



**HAL**  
open science

**Rôle du couple Flt3-ligand/Flt3 et de l'activation des  
"Mitogen-activated protein kinases" p38 dans la  
dysmégacaryopoïèse des patients atteints de  
myélofibrose primitive**

Christophe Desterke

► **To cite this version:**

Christophe Desterke. Rôle du couple Flt3-ligand/Flt3 et de l'activation des "Mitogen-activated protein kinases" p38 dans la dysmégacaryopoïèse des patients atteints de myélofibrose primitive. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T020 . tel-00652595

**HAL Id: tel-00652595**

**<https://theses.hal.science/tel-00652595>**

Submitted on 15 Dec 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE  
UNIVERSITE PARIS SUD/11  
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD**

**THESE pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS SUD/11  
Spécialité : CANCEROLOGIE**

**Présentée et soutenue publiquement par  
DESTERKE Christophe**

**Le 25 mai 2011, à Villejuif**

**Rôle du couple Flt3 ligand/Flt3 et de l'activation des « Mitogen-  
activated protein Kinases » p38 dans la dysmégacaryopoïèse  
des patients atteints de myélofibrose primitive**

**Membres du jury**

**Président: Pr. Olivier Hermine**

**Rapporteur : Dr. Françoise Porteu**

**Rapporteur : Dr. Jean Ripoche**

**Examineur : Dr. Marie-Françoise Bourgeade**

**Examineur : Pr. Jean-Loup Demory**

**Directeur de thèse : Dr. Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès**

**Co-directeur de thèse : Dr. Chrystèle Bilhou-Nabéra**



# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu au cours de ma thèse, tant sur le plan scientifique que personnel.

La thèse est une grande aventure au cours de laquelle il faut savoir tenir « le cap » et sans le soutien des personnes qui m'ont accompagné, jamais je n'aurais pu atteindre cet objectif.

A mon père : André DESTERKE,

A ma mère : Nicole DESTERKE,

A ma famille et à mes amis,

je voudrais exprimer un grand merci pour tous leurs encouragements.

Je remercie les membres de mon jury de thèse.

Mr le Professeur Olivier Hermine de me faire l'honneur de juger ma thèse en qualité de président de jury et pour l'intérêt scientifique manifesté.

Mme le Dr Françoise Porteu et Mr le Docteur Jean Ripoche de me faire l'honneur de juger ma thèse en qualité de rapporteur et pour l'intérêt scientifique manifesté.

Mme le Dr Marie-Françoise Bourgeade et Mr le Docteur Jean-Loup Demory de me faire l'honneur de juger ma thèse en qualité d'examineur et pour l'intérêt scientifique manifesté.

Je remercie mon directeur de thèse Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, pour m'avoir donné l'opportunité de mener à bien ce travail au sein de son équipe, pour son soutien continu pendant toutes ces années d'étude et pour sa gentillesse.

Je remercie mon co-directeur de thèse Chrystèle Bilhou-Nabéra pour m'avoir éclairé de ses connaissances en génétique et pour son soutien.

Je remercie les membres de l'équipe de Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès notamment et particulièrement Bernadette Guerton pour son soutien, sa gentillesse, sa disponibilité et son aide. Je tiens à remercier Denis Clay pour ses conseils en cytométrie. Je tiens à remercier aussi les personnes de passage dans l'équipe au cours de cette

période notamment : Olivier Pierre-Louis, Aurélie Chabanon, Christophe Martinaud, Frédéric Torossian avec qui j'ai passé des moments constructifs au cours de cette période.

Je remercie, Claude Boucheix et Georges Uzan, qui m'ont accueilli dans leur unité INSERM respective U602, puis U972, durant la réalisation de mes travaux de thèse.

Je remercie les organismes financiers qui ont investi dans ces études :

- L'association NRB : Nouvelles Recherches Biomédicales pour les contrats m'ayant permis de débiter ma thèse

- L'Institut National du Cancer (INCA) pour le financement accordé à ce sujet d'étude

- L'association Laurette Fugain pour le financement accordé à ce sujet d'étude

- La Société Française d'Hématologie pour l'obtention du prix d'Hématologie 2008

- L'Université Paris Sud/11 qui m'a octroyé un poste d'Ingénieur de Recherche ; ceci m'a permis de mener à bien la fin de mon travail de thèse.

Je remercie les patients ainsi que les cliniciens pour les échantillons qui ont permis la réalisation de cette étude.

Je remercie également le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) de l'hôpital Percy à Clamart et tout particulièrement le Professeur Jean-Jacques Lataillade, pour les échantillons sanguins.

Je remercie les chirurgiens orthopédistes du Centre Hospitalier Robert Ballanger d'Aulnay sous Bois pour les prélèvements de moelle osseuse.

