients
JAK2V617F	Shalber et al. <i>Blood</i> 2011;117(15):3668-73	S/T (n=199) V617F+ BCS (n=34) V617F- BCS (n=73) V617F+ S/T (n=20) V617F- S/T (n=72)	27.1% 100% 0% 100% 0%	Gra	0.32 0.44* 0.33 0.40 0.24	Increased levels of hemoglobin, hematocrit and red blood cell counts for 46/1 carriers
JAK2V617F	Villani et al. <i>Leukemia Res</i> 2011; [Epub ahead of print]	non MPN S/T (n=55) V617F+ MPN S/T (n=76) V617F- MPN S/T (n=32)	0% 100% 0%	Gra	0.24 0.51* 0.28	Not studied
JAK2V617F	Nehajevsky et al. <i>Haematologica</i> 2011; (this issue)	AML (n=176) AML with normal karyotype (n=81)	NA NA	NA NA	0.40 46/1 carriers: 58.1%	Increased frequency of myelomonocytic AML for 46/1 carriers Reduced survival and increased risk of death by infection for 46/1 carriers

continued on the next page

continued from the previous page

JAK2 exon 12	Özaydin et al. Leukemia 2008; 23(10):1924-6	PV (n=44)	100%	NA	46/1 carriers: 64%	Not studied
JAK2 exon 12	Jones et al. Blood 2010; 115(22):4517-23	MPN (n=69)	100%		0.39*	No association with biological and clinical parameters
MPL exon 10		MPN (n=176)	V617L (n=110) V515K (n=58) other MPL variants (8)	FB or Gra	NA	
MPL exon 10	Patnaik et al. Leukemia 2010; 24(4):859-60	ET and PMF (n=22)	V617L (n=16) V515K (n=6)	BM	0.25	Not studied
	Spolverini et al. Ann Hematol 2011; 90(3):365-6	CML (n=331)	N/A	NA	0.29	Not studied
	Smith et al. Blood 2011; 116(19):3923-32	CMML (n=16)	N/A	BM	0.28	Not studied

The mutation frequency is the percentage of patients carrying the mutation. The 46/1 allele frequency is the fraction of 46/1 alleles in total alleles of a cohort; for instance, the 46/1 allele frequency in the general population is 0.24 according to the Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), meaning that 45% of individuals are 46/1 carriers. The 46/1 haplotype is associated with predisposition to several types of disorders: reduced defense against infection, inflammatory disease, and myeloid malignancy including MPN, acute myelomonocytic leukemia, and NK-AML. * Results with P value <0.05. Abbreviations: MPN: myeloproliferative neoplasm; PV: polycythemia vera; ET: essential thrombocythemia; PMF: primary myelofibrosis; IE: idiopathic erythrocytosis; AML: acute myeloid leukemia; V617F+ and V617F-: positive or negative for the JAK2V617F mutation; SVT: splenic vein thrombosis; post-PV MF: post-PV myelofibrosis; LPN: lymphoid neoplasm; BCS: Budd-Chiari syndrome; CML: chronic myelogenous leukemia; CMML: chronic myelomonocytic leukemia; PB: peripheral blood; Gra: granulocyte; BM: bone marrow; HM: homozygous; NU: nullizygosity; N/A: not available.

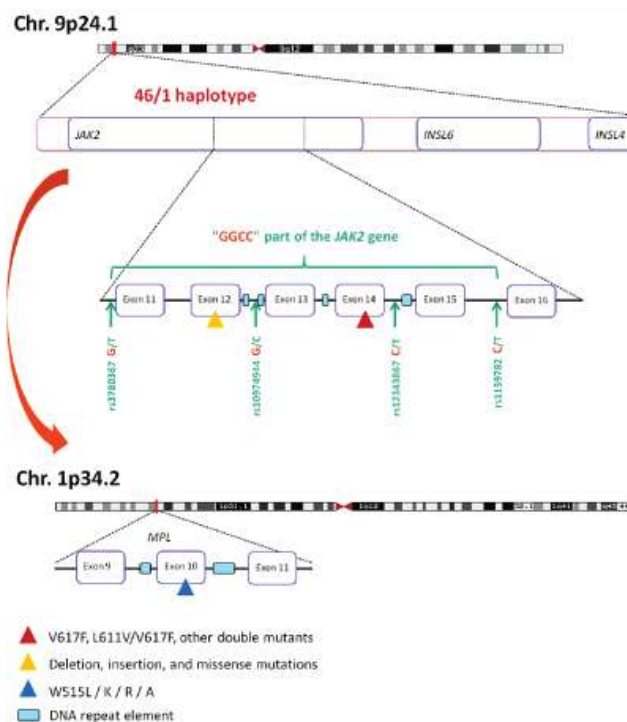


Figure 1. The 46/1 haplotype associated with a predisposition to mutation in the JAK2 and MPL genes and MPN. The 46/1 haplotype is a 280 Kb-long region of chromosome 9p which includes the entire JAK2, INSL6 and INSL4 genes. Most of the JAK2 mutations detected in MPN are localized in the "GGCC" part of the JAK2 gene, represented in green. The "GGCC" part, which begins in intron 10 and finishes in intron 15 of the JAK2 gene, is characterized by four single nucleotide polymorphisms: rs3780367 in intron 10, rs10974944 in intron 12, rs12343867 in intron 14, and rs1159782 in intron 15. These four single nucleotide polymorphisms are in complete linkage disequilibrium. The "GGCC" part of the 46/1 haplotype includes the most frequently mutated JAK2 exons: exon 14 (mainly the V617F mutation, represented by a red triangle), exon 12 (mutations and deletions are represented by a yellow triangle) and to a lesser degree, exons 13 and 15. In addition, the 46/1 haplotype has been reported to be associated with a predisposition to the acquisition of mutations in exon 10 of the MPL gene, located on a different chromosome. MPL exon 10 mutations are represented by a blue triangle. DNA repeat elements (represented by light blue rectangles) can be found close to JAK2 exons 12-15 and close to MPL exon 10. Such repeat sequences are known to increase the risk of DNA mutation or recombination. The presence of repeat elements being independent of the 46/1 haplotype, the mechanisms that make individuals carrying the 46/1 haplotype at higher risk of JAK2 and MPL mutation and MPN are currently not understood.

points – in short, these elements increase the risk of error when DNA is copied during cell division. DNA repeat elements can also influence gene expression by altering promoter accessibility, methylation or the chromatin structure. Our preliminary unpublished observations suggest that DNA repeat intronic sequences vary depending on

individuals and MPN patients and that they can be present in the JAK2 gene independently of the 46/1 haplotype.

In fact, the JAK2V617F mutation and all three types of MPN occur in individuals who do not carry the 46/1 haplotype. In MPN patients who carry the 46/1 haplotype, the V617F and other JAK2 mutations can be found located in

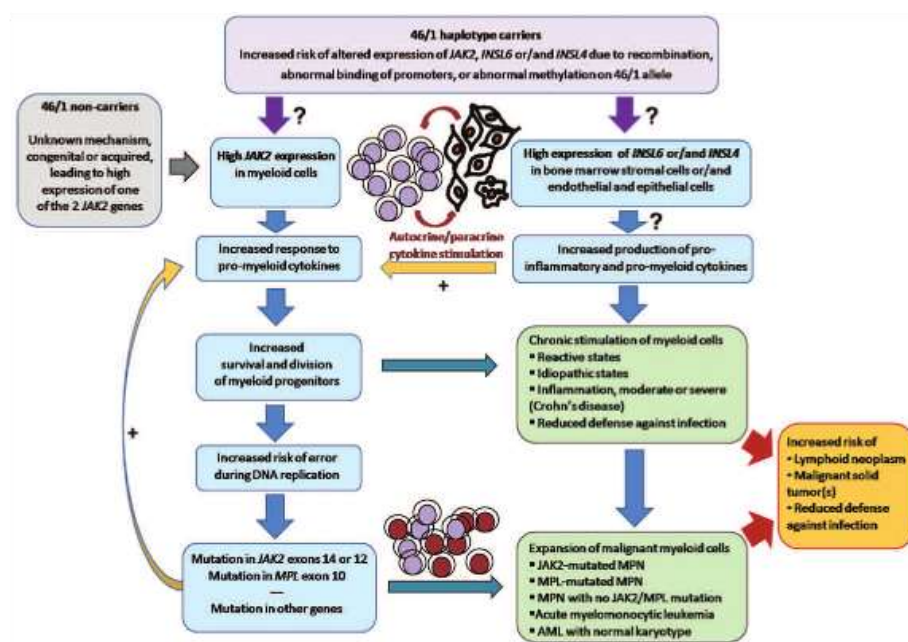


Figure 2. The *JAK2* 46/1 haplotype as a marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection. One hypothesis is that the 46/1 haplotype may be linked to high expression of the *JAK2* gene and/or of other genes that constitute the haplotype: *INSL6* and *INSL4*. The 46/1 haplotype could lead to high expression of the *JAK2* gene on the recombined allele through DNA recombination, mutation, altered promoter accessibility or abnormal methylation. This hypothesis is supported by the fact that high mRNA expression of *JAK2* is frequently observed in MPN patients, and required for certain MPN phenotypes in murine models. Thanks to high *Jak2* levels, affected myeloid cells would be more likely to divide in response to *Jak2*-activating cytokines, making genes important for myelopoiesis, such as *JAK2* and *MPL*, at greater risk of copy errors. Acquisition of mutations in *JAK2*, *MPL* or other genes would accelerate progression toward myeloid neoplasms. For patients who develop MPN, the presence of the 46/1 haplotype could influence disease evolution and survival. Carriers of the 46/1 haplotype who develop AML with normal karyotype (NK-AML) could have reduced survival due to death from infection, according to Nahajevsky et al. (this issue).¹⁰ In addition, the 46/1 haplotype may facilitate expression of *INSL6* and *INSL4* in non-hematopoietic cells, for instance in bone marrow stromal cells. Possible consequences could be excessive production of cytokines with dual action, pro-myeloid and pro-inflammatory, which would further stimulate expansion of myelomonocytic cells and thus facilitate an inflammatory response and perhaps impair defense against infection. Finally, patients with MPN, AML or severe chronic inflammation have been reported to be at greater risk of lymphoid neoplasms and malignant solid tumors.

the other (TCTT) allele yet more than 80% of all V617F mutations occur on the 46/1 allele.^{4,14} Accordingly, the literature shows that the proportions of patients with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis with the 46/1 haplotype are significantly higher in *JAK2*V617F-positive cohorts than in *JAK2*V617F-negative cohorts (Table 1). Moreover, the 46/1 haplotype can be associated with alterations other than mutations in the *JAK2* gene, notably repeated recombination of *JAK2* prior to and after the V617F mutation is associated with high *JAK2* mRNA expression, as we recently described in patients with polycythemia vera.¹⁴ Hence one hypothesis is that the 46/1 haplotype may include unidentified intronic DNA repeat sequences that somehow facilitate DNA recombination and over-expression of the *JAK2* gene located in the recombined allele. In such cases, as *Jak2* transmits the proliferation signals from all the cytokines critical for

myelopoiesis, the 46/1 haplotype would logically predispose carriers to chronically excessive stimulation of myelopoiesis, thereby exposing myeloid progenitors to more frequent cell division and further increased risk of error and mutation in genes more important for myelopoiesis, such as *JAK2* and *MPL* but also *TET2*, *CBL*, *LNK*, *EZH2*, *ASXL1* (list not exhaustive) (representation in Figure 2). We and others have begun to analyze *JAK2* mRNA expression in relation to the 46/1 haplotype with discordant results likely due to the small numbers of patients studied.^{3,6,14,15} However, it is clear that mRNA expression of both wild-type and mutated *JAK2* is frequently higher in leukocytes of MPN patients, and that high *JAK2* expression is relevant to MPN pathogenesis since it is necessary to reproduce polycythemia vera and primary myelofibrosis phenotypes in murine models.^{15,16} Further studies specifically designed to analyze the rela-

tionship of JAK2 mRNA expression in function of the 46/1 haplotype status of MPN patients, associated with intron sequencing, will prove or disprove association of the 46/1 haplotype with high JAK2 expression.

However, JAK2 is only one of the three genes that constitute the 46/1 haplotype. Because they are presumably not expressed in hematopoietic cells, INSL6 and INSL4 have been disregarded so far. Yet INSL6 is expressed in rat bone marrow stromal cells, and INSL4 expression was reported as forming an autocrine loop in cancer cells.^{17,18} Thus we should perhaps not exclude that the 46/1 haplotype could be associated with altered expression of INSL6 and/or INSL4, for instance in bone marrow stromal cells, eventually leading to altered cytokine production. There is proof of yet unexplained JAK2V617F-independent cytokine over-production in MPN, by both bone marrow stromal cells and malignant hematopoietic progenitors.^{19,20} The cytokines that were found to be over-produced were all linked to inflammation as well as capable of stimulating myelopoiesis, an unsurprising finding since evidence of inflammation in MPN is abundant.²¹ Future studies investigating the possible expression and consequences of INSL6 and INSL4 expression in cell types relevant to myelopoiesis and their relationship to the 46/1 status of patients should bring new and important insights into the pathogenesis of myeloid neoplasms as well as of inflammatory diseases.

Finally, the model according to which the 46/1 haplotype could predispose carriers to increased myelomonocytic response to cytokine stimulation is consistent with the well established fact in MPN that the burden of JAK2V617F alleles (typically 46/1 alleles) correlates better with leukocyte cell counts than with hematocrit or platelet counts.¹⁰ A chronic tendency to myelomonocytic expansion would be consistent with increased risks of more severe inflammatory response compared to the risk in 46/1 non-carriers. It would also constitute fertile ground for the acquisition of mutations in genes critical for myelomonocytic expansion and differentiation, eventually leading to malignant transformation toward MPN or AML. It is to be hoped that new genome wide association technologies that investigate both exonic and intronic sequences will provide a detailed analysis of the consequences of the 46/1 haplotype in terms of expression of the JAK2, INSL6 and INSL4 genes and will allow progress in understanding the complex mechanisms that underlie the association of the 46/1 haplotype with predisposition to myeloid neoplasms and inflammation.

Sylvie Hermouet, MD PhD, is Associate Professor of Hematology at the University of Nantes (France). She works in the field of myeloproliferative neoplasms (MPN), conducts research on MPN in Inserm UMR 892, and serves as Chair of the European network MPN & MPN-EuroNet (COST Action BM0902), dedicated to the molecular diagnosis of MPN and related congenital diseases (<http://www.mpnneuro.net>). Mathias Vilaine, MSc, is currently a PhD graduate student at the University of Nantes and performs research in Inserm UMR 892.

Financial and other disclosures provided by the author using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

References

- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008;111(5):2785-9.
- Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):455-9.
- Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):446-9.
- Olcaydu D, Harutyunyan A, Jiger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):450-4.
- Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, et al. JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. *Leukemia*. 2010;24(1):105-9.
- Jones AV, Campbell PJ, Beer PA, Schnittger S, Vannucchi AM, Zoi K, et al. The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(22):4517-23.
- Smalberg JH, Koehler E, Daneshmandi M, Ressler A, Saijo S, Trebicka J, et al. European Network for Vascular Disorders of the Liver (EN-Vie). The JAK2 46/1 haplotype in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis. *Blood*. 2011;117(15):3968-73.
- Kouroupi E, Kiladjian JI, Chomienne C, Dosquet C, Bellucci S, Valla D, et al. The JAK2 46/1 haplotype in splenic vein thrombosis. *Blood*. 2011;117(21):5777-8.
- Andrikovics H, Nahajevsky S, Koszarska M, Megyesi N, Bors A, Halm G, et al. JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010;24(10):1809-13.
- Nahajevsky S, Andrikovics H, Batai A, Adam E, Bors A, Csomor J, et al. The prognostic impact of germline 46/1 haplotype of Janus kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2011;96(11):1613-8.
- Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(8):955-62.
- Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR, et al. 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*. 2010;690(1-2):108-15.
- Cleary C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Pongé T, Harousseau JL, et al. JAK2 mutation and disease phenotype: A double L611V/V617F in dis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia*. 2010;24(5):1069-73.
- Vilaine M, Olcaydu D, Harutyunyan A, Bergeman J, Mourad T, Ramée JF, et al. Homologous recombination of wild-type JAK2, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. In press.
- 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(6):1865-7.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dimhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type JAK2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111(8):3931-40.
- Qi X, Shao M, Peng H, Bi Z, Su Z, Li H. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into neurons and glial cells and differential protein expression in a two-compartment bone marrow stromal cell/neuron co-culture system. *J Clin Neurosci*. 2010;17(7):908-13.
- Brandt B, Kemming D, Packeisen J, Simon R, Helms M, Feldmann U, et al. Expression of early placenta insulin-like growth factor in breast cancer cells provides an autocrine loop that predominantly enhances invasiveness and motility. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(4):823-37.
- Corre-Buscail I, Rineau D, Boissinot M, Hermouet S. Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukins 11 and 8. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1299-308.
- Boissinot M, Cleary C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. Anti-inflammatory hepatocyte growth factor and interleukin-11 are overexpressed in polycythemia vera and contribute to the growth of mutated erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene*. 2011;30(8):990-1001.
- Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Vannucchi AM, Barosi G, Antonioli E, et al. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*. 2011;96(2):315-8.

IV-2 Etudes fonctionnelles de Mpl

IV-2-1 Article 4 : Etude de l'expression et de la localisation cellulaire de Mpl et de Jak2 (*Cleyrat et al.*, en préparation)

La découverte de la dérégulation de l'expression du récepteur Mpl chez les patients atteints de Polyglobulie Vaquez en 1998 par Moliterno et coll. a permis de mieux cibler les acteurs des mécanismes conduisant à la prolifération anormale des cellules malignes dans les SMP. En effet, une diminution du niveau d'expression de Mpl à la surface des plaquettes des patients atteints de SMP peut expliquer augmentation de la concentration de Tpo circulante et ainsi induire une stimulation anormale des mégacaryocytes. Cependant, si l'hypothèse d'un effet de Jak2V617F sur la dégradation de Mpl chez ces patients a été émise pour expliquer les bas niveaux d'expression de Mpl dans les SMP, aucune preuve concrète n'a pu être donnée. De plus, pour certains patients présentant cette diminution d'expression de Mpl, aucune mutation de *JAK2* n'a été mise en évidence.

Récemment, l'étude de Pecquet et coll. a permis de mieux comprendre le rôle de Jak2V617F sur l'expression de Mpl (*Pecquet et al.*, 2012 Blood). Cette étude a été réalisée dans des cellules murines Ba/F3 infectées par un rétrovirus contenant les cDNA codant la protéine Jak2 murine (sauvage ou V617F) et le récepteur Mpl murin. Les observations de Pecquet et coll. semblent indiquer un effet négatif de Jak2V617F sur l'expression de Mpl. En effet, l'ajout de Jak2 sauvage induit l'augmentation de l'expression membranaire de Mpl avec notamment l'augmentation nette de la forme mature (84 KDa) sans faire varier la quantité de Mpl immature (74 KDa). Par contre, l'ajout de Jak2V617F induit la diminution dramatique de la quantité totale de Mpl dans les cellules Ba/F3. Il est intéressant de noter que pour le récepteur à l'Epo (EpoR) aucune variation de niveau d'expression à la membrane n'a été observée en présence de Jak2V617F. Pecquet et coll. ont également montré que le couple Mpl/Jak2V617F est dégradé dans le protéasome.

En collaboration avec le laboratoire du Dr. Wilson B. (Albuquerque, USA), notre équipe a étudié la localisation des protéines Jak2, sauvage ou V617F (à la membrane plasmique ou cytoplasmique, dans des lignées cellulaires hématopoïétiques humaines et murines) (*Girodon et al.*, 2011 Blood). L'un des éléments important de cette étude a été la distinction entre les deux formes de Mpl (immature à 74 KDa et mature à 85 KDa). Nous avons ainsi cherché à

déterminer le devenir de Mpl en présence de la forme sauvage de Jak2 ou de la forme mutée de Jak2 par des techniques de Western Blotting pour déterminer le niveau de glycosylation de Mpl et par des techniques d'imageries cellulaires pour déterminer la localisation et le devenir de Mpl dans ces différentes lignées cellulaires.

Autophagy of ER-retained Mpl is linked to low expression levels of Jak2 and provides an unconventional route to cell surface

Cédric Cleyrat^{1,2}, Anza Dareshouri¹, Mathias Vilaine², Mara P. Steinkamp¹, Daniela Boasa³, Mark Ellisman³, Sylvie Hermouet² and Bridget S. Wilson¹

1. Department of Pathology & Cancer Center, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM, 87131 USA

2. INSERM U892, Institut de Recherche Thérapeutique, CRCNA, Nantes, France

3. National Center for Microscopy and Imaging Research, University of California at San Diego, San Diego CA 92093 USA

Correspondence to: Sylvie Hermouet, INSERM UMR 892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes Cedex 01, France. Tel: +33 2 40 08 40 51; Fax: +33 2 40 08 40 50 ; E-mail: sylvie.hermouet@univ-nantes.fr

Keywords: Mpl/JAK2/JAK2V617F/polycythemiavera/essentialthrombocythemia

Running Title: Mpl expression and autophagy linked to Jak2 levels

Abstract

Bcr-Abl-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are characterized by the activating V617F mutation of the *JAK2* gene (*JAK2V617F*) and platelets with low or absent expression of Mpl, the thrombopoietin receptor. Yet aberrant Mpl expression (absence of mature form, accumulation of ER core-glycosylated form) in MPNs was found linked to low expression levels of wild type *JAK2* (*JAK2WT*). In this study, Mpl trafficking was evaluated in HEL cells (*JAK2V617F*^{+/+}) and K562 cells (*JAK2WT*^{+/+} and expressing the Bcr-Abl fusion protein characteristic of chronic myelogenous leukemia); in these cells, *Jak2WT* favours an increase in the ratio of mature/immature Mpl. K562 cells transfected with *JAK2WT*^{-mCitrine}, but not *JAK2V617F*^{-mCitrine}, had increased Mpl surface expression. Both endogenous Mpl and transfected Mpl^{mOrange2} were detected in punctate structures that stain positively with ER-Tracker and ER exit site (ERES) markers. These structures are negative for other common ER markers, as well as Golgi and endosomal proteins. Ultrastructural studies based on expression of Mpl^{mKO2-MiniSOG} revealed that Mpl accumulates in multivesicular bodies that bud from the ER. Consistent with an autophagic process, Mpl-containing structures stain positive for LC3. Thrombopoietin stimulus results in rapid delivery of ER core-glycosylated Mpl to the surface, likely through the “unconventional” autolysosome-mediated pathway. Thus, Mpl is mainly expressed as ER core-glycosylated form in hematopoietic cell lines, and appears to be degraded in autolysosomes or export to cell surface via an unconventional route.

Introduction

Thrombopoietin (Tpo) and its receptor, Mpl, are the principal regulators of early and late thrombopoiesis (Kaushansky, 2005). Mpl is expressed on platelets, hematopoietic stem cells and early progenitors, where it initiates critical cell survival and proliferation signals after Tpo stimulation (De Sauvage *et al.*, 1996; Solar *et al.*, 1998). When Mpl levels are analysed by SDS-PAGE of normal platelet lysates, two distinct bands reflect the maturation state of the glycosylated receptor (Royer *et al.*, 2005). The mature, 84 kDa form of Mpl bears N-linked carbohydrates that have been processed during transit through the Golgi and reaches the platelet surface through the conventional secretory pathway. The faster mobility, 74 kDa protein represents an immature form that has been modified only by core-glycosylation in the endoplasmic reticulum (ER). Tpo binding to Mpl results in lower circulating Tpo levels, providing a negative feedback pathway for platelet control of thrombopoiesis (Fielder *et al.*, 1996; Stoffel *et al.*, 1996). Conversely, suppression of Mpl protein expression in platelets led to elevated platelet counts in recent murine models, which was attributed at least in part to increased circulating Tpo that can binds to hematopoietic progenitors and megakaryocytes to induced thrombocytosis (Lannutti *et al.*, 2009; Tiedt *et al.*, 2009).

Mpl signalling is mediated through members of the Janus kinase family, principally Jak2 and Tyk2. Thus, acquired mutations in both Mpl (W515K/L) and Jak2 (V617F and others) are contributing factors in myeloproliferative neoplasms (MPN) (Boissinot *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2004; Ihara *et al.*, 1999). Previous studies reported that Mpl surface levels are often abnormally low in platelets of MPN patients, which may be accompanied by accumulation of the immature, ER core-glycosylated form (Kralovics *et al.*, 2003; Moliterno *et al.*, 1998; Moliterno & Spivak, 1999). Since a large fraction of MPN patients carry an activating form of JAK2, a possible scenario is that mutant Jak2 plays an active role in aberrant Mpl synthesis, trafficking or degradation (James *et al.*, 2005; Kralovics *et al.*, 2003). However, although Jak2V617F has been implicated in feedback control of Mpl message stability through miR-28 (Girardot *et al.*, 2010), a direct role for mutant Jak2 in Mpl trafficking is not supported. Indeed, 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 (Moliterno *et al.*, 2006). These authors also noted decreased Mpl expression in MPN patients lacking JAK2 mutations.

Evidence is more compelling that it is the absence of wild type Jak2, and not the presence of mutant Jak2, which is the most critical factor. In this scenario, normal Jak2 serves as a chaperone for Mpl routing to the cell surface and recycling (Huang *et al.*, 2001; Royer *et al.*,

2005; Tong *et al.*, 2006). Consistent with this concept, Tong *et al.* (2006) demonstrated that Jak2 binding to the Mpl Box domain contributed to both stability of the receptor and its exit from the ER (Tong *et al.*, 2006). In a recent study, we investigated the relationship between mRNA for wild-type or mutated JAK2 (JAK2WT, JAK2V617F, JAK2L611V) and the levels of Mpl forms in platelets from healthy donors (HD) and MPN patients. We found a strong correlation between levels of mature, Golgi-processed Mpl and JAK2WT mRNA.

Two interconnected and rapidly advancing cell biology fields provide a foundation for interpreting our results. The first is the unfolded protein response (UPR), which triggers several distinct pathways to sequester and dispose of misfolded proteins that accumulate in the ER (Walter & Ron, 2011). One fate for such proteins can be retrograde translocation from the ER into the cytosol and subsequent proteosomal destruction, through a group of processes referred to as ERAD (ER-associated degradation) (Meusser *et al.*, 2005; Nakatsukasa & Brodsky, 2008; Smith *et al.*, 2011). A second pathway, coined ERAD-II, stimulates autophagosome formation and routing of autophagocytosed material to the lysosomal degradation pathway (Fujita *et al.*, 2007). In this report, we provide evidence that association of Mpl with Jak2WT improves the likelihood for successful exit from the ER, Golgi processing and transit to the surface. When normal Jak2 is limiting or absent, Mpl accumulates in early autophagosomal structures that are physically connected to the ER and resemble isolation membranes (IM) described by others (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009). Through the autophagy pathway, Mpl also reaches secretory lysosomes of transfected hematopoietic cells. This provides a plausible route for limited amounts of ER-core glycosylated Mpl receptor to reach the cell surface. The emerging field of autophagy-based unconventional secretion, associated with such diverse processes as inflammation and tissue remodelling (Deretic *et al.*, 2012), may now be applicable to both the causation and potential treatment of myeloproliferative diseases.

By employing fluorescence and electron microscopy methods, we sought insight into the fate of Mpl protein that fails to progress through the classical secretory pathway (ER to Golgi to plasma membrane).

Results

Tracking Mpl expressed as a fluorescent fusion protein in cells expressing wildtype or mutant Jak2.

The role of Jak2WT in Mpl maturation and trafficking was evaluated in hematopoietic cell lines that expressed either exclusively mutant or wildtype Jak2. For the mutant Jak2 case, Human Erythroid Leukemia (HEL) cells were chosen based upon homozygous expression and amplification of *JAK2V617F*. To represent a hematopoietic cell line expressing modest levels of endogenous Jak2WT, we focused on K562 cells. K562 leukemia cells express the Bcr-Abl fusion protein typical of chronic myelogenous leukemia (CML), share characteristics of both early granulocyte and erythroid lineages and do not express Mpl.

Cellular localization of Mpl is a critical factor in the biogenesis and responsiveness of platelets to Tpo. Here, we used confocal imaging to study the distribution of endogenous Mpl (by immunofluorescence staining) or after transient expression of recombinant Mpl fused to a fluorescent reporter (Mpl^{mOrange2}). In JAK2^{V617F+/+} HEL cells, both endogenous Mpl and Mpl^{mOrange2} were largely restricted to intracellular foci throughout the cell. Mpl was barely detectable at the cell surface in these cells (Figure 1A-B). In JAK2^{WT+/+} K562 cells, appreciable amounts of Mpl^{mOrange2} were observed at the plasma membrane (arrow, Figure 1C). However, Mpl^{mOrange2} was also found in a large perinuclear, intracellular pool. Thus, despite similar western blotting profiles of mature/immature Mpl in these two cell lines, Mpl^{mOrange2} surface expression is a marked feature only of K562 cells that express endogenous Jak2WT.

Jak2WT, but not Jak2V617F, co-localizes with Mpl.

We next evaluated the extent to which Mpl and Jak2 co-localize in both cell types. Results in Figures 1D-G show that transfected Mpl^{mOrange2} co-localizes at the plasma membrane with endogenous Jak2WT in K562 cells (1D), while co-localization is minimal with endogenous Jak2V617F in HEL cells (1E). Arrowheads in plots at right mark location where strong co-localization was noted at the cell margin or intracellular vesicles. When co-transfected into K562 cells, Mpl^{mOrange2} and Jak2^{mCitrine} show significant co-localization at the plasma membrane as well as the intracellular pool (1F). Weak co-localization was observed when Mpl^{mOrange2} was co-transfected with Jak2^{V617F-mCitrine} in K562 cells (1G). Taken together this results support the role of wild type Jak2 in the expression at the surface of Mpl.

Sub cellular localization of Mpl.

Based upon the accumulation of the ER core-glycosylated form of Mpl in both cell lines, we expected an intracellular Mpl distribution consistent with an ER reticular pattern. The punctuate structures harboring both endogenous Mpl and transfected Mpl^{mOrange2} were inconsistent with this expectation indicating that Mpl are not retained or blocked in ER compartment. To characterize these Mpl-positive sub cellular structures, we performed multi-color confocal microscopy on cells expressing Mpl^{mOrange2} or Mpl^{mK02}. Micrographs in Figure 2 (A, C-F, H-J) report results after fixation and immunolabeling with fluorescent antibodies directed towards candidate proteins of known intracellular organelles and sub-regions of the ER. Images in Figure 2B and G are results from live cells labeled with the intra-vital dye, ER Tracker. Results show that fluorescent Mpl partially co-localizes with ER tracker, Sec31a (a marker of ER exit sites), LC3 (autophagic marker) and LAMP1 (lysosomal marker). In contrast, no significant localization was observed with Golgin-97 (Golgi marker). As shown in Supplemental Figure 1, co-localization was not observed between Mpl and calnexin (ER resident protein), ERGIC-53 (ER-Golgi intermediate compartment) or EEA1 (early endosome). Results were comparable in both cell types, indicating that intracellular Mpl is targeted to a post-ER compartment that reaches lysosomes through an LC3-dependent pathway. However, as shown in Supplemental Figure 2, functional Mpl can be express at the cell surface membrane in both *JAK2WT* and *JAK2V617F* cell lines confirming that both Jak2 form allow Mpl maturation and expression at the cell surface membrane.

Correlated light and electron microscopy localization study of Mpl.

Our next goal was to develop a reporter capable of identifying the intracellular location of Mpl with high spatial resolution. We focused on the innovative mini-SOG technology, which is based upon mutagenesis of *Arabidopsisphototropin 2*. Only half the size of green fluorescent proteins, mini-SOG emits singlet oxygen upon photo-activation and can be used to catalyze the local precipitation of diaminobenzidine (DAB) for electron microscopy studies (Shu *et al.*, 2011). Both HEL and K562 cell lines were transiently transfected with Mpl^{mK02-miniSOG}. After 24hr, cells were allowed to settle on poly-L lysine coated cover slips and fixed with glutaraldehyde. Transfected cells were identified based upon mini-SOG and mK02 fluorescence (Figures 3A, B), followed by photo-oxidation in the presence of DAB and oxygen infusion. Samples were then embedded in epon and processed for ultrathin sectioning, as described in Shu *et al* (2011).

Low magnification electron micrographs in Figures 3A, B show that dark precipitates marking the location of Mpl^{mk02-miniSOG} are predominantly in vesicular structures consistent with the punctuate dots seen in fluorescent images of K562 and HEL cells. In high resolution images of these structures in K562 cells (Figures 3E-G), it is apparent that these structures contain multi-vesicular bodies. Evidence for budding directly from the ER is found in micrographs in Figures 3E-F. The morphology is consistent with specialized transition regions, called isolated membrane, that are the initiation sites for autophagosome formation. These results provide the first evidence that, when retained in the ER, Mpl is concentrated and loaded into autophagic carrier vesicles. Osmiophilic reaction products also heavily stain lysosomes in these preparations, consistent with the partial co-localization of Mpl with LAMP1 (Figure 3G). The green arrow in Figure 3G is consistent with fusion of an Mpl-bearing autophagosome with a preexisting lysosome. Additional micrographs, documenting the photo-oxidation process and negative controls for these experiments are provided in Supplemental Figures 3 and 4.

The autolysosome provides a regulated secretory pathway for ER core-glycosylated Mpl to reach the cell surface.

Recently, a novel concept of autophagic unconventional route for protein trafficking emerged (Deretic *et al*, 2012). As shown in Figure 4A and B, some MPL-eCFP and LC3-RFP-eGFP punctuates does not fused together, indicating that some autophagosome does not fused with lysosome. Moreover, when K562 cells, that transiently expressing Mpl^{-mOr2}, were stimulated with Tpo chemically labeled with Alexa Fluor-488 dye (AF488) (SupplementaryFigure 1C). Tpo-488 binds specifically Mpl^{-mOr2} and upon activation, the receptor is internalized. As shown on the plotted fluorescence graph on supplementary figure 1C, there is a very good co-localization of Mpl^{-mOr2} and Tpo-488 at the plasma membrane as well as in endocytic vesicles. Intracellular vesicles containing Mpl^{-mOr2} only probably constitute a pool of receptor ready to be expressed at the membrane or being degraded.

Discussion

Here, we report new insight in the comprehension of Mpl expression and on the deregulation of Mpl surface expression. Like other cytokine receptors, Mpl levels are typically expressed at low to modest levels (Broudy *et al.*, 1997) The presence of immature forms may represent cellular control methods to limit the levels of surface receptors by imposing constraints on the transit to the cell surface. A fine balance of receptor recycling and degradation of course provides another level of control, imposed upon receptors that do reach the cell surface. In

K562 and in HEL human cell lines, expressing Jak2WT and Jak2V617F respectively, we detect co-localization of Mpl, lysosome and autophagosome markers indicating that Mpl was probably degraded after its production in ER via two different interconnecting pathways. We can speculate that only Mpl protein coupled to its specific kinase Tyk2 or Jak2 can pass the quality control in ER to be exported to Golgi compartment. In fact, it seems that Mpl was correctly folded only when Jak2 or Tyk2 was linked to its receptor (Royer *et al.*, 2005). It could explain why the JAK2WT mRNA level, and so the level of wild-type protein was important for Mpl production and maturation observed in platelets of MPN patients (Vilaine *et al.*, in preparation). This work supports the notion that Jak2 plays a role at multiple Mpl trafficking stages. Based upon our confocal results, Mpl co-localizes with Jak2WT in intracellular compartments. It is intriguing that over expression of Jak2WT in cultured cells lowers the fraction of ER core-glycosylated Mpl without achieving an overall increase in mature Mpl. Thus it seems likely that, in addition to its escort function, Jak may actively participate in ER-transmitted signals that result in Mpl degradation when it is overabundant in the ER. We note that additional layers of complexity may come into play during platelet development *in vivo*, where levels of both Tpo and its receptor are controlled through feedback loops. This may explain the differences in Mpl patterns observed in cultured lines and patient samples (Vilaine *et al.*, in preparation). Degradation pathway via autophagy mechanism is well known to degrade unfolded or aggregated proteins (Ogata *et al.*, 2006). Newly synthesized proteins are correctly folded and assembled in the ER. During a cellular stress, the ER failed to correct all proteins folding, leading to the accumulation of unfolded proteins. Thus misfolded and unfolded proteins are targeted to degradation by the autophagy machinery. In response to ER stress, transcription of genes encoding chaperones, lectins, and calcium pump activities are induced that serve to increase the ER's protein folding capacity (Ogata *et al.*, 2006). This process differs to the proteasome degradation pathway which specifically recognizes ubiquitinated proteins for proteasomal degradation. Autophagy is a dynamic process. Upon induction of autophagy, a piece of double-membrane cisternae (called phagophore) engulfs a portion of the cytoplasm and its edges fuse to form a double-membrane-bound autophagosome. The autophagosome subsequently fuses with a lysosome to become an autolysosome, and thereby degrades the cytoplasmic material using the lysosomal hydrolytic enzymes (Suzuki *et al.*, 2010). The majority of Mpl proteins are known to be largely restricted to intracellular foci under the cell membrane (Royer *et al.*, 2005). In these vesicles, Mpl are probably incorrectly folded or aggregated that can explain autophagy mechanism to eliminate unfolded proteins. One possibility was the implication of Mpl-tr

(Coers *et al.*, 2004). Mpl-tr was suspected to be implicated in the regulation of Mpl by degradation. Mpl-tr seems to be capable to link to Mpl to form hetero-complex that can trigger degradation of Mpl via autophagosomes. The second hypothesis was the lack of Jak2 and Tyk2 proteins to correctly folded Mpl proteins. However, data also revealed that ER core-glycosylated Mpl form can be export to cell surface membrane via autophagic unconventional route (Figure 5).

We and others have taken advantage of nucleated hematopoietic cells to study Mpl trafficking and its unique relationship with Jak2. However, platelet biogenesis has some unique features that have not yet been fully explored. Patient studies have thus far been limited to analysis of circulating platelets, which are devoid of nuclei and retain only limited organelle contents. In the future, critical mechanistic insight may be gained from studies of megakaryocyte precursors that are engaged in the synthesis and trafficking of Mpl. It is intriguing to note that platelets do have secretory lysosomes. It is intriguing to speculate that the autophagic pathway could be a normal route for Mpl to reach these organelles, providing a reservoir of ER core-glycosylated Mpl that can be mobilized for surface expression.

Finally, it as be recently described that Jak2V617F mediated phosphorylation of PRMT5 that influence some gene expression like ATG3 that is involved in autophagy mechanism (*Liu et al.*, 2011). We could speculate that Jak2V617F induced more autophagy than Jak2WT and thus more Mpl degradation.

Conclusion

Both Jak2WT and Jak2V617F allow Mpl maturation but the trafficking of Mpl to the cell surface is more efficient with Jak2WT. Co-localization of Mpl and Jak2V617F proteins is poor but allow efficient stimulation by Tpo, consistent with constitutive association and a role for Jak2 as chaperone along the exocytic or recycling pathways. We show that ER core-glycosylated Mpl form can be export to cell surface via autophagic unconventional pathway. Future works will seek to establish if other mutations found in MPN are linked to defects in Mpl expression or trafficking and the possible implication of Mpl-tr in Mpl degradation.

Materials and Methods

cDNA constructs. Construction of plasmids coding for JAK2^{WT} and JAK2^{V617F}, as well as JAK2^{WT-mCitrine} and JAK2^{V617F-mCitrine}, have been described (Cleyrat *et al.*, 2010; Girodon *et al.*, 2011). MPL cDNA fused to eCFP, mOrange2, mKO2 or miniSOG was generated by gene fusion PCR (Ho *et al.*, 1989) using pfu ultra DNA polymerase (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Total cDNA was amplified by PCR before sub-cloning into pcDNA3.1 directional topo vector (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All constructs were checked by sequencing. MPL cDNA and mKO2-miniSOG cDNA containing plasmids were gifts from Drs Tamotsu Yoshimori and Mark H. Ellisman (Shu *et al.*, 2011).

Transient transfection. Transient transfections of HEL and K562 cells were performed using the AmaxaNucleofector device (Amaxa, Cologne, Germany). Ten million cells were routinely transfected with 25 µg of the appropriate DNA plasmid following manufacturer's protocol. Cells were harvested for experiments 24hr after transfection.

Stably transfected cell lines. K562 cells were transfected with cDNA coding for MPL^{-mKO2} or MPL^{-mOr2} as described above, selected using geneticin, sorted by FACS and maintained in media supplemented with geneticin at 1000 µg/mL.

Immunoblots. Ten million cells were lysed in RIPA buffer and 25 µg of total proteins were loaded on a 4-15% polyacrylamide precast gradient gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), followed by transfer to nitrocellulose membrane with an IBlot device (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). After blocking, membranes were probed with specific antibodies for MPL (H-300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or p-JAK2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Blots probed for total JAK2 and β-actin were used for normalization (Millipore, Billerica, MA, USA). In certain cases, western blot membranes were stripped once using stripping buffer (Thermo Fischer Scientific) and then re-probed with another antibody. After incubation with a secondary antibody coupled to HRP (if necessary), blots were revealed with a chemiluminescent substrate (Thermo Fischer Scientific) and imaged with a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Intracellular labeling. For all intracellular labelling: all steps were done at room temperature; 10⁷ cells have been harvested and fixed with 2% PBS-PFA for 20 minutes; rinsed 3 times in

PBS for 5 minutes; permeabilized in 0.05% Triton X-100, 3% PBS-BSA for 10 minutes; nucleus have been stained with Hoechst dye during the permeabilization step; rinsed 3 times in PBS for 5 minutes; incubated with the primary antibody (all primary and secondary antibodies used are listed below) at 1/100 diluted in 3% PBS-BSA for 1^H30; rinsed 3 times in PBS for 5 minutes; incubated with the fluorescent secondary antibody at 1/200 diluted in 3% PBS-BSA for 1 hour; rinsed 3 times in PBS for 5 minutes; mounted in between a glass slide and a glass coverslip using Prolong Gold (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Mounted slides were kept at 4°C before imaging. Primary antibodies directed against: JAK2 (D2E12), calnexin (C5C9), EEA1 (C45B10) and PDI (C81H6) were purchased from Cell Signaling Technology (CST, Danvers, MA, USA); ERGIC-53, Sec31A and c-Mpl were purchased from Santa Cruz Biotechnololy (SCB, Santa Cruz, CA, USA); golgin-97 was purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); LC3 was purchased from MBL (MBL International, Woburn, MA, USA); CD107a (LAMP-1) was purchased from BioLegend (San Diego, CA, USA). Secondary antibodies used: DyLight-488 goat anti-rabbit and Capeli-488 goat anti-mouse were purchased from JacksonImmunoResearch (West Grove, PA, USA). Live cell labelling with ER-Tracker green have been done following manufacturer recommendation (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Tpo labeling with AlexaFluor 488. 20 µg of lyophilized human recombinant Tpo (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were reconstituted in 86 µL of PBS, mixed with 10 µL of NaHCO₃ at 1M and 4 µL of Alexa Fluor 488 dye at 2.94 µM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated at room temperature for 1 hour with very low magnetic agitation. Labelled Tpo was then separated from free dye using a G-25 spin column (GE, Waukesha, WI, USA) and labeled Tpo (Tpo-AF488) was eluted in PBS supplemented with ultra-pure BSA. The Degree Of Labeling (DOL) of the Tpo-AF488 have been determined by spectrophotometry technique and its purity have been evaluated by electrophoresis on a 10% non-reducing polyacrylamide gel and imaged with a fluorescence gel reader (supplementary figure 2B). DOL = 4.22 moles of dye per mole of Tpo. Cm_{Tpo-AF488} = 150 ng/µL.

Statistical analysis. Statistical analysis and diagram have been made using GraphPad Prism 5. Statistical test used are described in the legend of each corresponding figure.

Confocal imaging. All confocal images have been acquired using a LSM 510 META Zeiss microscope. A 405 nm laser diode, an argon and a HeNe1-543 nm lasers have been used with a 40xDIC Oil or a 63xDIC Oil objectives to acquire the different images.

Image acquisition and processing software. The ZEN software (Carl ZEISS) have been used for the acquisition of all confocal images, introduction of scale bar, determination of fluorescence intensity (fluorescence profile and co-localization) and minor image processing. Membrane fluorescence of K562-MPL-mKO2 cells stimulated or not with Tpo was determined by creating a membrane mask on unprocessed confocal images using Slide Book 5. For each cell, the mean fluorescence at the membrane has been obtained by averaging the total fluorescence by the number of pixel after removal of all pixels with fluorescence intensity equal or below the background. Western blot were imaged with a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ device (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the ImageLab 4.0.1 software. Quantitation of western blot bands was done using the same software.

Photo-oxidation and electron microscopy. HEL and K562 cells were transiently transfected with MPL-mKO2-miniSOG and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) in 0.1 M sodium cacodylate buffer (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), pH 7.4 at 4°C overnight. Cells were treated with blocking buffer, photooxidized, fixed, stained and embedded in resin for electron microscopy studies as described by (Shu et al, 2011). Ultrathin sections were prepared using a microtome (Leica UCT) and placed on formvar-carbon-coated Nickel grids. Sections were post-stained with 2% aqueous uranyl acetate (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and Ranolds lead citrate for 20 and 6 min respectively. Electron micrographs were captured in a Hitachi H7500 TEM equipped with an Advanced Microscopy Sciences XR60 camera.

Biotinylation assay. For each condition, 25×10^6 cells were stimulated or not with Tpo at 25 ng/mL at 37°C for different time. Then, cells were harvested, washed three times in ice cold PBS and re-suspended in 1 mL of PBS containing 1.5 mg of Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fischer Scientific). Biotinylation of surface protein was allowed for 30 minutes on ice, then cells were washed three times with ice cold PBS supplemented with 100 mM of glycine in order to quench free biotin. Cells were then lysed in RIPA buffer and biotinylated proteins were immunoprecipitated using streptavidin-agarose beads (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer recommendation. Samples were then loaded on a 4-15%

polyacrylamide precast gradient gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and then transferred to nitrocellulose membrane with an IBlot device (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Subsequently membranes were probed with specific antibodies for MPL (H-300). After incubation with a secondary antibody coupled to HRP (if necessary), blots were revealed with a chemiluminescent substrate (Thermo Fischer Scientific) and imaged with a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Acknowledgements

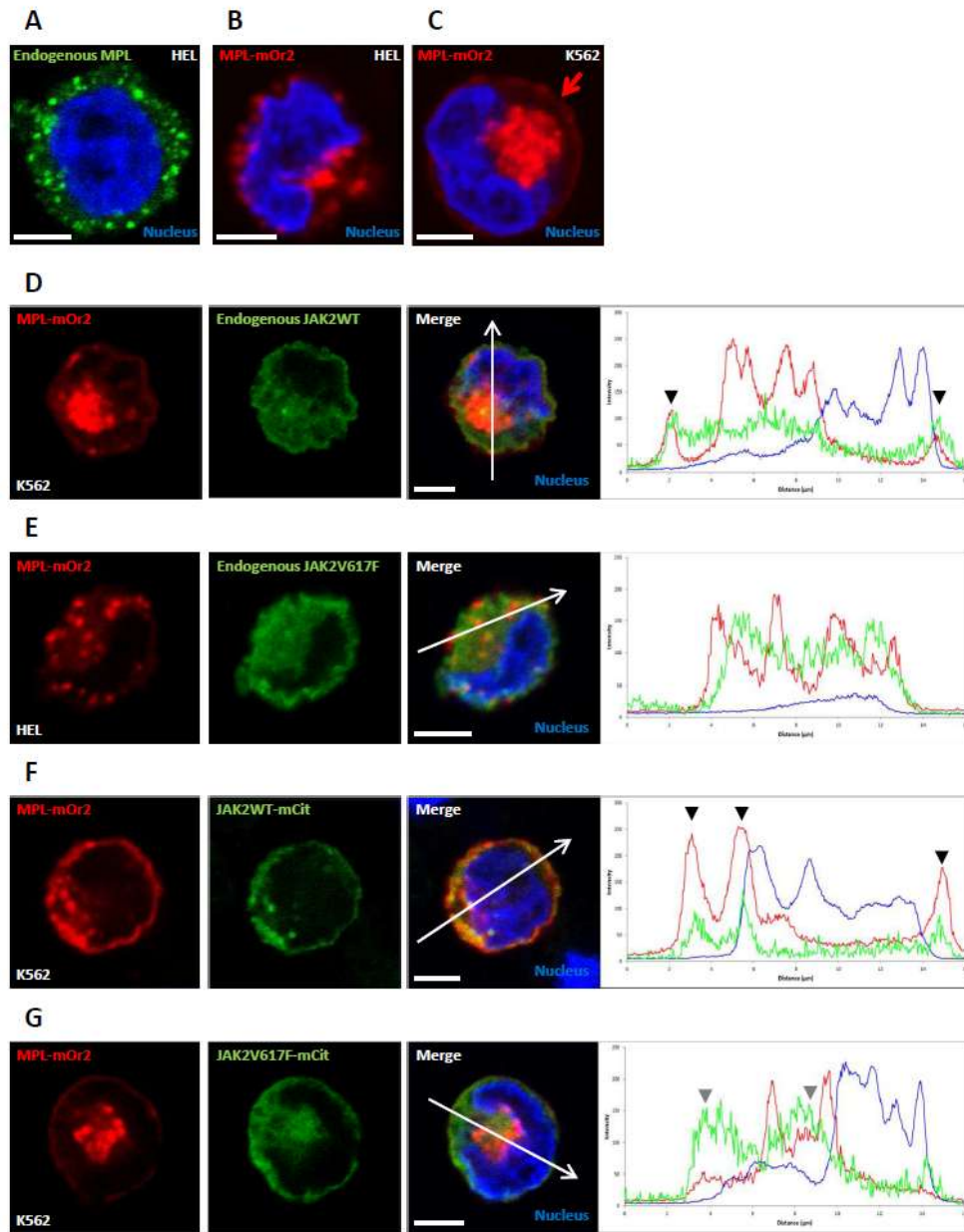
This work was supported by grants from NIH P50GM065794 to BSW, and the Ligue Nationale contre le Cancer (comités des Départements du Morbihan, d'Ille-et-Vilaine, de Vendée, des Charentes) to SH. MV is a recipient of a scholarship from the French Ministry of Research (2009-2012). Images in this paper were generated in the University of New Mexico & Cancer Center Fluorescence Microscopy Shared Resource, funded as detailed on: <http://hsc.unm.edu/crtc/microscopy/Facility.html>.

Authorship: CC, MV performed research, analysed data and helped write the manuscript. BSW and SH designed research, analysed data and wrote the manuscript.

References

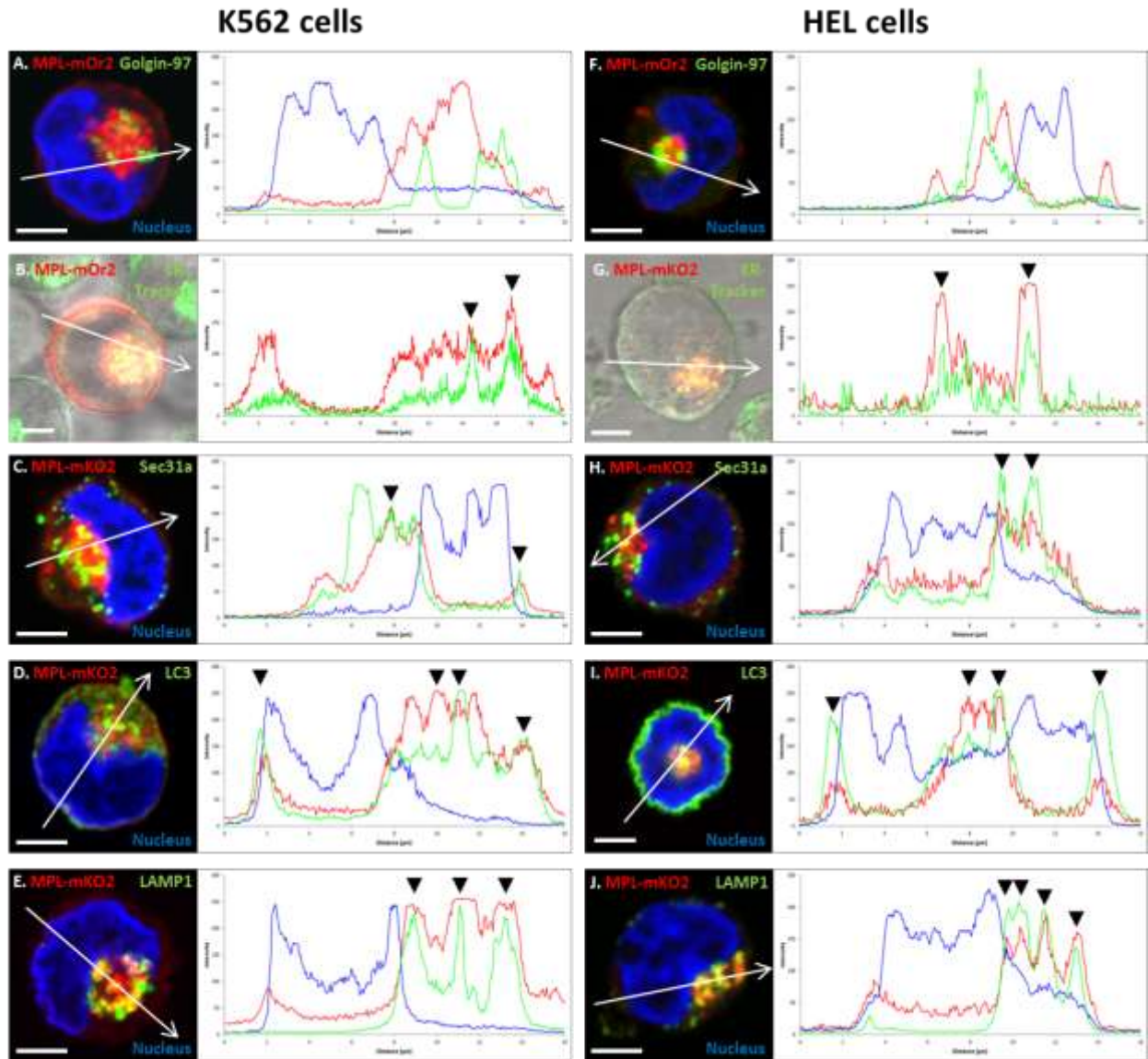
- Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S (2011) Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene***30**: 990-1001
- Broudy VC, Lin NL, Sabath DF, Papayannopoulou T, Kaushansky K (1997) Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin. *Blood***89**(6): 1896-904.
- Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau JL, Issa JP, 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
- Coers J, Ranft C, Skoda RC (2004) A truncated isoform of c-Mpl with an essential C-terminal peptide targets the full-length receptor for degradation. *J Biol Chem***279**(35): 36397-404.
- De Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, Moore MW (1996) Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med***183**: 651-656
- Deretic V, Jiang S, Dupont N (2012) Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation. *Trends Cell Biol*
- Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R (2004) Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood***103**: 4198-4200
- Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, de Sauvage FJ (1996) Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood***87**: 2154-2161
- Fujita E, Kourouk Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T (2007) Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet***16**: 618-629
- Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, Giraudier S, Constantinescu SN (2010) miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. *Blood***116**: 437-445
- Girodon F, Steinkamp MP, Cleyrat C, Hermouet S, Wilson BS (2011) Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood***118**: 2633-2634
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol***11**: 1433-1437
- Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene***77**: 51-59
- Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF (2001) The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell***8**: 1327-1338
- Ihara K, Ishii E, Eguchi M, Takada H, Suminoe A, Good RA, Hara T (1999) Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A***96**: 3132-3136
- 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
- Kaushansky K (2005) The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest***115**: 3339-3347
- Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC (2003) Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood***102**: 1869-1871

- Lannutti BJ, Epp A, Roy J, Chen J, Josephson NC (2009) Incomplete restoration of Mpl expression in the *mpl*^{-/-} mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. *Blood***113**: 1778-1785
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupre 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
- Lippert E, Girodon F, Hammond E, Jelinek J, Reading NS, Fehse B, Hanlon K, Hermans M, Richard C, Swierczek S, Ugo V, Carillo S, Harrivel V, Marzac C, Pietra D, Sobas M, Mounier M, Migeon M, Ellard S, Kroger N, Herrmann R, Prchal JT, Skoda RC, Hermouet S (2009) Concordance of assays designed for the quantification of JAK2V617F: a multicenter study. *Haematologica***94**: 38-45
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol***7**: 766-772
- Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL (1998) Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med***338**: 572-580
- Moliterno AR, Spivak JL (1999) Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood***94**: 2555-2561
- Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL (2006) Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood***108**: 3913-3915
- Nakatsukasa K, Brodsky JL (2008) The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic***9**: 861-870
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, et al. (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol***24**: 9220-9231.
- Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courttoy PJ, Constantinescu SN (2005) Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem***280**: 27251-27261
- Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ, Qi Y, Ramko EB, Davidson MW, Jin Y, Ellisman MH, Tsien RY (2011) A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol***9**: e1001041
- Smith MH, Ploegh HL, Weissman JS (2011) Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science***334**: 1086-1090
- Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL (1998) Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood***92**: 4-10
- Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC (1996) Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood***87**: 567-573
- Suzuki K, Ohsumi Y (2010) Current knowledge of the preautophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett* **584**: 1280-6.
- Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakhanova S, de Sauvage FJ, Jackson CW, Skoda RC (2009) Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood***113**: 1768-1777
- 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
- Tong W, Sulahian R, Gross AW, Hendon N, Lodish HF, Huang LJ (2006) The membrane-proximal region of the thrombopoietin receptor confers its high surface expression by JAK2-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem***281**: 38930-38940
- Walter P, Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science***334**: 1081-1086
- X Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, Harr MW, Levine RL, Xu H, Tefferi A, Deblasio A, Hatlen M, Menendez S, Nimer SD (2011) JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell***19**(2): 283-94.



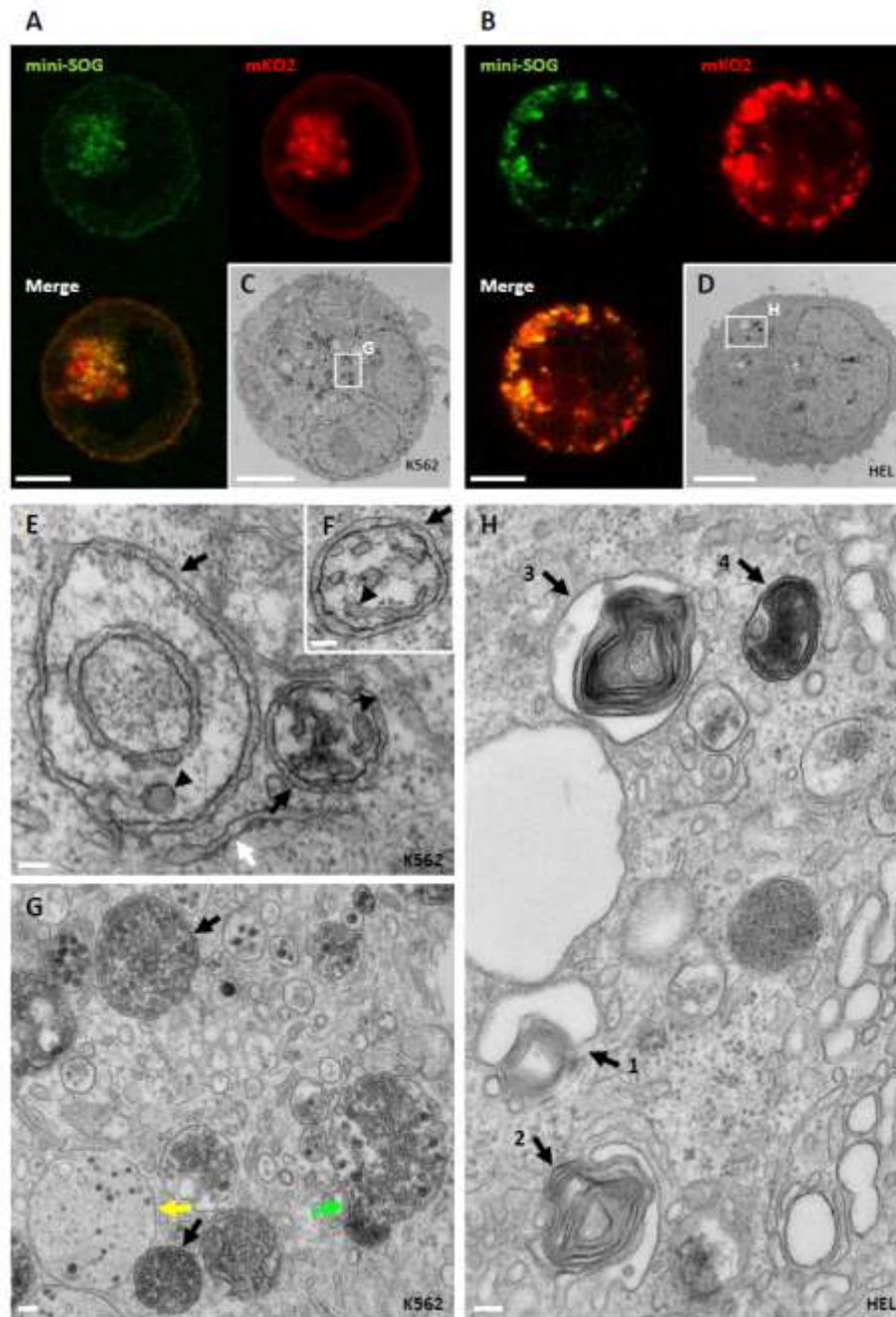
Legend of Figure 1: Mpl is expressed at the surface in JAK2WT cells and co-localizes strongly with JAK2WT.

A-B. Confocal fluorescent images of HEL cells (JAK2V617F+/+) after immuno-fluorescent labeling of endogenous Mpl (**A**), or after transient transfection with cDNA coding for a chimeric Mpl protein fused to mOrange2 (Mpl-mOr2) (**B**) are showing Mpl as largely restricted to intracellular foci throughout the cell. There are little or no Mpl receptors detectable at the cell surface. **C.** Confocal fluorescent image of K562 cells (JAK2WT+/+) transiently transfected with cDNA coding for Mpl-mOr2 shows an intracellular pool of Mpl-mOr2 and significant amounts of Mpl receptor that reach the plasma membrane (red arrow). **D-E.** Confocal fluorescent images obtained after transient expression of Mpl-mOr2 and immuno-fluorescent labeling of endogenous JAK2 in K562 (**D**) or HEL (**E**) cells. Traces of fluorescence profile (drawn across an individual cell and indicated by a white arrow) are showing a good co-localization of Mpl and JAK2WT in K562 cells at the plasma membrane (black triangles) but no co-localization have been observed between Mpl-mOr2 and JAK2V617F in HEL cells. **F-G.** Confocal fluorescent images obtained after transient co-expression of Mpl-mOr2 and either JAK2WT-mCitrine (JAK2-mCit) (**F**) or JAK2V617F-mCitrine (JAK2-V617F-mCit) (**G**) in K562 cells. Traces of fluorescence profile (white arrows) are showing a very good co-localization of Mpl-mOr2 with JAK2WT-mCit, especially at the plasma membrane (black triangles), but a very poor co-localization with JAK2V617F-mCit (grey triangles). Nucleus are labeled with Hoechst and scale bars = 5 μ m.



Legend of Figure 2: Co-localization study of Mpl with different intra-cellular compartments in K562 and HEL cells.

A-J. Confocal fluorescent images obtained after transient expression of Mpl-mOr2 or Mpl-mKO2 and immuno-fluorescent labeling of intra-cellular compartments' markers proteins in K562 (**A-E**) or HEL (**F-J**) cells. **B** and **G** have been obtained by live cell imaging experiments. In both cell lines, traces of fluorescence profile (white arrows) are showing a poor co-localization of Mpl-mOr2 with Golgin-97 (Golgi apparatus marker). A partial co-localization of Mpl-mKO2 have been found with the endoplasmic reticulum (ER) (ER-tracker), the ER exit sites (ERES)(Sec31a) and autophagy vesicles (LC3 positive vesicles). Finally a strong co-localization of Mpl-mKO2 with lysosomes (LAMP-1) has been found, indicating a possible degradation of Mpl directly after its production in the ER compartment via an autophagy mechanism. Nucleus are labeled with Hoechst and scale bars = 5 μm .

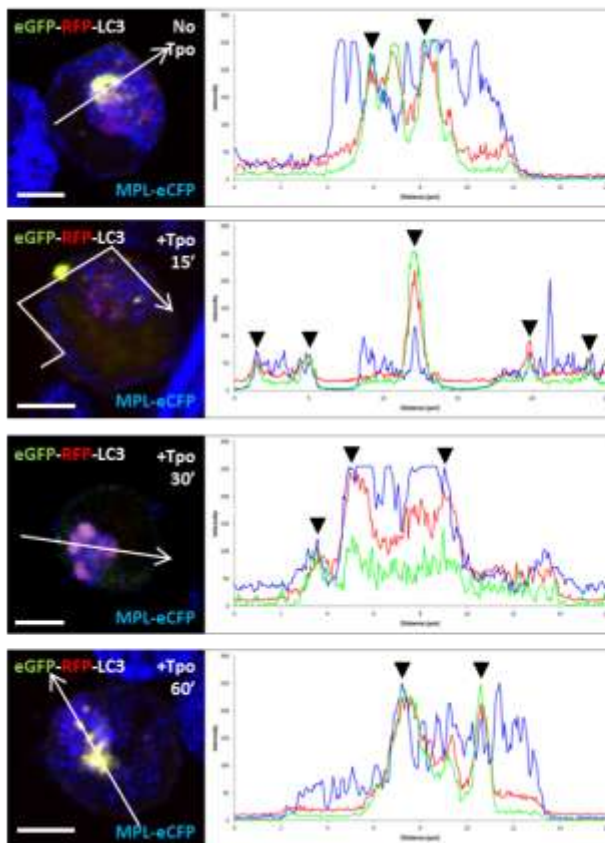


Legend of Figure 3: Correlated light and electron microscopy (EM) indicates a degradation of Mpl by autophagy.

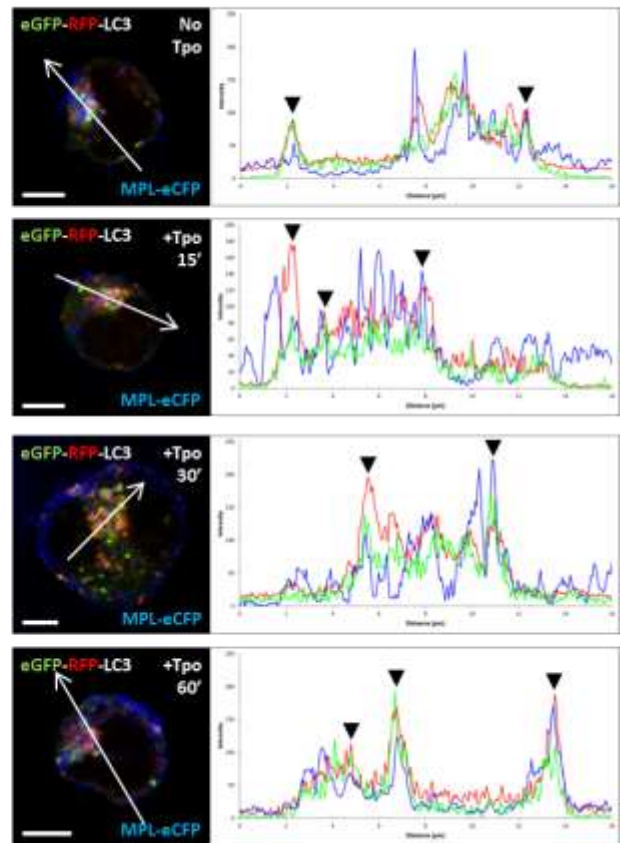
A-B. Confocal fluorescent images obtained after transient expression of Mpl tagged with mKO2 and miniSOG in K562 (A) and HEL (B) cells. **C-D.** Electron micrographs of K562 (C) and HEL (D) cells transiently expressing Mpl-mKO2-miniSOG. Dark precipitate indicates the presence of the miniSOG tagged Mpl protein after photo-precipitation of DAB. White boxes with associated letters indicate original location of higher magnification images with corresponding letters. **E-G.** High magnification electron micrograph of K562 cells showing the formation of autophagosomes (black arrow) from the ER membranes (white arrow) and around isolated membranes (IM) (black triangles). **G.** Shows an autophagosome (black arrow) docking with a lysosome (yellow arrow). The autolysosome (green arrow) resulting from the fusion of this two vesicles allows the delivery of the autophagosomal content into the lysosome for degradation. **H.** High magnification electron micrograph of HEL cells showing different stage of formation of autophagosomes (black arrows numbered from 1 (early stage) to 4 (late stage)).

N.B.: A and C, as well as B and G are not representing the exact same cell. Scale bars = 5 μ m (A-D) or 100 nm (E-H).

A. K562 cells



B. HEL cells



Legend of Figure 4: Correlated

This figure represents cells transfected with a LC3-RFP-eGFP construct and MPL-eCFP : LC3 is a marker of autophagic vesicles. When an autophagosome fuses with a lysosome to form an autolysosome, the acidity contained into the lysosome is going to quench the eGFP fluorescence of the LC3 construct...in this case we should observe blue (because of MPL-eCFP) and red (LC3-RFP) vesicles. If we observe blue, red and green vesicles that would mean that we have autophagosomes that haven't fused with lysosomes : in this case it can be that these autophagosomes are being used for secretion or that they have not yet fused with a lysosome

Unconventional membrane expression of immature MPL by autophagy

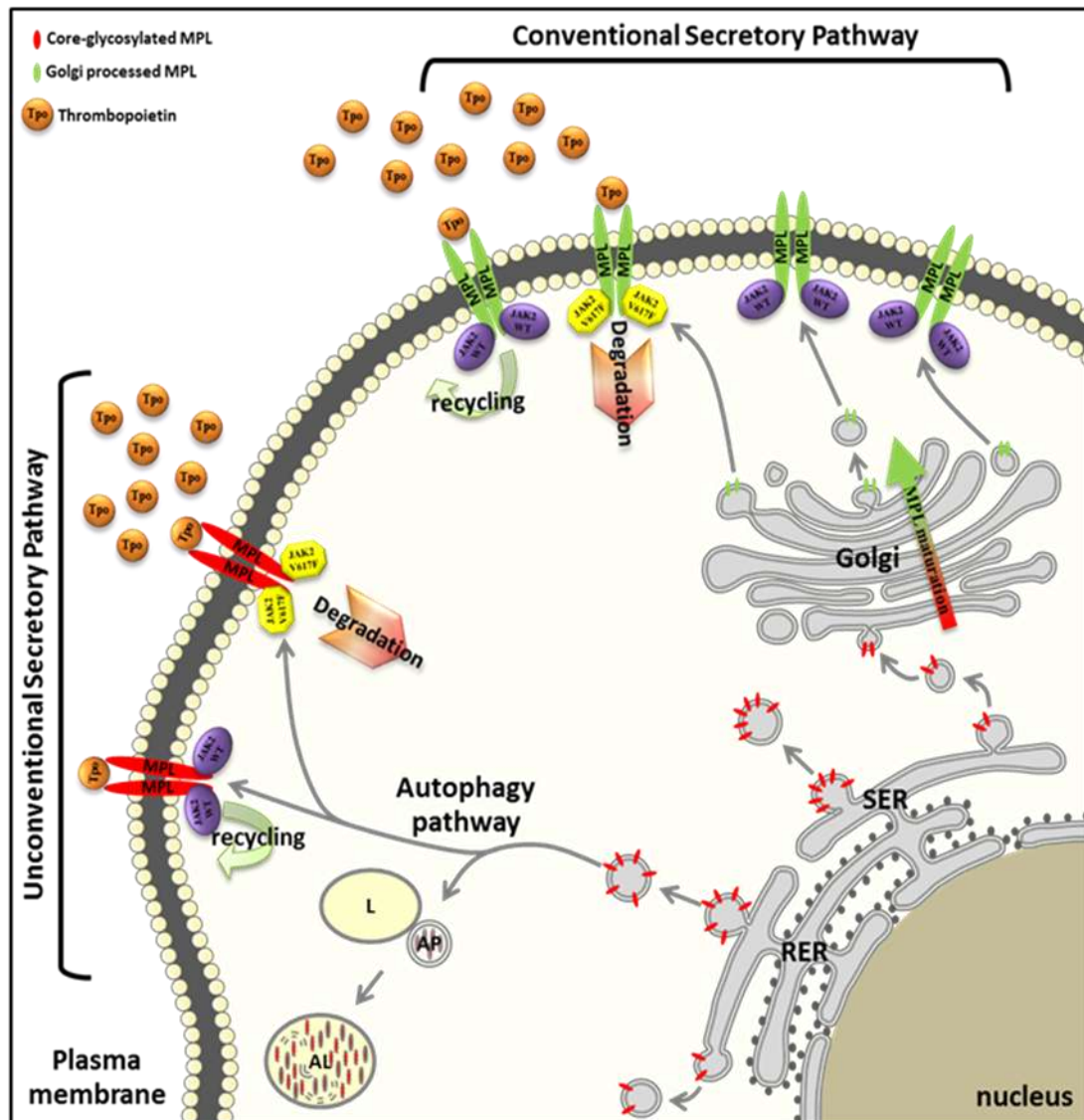
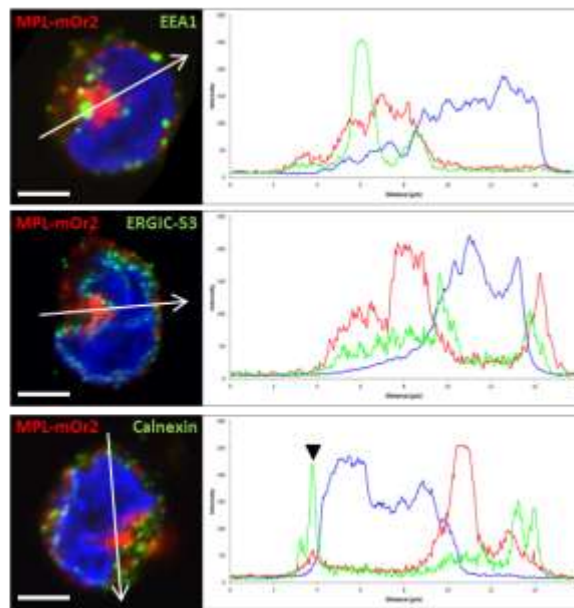
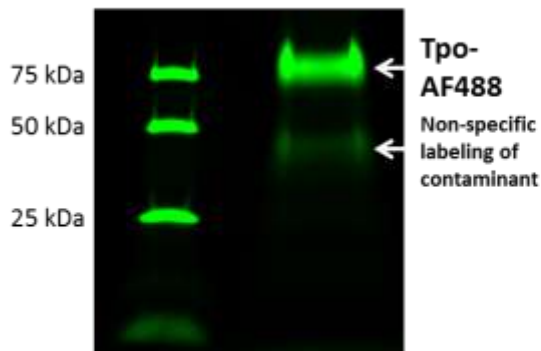


Figure 5. Trafficking of Mpl receptors in normal and MPN cells. Mpl can be export to the plasma membrane via 2 different routes. The conventional secretory pathway: Mpl was first produce in the ER (in red) and link to chaperone protein (Jak2 or Tyk2). After the addition of several glycosylation in ER compartment, the Mpl/Jak2 pair was transferred to Golgi apparatus where Mpl maturate (in green). Finally, Mpl/Jak2 pair was export to the plasma membrane via some vesicles and express as a homo-dimeric receptor (in green). At the plasma membrane, Tpo can bind to Mpl and induce signalling, and then the recycling or the degradation of the Mpl/Jak2 complex. In presence of Jak2V617F (in yellow), Mpl have similar route to be expressed, but was probably rapidly recycled or degraded due to the constitutive activation of Jak2V617F protein in the absence of Tpo stimulation. Mpl can be also expressed at the plasma membrane via unconventional secretory pathway. In fact, ER core-glycosylated Mpl (in red), not totally glycosylated, are trapped in vesicles that bounds from ER compartment to form autophagosomes. Then, these vesicles have 2 routes. The first one was for the degradation of ER core-glycosylated Mpl surplus via autophagosome that fused with lysosomes. The second outcome for ER core-glycosylated Mpl trapped in autophagosome was the export to the plasma membrane via an unconventional pathway. This ER core-glycosylated Mpl appear to be functional and can be recycled or degraded like the fully glycosylated Mpl.

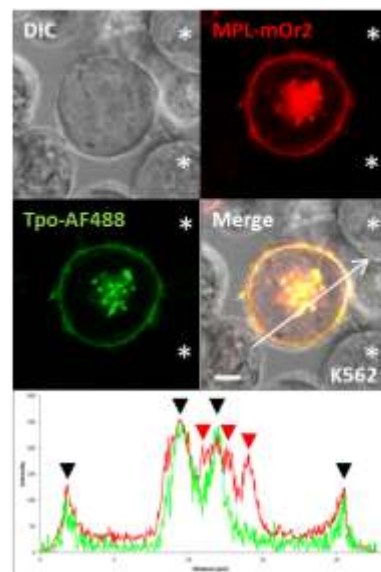
A. HEL cells



B. Tpo labeling with AF488

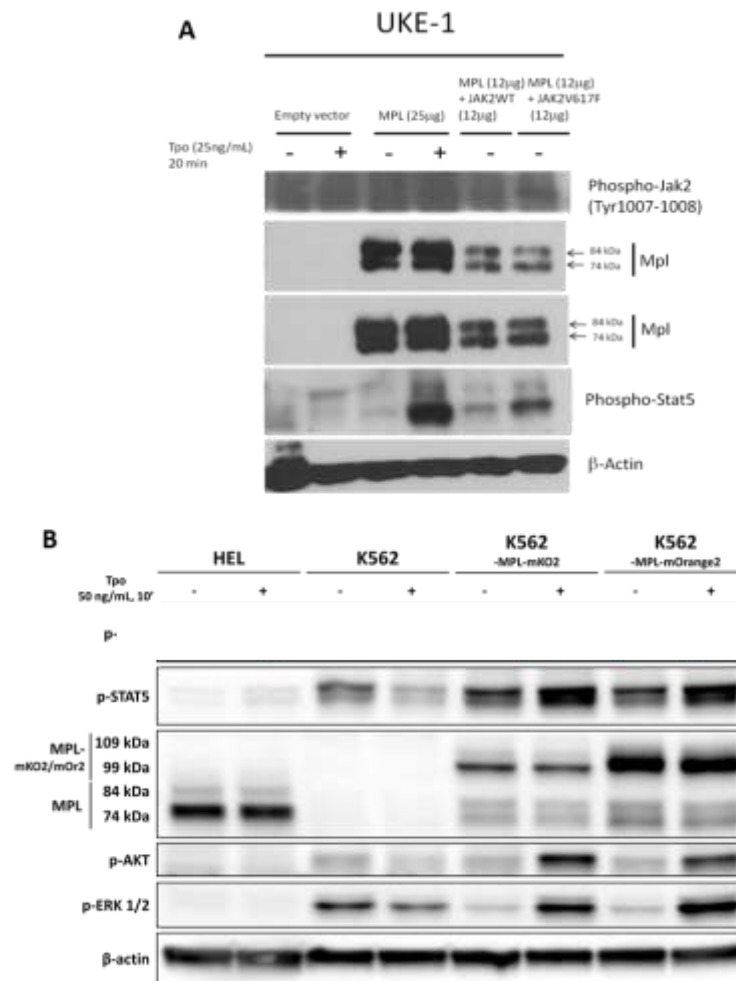


C. Stimulation with Tpo-AF488



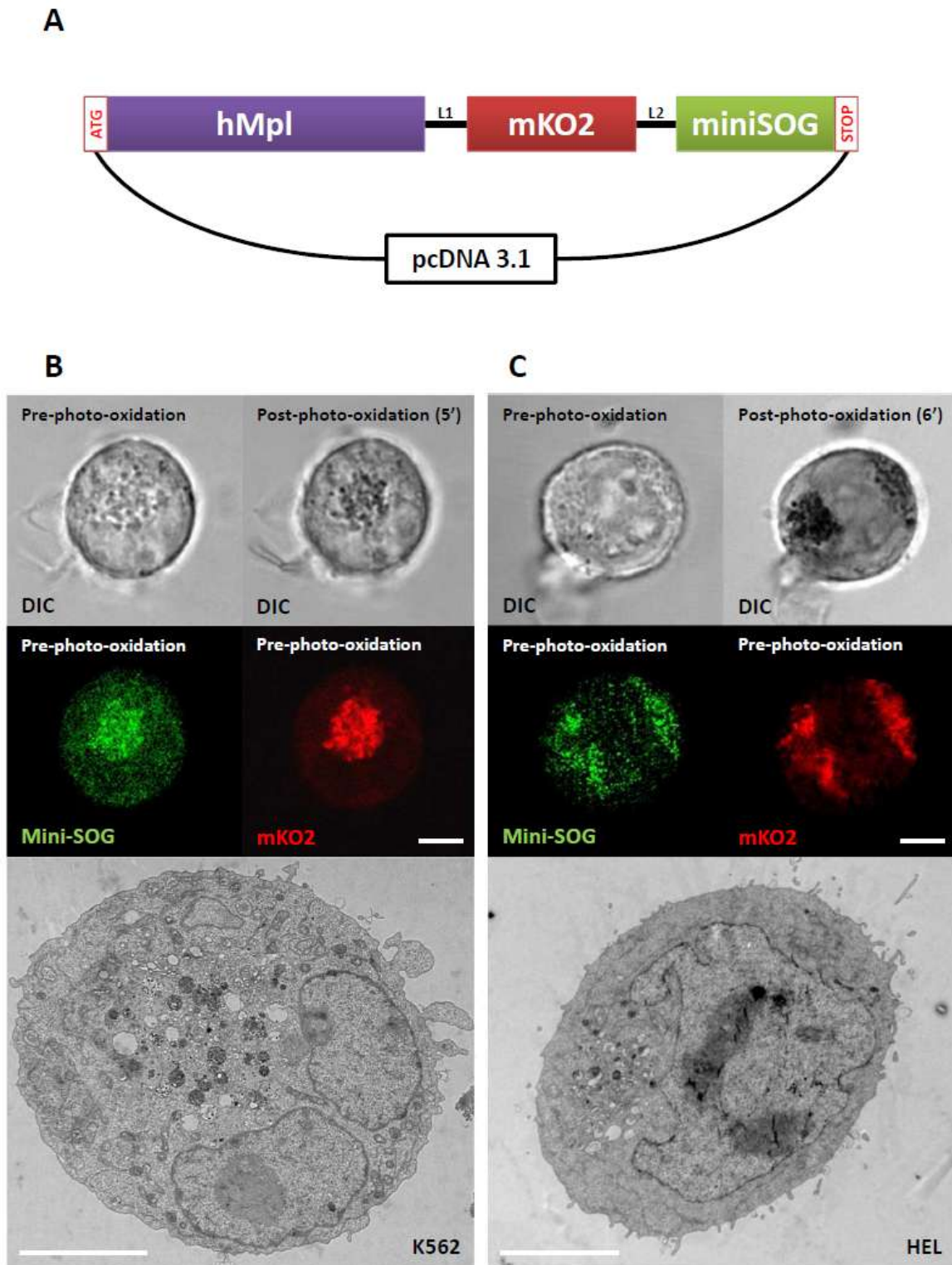
Legend of Supplementary Figure 1:

A. Additional co-localization attempt with early endosome (maybe would need to be repeated after Tpo stimulation...?) (EEA1), the ER-Golgi Intermediate Compartment (ERGIC-53) and another marker for ER (calnexin). **B.** Tpo labelling with AF488. **C.** Confocal image of K562 cells transiently expressing Mpl-mOr2 and stimulated with Tpo chemically labeled with Alexa Fluor-488 dye (AF488). Tpo-488 binds specifically Mpl-mOr2 and upon activation the receptor is internalized. As shown on the plotted fluorescence graph, there is a very good co-localization of Mpl-mOr2 and Tpo-488 at the plasma membrane as well as in endocytic vesicles (black triangles). Intracellular vesicles containing Mpl-mOr2 only (red triangles) constitute probably a pool of receptor ready to be expressed at the membrane or being degraded. As a control, white stars indicated untransfected cells that do not bind Tpo-AF488 and prove the specificity of the signal. Scale bars = 5 µm.



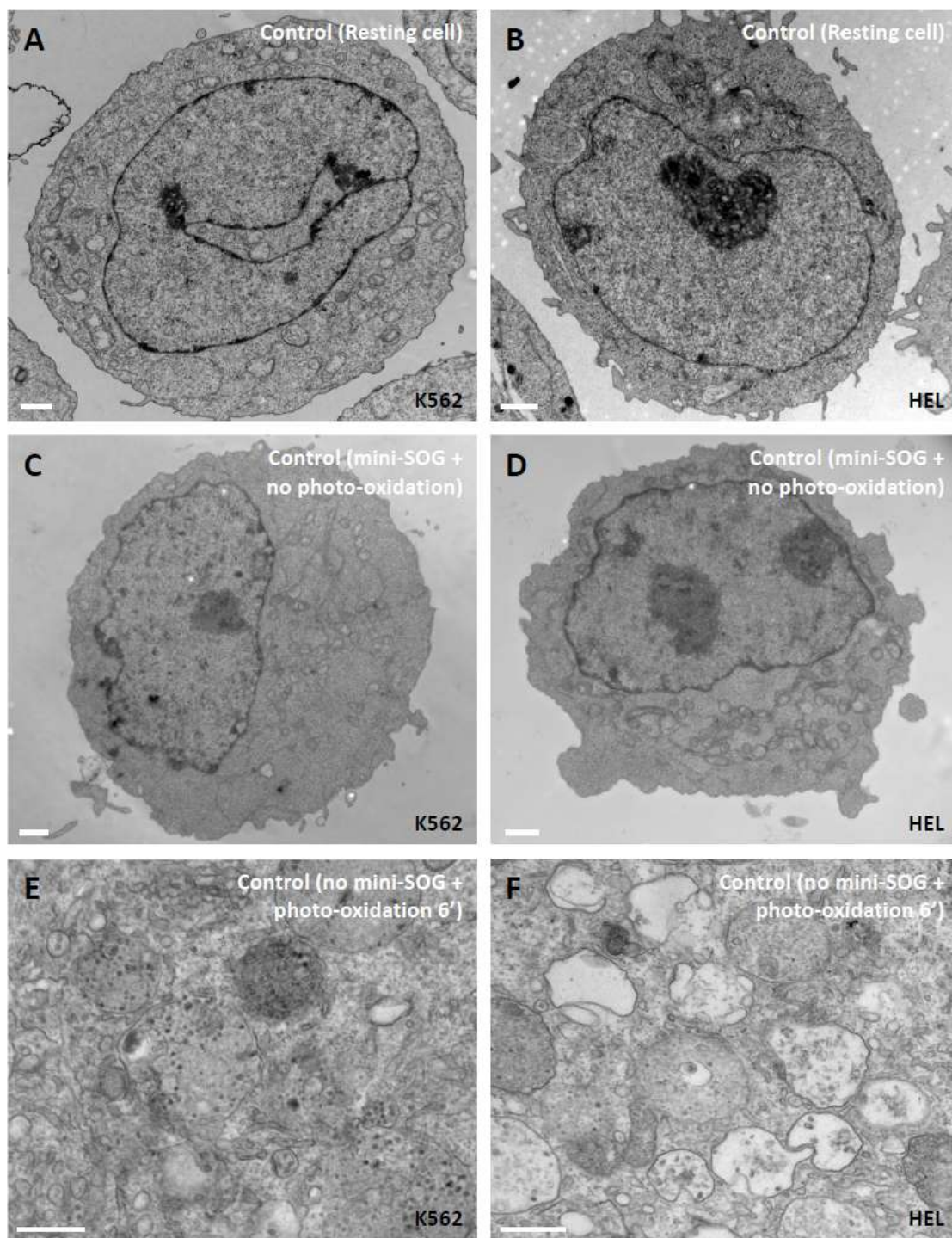
Legend of Supplementary Figure 2: Analysis of Tpo signalling of Mpl in HEL, K562 and UKE-1 cell lines.

A. Tpo stimulation of UKE-1 cell line (*JAK2V617F*^{+/+}) transiently transfected with MPL construction. After 20 minutes with 25ng/mL of Tpo at 37°C, a clear phosphorylation of Stat5 was detectable. **B.** Tpo stimulation of HEL and K562 cell lines. In HEL cells (*JAK2V617F*^{+/+}), a faint phosphorylation of Stat5 was detectable after Tpo stimulation, consistent with the Mpl expression profil that show us a large majority of ER core-glycosylated Mpl form. In K562 cells (*JAK2WT*^{+/+}), a clear phosphorylation of Stat5 was detectable with both MPL constructions: Mpl^{-mK02} and Mpl^{-mOrange2}.



Legend of Supplementary Figure 3: Correlated fluorescent and electron microscopy of mKO2-miniSOG labelled Mpl proteins.

A. Schematic representation of the DNA construct coding for the Mpl-mKO2-miniSOG fusion protein. **B-C.** Correlated light, before and after photo-oxidation, and electron micrograph images from a single K562 (**B**) or HEL (**C**) cell. Scale bars = 5 μ m.



Legend of Supplementary Figure 4: TEM images of control experiments on K562 and HEL cells showing the specificity of the signal/precipitate observed with photo-oxidized Mpl-mK02-miniSOG transfected cells.

A-B. TEM images of untransfected K562 (A) or HEL (B) cells. No dark precipitate can be observed. **C-D.** TEM images of K562 (C) or HEL (D) cells transfected with Mpl-mK02-miniSOG in absence of photo-oxidation showing the absence of obvious dark precipitate. **E-F.** High magnification TEM images of untransfected K562 (E) or HEL (F) cells submitted to the photo-oxidation process. Small dark spots can be observed in vesicles identified as lysosomes and are probably due to the presence of oxidative enzymes. The same observation have been made concerning mitochondria membranes. Scale bars = 1 μm (A-D) or 500 nm (E-F).

Conclusions :

Dans ce travail, nous avons entrepris de déterminer la localisation de Mpl dans des lignées cellulaires érythroïdes *JAK2WT* et *JAK2V617F* et réintroduit les formes sauvage et muté de Jak2 dans ces lignées pour voir leur impact sur l'expression des deux formes de Mpl (mature et immature) mais également sur leur localisation cellulaire. Nous avons ainsi montré que *Jak2WT* et *Jak2V617F* permettait la production et la maturation de Mpl ainsi que son expression à la membrane plasmique. Ce résultat est clairement différent de celui observé par Pecquet et coll. qui dans un modèle murin, en induisant l'expression de Mpl et de Jak2 murin, ont conclut à un impact délétère majeure de *Jak2V617F* sur l'expression de Mpl (*Pecquet et al.*, 2012 Blood). Cependant, nous avons pu montrer que la forme *Jak2V617F* induit une dégradation de Mpl après association. Cette dégradation se ferait à la suite de la production de Mpl dans le réticulum endoplasmique soit directement dans les lysosomes, soit à la suite d'une réponse aux protéines qui n'ont pas une bonne conformation 3D, induisant une dégradation par autophagie. Cette autophagie concerne donc la forme immature de la protéine Mpl. L'autophagie semble être induite par une réponse au stress au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, lorsqu'un trop grand nombre de protéines Mpl sont produites, et mal conformées, une réponse de survie cellulaire par élimination des protéines mal conformées intervient. Ceci peut s'expliquer par le manque de *Jak2WT* pour permettre une bonne conformation de toutes les protéines Mpl produite au niveau du réticulum endoplasmique. Cependant, nos résultats indiquent également que l'autophagie induite peut servir de voie non conventionnelle pour l'expression de Mpl à la surface cellulaire. Une partie des paires Mpl/Jak2 sont alors directement dirigée du RE vers des vésicules d'autophagie, et sont alors exportés vers la membrane plasmique (voir les images de microscopie électronique). Ce mécanisme permet ainsi l'expression membranaire d'une partie des récepteurs Mpl immatures. Ces récepteurs Mpl immatures semblent être fonctionnelles.

IV-2-2 Article 5 : Etude fonctionnelle des formes mutées MplW515K/L/A/R (article en préparation)

Nous rapportons ici le cas de trois membres d'une famille présentant une thrombocytose familiale. Une femme de 36 ans (proposante) (C1, **Figure 37**), présentant une hyperplaquettose chronique (entre 628 et 780 x10⁹/L) connue depuis 10 ans. D'autres cas d'hyperplaquettose chronique bénigne sont également connus dans sa famille : le père et la grand-mère paternelle. La grand-mère paternelle est décédée à un âge avancé à la suite d'un problème respiratoire, sans lien avec l'hyperplaquettose. Le père (74 ans) (C2, **Figure 37**) présente également une hyperplaquettose chronique bénigne. Aucun SMP n'a été observé dans cette famille.

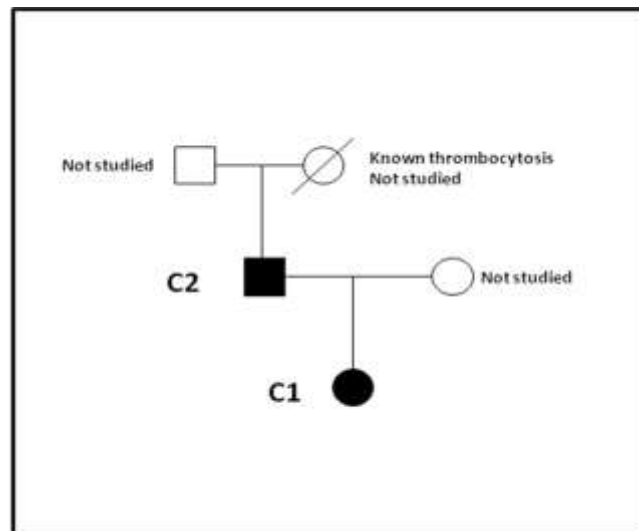


Figure 37 : Arbre généalogique de la famille étudiée présentant un historique d'hyperplaquettose bénigne. Les ronds correspondent aux individus de sexe féminin et les carrés correspondent aux individus de sexe masculin. Les carrés et ronds pleins (noirs) correspondent aux patients porteurs de la mutation T1588C de *MPL*.

Le premier diagnostic proposé a été celui d'une TE. Pour valider cette hypothèse, une recherche de mutation de *JAK2* et de *MPL* a été réalisée. Aucune mutation n'a été détectée dans les exons 12 et 14 de *JAK2*. Par contre, une mutation dans l'exon 10 de *MPL* a été mise en évidence à l'aide d'une technique de High Resolution Melting Curve (HRM) (**Figure 38**).

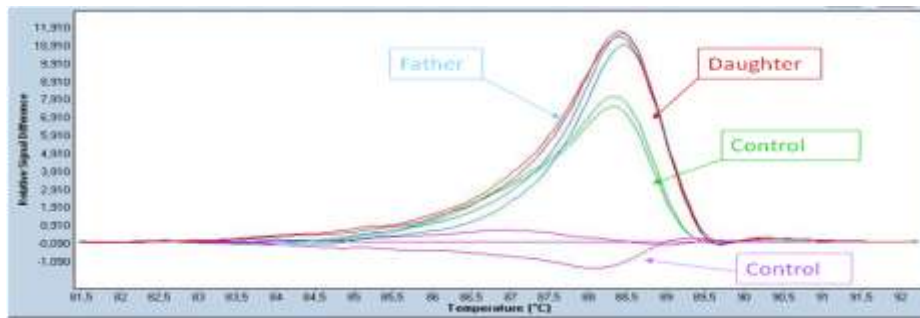


Figure 38 : Analyse HRM de l'exon 10 de *MPL* sur ADN génomique des deux cas d'hyperplaquettose bénigne familiale.

Par séquençage direct de l'exon 10 de l'ADN génomique de sang total (regroupant aussi bien des cellules saines que des clones malins dans les SMP) des deux patients, une mutation T1588C (W515R) à l'état hétérozygote a été détectée (**Figure 39**).



Figure 39 : Electrophérogammes du séquençage direct de l'exon 10 de *MPL* sur ADN génomique des deux cas d'hyperplaquettose bénigne familiale.

D'autres mutations de Mpl, touchant le même résidu (W515K/L) ont déjà été décrites comme étant activatrice de plusieurs voies de signalisation induisant la prolifération anormale des cellules hématopoïétiques. Aucune mutation *MPL*W515R n'a été rapportée à ce jour dans des familles pré-disposées aux TE, ni dans aucune des familles atteintes de thrombocytose héréditaire bénigne. Nous avons donc entrepris de déterminer si dans cette famille, la mutation T1588C (W515R) est héréditaire ou acquise, en étudiant de plusieurs types cellulaires hématopoïétiques et non hématopoïétiques chez les deux patients. Nous avons également étudié *in vitro* l'effet de cette mutation W515R sur l'activité de la protéine Mpl (signalisation basale et en présence de Tpo) en la comparant aux autres mutants déjà identifiés dans les SMP.

Germline *MPL*W515R mutation in a family with isolated thrombocytosis

Mathias Vilaine¹, Victor Gourain¹, Cédric Cleyrat^{1,2}, Delphine Féron¹, François Girodon³, Nadine Morineau⁴, Ashot Harutyunyan⁵, Robert Kralovics⁵, Sylvie Hermouet^{1,6}

¹INSERM UMR 892, CNRS UMR 6299, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, Nantes, France;

²Department of Pathology and Cancer Center, University of New Mexico Health Sciences Center, Albuquerque, NM, 87131 USA; ³Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon, France; ⁴Clinique Catherine de Sienne, Nantes, France; ⁵Center for Molecular Medicine (CeMM) of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria;

⁶Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.

Correspondance to : Sylvie Hermouet, INSERM UMR892, Institut de Recherche Thérapeutique, Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1, France.

Phone : +33 (0)2 28 08 03 30 ; Fax : +33 (0)2 28 08 02 04; E-mail : sylvie.hermouet@univ-nantes.fr

Keywords: hereditary thrombocytosis; familial thrombocytosis; *MPL* ; *MPL*W515R; germline mutation

Acknowledgements: This study was performed thanks to grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Comités Départementaux du Morbihan, Ile-et-Vilaine, Vendée and Charente of the Ligue Nationale contre le Cancer to SH. MV and CC benefited from scholarships from the French Ministry of Research (2009-2012 for MV, and 2007-2010 for CC). We are most grateful to the Biogenouest® Genomics core facility for its technical support.

Summary

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) and related congenital diseases form a group of hematological diseases that represent models of cancer development. Identification in MPNs of activating somatic mutations, either in the *JAK2* gene (*JAK2V617F*, in >50% patients) or in exon 10 of the *MPL* gene (*MPLW515K/L*, in <5% patients), was of major importance for the understanding of MPNs.¹⁻⁵ In parallel, hereditary thrombocytosis was found associated with several germline mutations of *MPL*, all distinct from the W515K/L mutations, and very recently, with a germline mutation of *JAK2* (*JAK2V617I*).⁶⁻¹⁰ We report the first germline *MPLW515* mutation (*MPLW515R*) in the context of familial, hereditary thrombocytosis.

Text

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) consist of three distinct clonal diseases, polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). They are characterized by the presence of activating mutations in genes encoding for two molecules critical for myelopoiesis, the tyrosine kinase Jak2, mutated in >50% MPNs, and Mpl, the Jak2-coupled receptor for thrombopoietin (Tpo), mutated in 5-10% ET and PMF.¹⁻⁵ A tight regulation of the expression and function of the “Mpl/Jak2 pair” appears to be critical for the maintenance of normal myelopoiesis. It is now established that dysfunction of the Mpl/Jak2 pair can be acquired, such as the somatic mutations in the *JAK2* and *MPL* genes observed in MPNs, or congenital, apparently leading to hereditary thrombocytosis only. Indeed, hereditary, familial thrombocytosis was found associated with several germline mutations, located either in the promoter of the *THPO* gene, encoding for Tpo, or in the *MPL* gene.⁶⁻¹² Of note, none of *MPL* germline mutations found in hereditary thrombocytosis concerned aminoacid W515. All W515 mutations in exon 10 of *MPL* were somatic and reported for MPN patients diagnosed with ET and PMF, thus patients with abnormal production of megakaryocytes and platelets. Hence, mutation in the *JAK2* and *MPL* genes could lead to both the malignant and hereditary forms of chronically myeloproliferative diseases, and logically the mutated aminoacids clearly differed in hereditary cases, which are mostly benign, and in MPNs, which range from relatively benign (ET) to aggressively malignant (PMF). However, this model was called into question by the recent discovery in a family with hereditary thrombocytosis, of a germline mutation in V617, the Jak2 aminoacid most frequently mutated in MPNs.¹⁰ Indeed, the presence of mutations concerning the same V617 aminoacid of Jak2 in MPNs and in a benign myeloproliferative disease implied that *JAK2V617* mutation may not

be sufficient to cause MPN and that other molecular mechanisms control disease phenotype, severity and progression toward MPN in individuals carrying a *JAK2V617* mutation. This new level of complexity added to the MPN model is supported by our finding of a germline *MPLW515* mutation in two members of a family presenting with isolated, benign thrombocytosis and absence of evolution toward ET or PMF over two generations.

In this family, father (74 yr-old) and daughter (36 yr-old) presented with chronic moderate thrombocytosis. A 36 year-old woman presented with chronic isolated thrombocytosis ($628\text{--}780.10^9$ Plts/L), known for >10 years. There was a familial history of isolated thrombocytosis for the father (74 year-old; 646.10^9 Plts/L) and the father's mother (deceased; no material available). For both the father and daughter, the *JAK2V617F* mutation was not detected; all other blood tests and bone marrow examinations were normal (Table 1 in Supplementary Appendix). Bone marrow aspiration revealed normal cellularity, presence of platelets clusters, no fibrosis and less than 10% of megakaryocytes with stag-horn nuclei without megakaryocytic dystrophy (Figure 1A). Endogenous colony formation assay was negative. The two patients presented no evidence of MPN, no splenomegaly, no hepatomegaly, no cause of secondary thrombocytosis and no history of thrombosis. The daughter has two pregnancies without complication. Clinical details are provided in the Supplementary Appendix. Routine screening for *MPL* mutation was performed using High Resolution Melting (HRM) curve analysis of *MPL* exon 10. Analysis of the HRM curves indicated the presence of a mutation (Figure 2A). Conventional sequencing of all *MPL* exons, performed on whole blood DNA, revealed heterozygous T1588C (W515R) mutation in exon 10 for both patients. To determine whether this mutation was acquired or congenital, direct sequencing of genomic DNA extracted from buccal swabs, hair follicles and purified CD3⁺ lymphocytes was performed. As shown in Figure 2B, conventional sequencing show the same, rare heterozygous T1588C (W515R) mutation of *MPL* in all tested tissues, indicating that the *MPLW515R* mutation was germline in both individuals. The *MPLW515R* mutation was previously reported solely in the context of sporadic cases of ET and PMF.¹¹ No other mutation was found in the *JAK2* and *MPL* genes. Familial thrombocytosis can also be secondary to an abnormally high level of circulating Tpo, which stimulates platelet production. Mutations in the promoter and in intron/exon junctions of the *THPO* gene were reported to induce increased Tpo production, notably by increasing transcription activity.⁹ Direct sequencing of all exons and of the promoter of *THPO* for mutation screening was negative for both patients.

Cytogenetic karyotype analysis and single-nucleotide-polymorphism array analysis of genomic DNA from whole blood of the two affected persons did not identify any areas of uniparental disomy or copy-number abnormalities, excepted for the father, who presented a deletion of chromosome Y, a frequent observation in older men (Supplementary Appendix).¹³ Results of the Affymetrix 6.0 SNP array analysis indicate that there is no evidence of genomic instability in the two patients.

In 2009, the 46/1 haplotype was described to predispose to the acquisition of mutation in *JAK2* and *MPL* genes and to MPNs independently of mutational status, in both sporadic and familial MPNs.¹⁴⁻¹⁶ Analysis by quantitative PCR assays specific for rs12343867, a marker of 46/1 haplotype, showed that the father did not carry the 46/1 allele whereas the daughter was heterozygous for the 46/1 haplotype. Hence, 46/1 haplotype and *MPL* mutational status were not linked in these patients.

It is established that inflammation is an important role in MPN pathogenesis. Inflammation-linked cytokines are frequently elevated and contribute to the expansion of the MPN clone.¹⁷ We measured serum levels of interleukin (IL)-6, IL-11, Hepatocyte Growth Factor (HGF), Erythropoietin and of Tpo. All were normal except for a high level of serum HGF, found for both patients: 2295 pg/mL for the father, and 2723pg/mL for the daughter, compared to the upper normal level of 1257pg/mL. Interestingly, we described recently that HGF and IL-11 were over-expressed by bone marrow stromal cells of MPN patients and contributed to clonal expansion independently of *JAK2*V617F mutation.¹⁸

The *MPL* gene is only expressed in early hematopoietic progenitors, in megakaryocytes and in platelets, suggesting that the *MPL*W515R mutation exerts its effects only in the hematopoietic compartment, more specifically in megakaryocytes. Deregulation of Mpl at the platelets surface is a classic feature in reactive states and MPN.^{19,20} Mpl is a glycoprotein detectable in 2 isoforms in whole platelets lysates; Mpl is first produced in a partially glycosylated, immature form with a molecular weight around 74 KDa, and then in a fully glycosylated form by Golgi processing (mature form with a molecular weight around 85 KDa). Only the mature Mpl form is functional and expressed at cell surface membrane.²¹ We found an abnormal Mpl expression profile in platelet lysates from both patients, with a decreased amount of total Mpl and only the mature form detectable (Figure 1B). As Mpl has been shown to regulate thrombopoiesis via the regulation of serum Tpo levels, the results suggest that platelet Tpo binding is possibly altered in both patients.^{12,22}

Impact of *MPLW515R* mutation on thrombopoietin (Tpo) signalling was then analysed by comparison with wild-type and mutated (W515K/L/A) *MPL* in the murine Ba/F3-EpoR and human K562 cell lines using transient transfection. Reportedly, the *MPLW515K*, L and A mutations activate signaling pathways in the absence of Tpo and are capable to induce a MPN phenotype in mice.^{5,23} We investigated the functional consequences of *MplW515R* expression using two different models: the K562 cell line (human lymphoblastic leukemia) and the Ba/F3-EpoR cell line (murine lymphoma). We performed transient transfections of constructs containing wild type (WT) or mutated human *MPL* cDNA. We found that *MPLW515R* was an activating mutation compared to *MPLWT*, but to a lesser extent than other *MPLW515* mutations. *MplW515R* induced tyrosine phosphorylation of Stat3, Stat5 and Erk1/2 (Figure 3). Of note, in transient transfection *MplW515R* was expressed as two isoforms in both cell lines. This contrasts with the presence of only the mature form of *Mpl* in our patients, perhaps because the *Mpl* maturation and glycosylation processes are more efficient and complete *in vivo* in megakaryocytes and platelets than *in vitro* in cell lines.

In summary, ours is the first report of germline *MPLW515* mutation, found associated with isolated hereditary thrombocytosis. The W515R mutation increases *Mpl* activity but to a lesser extent than the somatic *MPLW515K/L/A* mutations observed in the context of MPNs. Altogether, the data are consistent with sufficient increase in *Mpl/Jak2* function to explain thrombocytosis in the presence of normal circulating levels of Tpo and possibly decreased Tpo binding due to low platelet expression of *Mpl*. However, *MPLW515R* was first reported in the context of ET and PMF, supporting the model that promoting or repressing disease progression toward MPN requires additional genetic(s) event(s), not just *JAK2V617* or *MPLW515* mutation. In the two individuals studied so far, we did not detect another genetic abnormality capable of countering the impact of the germline *MPLW515R* mutation. Further investigation of this family and other patients with *MPLW515R* mutation might reveal which genes control progression to *MPL*-mutated MPN.

Materials and Methods

Samples and cell purification

Blood samples were obtained after informed consent. CD3⁺ lymphocytes and granulocytes were purified as previously described.²⁴ Platelet (Plts) lysates were prepared as previously described.²⁵

Preparation of genomic DNA

Genomic DNA (gDNA) from whole blood and granulocytes were prepared with Qiaamp DNA Blood (Qiagen, Valencia, CA, USA). DNA was isolated from buccal swabs and hair follicle using Nucleospin Tissue XS (Macherey-Nagel, Neumann, Germany).

JAK2 sequence analysis

JAK2 exons 12, 13, 14 and 15 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) as previously described.²⁴

THPO and MPL gene sequence analysis

Exons 1–6 of *THPO* and 1–12 of *MPL* genes, consisting of coding regions and intron/exon boundaries, were amplified by PCR. Primers used were previously published except for *MPL* exon 9 and 10 (Table 2 in Supplementary Appendix).²⁶ Products were purified using the kit Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Neumann, Germany) and subjected to direct sequencing.

Quantification of JAK2 46/1 rs12343867 SNP allelic ratios:

To quantify the wild-type and 46/1 allele, we used an allele-specific quantitative PCRs (AS-qPCRs) using rs12343867, marker of the 46/1 haplotype in *JAK2* intron 14, as previously described.²⁴

Affymetrix Genome-wide 6.0 SNP arrays

Hybridization to Affymetrix Genome-wide 6.0 SNP chips was performed according to manufacturer's protocols found on registration at <http://www.Affymetrix.com/products/>. The raw data were analyzed using the Genotyping Console version 4.1.2 software (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Dosage of serum cytokines levels

Blood tubes were centrifuged at 1400 g for 15 min, serum were then aliquoted into fresh polypropylene tubes, kept frozen at –80°C until cytokine was assessed in duplicate by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Quantikine Thrombopoietin (DTP00B), IL-6 (D6050), IL-11 (D1100) and HGF (DHG00) (R & D Systems Inc., Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Values (average of duplicates) are expressed as pg/mL.

Plasmas were kept frozen at -80°C until shipping on dry ice to the CHU of Dijon (France) where Epo was assessed by Chemiluminescent Immunometric Assay.

Transient transfection and western blotting

Ten million of Ba/F3-EpoR or 5 million of K562 cells were transiently transfected with MPL construction using Amaxa device. Cells were grown in RPMI 1640 10% FCS 1UI of Epo per mL and in DMEM 10% FCS respectively. Twenty-four hours after transfection, cells were starved in RPMI or DMEM 2% FCS during 4 hours. Cells were then stimulated or not with Tpo (5ng/mL, 20 min, 37°C), and lysed in modified RIPA buffer.²⁵ Western blotting was performed as previously described..²⁵ Mpl expression was studied using antibody (Ab) raised against the C-terminus of human Mpl (06-944), and anti- β -Actine (MAB1501R) were purchased from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Anti-phospho-Stat3-Y705 (9131), anti-phospho-Stat5-Y694 (9351), anti-phospho-Akt-S473 (9271), anti-Akt (9272), anti-phospho-Erk1/2-T202/204 (9106) and anti-Erk1/2 (9102) were purchased from Cell Signalling. Anti-Stat3 (610190) and anti-Stat5 (610191) were purchased from BD Bioscience (San Jose, CA, USA). Detection was by chemiluminescence according to the manufacturer (ECL detection Kit, Roche, Meylan, France).

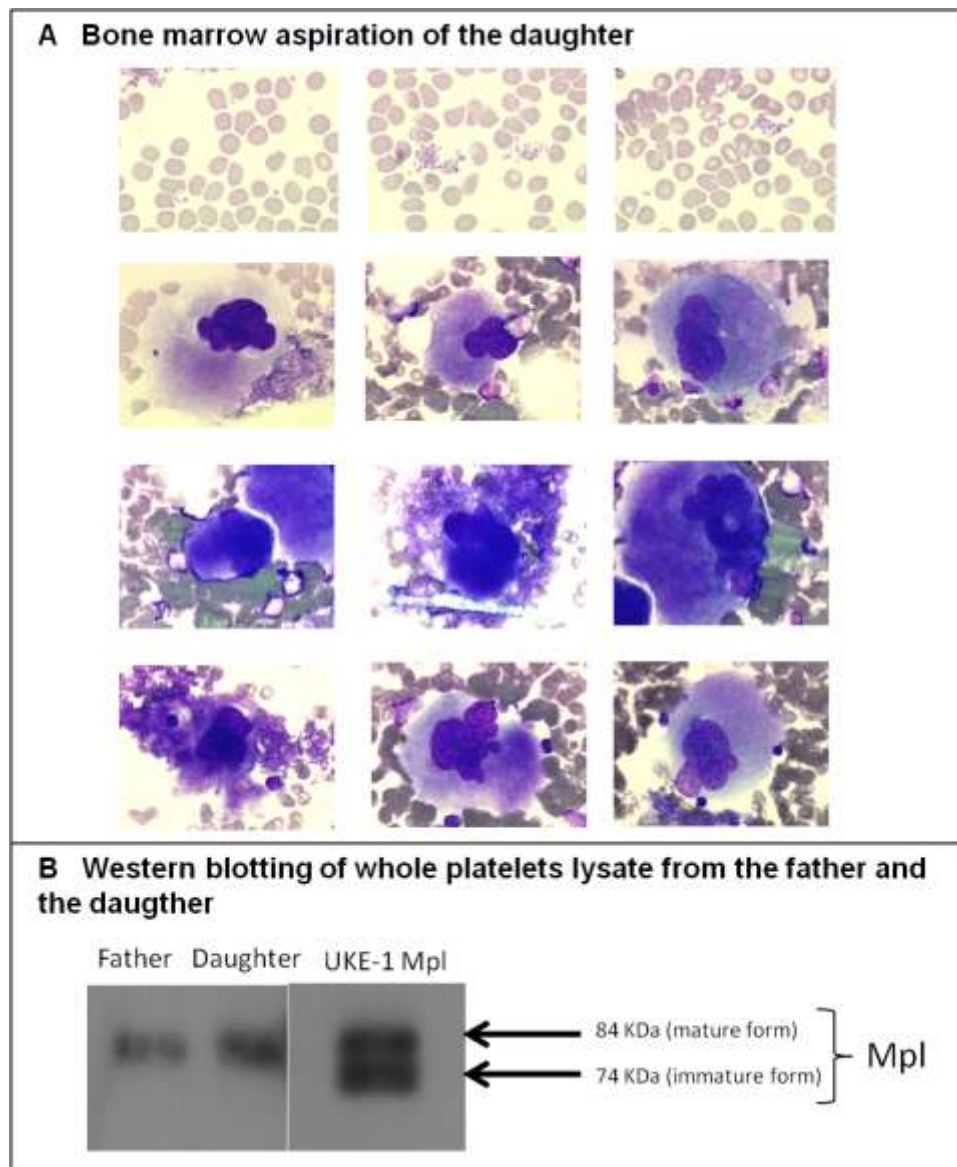


Figure 1: Bone marrow aspiration and analysis of Mpl expression in platelets of W515R-case.

Panel A: Bone marrow aspiration from the daughter. In the upper part of the panel, pictures revealed normal cellularity and platelet cluster. Zooming showed less than 10% of megakaryocytes with stag-horn nuclei without megakaryocytic dystrophy. **Panel B:** Mpl profile from platelet lysates of father and daughter, and from UKE-1-Mpl cells. UKE-1-Mpl has a normal Mpl expression profile with the 2 isoforms (mature and immature) in equal amount. Platelets from father and daughter harbor only the mature form of Mpl, suggesting acceleration of Mpl maturation processes.

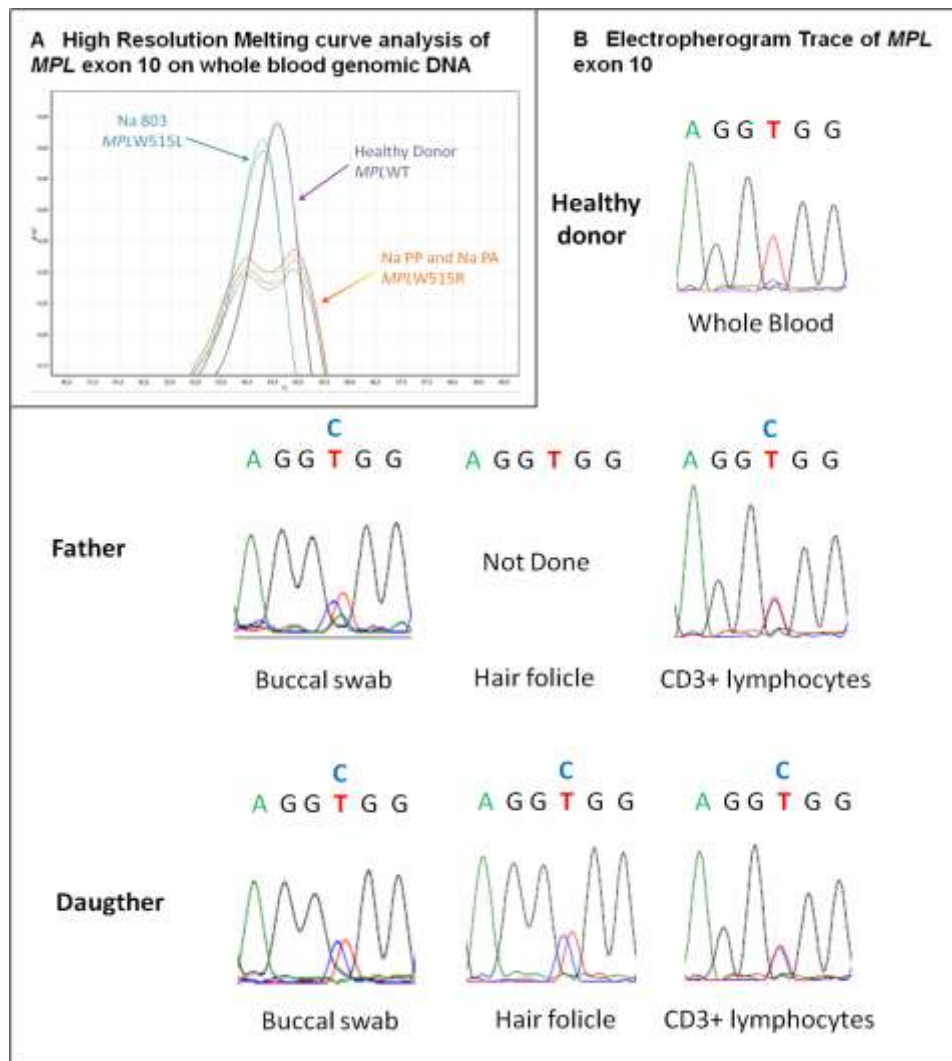


Figure 2: A germline T1588C mutation (W515R) in exon 10 of MPL.

Panel A: High Resolution Melting (HRM) curve analysis of MPL exon 10 of healthy donor (in purple), a positive control for the W515L (homozygous) mutation (in blue) and the two familial cases (in yellow and orange). Analysis of HRM of both cases indicates a mutation in exon 10 of MPL. **Panel B:** Direct sequencing of MPL exon 10 from genomic DNA extracted from buccal swab, hair follicles and CD3+ lymphocyte from daughter and father, and from whole blood from a healthy donor. The electropherogram trace revealed a TGG to CGG (T1588C) change in all tissues (W515R mutation), indicating a germline mutation.

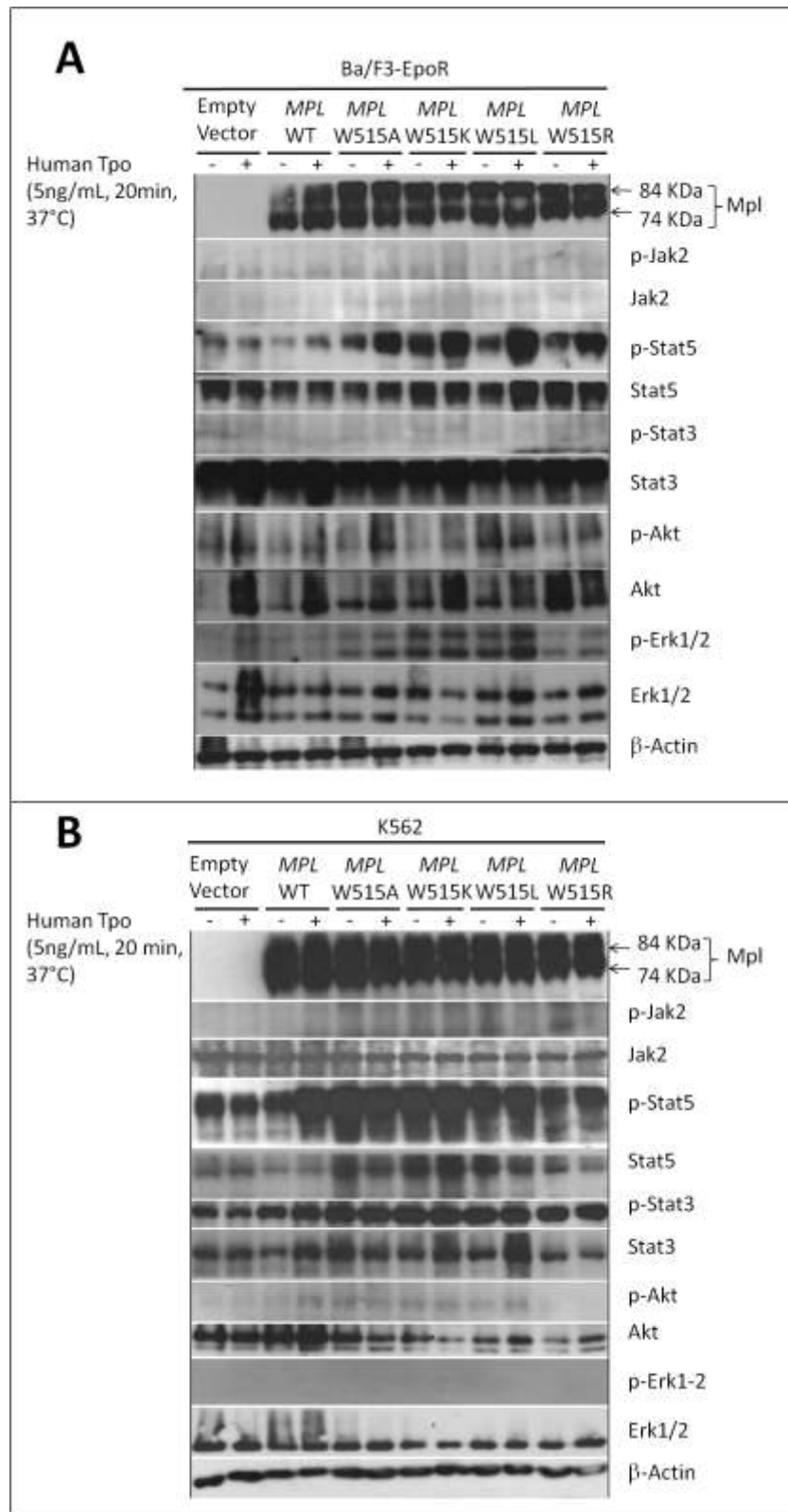


Figure 3: Analysis of the effect of the W515R Mpl mutant in Ba/F3-EpoR and K562 cell lines.

Western Blot analysis of transient transfection of WT and W515A/K/L and R mutant in K562 and Ba/F3-EpoR cell lines. **Panel A:** Representative results in Ba/F3-EpoR cell line. MplW515R induces a basal phosphorylation of Stat5 and Erk1/2. **Panel B:** Representative results in K562 cell line. In this human model, MplW515R induces a basal phosphorylation of Stat3/5. All these results indicate that MplW515R is an activating mutation.

References

1. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352(17):1779-90.
2. 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. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464):1054-61.
3. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037):1144-8.
4. 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(6):1865-7.
5. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006; 3(7):e270.
6. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006; 108(10):3472-6.
7. Liu K, Martini M, Rocca B, Amos CI, Teofili L, Giona F, Ding J, Komatsu H, Larocca LM, Skoda RC. Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica*. 2009; 94(10):1368-74.
8. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(31):11444-7.
9. Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, Skoda RC. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat Genet*. 1998; 18(1):49-52.
10. Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE, Schuh A. Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med*. 2012; 366(10):967-9.
11. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Bürkle D, Dengler R, Distelrath A, Eckart M, Eckert R, Fries S, Knoblich J, Köchling G, Laubenstein HP, Petrides P, Planker M, Pihusch R, Weide R, Kern W, Haferlach T. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2009; 94(1):141-4.
12. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Florindo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Gorius J, Cosman D, Vainchenker W. cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature*. 1994;369(6481):571-4.
13. Lippert E, Etienne G, Mozziconacci MJ, Laibe S, Gervais C, Girault S, Gachard N, Tigaud I, Dastugue N, Huguet F, Fort MP, Legros L, Eclache V, Mahon FX. Loss of the Y chromosome in Philadelphia-positive cells predicts a poor response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib mesylate therapy. *Haematologica*. 2010; 95(9):1604-7.
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. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009; 41: 446-449.
15. Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D, Passamonti F, Lippert E, Carillo S, Girodon F, Vannucchi A, Reading NS, Prchal JT, Ay C, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. The 'GGCC' haplotype of

JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. *Leukemia*. 2009; 23: 1924-1926.

16. Olcaydu D, Rumi E, Harutyunyan A, Passamonti F, Pietra D, Pascutto C, Berg T, Jäger R, Hammond E, Cazzola M, Kralovics R. The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2011; 96(3):367-7.
17. 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 polycythaemia vera. *Cytokine*; 20(4):178-83.
18. Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. 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. *Oncogene*. 2011; 30(8):990-1001.
19. 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(9):572-80.
20. 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(5):1869-71.
21. Tong W, Sulahian R, Gross AW, Hendon N, Lodish HF, Huang LJ. The membrane-proximal region of the thrombopoietin receptor confers its high surface expression by JAK2-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 2006; 281(50):38930-40.
22. De Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 1994; 369(6481):533-8.
23. Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakhanova S, de Sauvage FJ, Jackson CW, Skoda RC. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood*. 2009; 113(8):1768-77.
24. Vilaine M, Olcaydu D, Harutyunyan A, Bergeman J, Tiab M, Ramée JF, Chen JM, Kralovics R, Hermouet S. Homologous recombination of wild-type JAK2, a novel early step in the development of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2011; 118(24):6468-70.
25. Vilaine M, Harutyunyan A, Cleyrat C, Girodon F, Boissinot M, Lippert E, Dobo I, Wilson B, Kralovics R, Corre I, Hermouet S. *JAK2* mRNA expression may reflect Mpl/Jak2 activity in myeloproliferative neoplasms better than the *JAK2V617F* allelic ratio. In preparation.
26. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, Tsuboi K, Nitta M, Miyazaki H, Iida S, Ueda R. 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(11):4198-200.

Supplementary Appendix

Supplementary Table 1

	Father	Daughter
Sex	Male	Female
	At diagnosis	At diagnosis
Age (years)	74	36
Blood cell counts		
<i>Leukocytes</i> ($\times 10^9/L$)	8.4	7.7
<i>Neutrophils</i> ($\times 10^9/L$)	6.4	5.7
<i>Lymphocytes</i> ($\times 10^9/L$)	1.428	1.300
<i>Monocytes</i> ($\times 10^9/L$)	0.42	0.47
<i>Eosinophils</i> ($\times 10^9/L$)	0.084	0.23
<i>Basophils</i> ($\times 10^9/L$)	0	0
<i>Hemoglobin</i> (g/dL)	13.5	14.9
<i>Hematocrit</i> (%)	X	X
<i>Platelets</i> ($\times 10^9/L$)	646	660
<i>Platelets mean volume</i> (μm^3)	9.7	6.6
Red Cell Mass (ml/kg) (%)	X	X
EPO dosage (IU/L)	X	X
TPO dosage (pg/mL)	Not detectable	Not detectable
IL-11 dosage (pg/mL)	Not detectable	Not detectable
IL-6 dosage (pg/mL)	Not detectable	Not detectable
HGF dosage (pg/mL)	2295	2723
Splenomegaly	No	No
Cytogenetic abnormality	Not done	No
Endogenous Colony assay	Not done	Negative
Other clinical symptoms	No	No
CNA by SNP array	Chr.Y deletion	No
UPD by SNP array	No	No
<i>46/1 haplotype</i> (Chr. 9p) (%)	0.0%	50.0%
<i>BCR-ABL</i> rearrangement	No	No
<i>JAK2</i> mutation (exons 6, 12 to 15 and 19)	No	No
<i>THPO</i> mutation	No	No
<i>MPL</i> mutation	Yes, only <i>MPL</i> W515R	Yes, only <i>MPL</i> W515R
Allelic burden in (%)		
Whole blood	50%	50%
CD3+ lymphocyte	50%	50%
Buccal Swab	50%	50%
Hair follicle	50%	50%
Mpl protein profile in Platelets	Only mature (84 KDa) form of Mpl	Only mature (84 KDa) form of Mpl
Familial history	Father's mother have isolated thrombocytosis	

Supplementary Table 1: Clinical and biological characteristics of the father and the daughter. For both patients, the biological and clinical information presented above were collected at the time of diagnosis.

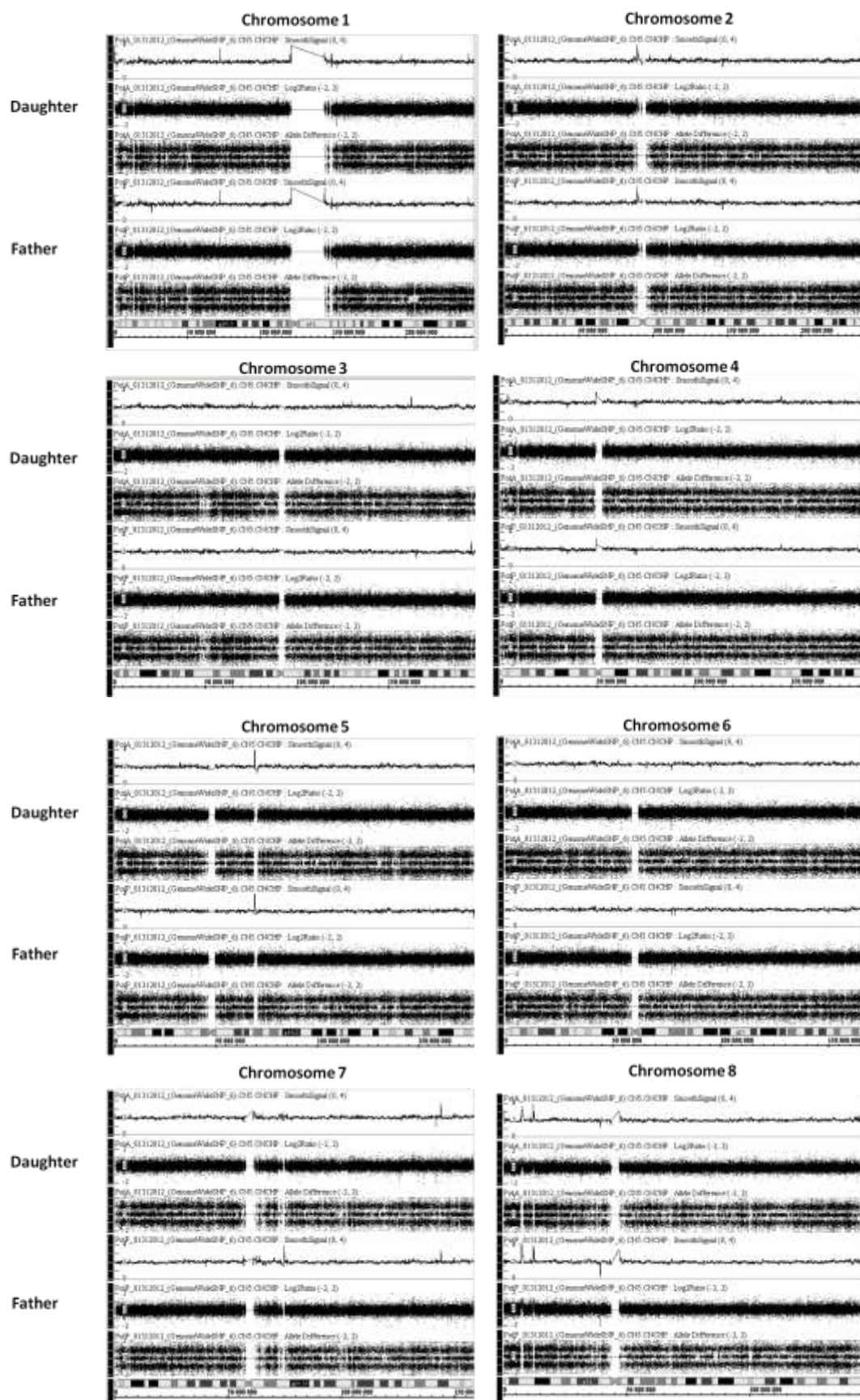
Supplementary Table 2

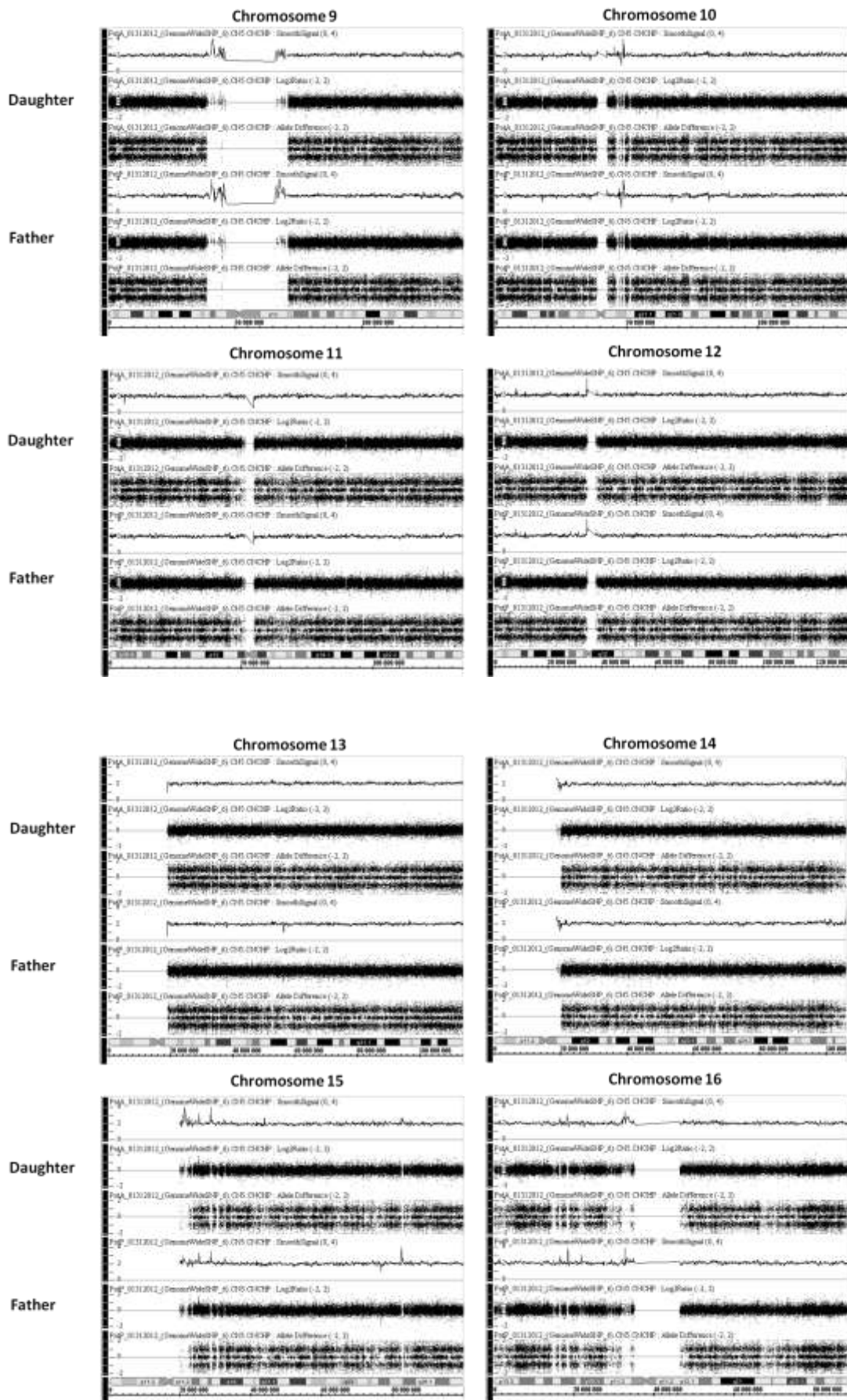
	Primer sequence (5' → 3')
<i>Primers for MPL sequencing (exons 9 and 10)</i>	
Fw exon 9	GGAATCTCCGACCGCCTGG
Rev exon 9	GCTGTGCGGCTTTGGTGC
Fw exon 10	TATGGGCCGAAGTCTGACCCTTT
Rev exon 10	CAGAGCGAACCAAGAATGCCTGT

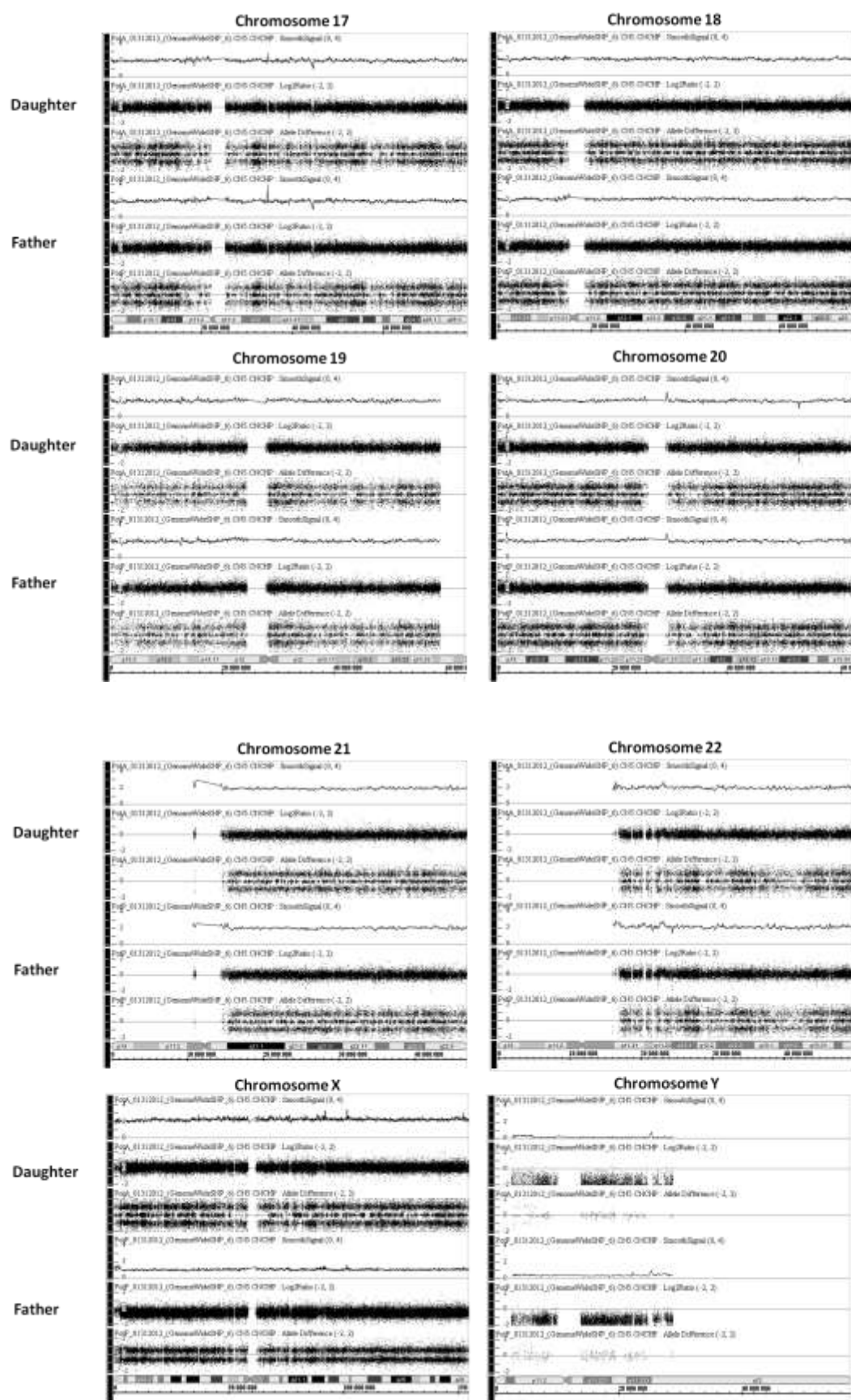
Supplementary Table 2: Unpublished primers for MPL sequencing.

Twenty-five ng of genomic DNA were amplified by PCR using Taq Polymerase Mix (Invitrogen) and 10 µM of forward and reverse primers. Cycling conditions were as follows: 95°C for 15 minutes followed by 35 cycles of 1 minute seconds at 95°C, 30 seconds at 58°C and 1 minute at 72°C. A final extension step at 72°C was performed for 10 minutes.

Supplementary Figure 1.







Supplementary Figure 1. Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 array analysis of whole blood gDNA of the father and the daughter.

Conclusions :

Dans ce travail, nous avons étudié deux membres d'une famille (un père et sa fille) présentant un historique d'hyperplaquettose héréditaire bénigne. Chez ces deux patients, nous avons identifié une mutation T1588C (W515R) à l'état hétérozygote, dans l'exon 10 de *MPL*, dans l'ADN génomique extrait de cellules de sang total, de granulocytes, de lymphocytes T CD3+, d'épithélium buccal et de cellules de bulbe de cheveux. Chez ces deux patients, l'analyse des lysats de plaquettes a uniquement révélé la présence de la forme mature (85 KDa) de Mpl comme fréquemment retrouvé chez les patients présentant un état inflammatoire. L'analyse de la moelle osseuse de la fille n'a pas révélé d'augmentation de la cellularité, ni d'anomalies morphologiques des mégacaryocytes. Cependant, des clusters de plaquettes ont été observés suggérant une possible activation des plaquettes. Les deux personnes se portent bien et présentent uniquement une élévation du chiffre des plaquettes (entre 628 et 780 x10⁹/L pour la fille et 646x10⁹/L pour le père).

L'étude des effets, *in vitro*, des mutations de *MPL* sur son expression protéique et sur les voies de signalisation dépendante de la Tpo dans deux modèles cellulaires différents : les cellules murines Ba/F3-EpoR et les cellules humaines K562. Les cellules porteuses d'une mutation de *MPL* (W515K/L et A) présentent une phosphorylation basale des voies de signalisation Stat3/5 et Erk1/2. Cette augmentation de la phosphorylation basale peut expliquer l'avantage de certains précurseurs mégacaryocytaires clonaux, exprimant une forme mutée de Mpl, conduisant à une augmentation du nombre de plaquettes et potentiellement à un SMP. Bien qu'étant activatrice, la mutation *MPL*W515R a un effet moindre sur l'activation des protéines des voies de signalisation normalement activées par la Tpo, Stat5 et Erk lorsque l'on compare à MplW515K et MplW515L. Cette différence d'intensité d'activation entre le mutant W515R et les autres mutants de Mpl peut sans doute suffire à expliquer pourquoi les deux cas étudiés ont développé une hyperplaquettose bénigne et non un SMP. Une étude plus approfondie de ces deux cas, par comparaison avec des cas de SMP avérés, permettra sûrement de mettre en évidence des facteurs génétiques, ou des mutations qui pourraient expliquer qu'ils n'ont pas développé de SMP (par séquençage complet du génome notamment). Cette étude de signalisation sera complétée par l'étude de Tyk2, Jak2 et Stat1. L'implication de la protéine de fusion Bcr/Abl dans la phosphorylation des différents acteurs est également en cours d'étude dans les cellules K562. En effet, il a été montré que cette kinase a pour substrat préférentiel la protéine Erk2 (Aceves-Luquero *et al.*, 2009). Cela peut expliquer pourquoi une seule forme d'Erk est détectée dans les cellules K562.

IV-3 Rôle des cytokines inflammatoires et de leurs récepteurs dans la pathogenèse des SMP

Article 6 : Les cytokines anti-inflammatoires HGF et IL-11 sont surexprimées chez les patients atteints de Polyglobulie de Vaquez et contribuent à la prolifération clonale des érythroblastes indépendamment de la mutation JAK2V617F. (*Boissinot et al.*, *Oncogene* 2011 ; 30(8): 990-1001).

Depuis les années 1990, plusieurs groupes ont démontré que la production de plusieurs cytokines est dérégulée chez les patients atteints de SMP. Des travaux antérieurs de notre équipe ont pu mettre en évidence que l'IL-11 augmente la réponse de progéniteurs de la moelle osseuse à l'érythropoïétine (Epo) et leur capacité à survivre en absence d'Epo (*Corre-Buscail et al.*, 2005 *Exp Hematol*). De plus, nous avons pu montrer une élévation des concentrations d'IL-11 et d'IL-8 dans les sérums de patients atteints de PV (*Hermouet et al.*, 2002 *Cytokine*). Or, l'IL-11 est connue pour stimuler l'érythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse. Nous avons alors entrepris de déterminer l'influence de diverses cytokines sur la pousse des progéniteurs érythroïdes de patients atteints de PV, ainsi que les cellules productrices de ces cytokines et le lien potentiel avec la protéine Jak2V617F.

Nous avons ainsi montré que les érythroblastes de PV dépendent de boucles autocrines HGF/IL-11/IL-6 pour leur prolifération. La cause de dérégulation de ces cytokines dans les SMP n'est pas connue. En effet, nous avons démontré que la production de ces cytokines est indépendante de la protéine Jak2V617F. De plus, les cellules stromales de la moelle osseuse produisent également de l'IL-11 et de l'HGF qui peuvent en retour stimuler les clones myéloïdes malins.

ORIGINAL ARTICLE

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

M Boissinot^{1,3,4}, C Cleyrat^{1,3}, M Vilaine¹, Y Jacques¹, I Corre¹ and S Hermouet^{1,2}

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

The V617F activating mutation of janus kinase 2 (JAK2), a kinase essential for cytokine signalling, characterizes Polycythemia vera (PV), one of the myeloproliferative neoplasms (MPN). However, not all MPNs 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 (Ab) arrays, and enzyme-linked immunosorbent assays for analyses of serum and bone marrow (BM) plasma, and quantitative reverse transcription-PCRs for analyses of cells purified from PV patients and controls. We found that PV patients over-expressed anti-inflammatory hepatocyte growth factor (HGF) and interleukin-11 (IL-11), BM mesenchymal stromal cells (BMMSCs) and erythroblasts being the main producers. In a second series of experiments, autocrine/paracrine cytokine stimulation of erythroblasts was blocked using neutralizing Abs 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/erythropoietin receptor cells, and invalidation of JAK2V617F in HEL cells using anti-JAK2 small interfering RNA, did not affect HGF and IL-11 expression. Thus, anti-inflammatory HGF and IL-11 are upregulated in PV and their overproduction 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.

Oncogene (2011) 30, 990–1001; doi:10.1038/nc.2010.479; published online 1 November 2010

Keywords: Polycythemia vera; JAK2V617F; hepatocyte growth factor (HGF); interleukin 11 (IL-11); interleukin 6 (IL-6); inflammation

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) constitute a group of three clonal diseases: Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis. About half of MPN patients present with activating mutations in the janus kinase 2 (JAK2) gene, which encodes for a tyrosine kinase essential for the signalling of many cytokines (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005). Among MPNs, 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 4–50% 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-Rs). Yet, in murine models, JAK2V617F is associated with polycythemia only when expressed at high levels (4–50% JAK2V617F-mutated alleles), whereas a significant proportion of PV patients carry a 50% JAK2V617F (Lacout et al., 2006; Lippert et al., 2006; Wernig et al., 2006; Tiedt et al., 2008). We now know that the JAK2V617F mutation is frequently associated with other molecular genetic abnormalities and that the JAK2V617F mutation can occur several times in certain patients; moreover, the presence of JAK2V617F does not ensure expansion of mutated progenitors (Nussenzweig et al., 2007; Kralovics, 2008; Lambert et al., 2009; Schaub et al., 2009; Cleyrat et al., 2010). 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 to be associated with a predisposition to MPN, with or without mutation of JAK2 (Jones et al., 2009; Kilpivaara et al., 2009; Olcaydu et al., 2009). The '46/1' haplotype is also associated with

Correspondence: Dr S Hermouet, INSERM UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, 9 quai Moncousu, Nantes 44093, France.

E-mail: sylvie.hermouet@chu-nantes.fr

[†]These authors contributed equally to this work.

[‡]Current address: LIMM, Experimental Haematology, Wellcome Trust Brenner Building, Leeds, UK.

Received 24 March 2010; revised 10 August 2010; accepted 14 September 2010; published online 1 November 2010

chronic inflammation, notably inflammatory bowel disease (Ferguson et al., 2010). Interestingly, although most evident in primary myelofibrosis, signs of chronic inflammation, such as increased production of inflammatory cytokines, interleukin (IL)-6 and vascular endothelial growth factor, are also observed in PV and in ET (Wickenhauser et al., 1999; Musolino et al., 2002; Panteli et al., 2005; Le Bousse-Kerdilès and Martyré, 1999). 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 in reducing inflammation-linked cytokine levels and symptoms, indicating that molecules other than JAK2 were likely involved (Tefferi, 2010).

We began to investigate the possible stimulation of PV progenitors by inflammation-linked, JAK2-activating cytokines because of previous observations of high messenger RNA (mRNA) levels of JAK2 in patients with erythrocytosis, either reactive or secondary (secondary erythrocytosis (SE)—high expression of JAK2 wild type (JAK2WT)) or primary (PV—high expression of both JAK2WT and JAK2V617F) (Lippert et al., 2006). In PV, high mRNA expression of JAK2 could be due to multiple copies (4.2 per cell) of the JAK2 gene, but this concerns a small minority of patients (Najfeld et al., 2007). 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 proerythroid, JAK2-activating 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 (BMMSCs) from PV and SE patients. Several proerythroid molecules were found to be over-expressed in PV: all were known to be linked to inflammation and were produced by BMMSCs or/and by hematopoietic progenitors themselves. These molecules were studied at the protein and mRNA levels using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) and quantitative reverse transcription-PCRs in purified cells: BMMSCs, CD34⁺ progenitors, glycophorin A-positive (GPA⁺) erythroblasts and CD3⁺ lymphocytes. Relevance to the pathogenesis of PV was investigated by studying the effects on *in vitro* growth of JAK2V617F-mutated erythroblasts. In addition, transfection of JAK2V617F in BaF-3/Epo-R cells, and anti-JAK2 small interfering (si)RNA in JAK2V617F-mutated HEL cells, was used to determine whether their production was a consequence of JAK2V617F.

Results

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

First, cytokine arrays were used to analyse cytokine expression in pools of serum from PV patients, compared with SE patients and healthy donors (HDs),

and in pools of BM plasma from PV patients, compared with SE patients (Supplementary Figure 1). SE and PV differed from HD in having high levels of IL-8, leptin and macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1) in serum. PV differed from SE in having high levels of hepatocyte growth factor (HGF) in serum, and high levels of tissue inhibitor of metalloproteases-1 (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 (Hermouet et al., 2002; Corre-Buscail et al., 2005).

Second, IL-8, leptin, MCP-1, HGF, TIMP-1, IL-11 and also IL-6, a major pro-inflammatory cytokine, were measured in PV and SE using ELISAs and levels were compared with 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 the 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/434) and 1594 in ET (n/415) vs 4673 in PV (n/449). TIMP-1 levels were confirmed as elevated in PV compared with SE only in BM plasma. Although serum IL-6 was elevated for some PV patients, overall IL-6 levels were not found to be significantly high in PV.

Of the three molecules confirmed as elevated in PV by ELISA, HGF and IL-11 seemed to be most interesting. Indeed, it was established that HGF could induce IL-11, an established stimulant of erythropoiesis (Quesniaux et al., 1992; Schwertschlag et al., 1999; Matsuda-Hashii et al., 2004; Ishii et al., 2007). In PV patients, serum levels of HGF and IL-11 were correlated with blood neutrophil counts (n/421, r/0.71, Po 0.005) and hematocrit (n/445, r/0.43, Po 0.01), respectively. Consequently, the rest of the study focused on HGF and IL-11.

Sequential production of HGF, IL-11, IL-6 and IL-8 by PV BMMSCs

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/429, r/0.51, Po 0.01; IL-11/IL-8: n/460, r/0.43, Po 0.01; TIMP-1/HGF: n/432, r/0.42, P/0.02).

Regulation of IL-11 by HGF and that of IL-6 and IL-8 by IL-11 were studied in BMMSCs, an established source of cytokines linked to inflammation. ELISA performed on supernatants of 31 BMMSC cultures (12 PV, 5 idiopathic erythrocytosis (IE), 14 SE) confirmed that IL-11 and IL-8 were present at high levels in supernatants of PV BMMSCs, but detected little or no HGF (Table 1). IL-11 and IL-8 levels were correlated in BMMSC supernatants (n/431, r/0.74, Po 0.01). BMMSC cultures (4 PV, 2 IE, 9 SE) were then stimulated either with HGF to study production of

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

Cytokine	Serum (pg/ml)			BM plasma (pg/ml)			BMMSC (pg per 1000 BMMSCs per 48h)		
	SE	IE	PV	SE	IE	PV	SE	IE	PV
IL-11									
No.	20	10	32	25	12	26	14	5	12
Mean± s.d.	0.5± 2.4	2.1± 4.8	99.1± 443	1.0± 4.4	3.4± 8.2	8.4± 13.3	2.2± 2.1	3.7± 3.3	13.0± 15.1
IL-8									
No.	17	10	31	26	12	23	13	5	12
Mean± s.d.	1196± 2311	1457± 3062	2566± 4518	770± 1195	1599± 1619	3665± 5040	4.4± 4.2	4.8± 4.8	26.5± 31.8
IL-6									
No.	9	6	13	11	8	10	6	4	7
Mean± s.d.	25.6± 72.2	5.9± 6.1	166± 473	2275± 3123	6799± 12180	6259± 13057	59.2± 66.4	46.2± 31.7	74.7± 87.3
SCF									
No.	8	4	10	10	5	9	ND	ND	ND
Mean± s.d.	651± 170	699± 225	643± 131	570± 206	635± 77	488± 95.3	ND	ND	ND
HGF									
No.	34	ND	49	26	ND	26	6	ND	11
Mean± s.d.	1765± 987	ND	5176± 3071	4438± 4544	ND	7929± 4786	8± 5	ND	17± 22
Leptin (men only)									
No.	31	ND	17	25	ND	13	3	ND	1
Mean± s.d.	17368± 10676	ND	11153± 3053	7125± 2231	ND	7083± 5201	800± 500	ND	2900
TIMP-1									
No.	32	ND	33	26	ND	26	5	ND	9
Mean± s.d.	109470± 134570	ND	125990± 78660	58520± 39800	ND	102200± 77360	700± 300	ND	700± 500
MCP-1									
No.	32	ND	33	26	ND	26	5	ND	11
Mean± s.d.	717± 1055	ND	896± 1139	1391± 1496	ND	2655± 5060	4± 4	ND	29± 24

Abbreviations: BM, bone marrow; BMMSC, BM mesenchymal stromal cells; HGF, hepatocyte growth factor; IE, idiopathic erythrocytosis; IL, interleukin; MCP-1, macrophage chemotactic protein-1; ND, not done; PV, Polycythemia vera; SCF, stem cell factor; SE, secondary erythrocytosis; TIMP-1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1.

For each patient, cytokine values were averages of duplicate or triplicate measures. Data are expressed as mean± s.d. of cytokine values of groups of patients. For healthy donors, 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, 259 000–661 000 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 three SE patients were female, PV and SE leptin levels were compared only for male patients. Serum leptin levels of female PV patients (22 061± 15 321 pg/ml) tended to be higher than those of female healthy donors (10 000± 7300 pg/ml), but differences were not significant.

*Po 0.05 compared with s.e.; **Po 0.05 compared with healthy donors, Mann–Whitney's rank sum test.

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 BMMSCs (Figures 1a and b, respectively), whereas exposure to IL-11 significantly increased the production of both IL-8 and IL-6 (Figures 1c and d, respectively).

To verify that PV BMMSC cultures did not contain clonal, JAK2V617F-mutated cells, BMMSCs of five PV patients with blood granulocytes positive for JAK2V617F were tested for the presence of JAK2V617F: all expressed only JAK2WT.

High mRNA expression of HGF and IL-11 in purified erythroblasts from PV patients
We also studied CD3 β lymphocytes, previously described as producers of IL-11 in PV (Ishii et al., 2007); CD34 β progenitor cells; and GPA β erythroblasts, all purified from the BM of six PV patients and seven SE controls. The %JAK2V617F measured in granulocyte DNA of the six PV patients ranged from 10 to 77%.

Expression of HGF, IL-11 and IL-6 mRNAs was studied using reverse transcription–quantitative PCRs (Figure 2). In PV and in SE, BMMSCs were high producers of HGF and IL-6 (Figure 2a). Although protein levels of IL-11 measured by ELISA in supernatants of cultured BMMSCs were clearly higher in PV than in SE, no significant difference was detected in IL-11 mRNA levels in BMMSCs from PV and SE patients (Figure 2a). In BM CD3 β lymphocytes (Figure 2b) and in CD34 β progenitors (Figure 2c), mRNA expression of HGF, IL-11 and IL-6 was negligible. The BM origin of CD3 β lymphocytes in our series may explain the discrepancy with the results of Ishii et al. (2007), who studied blood T-lymphocytes. In contrast to other cell types, PV GPA β erythroblasts expressed high mRNA 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 ¼ 1.00, Po 0.02 each). No correlation was found between JAK2V617F (% or mRNA levels), measured in each cell type, and HGF, IL-11 or IL-6 mRNA levels.

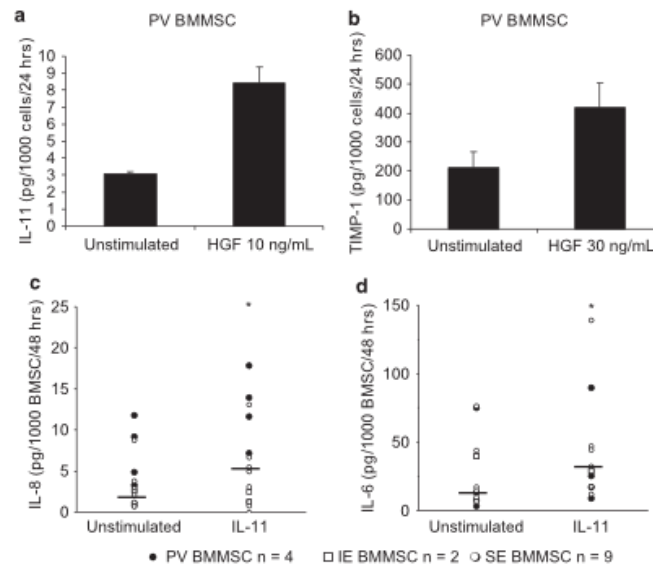


Figure 1 Cytokine secretion by BMMSCs of SE and PV patients. Adherent BMMSCs were grown in vitro for 12 days in RPMI and 10% fetal bovine serum (BMMSCs), then scraped and pelleted for mRNA studies, or stimulated with HGF for 24 h or IL-11 for 48 h, before culture supernatant collection for IL-11, TIMP-1, IL-6 and IL-8 ELISAs (see Materials and methods). (a) IL-11 secretion by BMMSCs of a PV patient, after exposure to HGF (10 ng/ml) for 24 h; (b) TIMP-1 secretion by BMMSCs of a PV patient, after exposure to HGF (30 ng/ml) for 24 h; (c) IL-8 secretion by PV (n=4), IE (n=2) and SE (n=9) BMMSCs exposed to IL-11 (10 ng/ml) for 48 h; (d) IL-6 secretion by PV (n=4), IE (n=2) and SE (n=9) BMMSCs exposed to IL-11 (10 ng/ml) for 48 h. (c, d) Horizontal bars represent median values. *Differences in cytokine production are significant (Po 0.05, Mann-Whitney's rank sum test).

Increased expression of gp130 and STAT3 mRNAs in purified PV erythroblasts
Expression of c-MET (the HGF receptor), glycoprotein (gp)130 (the receptor chain shared by IL-11 and IL-6), JAK2WT, JAK2V617F, signal transducer and activator of transcription (STAT)3 and STAT5 was analysed in BMMSCs, in CD3 β lymphocytes and in purified BM progenitors using reverse transcription-quantitative PCRs. No significant difference in expression of total JAK2, STAT3 or STAT5 was observed between PV and SE in BMMSCs, CD3 β lymphocytes and CD34 β 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 β 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 JAK2V617F mRNA levels. Taken together, correlation between HGF, IL-11 and IL-6 mRNA levels and increased HGF, IL-11, gp130 and STAT3 mRNA expression was consistent with activation of an HGF/c-MET/IL-11/IL-6/gp130/STAT3 cascade in PV erythroblasts.

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

We previously reported that neutralizing anti-IL-11 antibody (Ab) could block BFU-E and CFU-E growth in cultures of BM mononuclear cells (BMMCs) from PV patients, indicating partial dependence of PV erythroid progenitors on IL-11 (Corre-Buscail et al., 2005). HGF was blocked using neutralizing Ab directed against c-MET in cultures of HEL cells, which are homozygous for JAK2V617F and in liquid cultures of purified GPA β erythroblasts from four patients with JAK2V617F-mutated PV (JAK2V617F allelic ratio: 37, 91, 95 and 98%) (Figure 3). Compared with control cultures without Ab, the number of viable cells in PV cultures incubated for 24 h with anti-c-MET Ab (2 ng/ml) was consistently decreased by more than 40%. Decreased viability in the presence of anti-c-MET Ab concerned JAK2V617F-mutated cells, as it was observed for HEL cells (100% JAK2V617F-mutated) and for purified erythroblasts of PV patients, three with 490% cells bearing the JAK2V617F mutation. A similar inhibition of HEL and PV erythroblast growth was also observed with anti-IL-11 Ab (2 ng/ml). Anti-IL-8 Ab (2 ng/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 (two patients) or a weak (20%) inhibition (one patient) of erythroblast growth.

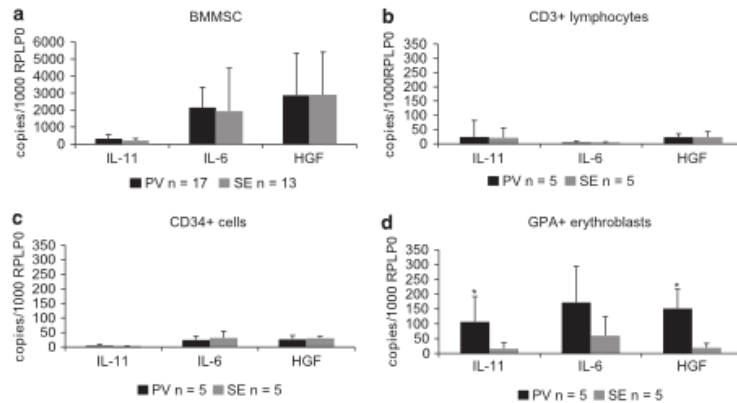


Figure 2 IL-11, IL-6 and HGF mRNA expression in purified cells of PV and SE patients. mRNA expression levels of IL-11, IL-6 and HGF were studied using reverse transcription-quantitative PCRs in purified cells isolated from BM of PV and SE patients (see Materials and methods). Data shown are means of at least three determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used to analyse data; $P < 0.05$ was statistically significant. (a) BMMSCs; (b) purified CD3 $^{+}$ lymphocytes; (c) purified CD34 $^{+}$ cell progenitors; (d) purified GPA $^{+}$ erythroblasts. Note the change of scale between BMMSCs and the other cell types.

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

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

Abbreviations: gp130, glycoprotein 130; HGF, hepatocyte growth factor; IL, interleukin; PV, Polycythemia vera; SE, secondary erythrocytosis; STAT, signal transducer and activator of transcription.

* $P < 0.05$ compared with SE, Mann-Whitney test.

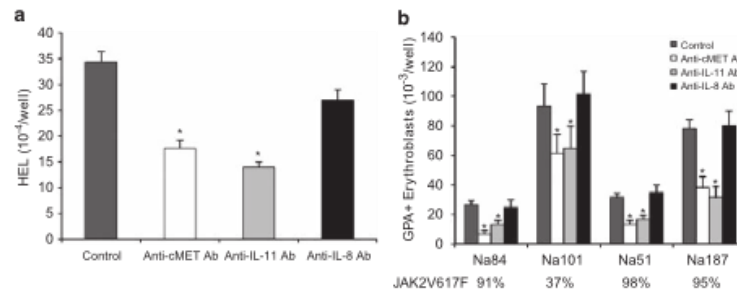


Figure 3 In vitro effects of neutralizing anti-c-MET and anti-IL-11 Abs on JAK2-V617F-mutated erythroid cells. Viable cells excluding trypan blue were enumerated in triplicate before and after 24-h incubation without Ab or with anti-c-MET, anti-IL-11 or anti-IL-8 Ab (used as a control Ab) (2 ng/ml each). (a) HEL cells (100% JAK2V617F) kept in RPMI medium and FCS. (b) GPA $^{+}$ erythroblasts purified from frozen BMMCs of four JAK2V617F-positive PV patients (Na84, Na101, Na51, Na187, with 91, 37, 98 and 95% JAK2V617F, respectively) and kept in IMDM and FCS without Epo. Data shown are mean $\pm$ s.d. of three independent cultures. * $P < 0.05$ compared with culture with control anti-IL-8 Ab (Student's t -test).

JAK2V617F independence of HGF and IL-11 expression
First, HGF level was measured in blood serum of three PV patients who were found to be positive for

endogenous erythroid colonies, but who carried no mutation of JAK2 (negative for V617F and exon 12 mutations). For 2/3 of these 'JAK2WT' patients, serum

HGF was found to be elevated (3216 and 4795 pg/ml) and comparable to the average serum HGF level of JAK2V617F-positive PV patients (4409 pg/ml, vs less than 1285 pg/ml in HDs).

Second, HGF, IL-11 and IL-6 mRNA expression was studied in HEL and UKE-1, two human cell lines homozygous for the JAK2V617F mutation. As shown in Table 2, high expression of IL-6, IL-11 or HGF was observed in HEL, but not UKE-1, indicating that homozygosity for JAK2V617F 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).

Third, we used anti-JAK2 siRNA to block expression of JAK2V617F in HEL cells. As shown in Figure 4a, JAK2V617F 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 JAK2V617F (Figures 4b–d, Supplementary Figure 2).

Fourth, the effects of JAK2V617F 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 allele-specific RT-qPCR and western blotting analysis, which showed a clear increase in tyrosine phosphorylation of JAK2 in JAK2V617F transfectants (Figure 5a). In comparison,

the increase in tyrosine phosphorylation of STAT5 and STAT3 in BaF-3/Epo-R cells expressing JAK2V617F was modest. Expression in BaF-3/Epo-R cells of wild-type and V617F-mutated JAK2, as well as another JAK2 mutant, JAK2L611V/V617F (Cleyrat et al., 2010), 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, JAK2WT and, to a lesser extent, JAK2V617F 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 JAK2V617F 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 (4 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 upregulation of HGF being independent of JAK2V617F, a high secretion of HGF (4 3500 pg/ml HGF) was typical of PV

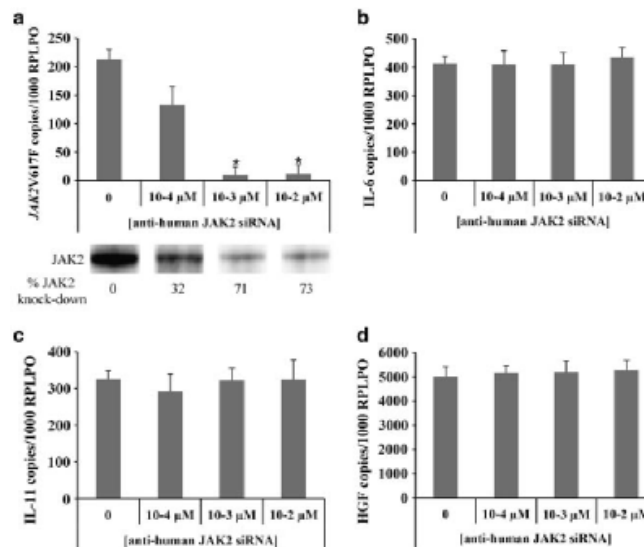


Figure 4 Effect of JAK2 siRNA on IL-11, IL-6 and HGF mRNA expression in HEL cells. 5×10^4 HEL cells were treated without or with 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} or 10^{-1} μ M of human JAK2 siRNA, then mRNA levels of JAK2, IL-6, IL-11, HGF and RPLP0 were quantified using reverse transcription-quantitative PCRs (see Materials and methods) and expressed as copies per 1000 RPLP0 mRNA copies. Data shown are means of at least two 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 with the control and 10^{-4} μ M conditions.

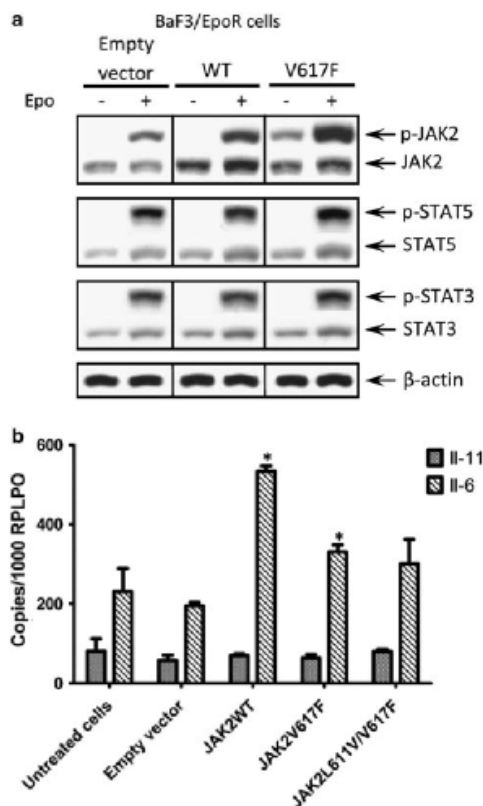


Figure 5 Effect of JAK2-V617F on HGF, IL-11 and IL-6 mRNA expression. The effect of JAK2-V617F on the mRNA expression of IL-11, IL-6 and HGF was studied in transient transfections of murine BaF-3/Epo-R cells. (a) Western blotting analyses of the expression of wild-type and V617F-mutated JAK2 in BaF-3/Epo-R 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 reverse transcription-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 three determinations. *Mann-Whitney's rank sum test was used for data analysis; $P < 0.05$ was statistically significant.

with 4–50% JAK2V617F, but was also observed with a lesser frequency, in other categories of patients, including JAK2V617F-negative PV, ET and SE. Hence, similar to very high hematocrit levels, high serum HGF was found to be associated with a high %JAK2V617F, but JAK2V617F 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

Upregulation of inflammation-linked cytokines—IL-6, IL-10, vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha—is now well established and is generally assumed to be a consequence of JAK2V617F. Yet, symptoms of chronic inflammation are observed both in JAK2V617F-mutated MPN and in MPN with no mutation of JAK2, particularly primary myelofibrosis (Geissler et al., 1998; Le Bousse-Kerdilès and Martyré, 1999; Wickenhauser et al., 1999; Hermouet et al., 2002; Musolino et al., 2002; Corre-Buscail et al., 2005; Panteli et al., 2005). The findings of the present study of PV patients support the opposite reasoning, that is, that upregulation of certain cytokines linked to inflammation is independent of the acquisition of the JAK2V617F 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, weight loss—without affecting the JAK2V617F burden (Hitoshi et al., 2010; Tefferi, 2010; Verstovsek, 2010).

Our study demonstrates that anti-inflammatory cytokines HGF and IL-11, as well as gp130, the signalling receptor chain common to IL-11 and IL-6, are upregulated in PV independently of JAK2V617F. In addition, TIMP-1, a molecule that controls HGF activity and has been reported to be over-expressed in primary myelofibrosis, was also found to be elevated in PV (Ho et al., 2007; Kopitz et al., 2007). HGF, IL-11 and IL-6 are produced by JAK2WT BMMSCs and JAK2V617F-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 BM: one concerns BMMSCs, 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 Abs blocking IL-11 or c-MET/HGF inhibited the growth of JAK2V617F-mutated erythroblasts. No correlation was found between JAK2V617F and HGF/IL-11 levels in patients, and in vitro JAK2V617F 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 the serum of ET patients. Altogether, our data are consistent with the upregulation of both HGF and IL-11 in MPN being characteristic of PV and independent of JAK2V617F.

Consistent with independence from JAK2V617F, deregulation of HGF, IL-11 and IL-6 has been reported in other haematological malignancies, notably multiple myeloma (Derksen et al., 2003; Giuliani et al., 2004). In both PV and multiple myeloma, BMMSCs were found to express high levels of IL-11 and IL-6, possibly in response to paracrine stimulation by HGF and IL-11 produced by malignant progenitors (Uchiyama et al.,

Table 3 HGF levels in serum in relation to the presence and allelic burden of JAK2V617F

	No. of patients	Serum HGF (pg/ml)		Patients with ≥ 3500 pg/ml HGF (%)
		Mean	s.d.	
PV with $\geq 50\%$ JAK2V617F	27	6120 ^a	3308	22/27 (81)
PV with 26–50% JAK2V617F	10	3712 ^a	2034 ^a	4/10 (40)
PV with 1–25% JAK2V617F	12	3314 ^a	1501 ^{b,c}	6/12 (50)
ET with 1–25% JAK2V617F	5	3236 ^a	1556 ^a	3/5 (60)
ET negative for JAK2V617F	10	1546 ^a	1032	1/10 (10)
SE	34	1765 ^a	987	1/34 (3)
Healthy donors	ND	Range: 663–1283		0 (0)

Abbreviations: ET, essential thrombocythemia; HGF, hepatocyte growth factor; ND, not determined; PV, Polycythemia vera; SE, secondary erythrocytosis.

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

^aSignificantly different than PV with $\geq 50\%$ JAK2V617F, $P \leq 0.028$.

^bSignificantly different than PV with $\geq 50\%$ JAK2V617F, $P \leq 0.0065$.

^cSimilar to PV with 26–50% JAK2V617F, $P \leq 0.340$.

^dSignificantly different from JAK2V617F-negative ET, $P \leq 0.042$.

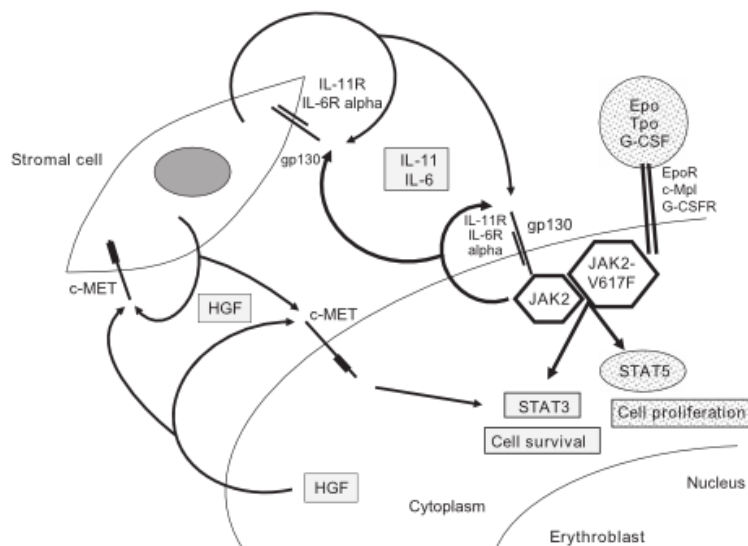


Figure 6 Model for interactions between HGF, IL-11 and IL-6 in the BM of PV patients: effects on the STAT3 pathway. In PV erythroblasts, the JAK2 (WT or V617F)/STAT5 pathway is activated mainly through Epo and Epo-R. HGF and IL-11 are produced at high levels by BMMSCs (HGF) and by GPA b-erythroblasts (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 through HGF and IL-11, which appears to be independent of JAK2V617F, contributes to the abnormal proliferation of clonal myeloid progenitors in PV, as blocking the c-MET/HGF/IL-11 pathways inhibits the growth of JAK2V617F-mutated erythroid cells.

1993; Zdzinska et al., 2008). 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 (Shinomiya et al., 2004; Bernet and Mehlen, 2007). Inversely, disturbing the equilibrium between a dependence receptor and its ligand, either by over-expression of ligand or by 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 (Tacchini et al., 2001; Kitajima et al., 2008). 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 (Du et al., 2007; Sattler and Salgia, 2007; Stelrecht et al., 2007; Comoglio et al., 2008). Our results suggest that blocking the HGF/c-MET and IL-11 pathways could be a novel therapeutic option in PV, perhaps for those patients who are no longer controlled by phlebotomy or/and hydroxurea (Gironde et al., 2008). In this regard, the established ability of interferon- α to suppress expression of c-MET and IL-11 may contribute to the disappearance of JAK2V617F-mutated clonal cells in PV patients treated with interferon- α (Aman et al., 1996; Radaeva et al., 2002; Kiladjan et al., 2006).

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. (2005, 2007), a definite threshold of STAT3 signalling is critical for the regulation of normal hematopoiesis. These authors showed that abnormal activation of STAT3 through 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 JAK2V617F, 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 for BCR-ABL-induced phenotypes in animal models (Coppo et al., 2009).

Last, as 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 (Kralovics, 2008; Schaub et al., 2009). 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 JAK2V617F 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 anti-inflammatory HGF and IL-11 are over-expressed in PV and likely contribute to the expansion of clonal erythroblasts, in a JAK2V617F-independent manner. 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.

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 SE, 12 IE, 15 ET). Diagnosis of PV and ET was made according to the World Health Organization criteria 2002 (Vardiman et al., 2002). All PV had low serum Epo and endogenous erythroid colonies; all SE had elevated serum Epo, no endogenous erythroid colonies and an identified cause of SE; IE patients had normal serum Epo and no endogenous erythroid colonies. JAK2V617F 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 to be positive for JAK2V617F. Serum was also obtained from 17 HD. Owing 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 150g for 10 min without brake. Supernatant (1/4 BM plasma) was pipetted off and cell pellets were suspended in RPMI; BMMCs were separated on Ficoll medium (1.077 g). After washing, aliquots of BMMCs were either used for immediate cultures or cell purification, or frozen in dimethyl sulfoxide in liquid nitrogen. Adherent BMMSCs were obtained after 12 days of culture as described previously (Hermouet et al., 2002; Corre-Buscail et al., 2005). Blood granulocytes were isolated from the lower interphase of a Ficoll density gradient (Dobo et al., 2004; Lippert et al., 2006). CD34⁺ cells (purity 4 95%), CD3⁺ lymphocytes (purity 4 98%) and GPA⁺ erythroblasts (purity 4 98%) were purified from frozen BMMCs using Microbead kits (Miltenyi Biotec, Germany). Cell pellets were kept in 500 ml Trizol (Invitrogen, Frederick, MD, USA) 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, USA), and JAK2WT and JAK2V617F allele-specific quantitative PCRs were performed in genomic DNA and in cDNA as described (Lippert et al., 2006, 2009).

Cytokine studies

Cytokine profiles of serum and BM plasma, kept frozen at -80°C , were analysed using cytokine arrays VI and VII (RayBiotech, Inc., Norcross, GA, USA; the list of cytokines tested is shown in Supplementary Table 1), and ELISAs: human and murine IL-6 and IL-11 Quantikine kits (R&D Systems, Abingdon, UK); IL-8, leptin and HGF EASIA kits (BioSource Europe); and MCP-1 and TIMP-1 instant kits (Bender Medsystems, Vienna, Austria).

Quantitative mRNA studies of cytokines and signalling molecules. Cell pellets kept in Trizol were submitted to mRNA extraction. After DNase treatment and reverse transcription, cDNAs were kept frozen at -80°C . Quantitative PCRs for TIMP-1, HGF, IL-11, IL-6, c-MET, gp130 (sequence common to variant forms), STAT3 and STAT5 (sequence common to a and b forms), as well as b-actin and RPLP0, used as control genes, were performed with specific primers and probes (Supplementary Table 2) on Rotorgene 6000 (Corbett Research, Mortlake, NSW (Inner West), Australia). Dilutions of DNA preparations of pCR4-TOPO-TA constructs (Invitrogen) containing the relevant amplicons were used as copy number standards for qPCR assays. As less variation in mRNA expression was observed for RPLP0 than for b-actin, results were expressed as mean number 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 was performed using Pfu Ultra DNA polymerase (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) with the following primers: forward, 5'-CACAAGCATTGG GTTGTAAATTATGGAGTATG-3', reverse, 5'-CATACTC CATTATTACAAACCAATGCTTG-3'. PCR products were amplified into TOP 10 chemically competent bacteria (Invitrogen) 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. In all, 25 ng of pcDNA3.1 containing either JAK2WT or JAK2V617F cDNA was used to transfect 10^7 BaF-3/Epo-R cells using the Amaxa Nucleofactor device (Amaxa, Cologne, Germany). Cells were then grown in 4 ml of RPMI medium supplemented with serum and Epo for 24 h, 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 h in RPMI medium supplemented with 10% FCS, then stimulated for 10 min with Epo (25 IU/ml) in RPMI and 2% FCS, at 37°C . Cells were harvested, washed twice in cold PBS, lysed in 60 ml RIPA buffer, then proteins (25 ng) were loaded on 10% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) (Corre-Buscail et al., 2005; Cleyrat et al., 2010). After blocking with 5% non-fat dry milk, membranes were incubated with Abs specific for p-STAT5 (Zymed, San Francisco, CA, USA), p-JAK2 and

p-STAT3 (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) or b-actin (Millipore Corporation), then stripped and re-probed with Ab specific for total JAK2 (Millipore Corporation), STAT3 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 nM of human JAK2 siRNA (Accell SMARTpool E-003146-00-0005, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 72 h 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 (25 ng/ml) and in methylcellulose (medium H4531, StemCell Inc., Vancouver, Canada) (Dobo et al., 2004; Corre-Buscail et al., 2005). Purified BM erythroblasts were grown for 24 h in IMDM liquid medium and serum, with or without Epo, with neutralizing polyclonal Ab, used at 2 ng/ml: anti-HGF, anti-c-MET and anti-IL-11 Ab were from R&D. 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, % JAK2V617F 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.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

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. 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 (MB, 2008).

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

References

- 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.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Cancer Genome Project et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK-2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054–1061.
- Bernet A, Mehlen P. (2007). Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer* 94: E12–E17.
- Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau J-L et al. (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 ERK 1/2 rather than STAT5. *Leukemia* 24: 1069–1073.

- Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. (2008). Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 7: 504–516.
- 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.
- 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.
- Derksen PW, de Gorter DJ, Meijer HP, Bende RJ, van Dijk M, Lokhorst HM et al. (2003). The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia* 17: 764–774.
- Dobo I, Donnard M, Girodon F, Mossuz P, Boiret N, Boukhari R et al. (2004). Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assay performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol J* 5: 161–167.
- Du W, Hattori Y, Yamada T, Matsumoto K, Nakamura T, Sagawa M et al. (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.
- Ferguson LR, Han DY, Fraser AG, Huebner C, Lam WJ, Morgan AR et al. (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.
- Geissler K, Ohler L, Fodinger M, Kabra E, Kollars M, Skoupy S et al. (1998). Interleukin-10 inhibits erythropoietin-independent growth of erythroid bursts in patients with polycythemia vera. *Blood* 92: 1967–1972.
- Girodon F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Dos Santos F 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. *Haematologica* 93: 1723–1727.
- 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.
- Hermouet S, Godard A, Pineau D, Correl I, Raher S, Lippert E et al. (2002). Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythemia vera. *Cytokine* 20: 178–183.
- 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.
- Ho CL, Lasho TL, Butterfield JH, Tefferi A. (2007). Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 31: 1389–1392.
- 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.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* 434: 1144–1148.
- Jenkins BJ, Roberts AW, Najdovska M, Grail D, Ernst M. (2005). The threshold of gp130-dependent 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 et al. (2007). Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis. *Blood* 109: 2380–2388.
- Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL et al. (2009). JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41: 446–449.
- 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.
- Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL et al. (2009). A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41: 455–459.
- 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.
- Kopitz C, Gerg M, Bandapalli OR, Ister D, Pennington CJ, Hauser S et al. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling. *Cancer Res* 67: 8615–8623.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR et al. (2005). A gain-of-function mutation of JAK-2 in myeloproliferative disorders. *New Engl J Med* 352: 1779–1790.
- Kralovics R. (2008). Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 22: 1841–1848.
- Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachet 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.
- 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.
- Le Bousse-Kerdiles MC, Martyrre MC. (1999). Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Ann Hematol* 78: 437–444. Review.
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V et al. (2006). The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 108: 1865–1867.
- Lippert E, Girodon F, Hammond E, Reading NS, Jelinek J, Badbaran A et al. (2009). Concordance of assays designed for the quantitation of JAK2V617F (1849G4 T): a multi-centre study. *Haematologica* 94: 38–45.
- Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y et al. (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.
- Musolino C, Calabro L, Bellomo G, Martello F, Loteta B, Pezzano C et al. (2002). Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 69: 159–163.
- Najfeld V, Cozza A, Berkofsky-Fessler W, Prchal J, Scalise A. (2007). Numerical gain and structural rearrangements of JAK2, identified by FISH, characterize both JAK2V617F F-positive and -negative patients with Ph-negative MPD, myelodysplasia, and B-lymphoid neoplasms. *Exp Hematol* 35: 1668–1766.
- Nussenzweig RH, Swierczek SI, Jelinek J, Gaikwad A, Liu E, Verstovsek S et al. (2007). Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation. *Exp Hematol* 35: 32–38.
- Olcaud D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Babinger I et al. (2009). A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41: 450–454.
- Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, Katsarakis A, Seferiadis K, Stebbing J et al. (2005). Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Rα, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *British J Haematol* 130: 709–715.
- Queniaux VF, Clark SC, Turner K, Fagg B. (1992). Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. *Blood* 80: 1218–1223.
- Radaeva S, Jaruga B, Hong F, Kim WH, Fan S, Cai H et al. (2002). Interferon-alpha activates multiple STAT signals and down-regulates c-Met in primary human hepatocytes. *Gastroenterology* 122: 1020–1034.
- Sattler M, Salgia R. (2007). c-MET and hepatocyte growth factor: potential new targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 9: 102–108.
- Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F et al. (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.
- 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.
- Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW et al. (2004). RNA interference reveals that ligand-independent MET activity is required for tumor cell signalling and survival. *Cancer Res* 64: 7962–7970.
- 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.
- 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.
- Tefferi A. (2010). JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms. *The Hematologist* 7: 5. Review.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J et al. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111: 3931–3940.
- 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.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292–2302.
- Verstovsek S. (2010). Therapeutic potential of janus-activated Kinase-2 inhibitors for the management of myelofibrosis. *Clin Cancer Res* 16: 1988–1996.
- 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.
- Wickenhauser C, Thiele J, Lorenzen J, Schmitz B, Frimpong S, Schramm K et al. (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.
- Zdzisinska B, Bojarska-Junak A, Dmoszynska A, Kandeler-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.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

Conclusions :

Dans ce travail, nous avons recherché l'existence de boucle autocrine/paracrine de production de cytokines qui peuvent intervenir dans la prolifération du clone malin. Pour cela, nous avons dans un premier temps, réalisé des dosages de cytokines (IL-11, IL-8, IL-6, HGF, SCF...) dans des sérums, des plasmas de moelle osseuse et des surnageants de culture de cellules stromales de la moelle osseuse de patients atteints de PV. Nous avons ainsi pu montrer que l'IL-11 et l'HGF sont des cytokines surexprimées chez les patients atteints de PV. Nous avons montré que cette augmentation des concentrations en IL-11 et HGF est dûe, au moins en partie, aux cellules stromales de la moelle osseuse des patients atteints de PV qui produisent plus d'IL-11 et d'HGF que les cellules de patients atteints d'érythrocytose secondaire. De plus, il apparaît que cette augmentation de la production d'IL-11 et d'HGF est indépendante de la mutation *JAK2V617F* et que ces deux cytokines participent à la prolifération du clone malin.

En conclusion, nous avons mis en évidence un rôle majeur des cytokines IL-11 et HGF dans la pathogénèse de la PV. En effet, de manière indépendante à la mutation *JAK2V617F*, l'IL-11 et l'HGF influencent la prolifération et probablement la survie cellulaire. De plus, l'IL-11 est connue pour stimuler myélopoïèse. Cependant, la cause de la dérégulation de l'expression de ces cytokines liées à l'inflammation reste à déterminer.

DISCUSSION

V- Discussion

Les SMP restent encore aujourd'hui des maladies dont la pathogénèse est mal comprise. En effet, malgré les découvertes des mutations de *JAK2* et de *MPL*, ainsi que de l'haplotype 46/1 ou encore des nombreuses altérations génétiques associées (mutations de *TET2*, *IDH1/2*, *c-CBL*, *LNK*...), l'événement primaire ou la séquence d'événements déclenchant les SMP reste à identifier (**Figure 40**).

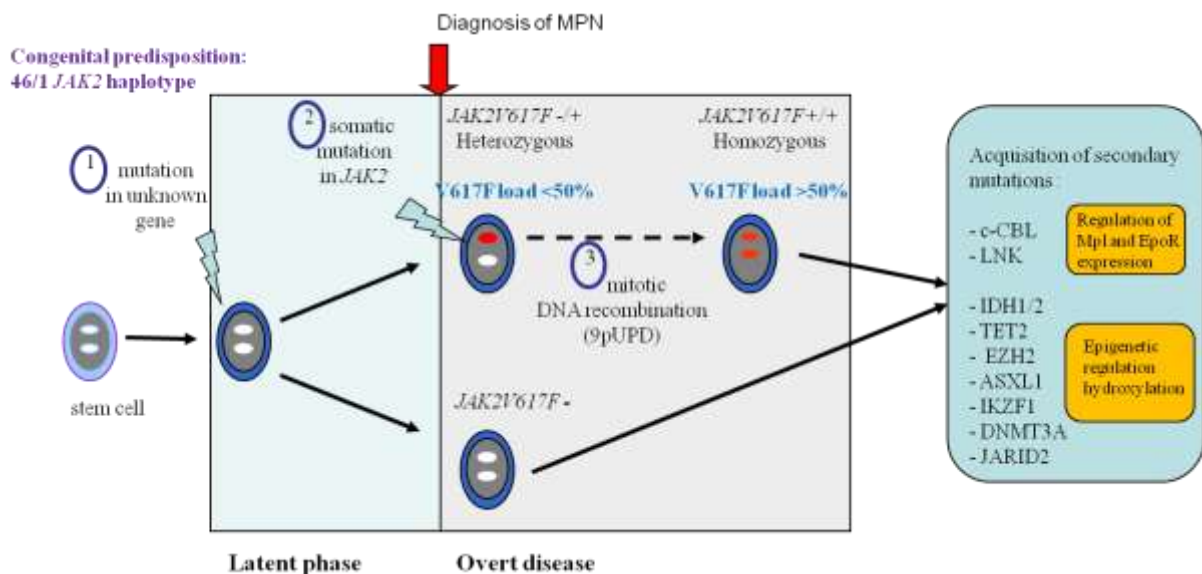


Figure 40 : Modèle de la pathogénèse des SMP (d'après Kralovics et al., 2005 NEJM ; 28;352(17):1779-90).

L'objectif de ce travail de thèse a été de mieux comprendre l'implication de certains éléments importants dans la pathogénèse des SMP : l'haplotype 46/1, le couple Mpl/Jak2 et les cytokines de l'inflammation.

L'haplotype 46/1 influence l'érythropoïèse et la granulopoïèse chez les patients atteints de SMP (article 2. Page 111).

Nous nous sommes intéressés à la possibilité de prédisposition génétique au développement de SMP en commençant par une étude de l'haplotype 46/1 afin de mieux comprendre son importance et son influence sur la mutation de *JAK2* dans la PV. Nous avons ainsi montré que la fréquence des patients atteints de PV, **homozygotes congénitaux** pour l'haplotype 46/1, est

plus élevée (23.5%) que dans la population générale (environ 6%, HapMap ss18834954, European population). Cette fréquence augmentée, indépendamment de la 9pUPD, suggère que l'haplotype 46/1 est effectivement un allèle ayant plus de risque d'acquérir des mutations de *JAK2*, accréditant ainsi l'hypothèse d'« hypermutabilité ». L'analyse des paramètres biologiques a révélé que l'haplotype 46/1 pourrait prédisposer de manière différentielle, les patients atteints de PV, à une **stimulation importante soit de l'érythropoïèse (patients hétérozygotes pour l'haplotype 46/1), soit de la granulopoïèse et de l'érythropoïèse** dans une moindre mesure (**patients homozygotes pour l'haplotype 46/1**), **indépendamment de la charge allélique *JAK2V617F***. Ces données accréditent la deuxième hypothèse dite du « terrain fertile » émise par Olcaydu et coll. (*Olcaydu et al.*, 2009 Nature Genetics). Ces résultats nécessitent tout de même d'être validés sur une cohorte plus importante.

Variabilité de charge allélique *JAK2V617F* entre l'ADNg et l'ADNc de patients atteints de PV (article 2. Page 111).

Pour le moment, peu d'études se sont intéressées au niveau d'expression de *JAK2* au niveau de l'ARNm. En effet, l'étude au niveau ADN génomique est plus aisée afin de déterminer la charge allélique, notamment pour la routine en diagnostic. Cependant, notre groupe a publié un travail en 2006 comparant notamment les charges alléliques de *JAK2V617F* dans l'ADNg et dans l'ADNc (*Lippert et al.*, 2006 Blood). Cette étude avait montré une bonne corrélation entre les niveaux de *JAK2V617F* entre les deux séries d'échantillons, comme nous avons pu le confirmer dans ce travail de thèse, en notant tout de même une certaine variabilité, chez certains patients.

Nous avons alors entrepris d'analyser les niveaux d'expression des ARNm *JAK2* sauvage, *JAK2V617F* et *JAK2* total en fonction de l'haplotype 46/1. Nous avons noté des variations supérieures à 30% chez 19 des 54 patients analysés (35.2%) entre les charges alléliques détectées sur l'ADNg et l'ADNc. **Ces variations du niveau d'expression de l'ARNm de *JAK2* ne sont pas influencées par la présence de l'haplotype 46/1.** Les premiers résultats présentés au cours du meeting de l'American Society of Hematology en 2011 par le groupe du Dr. Levine suggéraient que l'haplotype 46/1 pouvait influencer le niveau d'expression de *JAK2* au niveau ARNm. Leurs résultats montraient un rôle d'un polymorphisme (rs1887428) présent au niveau du d'une séquence régulatrice c-Fos/c-Jun du promoteur de *JAK2* (*Schram et al.*, Abstract 124, Session 634). En effet, en modifiant la séquence nucléotidique du site de fixation au promoteur de *JAK2*, le polymorphisme rs1887428 favoriserait la fixation de c-Fos/c-Jun, induisant ainsi un taux supérieur de transcription de *JAK2* à partir de l'allèle 46/1.

Cependant, l'un des points difficiles à résoudre reste la régulation de la production de la protéine Jak2. En effet, tout le monde s'accorde sur le point que des niveaux variables d'ARNm de JAK2 ne signifient pas pour autant des niveaux variables de quantité de protéine Jak2. L'étude de lysats de cellules de patients reste compliquée à mettre en place sur un nombre important de patients.

Le niveau d'expression de JAK2 au niveau ARNm est influencé par des recombinaisons homologues répétées, mais pas par la 9pUPD seule (article 1. Page 96).

Comme nous l'avons montré pour deux cas de PV (présentant une charge allélique < 30% de *JAK2*V617F sur l'ADNg), il semble que le niveau d'expression de *JAK2* puisse être altéré par des successions de recombinaisons homologues, d'abord de petite taille (inférieure à 500Kb) avant l'acquisition de la mutation V617F, puis plus large, de type 9pUPD. Nos résultats montrent que les recombinaisons homologues de grande taille post-V617F (comme **la disomie uniparentale du chromosome 9p**) **ne semblent pas affecter l'expression de *JAK2***. De plus, il est intéressant de noter que l'un des deux patients (Na1253) a perdu l'allèle 46/1 après la 9pUPD. La cause de cette dérégulation reste donc à identifier. Cependant, avec les technologies disponibles à ce jour, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autres patients porteurs de recombinaisons homologues pré-V617F. Il est intéressant de noter que ces deux cas de PV présentent une chronologie d'acquisition d'anomalies génétiques similaires. En effet, les deux patients ont tout d'abord eu une première recombinaison homologue d'une partie, ou de *JAK2* entier, puis l'acquisition de la mutation V617F et enfin des disomies uniparentales du chromosome 9p. Cependant, si nous avons observé un niveau très élevé d'ARNm de *JAK2* (> 3000 copies de *JAK2* / 100 ABL), nous n'avons pas pu vérifier que cette augmentation se traduisait par une plus grande quantité de protéine Jak2. Dans cette étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence de liens entre les niveaux d'ARNm de *JAK2* et les paramètres biologiques des patients. Dans ce travail, nous avons également pu montrer que **la disomie uniparentale du chromosome 9p est fréquente chez les patients atteints de PV présentant une charge allélique inférieure à 50%.**

Le niveau d'expression de Mpl mature à la membrane plasmique est corrélé à la présence de quantités suffisantes d'ARNm de *JAK2*WT, et non de *JAK2*V617F (article 2. Page 111).

Nous nous sommes intéressés au couple de protéines Mpl/Jak2. Moliterno et coll. ont montré à la fin des années 90 que l'expression de Mpl dans les plaquettes est altérée chez les patients

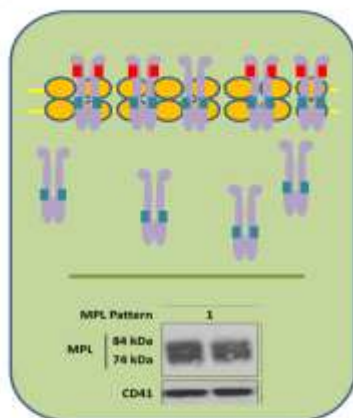
atteints de SMP (*Moliterno et al.*, 1998 NEJM). Plusieurs études ont tenté de trouver une explication à cette altération du niveau d'expression de Mpl. Kralovics et coll. ont montré que le niveau d'expression d'ARNm de *MPL* n'est pas dérégulé, suggérant une anomalie de production ou de maturation du récepteur Mpl (anomalie post-transcriptionnelle) confirmant ainsi les travaux de Moliterno et coll. (*Moliterno et al.*, 1999 Blood; *Kralovics et al.*, 2003 Blood). A la découverte de la mutation *JAK2V617F*, une hypothèse émergea pour tenter d'expliquer cette diminution d'expression de Mpl. Plusieurs groupes ont conclu que cette dérégulation était une conséquence de la présence de la protéine Jak2V617F (*Moliterno et al.*, 2006 Blood ; *Pecquet et al.*, 2012 Blood). Cette hypothèse est séduisante. En effet, la protéine Jak2 est connue pour être l'une des protéines chaperonnes de Mpl (*Huang et al.*, 2001 Mol Cell; *Royer et al.*, 2005 J Biol Chem ; *Tong et al.*, 2006 J Biol Chem). Jak2 se fixe au niveau des régions Box de Mpl et va permettre à Mpl de poursuivre son processus de maturation et d'acquisition de sa conformation 3D (*Royer et al.*, 2005 J Biol Chem). La présence de la protéine Jak2V617F, constitutivement active, pourrait induire soit des problèmes de production/maturation soit une dégradation plus rapide de la protéine Mpl (*Moliterno et al.*, 2006 Blood). Récemment, l'étude de Pecquet et coll. a démontré que la protéine Jak2V617F murine induit une dégradation de la protéine Mpl (*Pecquet et al.*, 2012 Blood). A l'opposé, lorsque JAK2 sauvage est introduit dans des cellules Ba/F3, Pecquet et coll. ont observé une augmentation de la quantité, de la maturation et de l'expression à la membrane plasmique de Mpl. La dégradation de Mpl par Jak2V617F a lieu dans le protéasome. Cependant, cette observation n'explique pas les cas des patients atteints de SMP, sans mutation de *JAK2*, et ayant une altération de l'expression de Mpl. Notre étude a clairement montré qu'une partie **des patients atteints de SMP ne présentant pas de mutation *JAK2V617F*, ont une diminution de l'expression ou une altération de la maturation de Mpl**. Nous avons par ailleurs défini **quatre profils d'expression de Mpl différents** : un premier profil où l'on retrouve les **formes mature et immature de Mpl, exprimées à des niveaux comparables**, correspondant au profil typique des **donneurs sains**. Le deuxième profil, où l'on ne retrouve que **la forme mature de Mpl**, est typique des **états inflammatoires**. On retrouve également un troisième profil dans lequel on ne peut détecter que **la forme immature de Mpl** et enfin un quatrième profil pour lequel on **ne détecte pas de Mpl** en western blot. De plus, nous avons corrélé le profil d'expression de Mpl chez ces patients avec les niveaux d'expression de *JAK2* au niveau ARNm. Ainsi, nous avons trouvé que **l'expression de la forme mature de Mpl est liée à un niveau normal d'ARNm de *JAK2WT***. Au contraire, des niveaux bas d'ARNm de *JAK2WT* sont liés à l'absence de la forme mature de Mpl dans les plaquettes de

patients atteints de SMP. Ces résultats semblent logiques, dans le sens où, si la cellule dispose de suffisamment de protéine Jak2, elle pourra produire et permettre une maturation et l'acquisition d'une conformation 3D correcte à Mpl. Au contraire, si la cellule vient à manquer de Jak2, les protéines Mpl en trop grande quantité, ne seront pas toutes prises en charges par des protéines chaperonnes Jak2 et donc ne finiront pas leur maturation, n'acquerront pas une bonne conformation 3D et seront donc éliminées via des systèmes de dégradation telle que le protéasome.

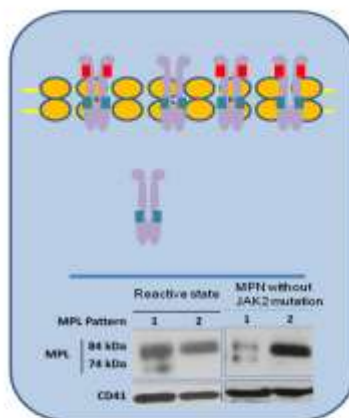
Jak2V617F interagit avec Mpl et permet sa maturation, mais induit aussi une dégradation plus importante de Mpl que Jak2WT (article 2. Page 111).

Nos études *in vitro* indiquent que la protéine **Jak2V617F est capable d'interagir avec Mpl, d'assurer la maturation et l'expression à la membrane de Mpl**. Cependant, dans ces fonctions, **Jak2 sauvage est plus efficace que Jak2V617F**. Une explication possible pourrait être liée au fait que la protéine Jak2V617F est constitutivement active et pourrait induire la dégradation de Mpl plus rapidement que Jak2 sauvage comme suggéré par Pecquet et coll. (Pecquet *et al.*, 2012 Blood). Certaines de nos observations faites à l'aide de transfections transitoires et de western blotting ont montré que l'ajout de Jak2 sauvage permet effectivement d'augmenter la production totale de la protéine Mpl (immature et mature) confirmant ainsi le rôle de protéine chaperonne de Jak2. Par contre, l'ajout de Jak2V617F, bien que permettant la production de Mpl aussi bien sous forme immature que mature, induit une diminution de la quantité totale de Mpl suggérant une dégradation du couple Mpl/Jak2. Malgré tout, **Jak2V617F permet la formation d'un homo-dimère fonctionnel de Mpl** comme l'ont montré nos expériences de transfections dans des cellules humaines UKE-1 (JAK2V617F^{+/+}) dans lesquelles la stimulation par la Tpo induit une signalisation spécifique par phosphorylation de Stat5.

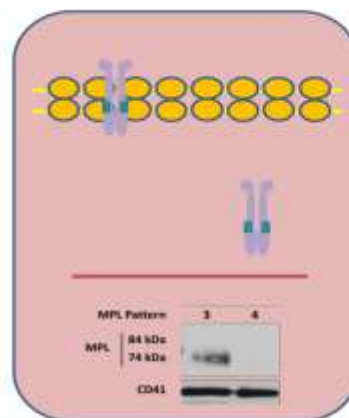
En conclusion, il semble que les niveaux de Mpl et de Jak2 soient liés dans les cellules hématopoïétiques. Chez les patients atteints de SMP, un niveau bas de Mpl est associé à un niveau faible d'expression de JAK2WT. De plus, la protéine Jak2V617F ne permet pas un niveau normal d'expression de Mpl, probablement en induisant la dégradation rapide de Mpl (**Figure 41** page 224).



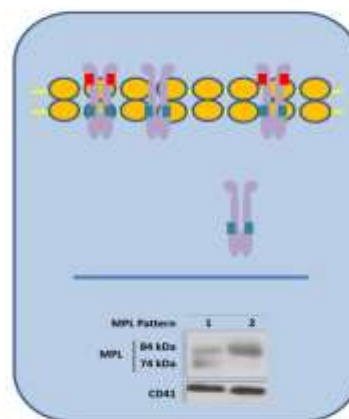
A Normal case
Normal JAK2 mRNA level



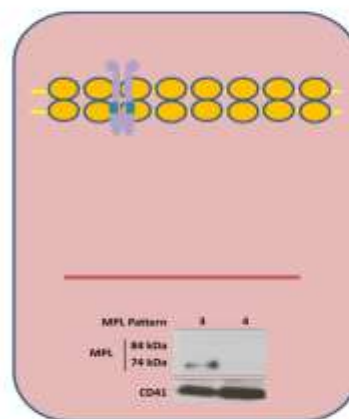
B Case of JAK2V617F negative MPN
or reactive states...
with normal JAK2WT mRNA level



C Case of JAK2V617F negative MPN
with low JAK2WT mRNA level



D Case of JAK2V617F positive MPN
with normal JAK2WT mRNA level



E Case of JAK2V617F positive MPN
with low JAK2WT mRNA level

Figure 41 : Relation entre le niveau d'expression de JAK2 au niveau ARNm et le profil d'expression de Mpl dans les plaquettes. La protéine Mpl est représentée en violet. Les carrés de couleur bleue et rouge indiquent le niveau de glycosylation de Mpl **A.** Cas des donneurs sains. Les deux isoformes de Mpl (84 et 74 KDa) sont détectables avec un ratio 50:50. **B.** Cas de patients ayant un état inflammatoire ou un SMP sans mutation JAK2V617F présentant un niveau d'expression de l'ARNm JAK2WT > 300 copies / 100 ABL. On observe une diminution de la quantité totale de Mpl avec une majorité de forme mature (84 KDa). La forme immature (74 KDa) est soit détectable en faibles quantités, soit indétectable. **C.** Cas de SMP sans mutation JAK2V617F présentant un niveau d'expression de l'ARNm JAK2WT < 300 copies / 100 ABL. On observe une diminution de la quantité totale de Mpl avec seulement la forme immature (74 KDa). La forme immature (74 KDa) est soit détectable en faible quantité, soit indétectable. La forme mature n'est jamais détectable. **D.** Cas de SMP avec mutation JAK2V617F présentant un niveau d'expression de l'ARNm JAK2WT > 300 copies / 100 ABL. On observe une diminution de la quantité totale de Mpl avec une majorité de forme mature (84 KDa). Mpl immature (74 KDa) est soit détectable en faible quantité, soit indétectable. **E.** Cas de SMP avec mutation JAK2V617F présentant un niveau d'expression de l'ARNm JAK2WT < 300 copies / 100 ABL. On observe une diminution de la quantité totale de Mpl avec seulement la forme immature, en faible quantité, soit indétectable; Mpl mature n'est jamais détectable.

La forme immature de Mpl est dégradée dans des vésicules d'autophagie qui permettent également son expression à la membrane via une voie d'export non-conventionnelle (article 4. Page 156).

Nos observations réalisées avec des constructions JAK2 et MPL dans des cellules murines et humaines sont clairement différentes de celles de Pecquet et coll. (*Pecquet et al.*, 2012 Blood). Une de nos premières études avait permis de déterminer la localisation de Jak2WT et Jak2V617F, mettant ainsi en évidence que la localisation cellulaire des deux protéines est identique (*Girodon et al.*, 2011 Blood). Lorsque nous avons étudié Jak2 et Mpl, nous n'avons pas observé de diminution aussi importante du niveau de Mpl que dans l'étude de Pecquet et coll., lorsque nous réintroduisons JAK2V617F dans les lignées cellulaires. Par contre, il semble qu'en présence de Jak2V617F, Mpl se trouve être moins présente à la membrane plasmique, en comparaison avec Jak2WT. De plus, nous avons montré que **la majorité des protéines Mpl correspond à la forme immature de Mpl** (74 KDa) et que celle-ci se trouve être **dégradée en partie dans des autolysosomes**. Cela est peut être dû aux différences d'espèces (souris/humain) avec des interactions différentes entre Mpl et Jak2 murins et humains. Une autre explication peut être liée à l'utilisation du système d'expression des constructions plasmidiques : Pecquet et coll. ont utilisé un système rétroviral stable avec un tri cellulaire en fonction du niveau d'expression de JAK2 et d'un marqueur secondaire ; alors que nous avons utilisé des transfections transitoires, non rétrovirales. De même, les différences observées sur les mécanismes de dégradation de Mpl peuvent être liées à plusieurs paramètres : différences souris/humains, ou système d'expression utilisé. En effet, il est connu qu'une expression trop importante de protéines induit une réponse cellulaire de survie par autophagie. Cette réponse appelée « réponse aux protéines non-conformées » ou UPR (Unfold Protein Response) correspond à un mécanisme déclenché par la cellule suite à un stress détecté au niveau du réticulum endoplasmique et a pour rôle d'éliminer le surplus de protéines mal conformées. Cependant, les corrélations établies entre les profils d'expression de Mpl et les niveaux d'ARNm de JAK2 semblent indiquer que, lorsque les niveaux de JAK2 sont bas, le niveau de maturation de Mpl est bas. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une majorité des protéines immatures Mpl seraient mal conformées, car non liées à Jak2, et seraient donc dégradées via des vésicules d'autophagie. Enfin, cette étude nous a permis de mettre en évidence **un nouveau mécanisme de trafic et d'expression membranaire de la protéine Mpl**. Ce mécanisme passerait par **une voie non-conventionnelle liée à l'autophagie**, ce qui permettrait **l'export à la membrane de protéine Mpl immature mais fonctionnelle**. Ce mécanisme inhabituel d'export de protéine Mpl se ferait aussi bien **dans des cellules**

JAK2WT⁺/+ que JAK2V617F⁺/+. Il serait intéressant de confirmer ces résultats dans les cellules de patients ou de donneurs sains par l'étude de marqueurs de l'autophagie et de Mpl afin de valider ce nouveau modèle. Cependant, la forte expression de Mpl induite par les transfections pourrait aussi expliquer le fait que l'on retrouve Mpl immature au niveau de la membrane plasmique Hitchcock et coll. avaient conclu que seule la forme mature de 84 KDa était détectable dans la membrane plasmique, la forme immature de 74 KDa étant détectée dans le reste du lysat cellulaire (Ba/F3-Mpl) (*Hitchcock et al.*, 2008 Blood).

Mutation T1588C de l'exon 10 de MPL (W515R) en l'absence de SMP (article 5. Page 183).

Nous avons étudié deux membres d'une famille (un père et sa fille) ayant un historique d'**hyperplaquettose bénigne** associée à une **mutation germinale T1588C dans l'exon 10 de MPL (MPLW515R)**. Dans cette famille, **aucun cas de SMP n'a été détecté**. L'analyse du **myélogramme a révélé une morphologie et une cellularité normale**. Par contre, des amas de plaquettes ont été détectés, suggérant une activation plaquettaire. Il est intéressant de noter que chez ces deux personnes, **seule la forme mature de Mpl a été détectée dans les plaquettes** par western blotting (comme observé dans les états inflammatoires réactionnels), suggérant un défaut de production ou une dégradation rapide de Mpl. Il serait intéressant de quantifier le niveau d'expression de JAK2WT au niveau ARNm. Au vu des résultats de western blotting, on s'attend à trouver un niveau d'ARNm de JAK2WT < 300 copies / 100 ABL. Cependant, dans ce cas, Mpl est muté. On pourrait donc trouver une forte expression de JAK2WT au niveau ARNm, dans un effort inefficace de la cellule, pour compenser un défaut d'interaction entre MplW515R et Jak2. L'analyse fonctionnelle des mutants de Mpl (W515K/L/A/R) a montré des différences de niveau d'activation des voies de signalisation basale, et en réponse à une stimulation par la Tpo. En effet, il apparaît que **MplW515R**, bien qu'étant **constitutivement activée**, présente un **effet moindre sur la signalisation Stat3/5, Erk1/2 et Akt**. Cette différence de niveau d'activation peut certainement, en partie, expliquer l'hyperplaquettose bénigne. **Aucune autre anomalie génétique** n'a pu être détectée, aussi bien par séquençage direct (JAK2, THPO et MPL) que par SNP array. D'autres laboratoires ont identifié des patients porteurs de la mutation MPLW515R. Les diagnostics de TE ou de MFP ont été portés pour ces patients. Il serait intéressant de comparer cette famille nantaise présentant une hyperplaquettose bénigne avec les cas présentant une TE ou une MFP afin de mieux comprendre les éléments qui pourraient influencer l'évolution de la pathologie vers un SMP. Un séquençage complet du génome des patients porteurs de mutation MPLW515R

développant ou non un SMP permettrait peut être l'identification d'anomalie additionnelle facilitant ou inhibant le développement d'un SMP. Notre étude suggère que la mutation ***MPLW515R*** n'est pas suffisante, seule, pour déclencher un SMP.

Comme nous avons pu le démontrer, les patients atteints de SMP présentent fréquemment une dérégulation de l'expression de l'ARNm de *JAK2*. Il serait donc intéressant de confirmer ces variations entre l'ADNg et l'ADNc sur des cohortes de patients plus importantes, en fonction du diagnostic. Afin de déterminer de possibles autres conséquences liées aux variations du niveau d'expression de l'ARNm de *JAK2*, il serait intéressant de corrélér ces pourcentages de charge allélique avec les paramètres biologiques des patients et de vérifier le niveau d'expression de *Jak2* par western blotting. De plus, les mécanismes de (dé)régulation du niveau d'expression de *JAK2* ne sont, pour le moment, pas connus. Cependant, cette dérégulation de l'expression et, de manière plus générale, de l'activité de *Jak2* et de *Mpl* semble être un élément central dans la pathogénèse des SMP. En effet, la majorité des mutations découvertes concernent *Jak2* ou *Mpl*, et dans certains cas de SMP sans mutation identifiée, l'expression de *Mpl* est altérée. Il est connu que le récepteur à l'Epo (EpoR) est régulé de manière similaire, en termes de maturation du récepteur, par *Jak2* (Sulahian *et al.*, 2009 Blood). Il serait intéressant d'étudier plus précisément les niveaux d'expression du récepteur à l'Epo chez les patients atteints de SMP afin de déterminer s'il y a ou non une altération des niveaux de maturation de l'EpoR en présence de la protéine *Jak2V617F*. L'étude de Pecquet et coll. a montré que dans un modèle murin, l'expression membranaire de l'EpoR n'est pas altérée. Cependant, l'étude des niveaux de maturation du récepteur semble être importante à réaliser. De même, l'étude du récepteur au G-CSF (G-CSFR), impliqué dans la granulopoïèse, pourrait être une piste intéressante afin de compléter l'étude de l'influence de *Jak2V617F*, ou du niveau de *Jak2* sauvage, sur les niveaux de maturation et d'expression membranaire de ces récepteurs impliqués dans la myélopoïèse des 3 lignées cellulaires principalement impliquées dans les SMP.

Les cytokines influencent la prolifération et la survie des clones malins (article 6. Page 204).

Nous nous sommes intéressés à l'importance des **cytokines inflammatoires** dans les SMP et en particulier aux cytokines **IL-11** et **HGF**. Nous avons **confirmé la surexpression** de ces deux cytokines chez les **patients atteints de SMP**. Nous avons également montré que les **progéniteurs érythroïdes** et les **cellules stromales de la moelle osseuse de patients atteints**

de PV produisent plus d'HGF et d'IL-11 que celles des donneurs sains. De plus, cette surexpression n'est **pas la conséquence de la présence de la protéine Jak2V617F**. Enfin, il a été montré que **ces cytokines favorisent la pousse des progéniteurs érythroïdes des patients atteints de PV**. Ces résultats semblent confirmer l'implication des cytokines telles que l'HGF et l'IL-11 dans la prolifération du clone malin.

Les mutations de JAK2 et de MPL ne suffisent pas pour développer un SMP. Importance des cytokines dans la pathogénèse des SMP.

Plusieurs études concluent sur le rôle prépondérant des cytokines dans la prolifération clonale. Le TNF α semble notamment jouer un rôle majeur. Le TNF α est connu pour être un régulateur négatif des cellules hématopoïétiques en cycle cellulaire en induisant la sénescence et l'instabilité génétique dans les cellules cibles (*Murase et al.*, 1987 Blood; *Dybedal et al.*, 2001 Blood; *Beyne-Rauzy et al.*, 2004 Oncogene). Pourtant, dans le cas de SMP, le TNF α permet l'expansion préférentielle du clone JAK2V617F (*Fleischman et al.*, 2011 Blood). Les clones mutés se retrouvent être protégés vis-à-vis du TNF α ce qui favorise la sélection clonale des cellules résistantes aux molécules inflammatoires. De même, pour la formation de colonies *in vitro*, les progéniteurs érythroïdes de patients atteints de PV sont dépendants des cytokines IL-11 et IL-8 en absence d'Epo (*Corre-Buscail et al.*, 2005 Experimental Hematology). De plus, la fibrose médullaire réactionnelle, qui survient avec l'évolution de la pathologie chez les patients atteints de TE ou de PV, peut être réduite lorsque le clone JAK2V617F-positif est diminuée par un traitement cytoréducteur.

Plusieurs études ont montré que l'acquisition de la mutation JAK2V617F n'est pas l'événement génétique primaire déclenchant les SMP. Nussenzveig et coll. ont mis en évidence chez des patients atteints de PV, que des colonies BFU-E JAK2WT, pouvaient pousser en absence d'Epo (*Nussenzveig et al.*, 2007 Exp Hematol).

De plus, il a été montré que la mutation JAK2V617F, seule, ne pouvait suffire à permettre une expansion majeure du clone malin. Chez des patients atteints de TE, différents clones JAK2V617F d'origine polyclonale ont pu être mis en évidence (*Lambert et al.*, 2009 Blood). Nous avons identifié trois patientes atteintes de PV et porteurs d'une double mutation JAK2L611V/V617F (charge allélique comprise entre 20 et 30%). Cependant, chez une de ces patientes, nous avons pu détecter plusieurs clones mineurs porteurs notamment de la mutation JAK2V617F (environ 2% de charge allélique) (*Cleyrat et al.*, 2010 Leukemia). De plus, lors de l'analyse fonctionnelle de ces mutants, nous avons pu remarquer que le double mutant

Jak2L611V/V617F activait de manière plus importante les voies de signalisation Epo-dépendante (Erk1/2 et Akt). D'autres évidences de la survenue secondaire de la mutation *JAK2V617F* ont été décrites. En effet, chez certains patients atteints de SMP, des colonies présentent une délétion chromosomique du chromosome 20q clonale associée à la mutation *JAK2V617F*, alors que d'autres ont un statut *JAK2WT* (Schaub *et al.*, 2009 Blood).

Plusieurs études basées sur des modèles murins ont permis de mettre en exergue la difficulté d'obtenir un phénotype spécifique (PV, MFP ou TE) à partir d'une seule mutation *JAK2V617F*. Récemment, Lundberg *et coll.* ont présenté des données sur des modèles murins dans lesquels les moelles osseuses sont reconstituées avec des mélanges de cellules *JAK2WT* et de cellules *JAK2V617F*+/+ à différents ratios (Tiedt *et al.*, 2008 Blood; Lundberg *et al.*, Abstract 615; Session 634). Lundberg *et coll.* ont ainsi pu mettre en évidence que des ratios élevés de *JAK2V617F*/*JAK2WT* permettaient d'obtenir un phénotype de SMP. Par contre, des ratios avec très peu de cellules *JAK2V617F* ne permettent pas d'obtenir un phénotype de SMP chez les souris. Ces données indiquent clairement que l'acquisition de la seule mutation *JAK2V617F* dans une cellule n'est pas un évènement suffisamment transformant pour aboutir à un SMP. Des événements précédant la mutation V617F ou la présence d'éléments prédisposant aux SMP semblent être indispensables pour donner un avantage prolifératif aux cellules mutées *JAK2V617F*. Par contre, une fois que les cellules *JAK2V617F* représentent un nombre important de cellules du système myéloïde, alors, le phénotype de SMP apparaît.

Une des possibles explications de la dérégulation du niveau d'expression ou de la fonction de Jak2/Mpl pourrait être liée à la dérégulation de certaines cytokines. En effet, la plupart des cytokines trouvées surexprimées dans les SMP sont connues pour stimuler l'hématopoïèse, ce qui pourrait *in fine* augmenter la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et ainsi faciliter l'acquisition de mutations. En retour, la cellule mutée pourrait chercher à contrebalancer l'effet de ces mutations par la dérégulation de l'expression du couple Mpl/Jak2 afin de « freiner » la prolifération anormale.

En conséquence, **nous proposons un modèle de pathogénèse des SMP**, avec le dysfonctionnement du couple protéique Mpl/Jak2 constituant l'élément majeur de l'apparition du phénotype de SMP (**Figure 42** page 230).

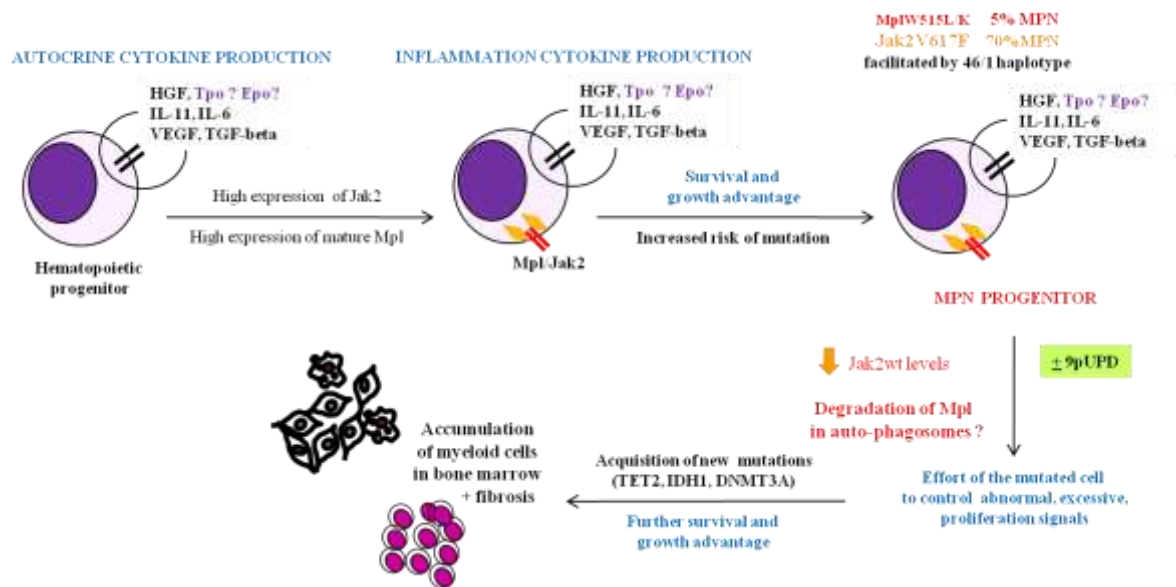


Figure 42 : Nouveau modèle de pathogénèse des SMP proposé.

Dans ce modèle, une stimulation anormale des progéniteurs hématopoïétiques par des cytokines inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-11, l'HGF ou des cytokines spécifiques de lignées telles que la Tpo ou l'Epo induirait une prolifération et une myélopoïèse importante associée à une forte expression de Jak2 et de la forme mature de Mpl. Cette stimulation importante des progéniteurs hématopoïétiques aboutirait à une augmentation de la survie et de la prolifération ainsi qu'à une augmentation du risque d'acquisition de mutation. Dans un progéniteur hématopoïétique, l'acquisition de mutations de *JAK2* ou de *MPL*, facilitée par la présence de l'haplotype 46/1, correspondrait à l'apparition du progéniteur malin qui donnera le phénotype de SMP. De plus, dans plus de 60% des cas de PV et dans certains cas de MFP, l'acquisition d'un statut homozygote pour la mutation *JAK2V617F* pourrait venir amplifier les signaux de prolifération et de survie. Afin de contrôler les signaux de prolifération anormaux et excessifs, les cellules malignes réagiraient par plusieurs mécanismes pour aboutir à une diminution de l'expression de la protéine Jak2, ce qui provoquerait également une destruction de Mpl via des auto-phagosomes suite à une trop faible quantité de protéines Jak2 (chaperonne de Mpl). D'autres mutations impliquées dans la régulation de l'expression de récepteurs tels que l'EpoR et Mpl peuvent survenir (mutations de *c-CBL* ou de *LNK*) ou toucher des gènes impliqués dans la régulation épigénétique (*EZH2*, *ASXL1* ou encore *DNMT3A*) qui donneraient un avantage de survie et de prolifération supplémentaire, voire orienteraient l'évolution de la pathologie vers une LAM.

En conclusion, ce travail a contribué à mieux comprendre la pathogénèse des SMP en décrivant l'implication des cytokines liées à l'inflammation dans la prolifération et la survie des cellules myéloïdes, l'importance du couple Mpl/Jak2 et sa régulation, l'impact de la présence de la protéine Jak2V617F sur l'expression de Mpl et sur l'importance des niveaux de Jak2 sauvage dans les cellules malignes. Ces résultats ouvrent des nouvelles voies à explorer en vue de nouveaux outils de diagnostic ou pour de potentiels traitements tels que l'association d'inhibiteur de Jak2 et d'inhibiteur du récepteur à l'HGF (c-Met) (**Annexe** page 234).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

VI- Conclusion générale et perspectives

Si de nombreuses anomalies génétiques ont été identifiées dans les SMP, celles-ci sont chez bon nombre de patients des événements secondaires, tardifs ou encore, dits « passagers » dans la pathogénèse de ces maladies. Dans ce travail de thèse, nous avons ciblé plusieurs molécules qui nous semblent être d'intérêt majeur pour la compréhension de la pathogénèse des SMP.

Nous nous sommes ainsi intéressés au couple Mpl/Jak2 qui se trouve être central dans l'hématopoïèse myéloïde en agissant aussi bien sur les progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes précoces, que sur les mégacaryocytes et les plaquettes. Une altération de l'expression ou de la fonction du couple Mpl/Jak2 peut donc conduire à une dérégulation de la production de cellules sanguines myéloïdes. De plus, nous avons recherché une production anormale de cytokines inflammatoires chez les patients atteints de SMP et déterminé les cellules productrices de ces cytokines. En effet, certaines de ces cytokines sont connues pour favoriser la prolifération et la survie des clones malins.

Dans un premier temps, nous avons étudié les niveaux d'expression de *JAK2* au niveau ARNm et montré que les charges alléliques de *JAK2V617F* varient entre l'ADNg et l'ADNc pour une partie des patients atteints de PV. De plus, les variations de niveau d'expression des ARNm *JAK2* sont importantes et nous avons pu mettre en évidence que l'expression de Mpl, sous sa forme mature et fonctionnelle, à la membrane plasmique est corrélée au niveau d'expression de *JAK2WT*. Nous avons également montré que la protéine Jak2V617F est capable d'interagir avec Mpl, comme Jak2WT, mais que l'interaction de Jak2V617F avec Mpl résulte en une plus grande dégradation de Mpl, par rapport à Jak2WT. Par des études de microscopie confocale, nous avons réussi à identifier la localisation cellulaire de Mpl dans des lignées cellulaires hématopoïétiques. Nous avons ainsi montré qu'en présence de Jak2WT, la protéine Mpl est clairement exprimée à la membrane plasmique, alors qu'en présence de Jak2V617F, Mpl se trouve préférentiellement bloquée dans des vésicules intra-cellulaires avec très peu d'expression membranaire. Enfin, en collaboration nous avons pu montrer que ces vésicules intra-cellulaires sont des vésicules d'autophagie qui permettent la dégradation des protéines mal conformées. Cependant, de manière surprenante, la voie des autophagosomes permet l'export vers la membrane de la forme immature fonctionnelle de Mpl.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence une nouvelle anomalie génétique précoce : la recombinaison homologue du gène *JAK2* sauvage. En effet, chez deux patients atteints de PV, nous avons pu montrer que les clones porteurs de la mutation V617F sont porteurs de recombinaisons homologues multiples. Chez ces deux patients, nous avons mis en évidence une recombinaison homologue du gène *JAK2*WT qui précède l'acquisition de la mutation *JAK2*V617F, suivi d'une 9pUPD. Ces événements de recombinaison homologue à répétition semblent induire une très forte expression d'allèle muté *JAK2*V617F.

Nous avons également pu mettre en évidence pour la première fois la mutation T1588C de l'exon 10 de *MPL* (W515R) dans un contexte de thrombocytose héréditaire bénigne. L'étude des deux membres de cette famille nantaise a permis de montrer qu'il s'agit d'une mutation germinale, à l'état hétérozygote. De plus, l'étude fonctionnelle de cette mutation a permis de prouver qu'il s'agit d'une mutation activatrice des voies de signalisation Stat3/5 et Erk1/2, mais de manière moins importante que les autres mutations de *MPL* précédemment décrites (*MPL*W515L/K/A). Cependant, le seul fait que la mutation *MPL*W515R soit moins activatrice que les autres mutations de *MPL* ne peut pas expliquer le phénotype observé chez ces deux cas. En effet, la mutation *MPL*W515R a déjà été identifiée chez plusieurs patients atteints de TE ou de MFP. Ces données vont dans le même sens que les travaux de Mead et coll. sur le mutant *JAK2*V617I identifié dans une famille atteinte de thrombocytose héréditaire (Mead et al., 2012 NEJM). Il semble donc que les mutations de *JAK2* ou de *MPL*, seules, ne suffisent pas à développer un phénotype de SMP.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une boucle autocrine de production d'IL-11 et d'HGF dans les érythroblastes de patients atteints de PV, et ce, de manière indépendante à *JAK2*V617F. Ces deux cytokines, aussi produites par les cellules stromales de la moelle osseuse, contribuent à la survie et la prolifération des clones malins.

Pour compléter ces travaux, il serait intéressant de valider nos résultats sur l'expression de *Mpl* et de *JAK2* au niveau de l'ARNm sur une cohorte de patients plus importante. En effet, nous avons montré que l'expression de la forme mature de *Mpl* est liée au niveau d'expression de l'ARNm de *JAK2*WT. L'étude par qPCR-AS des niveaux d'ARNm de *JAK2* permettrait de compléter le diagnostic des patients atteints de SMP en évaluant le degré d'altération de *Mpl*, qui est un acteur majeur de l'hématopoïèse myéloïde. De plus, cette étude peut être facilement mise en place en routine dans les laboratoires de diagnostic ; la

préparation des ADNc étant déjà réalisée dans la routine de certains laboratoires alors que l'étude des protéines s'avère beaucoup plus complexe à mettre en place.

Une étude plus approfondie des deux cas familiaux présentant une mutation T1588C (*MPLW515R*) associée à un phénotype de thrombocytose héréditaire bénigne permettrait peut être l'identification d'altération génétique supplémentaire pouvant favoriser le développement d'un SMP, par comparaison avec des cas avérés de SMP porteurs de mutation *MPLW515R*.

Enfin, une étude de l'implication des récepteurs aux cytokines, notamment de la famille IL-6 et de l'HGF (c-Met) permettrait de compléter le travail déjà réalisé sur les cytokines. Ainsi, nous pourrions peut être identifier des récepteurs capable de se coupler à Jak2WT ou V617F et qui pourraient influencer la prolifération clonale. Par exemple, il a déjà été montré que le récepteur à l'IL-6R soluble est surexprimé dans les sérums de patients atteints de TE. De plus, la plupart de ces cytokines sont impliquées également dans les mécanismes liés à l'adaptation aux conditions d'hypoxie. Or, il est admis que les patients présentant une forte expansion clonale ou une fibrose médullaire ont une moelle osseuse hypoxique.

Par exemple, l'HGF est une cytokine dont la production est en partie régulée par l'hypoxie. L'ARNm de l'HGF est stabilisé en condition d'hypoxie. De même, son récepteur (c-Met) est lui aussi stabilisé. L'hypoxie est également connue pour induire l'activation de la voie Jak2/Stat5 ou encore la production d'IL-8. Stat5 peut en retour venir stabiliser HIF1 α . De nombreuses questions sont à aborder concernant le lien possible entre les SMP et l'hypoxie. Par exemple, il serait intéressant de voir si l'hypoxie influence la survie et la prolifération des clones *JAK2V617F*, ou encore sur l'expression des récepteurs aux cytokines.

En conclusion, ce travail de thèse ouvre des perspectives en terme d'outil diagnostique avec les PCR quantitative allèle spécifique de *JAK2V617F* sur ADNc ainsi que des perspectives thérapeutiques avec l'utilisation d'inhibiteur de c-Met en combinaison avec des inhibiteurs de Jak2 afin de lutter contre l'expansion clonale. De plus, ce travail a permis de mieux comprendre la relation entre Mpl et Jak2 et le rôle des cytokines dans la pathogénèse des SMP.

ANNEXE

E-Letter in Blood : comment on Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2012;119:3219-3225

Inflammation and clone evolution in myeloproliferative neoplasms: Interest of combining drugs that target key cytokines with different signaling pathways

Sylvie Hermouet, Associate Professor, Claire Leveau, Mathias Vilaine

Inserm UMR892/CNRS UMR6299

Recent attention has focused on the role played by chronic inflammation in common complications of myeloproliferative neoplasms (MPNs) (1). Inflammation induces cytokines that stimulate myelopoiesis, and chronic stimulation increases the risk of genetic mutation, hereby facilitating the emergence of clonal, malignant myelopoiesis. Whether the excess of cytokines in MPNs derives mostly from non-clonal (stromal, endothelial) cells or from clonal myeloid progenitors is debated. Both overproduce interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-11, TNF- α and hepatocyte growth factor (HGF); the proportion of cytokines of non-clonal vs clonal origin likely varies among patients and MPN subtypes (2-5). Moreover, the production of HGF and IL-11 is independent of JAK2V617F (5). Cytokine excess may initiate emergence of the MPN clone and likely fosters clonal expansion for many patients, thus the chance to eradicate clonal cells by targeting inflammation-related cytokines early in the course of disease is real. Already interferon- α , which represses IL-11 and c-Met, the receptor for HGF, suppresses JAK2V617F-mutated clones. Greater sensitivity to treatment can be obtained by combining drugs that target cytokines with different signaling pathways. We tested c-Met/ALK inhibitor PF-2341066 alone and associated with anti-Jak1/2 inhibitor INCB018424 (ruxolitinib) on JAK2V617F+/+ UKE-1 cells. A weak inhibition was observed when molecules were tested separately at >1000 nM but when 5 nM PF-2341066 was used together with 200 nM INCB018424, >50% growth inhibition was observed. Thus, therapeutic protocols combining drugs that target cytokines at different levels, i.e. production (interferon- α , HDAC, statins), receptors or signaling pathways (c-Met or Jak1/2 inhibitors), should allow to eradicate MPN clonal cells. Since each patient differs in term of cytokines, Jak1/2 expression, and driving or/and passenger mutations potentially able to alter response to cytokines or/and treatment, efficient combination therapies in MPN will be personalized, adapted to the patient's cytokine and mutation profile. The technology (cytokine profiling, next-generation sequencing) and many of the drugs are already available.

References.

1. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2012 Feb 7. [Epub ahead of print]
2. Corre I, Pineau D, Hermouet S. 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. *Exp Hematol*. 1999; 27(1): 28-36.
3. Corre-Buscail I, Pineau D, Boissinot M, Hermouet S. Erythropoietin- independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukins 11 and 8. *Exp Hematol*. 2005; 33(11): 1299-1308.
4. Le Bousse-Kerdilès MC, Martyr MC, Samson M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur Cytokine Netw*. 2008;19(2):69-80.
5. Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M, Jacques Y, Corre I, Hermouet S. Anti-inflammatory hepatocyte growth factor and interleukin-11 are overexpressed in Polycythemia Vera and contribute to the growth of mutated erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene*. 2011;30(8):990-1001.

Claire Leveau

Inserm UMR892/CNRS UMR6299 Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
Institut de Recherche Thérapeutique - Université de Nantes 8 quai Moncousu 44007 Nantes,
France

Mathias Vilaine

Inserm UMR892/CNRS UMR6299 Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
Institut de Recherche Thérapeutique - Université de Nantes 8 quai Moncousu 44007 Nantes,
France

Sylvie Hermouet

Inserm UMR892/CNRS UMR6299 Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers
Institut de Recherche Thérapeutique - Université de Nantes 8 quai Moncousu 44007 Nantes,
France

Acknowledgements: We thank Pfizer for providing PF-2341066 and are grateful to Novartis and Incyte for providing INCB018424. This work was supported by a grant from La Ligue Nationale contre le Cancer (Comités Départementaux de Mayenne, Charente, et Vendée) to Sylvie Hermouet.

Correspondence: Sylvie Hermouet, Inserm UMR892/CNRS UMR6299, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche Thérapeutique - Université de Nantes, 8 quai Moncousu, 44007 Nantes, France. E-mail: sylvie.hermouet@univ-nantes.fr

	Sains	
	Femmes	Hommes
Leucocytes ($\times 10^9/\text{L}$)	4 – 10	4 – 10
Hématies ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4.1 – 5.1	4.5 – 5.9
Hémoglobine (g/dL)	12 – 16	13.5 – 17.5
Hématocrite (L/L)	36 – 46	41 – 52
VGM (fL)	80 – 98	80 – 98
Plaquettes ($\times 10^9/\text{L}$)	150 – 400	150 – 400
Lymphocytes ($\times 10^9/\text{L}$)	2.0 – 4.5	1.5 – 3.5
Monocytes ($\times 10^9/\text{L}$)	3 – 9	0.15 – 0.8

Table: Valeurs de l'hémogramme normal en fonction du sexe.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. (1976). Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. N Engl J Med;295(17):913-6.
- Addison W. (1841). On the colourless corpuscles and on the molecules and cyto blasts in the blood. London Med Gaz;30:144-152.
- Akashi K, Harada M, Shibuya T, Eto T, Takamatsu Y, Teshima T, Niho Y. (1991). Effects of interleukin-4 and interleukin-6 on the proliferation of CD34+ and CD34- blasts from acute myelogenous leukemia. Blood;78(1):197-204.
- Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. (1996). Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. Blood;87(6):2162-70.
- Andrikovics H, Nahajevszky S, Koszarska M, Meggyesi N, Bors A, Halm G, Lueff S, Lovas N, Matrai Z, Csomor J, Rasonyi R, Egyed M, Varkonyi J, Mikala G, Sipos A, Kozma A, Adam E, Fekete S, Masszi T, Tordai A. (2010). JAK2 46/1 haplotype analysis in myeloproliferative neoplasms and acute myeloid leukemia. Leukemia;24(10):1809-13.
- Argetsinger LS, Kouadio JL, Steen H, Stensballe A, Jensen ON, Carter-Su C. (2004). Autophosphorylation of JAK2 on tyrosines 221 and 570 regulates its activity. Mol Cell Biol;24(11):4955-67.
- Argetsinger LS, Stuckey JA, Robertson SA, Koleva RI, Cline JM, Marto JA, Myers MG Jr, Carter-Su C. (2010). Tyrosines 868, 966, and 972 in the kinase domain of JAK2 are autophosphorylated and required for maximal JAK2 kinase activity. Mol Endocrinol;24(5):1062-76.
- Bacon CM, Tortolani PJ, Shimosaka A, Rees RC, Longo DL, O'Shea JJ. (1995). Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. FEBS Lett;370(1-2):63-8.
- Banu N, Wang JF, Deng B, Groopman JE, Avraham H. (1995). Modulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin: the c-Mpl ligand. Blood;86(4):1331-8.
- Barillé S, Collette M, Thabard W, Bleunven C, Bataille R, Amiot M. (2000). Soluble IL-6R alpha upregulated IL-6, MMP-1 and MMP-2 secretion in bone marrow stromal cells. Cytokine;12(9):1426-9.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S, et al. (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. Cell;77(7):1117-24.
- 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 JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet;365(9464):1054-61.
- Bazan JF. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A;87(18):6934-8.
- Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R, Wheatley K, Buck G, Harrison CN, Green AR. (2008). MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. Blood;112(1):141-9.
- Beer PA, Delhommeau F, LeCouédic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D, Kusec R, McMullin MF, Harrison CN, Vannucchi AM, Vainchenker W, Green AR. (2010a). Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. Blood;115(14):2891-900.
- Beer PA, Ortmann CA, Campbell PJ, Green AR. (2010b). Independently acquired biallelic JAK2 mutations are present in a minority of patients with essential thrombocythemia. Blood;116(6):1013-4.
- Bellanné-Chantelot C, Jego P, Lionne-Huyghe P, Tulliez M, Najman A; French group on myeloproliferative disorders. (2008). The JAK2(V617F) mutation may be present several years before the occurrence of overt myeloproliferative disorders. Leukemia;22(2):450-1.
- Beru N, McDonald J, Lacombe C, Goldwasser E. (1986). Expression of the erythropoietin gene. Mol Cell Biol;6(7):2571-5.
- Beurlet S, Krief P, Sansonetti A, Briend-Marchal A, Kiladjian JJ, Padua RA, Chomienne C, Cassinat B. (2011). Identification of JAK2 mutations in canine primary polycythemia. Exp Hematol;39(5):542-5.
- Beyne-Rauzy O, Recher C, Dastugue N, Demur C, Pottier G, Laurent G, Sabatier L, Mansat-De Mas V. Tumor necrosis factor alpha induces senescence and chromosomal instability in human leukemic cells. (2004). Oncogene;23(45):7507-16.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. (2003). Met, metastasis, motility and more. Nat Rev Mol Cell Biol;4(12):915-25.

- Bizzozzero G. (1882). Ueber einer neuen formbestandtheil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und der blutgerinnung. Virchows Arch fur pathol Anat und Physiol.;90:261-332.
- Bonnet D, Dick JE. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med.;3(7):730-7.
- Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science;251(4995):802-4.
- Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. (2003). Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. Science;300(5628):2101-4.
- Bradley TR and Metcalf D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust J Exp Biol Med Sci.;44(3):287-99.
- Broudy VC, Lin NL, Fox N, Taga T, Saito M, Kaushansky K. (1996). Thrombopoietin stimulates colony-forming unit-megakaryocyte proliferation and megakaryocyte maturation independently of cytokines that signal through the gp130 receptor subunit. Blood;88(6):2026-32.
- Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K. (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. Blood;85(7):1719-26.
- Broudy VC, Lin NL, Sabath DF, Papayannopoulou T, Kaushansky K. (1997). Human platelets display high-affinity receptors for thrombopoietin. Blood;89(6):1896-904.
- Brown WH. (1913). The Histogenesis of blood platelets. J Exp Med.;18(3):278-86.
- Budarf M, Huebner K, Emanuel B, Croce CM, Copeland NG, Jenkins NA, D'Andrea AD. (1990). Assignment of the erythropoietin receptor (EPOR) gene to mouse chromosome 9 and human chromosome 19. Genomics;8(3):575-8.
- Bunn HF, Poyton RO. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. Physiol Rev.;76(3):839-85.
- Butcher C, D'Andrea RJ. (2000). Molecular aspects of polycythemia vera (review). Int J Mol Med.;6(3):243-52.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature;425(6960):841-6.
- Chaligné R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couédic JP, Fava F, Mazurier F, Godin I, Maloum K, Larbret F, Lécuse Y, Vainchenker W, Giraudier S. (2007). Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. Blood;110(10):3735-43.
- Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, Kiladjian JJ, Socié G, Bordessoule D, Le Bousse-Kerdilès MC, Vainchenker W, Giraudier S. (2008). New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. Leukemia;22(8):1557-66.
- Chérel M, Sorel M, Lebeau B, Dubois S, Moreau JF, Bataille R, Minvielle S, Jacques Y. (1995). Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11. Blood;86(7):2534-40.
- Chiba S, Takahashi T, Takeshita K, Minowada J, Yazaki Y, Ruddle FH, Hirai H. (1997). Selective expression of mRNA coding for the truncated form of erythropoietin receptor in hematopoietic cells and its decrease in patients with polycythemia vera. Blood;90(1):97-104.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. Blood;82(7):2031-7.
- Clausen PA, Athanasiou M, Chen Z, Dunn KJ, Zhang Q, Lautenberger JA, Mavrothalassitis G, Blair DG. (1997). ETS-1 induces increased expression of erythroid markers in the pluripotent erythroleukemic cell lines K562 and HEL. Leukemia;11(8):1224-33.
- Coers J, Ranft C, Skoda RC. (2004). A truncated isoform of c-Mpl with an essential C-terminal peptide targets the full-length receptor for degradation. J Biol Chem.;279(35):36397-404.
- Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. Cell;109(4):523-35.

- Constantinescu SN, Ghaffari S, Lodish HF. (1999). The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. Trends Endocrinol Metab.;10(1):18-23.
- Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF. (2001). The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. Mol Cell.;7(2):377-85.
- Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. (1984). Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. Nature;311(5981):29-33.
- Corash L. and Levin J. (1990). The relationship between megakaryocyte ploidy and platelet volume in normal and thrombocytopenic C3H mice. Exp Hematol.;18(9):985-9.
- Corre-Buscail I, Pineau D, Boissinot M, Hermouet S. (2005). Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukin-11 and interleukin-8. Exp Hematol.;33(11):1299-308.
- Cross NC. (2011). Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. Hematology Am Soc Hematol Educ Program;2011:208-14.
- Dahlen DD, Broudy VC, Drachman JG. (2003). Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs. Blood;102(1):102-8.
- Dalal I, Arpaia E, Dadi H, Kulkarni S, Squire J, Roifman CM. (1998). Cloning and characterization of the human homolog of mouse Jak2. Blood;91(3):844-51.
- Dameshek W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood;6(4):372-5.
- Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, Kouzarides T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. Nature;461(7265):819-22.
- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. (2006). The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev.;20(3):161-71.
- De Gaetano G. (2001). A new blood corpuscle: an impossible interview with Giulio Bizzozero. Thromb Haemost.;86:973-979.
- De Haan G, Dontje B, Engel C, Loeffler M, Nijhof W. (1995). In vivo effects of interleukin-11 and stem cell factor in combination with erythropoietin in the regulation of erythropoiesis. Br J Haematol.;90(4):783-90.
- De Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, Moore MW. (1996). Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. J Exp Med.;183(2):651-6.
- De Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, et al. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. Nature;369(6481):533-8.
- De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. Science;255(5042):306-12.
- Dean M, Park M, Le Beau MM, Robins TS, Diaz MO, Rowley JD, Blair DG, Vande Woude GF. (1985). The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. Nature;318(6044):385-8.
- Debili N, Wendling F, Cosman D, Titeux M, Florindo C, Dusanter-Fourt I, Schooley K, Methia N, Charon M, Nador R, et al. (1995). The Mpl receptor is expressed in the megakaryocytic lineage from late progenitors to platelets. Blood;85(2):391-401.
- Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, Vainchenker W. (1995). The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. Blood;86(7):2516-25.
- Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Massé A, Godin I, Le Couedic JP, Debili N, Saulnier P, Casadevall N, Vainchenker W, Giraudier S. (2007). Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. Blood;109(1):71-7.
- Desterke C, Bilhou-Nabéra C, Guerton B, Martinaud C, Tonetti C, Clay D, Guglielmelli P, Vannucchi A, Bordessoule D, Hasselbalch H, Dupriez B, Benzoubir N, Bourgeade MF, Pierre-Louis O, Lazar V, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A, Gisslinger H, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC; French Intergroup of Myeloproliferative Disorders.; French INSERM; European EUMNET Networks on Myelofibrosis. FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis. (2011). Cancer Res.;71(8):2901-15.

Dittrich E, Haft CR, Muys L, Heinrich PC, Graeve L. (1996). A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. J Biol Chem; **271**(10):5487-94.

Dobo I, Boiret N, Lippert E, Girodon F, Mossuz P, Donnard M, Campos L, Pineau D, Bascans E, Praloran V, Hermouet S. (2004). A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. Haematologica; **89**(10):1207-12.

Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. (1995). The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. J Biol Chem; **270**(10):4979-82.

Drachman JG, Kaushansky K. (1997). Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. Proc Natl Acad Sci U S A; **94**(6):2350-5.

Du X, Williams DA. (1997). Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. Blood; **89**(11):3897-908.

Dybedal I, Bryder D, Fossum A, Rusten LS, Jacobsen SE. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. (2001). Blood; **98**(6):1782-91.

Emadi S, Clay D, Desterke C, Guerton B, Maquarre E, Charpentier A, Jasmin C, Le Bousse-Kerdilès MC; French INSERM Research Network on MMM. (2005). IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. Blood; **105**(2):464-73.

Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature; **387**(6636):921-4.

Engel E. (1980). [A new genetic concept: the uniparental disomy and its potential effect, the isodisomy (author's transl)]. J Genet Hum; **28**(1):11-22.

Epstein E, Goedel A. (1934). Haemorrhagische thrombocythaemie bei vascularer schrumpfmilz. Vich Arch (Pathol Anat); **292**:233.

Erikson J, Griffin CA, ar-Rushdi A, Valtieri M, Hoxie J, Finan J, Emanuel BS, Rovera G, Nowell PC, Croce CM. (1986). Heterogeneity of chromosome 22 breakpoint in Philadelphia-positive (Ph+) acute lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A; **83**(6):1807-11.

Feener EP, Rosario F, Dunn SL, Stancheva Z, Myers MG Jr. (2004). Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. Mol Cell Biol; **24**(11):4968-78.

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**(1-2):108-15.

Ferguson-Smith AC, Chen YF, Newman MS, May LT, Sehgal PB, Ruddle FH. (1988). Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. Genomics; **2**(3):203-8.

Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. (1981). Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. Blood; **58**(5):916-9.

Fiedler W, Henke RP, Ergün S, Schumacher U, Gehling UM, Vohwinkel G, Kilic N, Hossfeld DK. (2000). Derivation of a new hematopoietic cell line with endothelial features from a patient with transformed myeloproliferative syndrome: a case report. Cancer; **88**(2):344-51.

Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S, Vasudevan KB, LaTocha DH, Yang F, Press RD, Loriaux MM, Pahl HL, Silver RT, Agarwal A, O'Hare T, Druker BJ, Bagby GC, Deininger MW. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. (2011). Blood; **118**(24):6392-8.

Flint-Ashtamker G, Eisen-Lev R, Cohen J, Jun-shen Huang L, Neumann D. (2002). Amino acid residues 268-276 of the erythropoietin receptor contain an endocytosis motif and are required for erythropoietin-mediated proliferation. FEBS Lett; **518**(1-3):189-94.

Freedman DA, Wu L, Levine AJ. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. Cell Mol Life Sci; **55**(1):96-107.

Funakoshi-Tago M, Pelletier S, Matsuda T, Parganas E, Ihle JN. (2006). Receptor specific downregulation of cytokine

signaling by autophosphorylation in the FERM domain of Jak2. EMBO J.;25(20):4763-72.

Funakoshi-Tago M, Tago K, Kasahara T, Parganas E, Ihle JN. (2008). Negative regulation of Jak2 by its autophosphorylation at tyrosine 913 via the Epo signaling pathway. Cell Signal.;20(11):1995-2001.

Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. (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):34473-9.

Geddis AE. (2010). Megakaryopoiesis. Semin Hematol.;47(3):212-9.

Geissler K, Ohler L, Födinger 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(6):1967-72.

Ghilardi N, Skoda RC. (1999). A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA. Blood;94(4):1480-2.

Girardot M, Pecquet C, Boukour S, Knoops L, Ferrant A, Vainchenker W, Giraudier S, Constantinescu SN. (2010). miR-28 is a thrombopoietin receptor targeting microRNA detected in a fraction of myeloproliferative neoplasm patient platelets. Blood;116(3):437-45.

Giron F, Schaeffer C, Cleyrat C, Mounier M, Lafont I, Santos FD, Duval 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 hydroxyurea therapy. Haematologica;93(11):1723-7.

Gnanasambandan K, Magis A, Sayeski PP. (2010). The constitutive activation of Jak2-V617F is mediated by a π stacking mechanism involving phenylalanines 595 and 617. Biochemistry;49(46):9972-84.

Goette NP, Lev PR, Heller PG, Glembotsky AC, Chazarreta CD, Salim JP, Molinas FC, Marta RF. (2010). Abnormal regulation of soluble and anchored IL-6 receptor in monocytes from patients with essential thrombocythemia. Exp Hematol.;38(10):868-876.

Gondek LP, Dunbar AJ, Szpurka H, McDevitt MA, Maciejewski JP. (2007). SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD. PLoS One;2(11):e1225.

Graf D, Haselow K, Müns I, Bode JG, Häussinger D. Caspase-mediated cleavage of the signal-transducing IL-6 receptor subunit gp130. (2008). Arch Biochem Biophys;477(2):330-8.

Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ, Moore MW. (1994). Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. Science;265(5177):1445-7.

Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. (2006). Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. Biochem Pharmacol.;72(11):1538-46.

Haan S, Wüller S, Kaczor J, Rolvering C, Nöcker T, Behrmann I, Haan C. (2009). SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. Oncogene;28(34):3069-80.

Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W. (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. Proc Natl Acad Sci U S A;89(23):11574-8.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J.;374(Pt 1):1-20.

Hermouet S, Corre I, Lippert E. Interleukin-8 and other agonists of Gi2 proteins: autocrine paracrine growth factors for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors. (2000). Leuk Lymphoma;38(1-2):39-48.

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 polycythaemia vera. Cytokine;20(4):178-83.

Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. Cell;63(6):1149-57.

Hilbert DM, Kopf M, Mock BA, Köhler G, Rudikoff S. (1995). Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. J Exp Med;182(1):243-8.

- Hilkens CM, Is'harc H, Lillemeier BF, Strobl B, Bates PA, Behrmann I, Kerr IM. (2001). A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. FEBS Lett.;505(1):87-91.
- Hilton DJ, Watowich SS, Katz L, Lodish HF. (1996). Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. J Biol Chem.;271(9):4699-708.
- Hilton DJ, Watowich SS, Murray PJ, Lodish HF. (1995). Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A;92(1):190-4.
- Hino M, Tojo A, Misawa Y, Morii H, Takaku F, Shibuya M. (1991). Unregulated expression of the erythropoietin receptor gene caused by insertion of spleen focus-forming virus long terminal repeat in a murine erythroleukemia cell line. Mol Cell Biol.;11(11):5527-33.
- Hitchcock IS, Chen MM, King JR, Kaushansky K. (2008). YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. Blood;112(6):2222-31.
- Hjertner O, Torgersen ML, Seidel C, Hjorth-Hansen H, Waage A, Børset M, Sundan A. (1999). Hepatocyte growth factor (HGF) induces interleukin-11 secretion from osteoblasts: a possible role for HGF in myeloma-associated osteolytic bone disease. Blood;94(11):3883-8.
- Ho CL, Lasho TL, Butterfield JH, Tefferi A. (2007). Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders. Leuk Res.;31(10):1389-92.
- Horikawa Y, Matsumura I, Hashimoto K, Shiraga M, Kosugi S, Tadokoro S, Kato T, Miyazaki H, Tomiyama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kanakura Y. (1997). Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. Blood;90(10):4031-8.
- Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, Miyamoto H, Tanaka Y, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, Yamamoto N. (1994). Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. Eur J Immunol.;24(8):1945-8.
- Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. Mol Cell;8(6):1327-38.
- Imai T, Koike K, Kubo T, Kikuchi T, Amano Y, Takagi M, Okumura N, Nakahata T. (1991). Interleukin-6 supports human megakaryocytic proliferation and differentiation in vitro. Blood;78(8):1969-74.
- Ishida-Takahashi R, Rosario F, Gong Y, Kopp K, Stancheva Z, Chen X, Feener EP, Myers MG Jr. (2006). Phosphorylation of Jak2 on Ser(523) inhibits Jak2-dependent leptin receptor signaling. Mol Cell Biol.;26(11):4063-73.
- Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. J Cell Biol.;147(6):1299-312.
- Ivanovic Z, Hermitte F, Brunet de la Grange P, Dazey B, Belloc F, Lacombe F, Vezon G, Praloran V. (2004). Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O2 concentration (3%). Stem Cells;22(5):716-24.
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature;313(6005):806-10.
- Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak L. (1957). Role of the kidney in erythropoiesis. Nature;179(4560):633-4.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon 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(7037):1144-8.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon 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(7037):1144-8.
- Janssen HL, Garcia-Pagan JC, Elias E, Mentha G, Hadengue A, Valla DC; European Group for the Study of Vascular Disorders of the Liver. (2003). Budd-Chiari syndrome: a review by an expert panel. J Hepatol.;38(3):364-71.
- Jeffers M, Rong S, Vande Woude GF. (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. Mol Cell Biol.;16(3):1115-25.

- Jenkins BJ, Roberts AW, Najdovska M, Grail D, Ernst M. The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis. (2005). Blood;105(9):3512-20.
- Jones AV, Campbell PJ, Beer PA, Schnittger S, Vannucchi AM, Zoi K, Percy MJ, McMullin MF, Scott LM, Tapper W, Silver RT, Oscier D, Harrison CN, Grallert H, Kisialiou A, Strike P, Chase AJ, Green AR, Cross NC. (2010). The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. Blood;115(22):4517-23.
- 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(4):446-9.
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulous D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC. (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. Blood;106(6):2162
- Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG. (1990). Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. Blood;76(1):31-5.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE Jr, Shivdasani RA, von Andrian UH. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. Science;317(5845):1767-70.
- Kai T and Spradling A. (2003). An empty Drosophila stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. Proc Natl Acad Sci U S A;100(8):4633-8.
- Karow J, Hudson KR, Hall MA, Vernallis AB, Taylor JA, Gossler A, Heath JK. (1996). Mediation of interleukin-11-dependent biological responses by a soluble form of the interleukin-11 receptor. Biochem J;318(Pt 2):489-95.
- Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H. (2003). Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. Cancer Metastasis Rev;22(2-3):223-36.
- Kaushansky K, Karplus PA. (1993). Hematopoietic growth factors: understanding functional diversity in structural terms. Blood;82(11):3229-40.
- Kaushansky K. (2003). Thrombopoietin: accumulating evidence for an important biological effect on the hematopoietic stem cell. Ann N Y Acad Sci;996:39-43.
- Kaushansky K. (2009). Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling. J Thromb Haemost;7 Suppl 1:235-8.
- Kawamata N, Ogawa S, Yamamoto G, Lehmann S, Levine RL, Pikman Y, Nannya Y, Sanada M, Miller CW, Gilliland DG, Koeffler HP. (2008). Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. Exp Hematol;36(11):1471-9.
- Kawasaki H, Nakano T, Kohdera U, Kobayashi Y. (2001). Hypersensitivity of megakaryocyte progenitors to thrombopoietin in essential thrombocythemia. Am J Hematol;68(3):194-7.
- Kelemen E, Cserhati I, Tanos B. (1958). Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera. Acta Haematol;20(6):350-5.
- Kelley LL, Koury MJ, Bondurant MC, Koury ST, Sawyer ST, Wickrema A. (1993). Survival or death of individual proerythroblasts results from differing erythropoietin sensitivities: a mechanism for controlled rates of erythrocyte production. Blood;82(8):2340-52.
- Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FW, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, Cazals-Hatem D, Plessier A, Garcia-Pagan JC, Darwish Murad S, Raffa S, Janssen HL, Gardin C, Cereja S, Tonetti C, Giraudier S, Condat B, Casadevall N, Fenaux P, Valla DC. (2008). The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchic vein thrombosis: a report on 241 cases. Blood;111(10):4922-9.
- 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(4):455-9.
- Kirby SL, Cook DN, Walton W, Smithies O. (1996). Proliferation of multipotent hematopoietic cells controlled by a truncated erythropoietin receptor transgene. Proc Natl Acad Sci U S A;93(18):9402-7.
- Kirito K, Watanabe T, Sawada K, Endo H, Ozawa K, Komatsu N. (2002). Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. J Biol Chem;277(10):8329-37.

- Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A, Ohki M. (2001). Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. EMBO J.;20(24):7184-96.
- Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, Gisslinger B, Schalling M, Bagienski K, Olcaydu D, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Jäger R, Pieri L, Guglielmelli P, Iacobucci I, Martinelli G, Cazzola M, Vannucchi AM, Gisslinger H, Kralovics R. (2011). Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. Blood.;118(1):167-76.
- Kotzot D. (2001). Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. J Med Genet.;38(8):497-507.
- Kouroupi E, Kiladjian JJ, Chomienne C, Dosquet C, Bellucci S, Valla D, Cassinat B. (2011). The JAK2 46/1 haplotype in splanchic vein thrombosis. Blood.;117(21):5777-8.
- Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, Skoda RC. (2003). Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. Blood.;102(5):1869-71.
- Kralovics R, Indrak K, Stopka T, Berman BW, Prchal JF, Prchal JT. (1997). Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemia. Blood.;90(5):2057-61.
- 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 JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med.;352(17):1779-90.
- Kralovics R, Stockton DW, Prchal JT. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. (2003). Blood.;102(10):3793-6.
- Kralovics R. (2008). Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. Leukemia.;22(10):1841-8.
- Krantz SB. (1991). Erythropoietin. Blood.;77(3):419-34.
- Krause DS, Van Etten RA. (2007). Right on target: eradicating leukemic stem cells. Trends Mol Med.;13(11):470-81.
- Lacombe C, Mayeux P. (1998). Biology of erythropoietin. Haematologica.;83(8):724-32.
- 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(5):1652-60.
- 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(14):3018-23.
- Landrette SF, Madera D, He F, Castilla LH. (2011). The transcription factor PlagL2 activates Mpl transcription and signaling in hematopoietic progenitor and leukemia cells. Leukemia.;25(4):655-62.
- Laterveer L, Lindley IJ, Hamilton MS, Willemze R, Fibbe WE. (1995). Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. Blood.;85(8):2269-75.
- Laterveer L, Lindley IJ, Heemskerk DP, Camps JA, Pauwels EK, Willemze R, Fibbe WE. (1996). Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. Blood.;87(2):781-8.
- Laubach JP, Fu P, Jiang X, Salter KH, Potti A, Arcasoy MO. (2009). Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. Exp Hematol.;37(12):1411-22.
- Law ML, Cai GY, Lin FK, Wei Q, Huang SZ, Hartz JH, Morse H, Lin CH, Jones C, Kao FT. (1986). Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. Proc Natl Acad Sci U S A.;83(18):6920-4.
- Le Bousse-Kerdilès MC, Chevillard S, Charpentier A, Romquin N, Clay D, Smadja-Joffe F, Praloran V, Dupriez B, Demory JL, Jasmin C, Martyré MC. (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. Blood.;88(12):4534-46.
- 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(10):437-44.
- Le Bousse-Kerdilès MC, Souyri M, Smadja-Joffe F, Praloran V, Jasmin C, Ziltener HJ. (1992). Enhanced hematopoietic growth factor production in an experimental myeloproliferative syndrome. Blood.;79(12):3179-87.

Lee TS, Ma W, Zhang X, Kantarjian H, Albitar M. (2009). Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. BMC Struct Biol;**9**:58.

Leonard WJ, O'Shea JJ. (1998). Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol;**16**:293-322.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell;**7**(4):387-97.

Li J, Sabath DF, Kuter DJ. (2000). Cloning and functional characterization of a novel c-mpl variant expressed in human CD34 cells and platelets. Cytokine;**12**(7):835-44.

Liboi E, Carroll M, D'Andrea AD, Mathey-Prevot B. (1993). Erythropoietin receptor signals both proliferation and erythroid-specific differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A;**90**(23):11351-5.

Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, Kroemer RT. (2001). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. Protein Eng;**14**(1):27-37.

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**(6):1865-7.

Liu K, Kralovics R, Rudzki Z, Grabowska B, Buser AS, Olcaydu D, Gisslinger H, Tiedt R, Frank P, Okoń K, van der Maas AP, Skoda RC. (2008). A de novo splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythemia in a Polish family. Haematologica;**93**(5):706-14.

Liu K, Martini M, Rocca B, Amos CI, Teofili L, Giona F, Ding J, Komatsu H, Larocca LM, Skoda RC. (2009). Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. Haematologica;**94**(10):1368-74.

Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith MA. (1998). JAK/STAT signaling by cytokine receptors. Curr Opin Immunol;**10**(3):271-8.
Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. (1999). Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. Science;**283**(5404):987-90.

Lodish HF, Hilton D, Longmore G, Watowich SS, Yoshimura A. (1992). The erythropoietin receptor: dimerization, activation, and tumorigenesis. Cold Spring Harb Symp Quant Biol;**57**:95-106.

Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, et al. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. Nature;**369**(6481):565-8.

Longmore GD, Pharr P, Lodish HF. (1992). Mutation in murine erythropoietin receptor induces erythropoietin-independent erythroid proliferation in vitro, polycythemia in vivo. Leukemia;**6 Suppl 3**:130S-134S.

Lundberg P, Kubovcakova L, Takizawa H, Hao-Shen H, Manz MG, Skoda RC. (2011). JAK2-V617F Expressing Stem Cells Display a Competitive Advantage At Low Limiting Dilution and Are Capable of Initiating MPN Phenotype. **Oral Session: 634; Abstract 615.** Myeloproliferative Syndromes: Biological Advances I. 53rd American Society of Hematology annual meeting.

Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Isaac S, Seto E, Hiebert SW. (2000). A mechanism of repression by acute myeloid leukemia-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. J Biol Chem;**275**(1):651-6.

Ma W, Kantarjian H, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh CH, O'Brien S, Giles F, Bruey JM, Albitar M. (2010). JAK2 exon 14 deletion in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. PLoS One;**5**(8):e12165.

Ma W, Kantarjian H, Zhang X, Yeh CH, Zhang ZJ, Verstovsek S, Albitar M. (2009). Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. J Mol Diagn;**11**(1):49-53.

Ma W, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh CH, Uyeji J, Albitar M. (2011). MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. Diagn Mol Pathol;**20**(1):34-9.

Manshoury T, Estrov Z, Quintás-Cardama A, Burger J, Zhang Y, Livun A, Knez L, Harris D, Creighton CJ, Kantarjian HM, Verstovsek S. Bone marrow stroma-secreted cytokines protect JAK2(V617F)-mutated cells from the effects of a JAK2 inhibitor. (2011). Cancer Res;**71**(11):3831-40.

- Maouche L, Tournamille C, Hattab C, Boffa G, Cartron JP, Chrétien S. (1991). Cloning of the gene encoding the human erythropoietin receptor. Blood;**78(10)**:2557-63.
- Marinou I, Walters K, Winfield J, Bax DE, Wilson AG. (2010). A gain of function polymorphism in the interleukin 6 receptor influences RA susceptibility. Ann Rheum Dis;**69(6)**:1191-4.
- Marta R, Goette N, Lev P, Heller P, Kornblihtt L, Vassallú P, Glembotsky A, Pirola C, Molinas F. (2004). Increased levels of plasma interleukin-6 soluble receptor in patients with essential thrombocythemia. Haematologica;**89(6)**:657-63.
- Matsuda T, Feng J, Witthuhn BA, Sekine Y, Ihle JN. (2004). Determination of the transphosphorylation sites of Jak2 kinase. Biochem Biophys Res Commun;**325(2)**:586-94.
- Matsumura I, Ishikawa J, Nakajima K, Oritani K, Tomiyama Y, Miyagawa J, Kato T, Miyazaki H, Matsuzawa Y, Kanakura Y. (1997). Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. Mol Cell Biol;**17(5)**:2933-43.
- Mattia G, Vulcano F, Milazzo L, Barca A, Macioce G, Giampaolo A, Hassan HJ. (2002). Different ploidy levels of megakaryocytes generated from peripheral or cord blood CD34+ cells are correlated with different levels of platelet release. Blood;**99(3)**:888-97.
- Mazurkiewicz-Munoz AM, Argetsinger LS, Kouadio JL, Stensballe A, Jensen ON, Cline JM, Carter-Su C. (2006). Phosphorylation of JAK2 at serine 523: a negative regulator of JAK2 that is stimulated by growth hormone and epidermal growth factor. Mol Cell Biol;**26(11)**:4052-62.
- McMullin MF. (2009). Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. Hematology Am Soc Hematol Educ Program;**2009**:629-35.
- Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE, Schuh A. (2012). Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. N Engl J Med;**366(10)**:967-9.
- Mignotte V, Deveaux S, Filipe A. (1996). Transcriptional regulation in megakaryocytes: the thrombopoietin receptor gene as a model. Stem Cells;**14 Suppl 1**:232-9.
- Mignotte V, Vigon I, Boucher de Crèvecœur E, Roméo PH, Lemarchandel V, Chrétien S. (1994). Structure and transcription of the human c-mpl gene (MPL). Genomics;**20(1)**:5-12.
- Mittelman M, Gardyn J, Carmel M, Malovani H, Barak Y, Nir U. (1996). Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes. Leuk Res;**20(6)**:459-66.
- Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN. (1991). Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. Mol Cell Biol;**11(10)**:4895-902.
- Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. (2001). Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. J Biol Chem;**276(4)**:2494-502.
- Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. (1998). Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. N Engl J Med;**338(9)**:572-80.
- Moliterno AR, Spivak JL. (1999). Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. Blood;**94(8)**:2555-61.
- Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. (2004). Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A;**101(31)**:11444-7.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. Blood;**107(5)**:1878-87.
- Müllberg J, Dittrich E, Graeve L, Gerhartz C, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Heinrich PC, Rose-John S. (1993). Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. FEBS Lett;**332(1-2)**:174-8.
- Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. (1993). The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. Eur J Immunol;**23(2)**:473-80.
- Müller-Newen G, Küster A, Hemmann U, Keul R, Horsten U, Martens A, Graeve L, Wijdenes J, Heinrich PC. (1998). Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. J Immunol;**161(11)**:6347-55.

- Murase T, Hotta T, Ohno R, Saito H. Predominant suppression of neutrophil colony growth by recombinant human tumor necrosis factor. (1987). Proc Soc Exp Biol Med.;186(2):188-91.
- 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(3):159-63.
- Nahajevszky S, Andrikovics H, Batai A, Adam E, Bors A, Csomor J, Gopcsa L, Koszarska M, Kozma A, Lovas N, Lueff S, Matrai Z, Meggyesi N, Sinko J, Sipos A, Varkonyi A, Fekete S, Tordai A, Masszi T. (2011). The prognostic impact of germline 46/1 haplotype of Janus kinase 2 in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. Haematologica.;96(11):1613-8.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. (1989). Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature.;342(6248):440-3.
- Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H. (1992). A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. Science.;257(5073):1138-41.
- Nakamura Y, Nakauchi H. (1994). A truncated erythropoietin receptor and cell death: a reanalysis. Science.;264(5158):588-9.
- Nakatake M, Monte-Mor B, Debili N, Casadevall N, Ribrag V, Solary E, Vainchenker W, Plo I. (2012). JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. Oncogene.;31(10):1323-33.
- Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. (1993). Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. Blood.;82(4):1120-6.
- Niikawa N, Kajii T. (1984). The origin of mosaic Down syndrome: four cases with chromosome markers. Am J Hum Genet.;36(1):123-30.
- Noguchi CT, Bae KS, Chin K, Wada Y, Schechter AN, Hankins WD. (1991). Cloning of the human erythropoietin receptor gene. Blood.;78(10):2548-56.
- 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(1):32-8.
- O'Brien CA, Manolagas SC. (1997). Isolation and characterization of the human gp130 promoter. Regulation by STATS. J Biol Chem.;272(23):15003-10.
- Ohnishi H, Hosoi K, Yoshino H, Sugiura M, Matsushima S, Watanabe T, Bessho F. (2009). A novel JAK2 splicing mutation in neonatal myeloproliferative disorder accompanying congenital anomalies. Br J Haematol.;145(5):676-8.
- 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(4):450-4.
- Olcaydu D, Rumi E, Harutyunyan A, Passamonti F, Pietra D, Pascutto C, Berg T, Jäger R, Hammond E, Cazzola M, Kralovics R. (2011). The role of the JAK2 GGCC haplotype and the TET2 gene in familial myeloproliferative neoplasms. Haematologica.;96(3):367-74.
- Olcaydu D, Skoda RC, Looser R, Li S, Cazzola M, Pietra D, Passamonti F, Lippert E, Carillo S, Girodon F, Vannucchi A, Reading NS, Prchal JT, Ay C, Pabinger I, Gisslinger H, Kralovics R. (2009). The 'GGCC' haplotype of JAK2 confers susceptibility to JAK2 exon 12 mutation-positive polycythemia vera. Leukemia.;23(10):1924-6.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. Cell.;109 Suppl:S121-31.
- Osler W. Chronic cyanosis, with polycythaemia and enlarged spleen: a new clinical entity. 1903. (2008) Am J Med Sci.;335(6):411-7.
- Osler W. Splenic Polycythaemia with Cyanosis. (1908). Proc R Soc Med.;1(Clin Sect):41-3.
- 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. Br J Haematol.;130(5):709-15.
- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. (2008). Host genetic variation contributes to phenotypic

diversity in myeloproliferative disorders. Blood;111(5):2785-9.

Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A. (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood;108(10):3472-6.

Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. (1987). Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. Proc Natl Acad Sci U S A;84(18):6379-83.

Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? Proc Natl Acad Sci U S A;100 Suppl 1:11842-9.

Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Caramazza D, Siragusa S, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. (2010). MPL mutation effect on JAK2 46/1 haplotype frequency in JAK2V617F-negative myeloproliferative neoplasms. Leukemia;24(4):859-60.

Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, O'Hara RM Jr, Leary AC, Sibley B, Clark SC, Williams DA, et al. (1990). Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. Proc Natl Acad Sci U S A;87(19):7512-6.

Pecquet C, Diaconu CC, Staerk J, Girardot M, Marty C, Royer Y, Defour JP, Dusa A, Besancenot R, Giraudier S, Villeval JL, Knoop L, Courtoy PJ, Vainchenker W, Constantinescu SN. (2012). Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. Blood;119(20):4625-35.

Penta K, Sawyer ST. (1995). Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation, nuclear translocation, and DNA binding of STAT1 and STAT5 in erythroid cells. J Biol Chem;270(52):31282-7.

Peters M, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. (1996). The function of the soluble IL-6 receptor in vivo. Immunol Lett;54(2-3):177-84.

Pietra D, Brisci A, Rumi E, Boggi S, Elena C, Pietrelli A, Bordoni R, Ferrari M, Passamonti F, De Bellis G, Cremonesi L, Cazzola M. (2011). Deep sequencing reveals double mutations in cis of MPL exon 10 in myeloproliferative neoplasms. Haematologica;96(4):607-11.

Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med;3(7):e270.

Pikman Y, Levine RL. (2007). Advances in the molecular characterization of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. Curr Opin Oncol;19(6):628-34.

Plo I, Nakatake M, Malivert L, de Villartay JP, Giraudier S, Villeval JL, Wiesmuller L, Vainchenker W. (2008). JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. Blood;112(4):1402-12.

Pradhan A, Lambert QT, Griner LN, Reuther GW. (2010). Activation of JAK2-V617F by components of heterodimeric cytokine receptors. J Biol Chem;285(22):16651-63.

Prchal JF, Axelrad AA. (1974). Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. N Engl J Med;290(24):1382.

Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. (2006). JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. Leukemia;20(3):471-6.

Quesniaux VF, Clark SC, Turner K, Fagg B. (1992). Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. Blood;80(5):1218-23.

Rafiq S, Frayling TM, Murray A, Hurst A, Stevens K, Weedon MN, Henley W, Ferrucci L, Bandinelli S, Corsi AM, Guralnik JM, Melzer D. (2007). A common variant of the interleukin 6 receptor (IL-6r) gene increases IL-6r and IL-6 levels, without other inflammatory effects. Genes Immun;8(7):552-9.

Raslova H, Roy L, Vourc'h C, Le Couedic JP, Brison O, Metivier D, Feunteun J, Kroemer G, Debili N, Vainchenker W. (2003). Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. Blood;101(2):541-4.

Reuther GW. (2008). JAK2 activation in myeloproliferative neoplasms: a potential role for heterodimeric receptors. Cell Cycle;7(6):714-9.

- Rinaldi CR, Rinaldi P, Alagia A, Gemei M, Esposito N, Formiggini F, Martinelli V, Senyuk V, Nucifora G, Pane F. (2010). Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia. Blood; **116(26)**:6023-6.
- Robertson SA, Koleva RI, Argetsinger LS, Carter-Su C, Marto JA, Feener EP, Myers MG Jr. (2009). Regulation of Jak2 function by phosphorylation of Tyr317 and Tyr637 during cytokine signaling. Mol Cell Biol ; **29(12)**:3367-78.
- Rodriguez C, Grosgeorge J, Nguyen VC, Gaudray P, Theillet C. (1995). Human gp130 transducer chain gene (IL6ST) is localized to chromosome band 5q11 and possesses a pseudogene on chromosome band 17p11. Cytogenet Cell Genet; **70(1-2)**:64-7.
- Rouyez MC, Boucheron C, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I, Porteu F. (1997). Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. Mol Cell Biol; **17(9)**:4991-5000.
- Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. (2005). Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. J Biol Chem; **280(29)**:27251-61.
- Sabath DF, Kaushansky K, Broudy VC. (1999). Deletion of the extracellular membrane-distal cytokine receptor homology module of Mpl results in constitutive cell growth and loss of thrombopoietin binding. Blood; **94(1)**:365-7.
- Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. Mol Cell Biol; **20(10)**:3387-95.
- Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. (2003). Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. Mol Biol Cell; **14(4)**:1448-59.
- Saltzman A, Stone M, Franks C, Searfoss G, Munro R, Jaye M, Ivashchenko Y. (1998). Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue. Biochem Biophys Res Commun; **246(3)**:627-33.
- Sanei M, Pickering R, Kumke K, Nasuda S, Houben A. (2011). Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids. Proc Natl Acad Sci U S A; **108(33)**:E498-505.
- Satoh Y, Matsumura I, Tanaka H, Ezoe S, Fukushima K, Tokunaga M, Yasumi M, Shibayama H, Mizuki M, Era T, Okuda T, Kanakura Y. (2008). AML1/RUNX1 works as a negative regulator of c-Mpl in hematopoietic stem cells. J Biol Chem; **283(44)**:30045-56.
- Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K, Hitchcock IS. (2010). Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. (2010). Blood; **115(6)**:1254-63.
- 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 predisposing mutations for JAK2-V617F. Blood; **113(9)**:2022-7.
- Schofield R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells; **4(1-2)**:7-25.
- Schram AM, Xu X, Kilpivaara O, Mukherjee S, Viny AD, Guryanova O, Klein RJ, Levine RL. (2011). Genetic and Functional Investigation of Germline JAK2 Alleles That Predispose to Myeloproliferative Neoplasms. **Oral Session: 634; Abstract 124. Myeloproliferative Syndromes: Biological Advances I. 53rd American Society of Hematology annual meeting.**
- Schulze H, Ballmaier M, Welte K, Germeshausen M. (2000). Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. Exp Hematol; **28(3)**:294-304.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR. (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med; **356(5)**:459-68.
- Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH. (1986). Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. Proc Natl Acad Sci U S A; **83(14)**:5219-22.
- Sherwood JB, Shouval D. (1986). Continuous production of erythropoietin by an established human renal carcinoma cell line: development of the cell line. Proc Natl Acad Sci U S A; **83(1)**:165-9.
- Siemiakowska A, Bieniaszewska M, Hellmann A, Limon J. (2010). JAK2 and MPL gene mutations in V617F-negative

myeloproliferative neoplasms. Leuk Res.;34(3):387-9.

Skoda RC, Seldin DC, Chiang MK, Peichel CL, Vogt TF, Leder P. (1993). Murine c-mpl: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. EMBO J.;12(7):2645-53.

Smalberg JH, Koehler E, Darwish Murad S, Plessier A, Seijo S, Trebicka J, Primignani M, de Maat MP, Garcia-Pagan JC, Valla DC, Janssen HL, Leebeek FW; European Network for Vascular Disorders of the Liver (EN-Vie). (2011). The JAK2 46/1 haplotype in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis. Blood.;117(15):3968-73.

Snyers L, Renauld JC, Szpirer C, Content J. (1995). Cloning and chromosomal localization of a pseudogene corresponding to a mRNA for a soluble IL-6 receptor. DNA Seq.;5(5):311-4.

Sokol L, Luhovy M, Guan Y, Prchal JF, Semenza GL, Prchal JT. (1995). Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin. Blood.;86(1):15-22.

Solar GP, Kerr WG, Zeigler FC, Hess D, Donahue C, de Sauvage FJ, Eaton DL. (1998). Role of c-mpl in early hematopoiesis. Blood.;92(1):4-10.

Solberg LA Jr. (2002). Therapeutic options for essential thrombocythemia and polycythemia vera. Semin Oncol.;29(3 Suppl 10):10-5.

Souyri M, Vigon I, Penciolelli JF, Heard JM, Tambourin P, Wendling F. (1990). A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. Cell.;63(6):1137-47.

Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, Willard HF, Ledbetter DH, Hejtmancik JF, Pollack MS, O'Brien WE, Beaudet AL. (1988). Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. Am J Hum Genet.;42(2):217-26.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. (2001). Stem cells find their niche. Nature.;414(6859):98-104.

Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC. (1996). Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. Blood.;87(2):567-73.

Stopka T, Zivny JH, Stopkova P, Prchal JF, Prchal JT. (1998). Human hematopoietic progenitors express erythropoietin. Blood.;91(10):3766-72.

Sulahian R, Cleaver O, Huang LJ. (2009). Ligand-induced EpoR internalization is mediated by JAK2 and p85 and is impaired by mutations responsible for primary familial and congenital polycythemia. Blood.;113(21):5287-97.

Suthaus J, Tillmann A, Lorenzen I, Bulanova E, Rose-John S, Scheller J. (2010). Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. Mol Biol Cell.;21(15):2797-807.

Szpurka H, Gondek LP, Mohan SR, Hsi ED, Theil KS, Maciejewski JP. (2009). UPD1p indicates the presence of MPL W515L mutation in RARS-T, a mechanism analogous to UPD9p and JAK2 V617F mutation. Leukemia.;23(3):610-4.

Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell.;58(3):573-81.

Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, Rohatiner AZ, Lister TA, Kelly G, Luongo JL, Danet-Desnoyers GA, Bonnet D. (2005). Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. Blood.;106(13):4086-92.

Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, Pieri L, Finke CM, Kilpivaara O, Wadleigh M, Mai M, McClure RF, Gilliland DG, Levine RL, Pardanani A, Vannucchi AM. (2010). IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. Leukemia.;24(7):1302-9.

Tefferi A, Lasho TL, Patnaik MM, Finke CM, Hussein K, Hogan WJ, Elliott MA, Litzow MR, Hanson CA, Pardanani A. (2010). JAK2 germline genetic variation affects disease susceptibility in primary myelofibrosis regardless of V617F mutational status: nullizygosity for the JAK2 46/1 haplotype is associated with inferior survival. Leukemia.;24(1):105-9.

Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. (2009). The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. Cancer.;115(17):3842-7.

Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. (2011). Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. J Clin

Oncol.;**29(10)**:1356-63.

Tefferi A, Vardiman JW. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. Leukemia;**22(1)**:14-22.

Teofili L, Giona F, Torti L, Cenci T, Ricerca BM, Rumi C, Nunes V, Foà R, Leone G, Martini M, Larocca LM. (2010). Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. Haematologica;**95(1)**:65-70.

Tesio M, Golan K, Corso S, Giordano S, Schajnovitz A, Vagima Y, Shvitiel S, Kalinkovich A, Caione L, Gammaitoni L, Laurenti E, Buss EC, Shezen E, Itkin T, Kollet O, Petit I, Trumpp A, Christensen J, Aglietta M, Piacibello W, Lapidot T. (2011). Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. Blood;**117(2)**:419-28.

Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC. (2007). Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. Blood;**110(1)**:375-9.

Thiel S, Behrmann I, Dittrich E, Muys L, Tavernier J, Wijdenes J, Heinrich PC, Graeve L. (1998). Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. Biochem J;**330(Pt 1)**:47-54.

Thiel S, Dahmen H, Martens A, Müller-Newen G, Schaper F, Heinrich PC, Graeve L. (1998). Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. FEBS Lett;**441(2)**:231-4.

Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakhanova S, de Sauvage FJ, Jackson CW, Skoda RC. (2009). Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. Blood;**113(8)**:1768-77.

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(8)**:3931-40.

Till JE and McCulloch EA. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat Res;**14**:213-22.

Till JE and McCulloch EA. (1964). Repair process in irradiated mouse hematopoietic tissue. Ann N Y Acad Sci;**114**:115-25.

Tong W, Lodish HF. (2004). Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. J Exp Med;**200(5)**:569-80.

Tong W, Sulahian R, Gross AW, Hendon N, Lodish HF, Huang LJ. (2006). The membrane-proximal region of the thrombopoietin receptor confers its high surface expression by JAK2-dependent and -independent mechanisms. J Biol Chem;**281(50)**:38930-40.

Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjani Y, Young C, Jensen ON, Xu CF, Neubert TA, Skoda RC, Hubbard SR, Silvennoinen O. (2011). The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. Nat Struct Mol Biol;**18(9)**:971-6.

Valla DC. (2009). Primary Budd-Chiari syndrome. J Hepatol;**50(1)**:195-203.

Vaquez H. (1892). Sur une forme spéciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante. C R Soc Biol (Paris);**4**:384.

Verdier F, Walrafen P, Hubert N, Chretien S, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P. (2000). Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors. J Biol Chem;**275(24)**:18375-81.

Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, Estrov Z, Fridman JS, Bradley EC, Erickson-Viitanen S, Vaddi K, Levy R, Tefferi A. (2010). Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. N Engl J Med;**363(12)**:1117

Vigon I, Florindo C, Fichelson S, Guenet JL, Mattei MG, Souyri M, Cosman D, Gisselbrecht S. (1993). Characterization of the murine Mpl proto-oncogene, a member of the hematopoietic cytokine receptor family: molecular cloning, chromosomal location and evidence for a function in cell growth. Oncogene;**8(10)**:2607-15.

Vigon I, Mornon JP, Cocault L, Mitjavila MT, Tambourin P, Gisselbrecht S, Souyri M. (1992). Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A;**89(12)**:5640-4.

- Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. (2005). Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. Blood; **105**(2):600-8.
- Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, Gramlich JL, Neuberger DS, Podar K, Griffin JD, Sattler M. (2006). Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. J Biol Chem; **281**(26):18177-83.
- Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W, Cui Y, Wang J, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Fan T, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, Ikehara S. (2006). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. Stem Cells; **24**(3):482-93.
- Watowich SS, Yoshimura A, Longmore GD, Hilton DJ, Yoshimura Y, Lodish HF. (1992). Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A; **89**(6):2140-4.
- Wendling F, Varlet P, Charon M, Tambourin P. (1986). MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. Virology; **149**(2):242-6.
- 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**(11):4274-81.
- 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 smokers polyglobuly spontaneously express IL-6 and IL-6R and secrete IL-6. Leukemia; **13**(3):327-34.
- Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, Skoda RC. (1998). An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. Nat Genet; **18**(1):49-52.
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN. (1993). JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. Cell; **74**(2):227-36.
- Wright JH. (1910). The histogenesis of the blood platelets. Journal of Morphology; **21**(2):263-278.
- Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. Science; **241**(4867):825-8.
- Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, Murakami M, Yamasaki K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. (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. EMBO J; **12**(4):1705-12.
- Yosha L, Ravid O, Ben-Califa N, Neumann D. (2011). Cytosolic lysine residues enhance anterograde transport and activation of the erythropoietin receptor. Biochem J; **435**(2):509-18.
- Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. Proc Natl Acad Sci U S A; **93**(1):407-11.
- Zhang et al Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature; **425**(6960):836-41.
- Zhang JG, Zhang Y, Owczarek CM, Ward LD, Moritz RL, Simpson RJ, Yasukawa K, Nicola NA. (1998). Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma. J Biol Chem; **273**(17):10798-805.
- Zhou YJ, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, Boyd JG, Lin W, Roberts JL, Lengi A, Buckley RH, Geahlen RL, Candotti F, Gadina M, Changelian PS, O'Shea JJ. (2001). Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. Mol Cell; **8**(5):959-69.

Résumé

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont un groupe de trois hémopathies regroupant la Polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle et la myélofibrose primitive. Depuis 2005, les découvertes des mutations de *JAK2* et de *MPL* ont mis en exergue l'importance du couple Mpl/Jak2 dans le développement des SMP. Chez les patients atteints de SMP, l'expression de Mpl plaquettaire est fréquemment diminuée. L'objectif de ce travail a été de mieux caractériser les niveaux d'expression et d'activité de la paire Mpl/Jak2 et de comprendre le rôle et l'implication des mutations des gènes *MPL* et *JAK2*, ainsi que des cytokines inflammatoires dans la pathogénèse des SMP. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des variations d'expression importantes entre les charges alléliques *JAK2*V617F mesurées dans l'ADN et l'ARN de patients atteints de PV, par PCRs quantitatives spécifiques d'allèle. Nous avons montré que la mesure de l'expression de *JAK2*WT au niveau ARNm permet d'évaluer le niveau d'expression et la fonctionnalité de Mpl au niveau des plaquettes. Par ailleurs, nous avons établi que la mutation T1588C de l'exon 10 de *MPL* (W515R) ne permet pas, seule, d'induire un phénotype de SMP, apportant ainsi un argument supplémentaire en faveur du caractère non-transformant des mutations de *JAK2* et de *MPL* chez l'homme. Enfin, nous avons montré qu'il existe chez les patients atteints de PV, une boucle autocrine de production de cytokines liées à l'inflammation, dont l'IL-11 et l'HGF, qui favorisent la prolifération et la survie des cellules myéloïdes malignes de manière indépendante de la mutation *JAK2*V617F.

Mots clés : Syndromes Myéloprolifératifs, Jak2, Mpl, haplotype 46/1, recombinaison homologue, *JAK2*V617F, *MPL*W515R, thrombocytose héréditaire.

Abstract

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) form a group of three blood diseases including Polycythemia Vera (PV), essential thrombocytemia and primary myelofibrosis. Since 2005, discoveries of *JAK2* and *MPL* mutations highlighted the importance of the Mpl/Jak2 couple in the development of MPNs. The Mpl protein is the receptor to thrombopoietin, a key cytokine in myeloid hematopoiesis. For MPN patients, platelet Mpl expression is frequently decreased. The aim of this work was to better characterize the Mpl/Jak2 couple in MPNs and to better understand the roles and implication of *MPL/JAK2* mutations and of inflammation-linked cytokines in MPN pathogenesis. We showed that *JAK2*V617F allele burden varies between DNA and cDNA in PV patients, as measured using allele specific quantitative PCR assays, which means that expression of the mutated *JAK2* gene varies according to patients. Moreover, we showed that *JAK2*WT mRNA levels reflect the platelet Mpl expression levels. We also established that the T1588C mutation in *MPL* exon 10 (W515R) was not sufficient, alone, to induce a MPN phenotype, giving another argument in favor of the non- or poorly-transforming character of *JAK2*V617F and *MPL* W515 mutations in human. Finally, we showed that an autocrine loop of inflammation-linked cytokines (interleukin-11, Hepatocyte Growth Factor) exist in myeloid progenitors of MPN patients, which facilitates proliferation and survival of malignant myeloid cells, independently of *JAK2*V617F mutation. Altogether, this work allowed us to better understand MPN pathogenesis via the study of several key actors: the Mpl/Jak2 couple and inflammation-linked cytokines.

Keywords: Myeloproliferative neoplasms, Jak2, Mpl, 46/1 haplotype, homologous recombination, *JAK2*V617F, *MPL*W515R, hereditary thrombocytosis.