# ABBREVIATIONS

3'UTR : « 3'untranslated-region »  
5-AZA : 5-azacytidine  
5-FU : 5-fluorouracil  
ABCG2 : ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2  
*ABL* : oncogène Abelson  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AGM : aorta gonad mesonephros  
ALDH : aldehyde dehydrogenase  
Ang-1 : angiopoïétine 1  
Anx2 : annexine 2  
AP1 : activator Protein 1  
ARE : AU rich elements  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
Atf : activating transcription factor  
ATM : ataxia telangiectasia mutated  
BCL2 : B-cell CLL/lymphoma 2  
Bcl-XL : BCL2-like 1  
bFGF : basic fibroblast growth factor  
BFU-EM : « burst forming unit » érythro-mégacaryocytaire  
BIM : BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)  
BMI1 : BMI1 polycomb ring finger oncogene  
BNIP3 : BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3a  
BOM : biopsie ostéo-médullaire  
Cad : cadhérine  
CAFC : cobblestone area-forming cell-assay  
CAMT : thrombocytopénie amégacaryocytaire congénitale  
CAR : CXCL12 abundant reticular cell  
CBL : Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence  
CBP : Csk-binding protein  
CD9 : tétraspanine 9  
CDKI : cyclin dependent kinase inhibitor  
c-FMS : alias CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor)  
CFU: colony forming unit  
CFU-EM : « colony forming unit » érythro-mégacaryocytaire  
CFU-GEMM : « colony forming unit » granulo-érythro-méga-monocytaire  
CFU-Meg : « colony forming unit » mégacaryocytaire  
CFU-S : colony forming unit in the spleen  
c-kit : v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog  
CLP : progéniteur commun lymphoïde  
CMP : progéniteur commun myéloïde  
c-*MPL* : gène du récepteur à la thrombopoïétine  
c-myc : v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)  
CNTF : ciliary neurotrophic factor  
Creb : cAMP responsive element binding protein  
CSH : cellule souche hématopoïétique  
CSM : cellule souche/stromale mésenchymateuse  
CXCR4 : récepteur de la chimiokine CXCL12  
Cys : région riche en cystéine  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DMS : système de démarcation membranaire  
DUSP : « Dual specificity MAPK phosphatase »  
E : répétition EGF homologue

EGF : epithelial growth factor  
 EPO : érythropoïétine  
 EPO-R : récepteur de l'érythropoïétine  
 ERK : elk-related tyrosine kinase  
 FERM : domaine de liaison des partenaires  
 FGF-4 : fibroblast growth factor 4  
 FGFR : récepteur du « fibroblast growth factor »  
 FITC : fluorescein isothiocyanate  
 FL : Flt3-ligand  
 FLI-1 : Friend leukemia virus integration 1  
*FLK1* : « fetal liver kinase 1 », alias *KDR* ou *VEGFR2*  
*FLK2* : « fetal liver kinase 2 », alias *FLT3*  
*FLT1* : « FMS-like tyrosine kinase 1 », alias *VEGFR1*  
*FLT3* : « FMS-like tyrosine kinase 3 »  
*FLT4* : « FMS-like tyrosine kinase 4 », alias *VEGFR3*  
 Fn : fibronectine  
*FOG-1* : Friend of GATA-1  
*FOS* : FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog  
*FRA1* : jun B proto-oncogene, alias *JUNB*  
 G6PD : glucose 6 phosphate dehydrogenase  
 GATA-1 : GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)  
 G-CSF : granulocyte colony stimulating factor  
 GM-CSF : « granulocyte monocyte colony stimulating factor »  
 GMP : progéniteur granulo-monocytaire  
 gp130 : chaîne de glycoprotéines 130 kDa des récepteurs aux cytokines  
 GPCR : récepteur couplé aux protéines G  
 GPIb $\alpha$  : glycoprotein Ib, alpha polypeptide  
 GPIX : glycoprotein IX  
 GPV : glycoprotein V  
 Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2  
 H2A : histone 2A  
 H2B : histone 2B  
 H3 : histone 3  
 H4 : histone 4  
 HAC : histone acétylase  
 HDAC : histone déacétylase  
 HDACi : inhibiteur d'HDAC  
 HLA : human leukocyte antigen  
 HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransferase  
 IFN : interféron  
 IGF-1 : insulin growth factor  
 IL : interleukine  
 IR : récepteur à l'insuline  
 ITD : internal tandem duplication  
 Jak : Janus kinase  
 Jak2V617F : mutation V617F de la tyrosine Jak2  
 JH1 : domaine Janus-like 1  
 JH2 : domaine Janus-like 2  
 JNK : c-Jun NH2-terminal kinase  
*JUN* : oncogene *JUN*, alias *API1*  
 L : leucine  
 LAM : leucémie aiguë myéloïde  
 LCM : laser capture microdissection  
 LEF-1 : lymphoid enhancer-binding factor 1  
 LIF : leukemia inhibitor factor

Lin : lineage  
 LMC : leucémie myéloïde chronique  
 LTC-IC : long term culture-initiating cell  
*MAF*: v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)  
 MAPK : mitogen-activated protein kinase  
 mb-FL : Flt3-ligand membranaire  
 MCAM : melanoma-associated cell adhesion molecule  
 MCL1 : myeloid cell leukemia sequence 1  
 M-CSF : macrophage colony stimulating factor  
 MEP : progéniteur érythrocytaire mégacaryocytaire  
 MFP : myélofibrose primitive  
 MK : mégacaryocyte  
 MMP : métalloprotéase  
 Nix : BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like  
 NK : “natural killer”  
 NOD/SCID : nonobese diabetes/severe combined immunodeficiency  
 OSM : oncostatin M  
 PDGFR : récepteur du “platelet-derived growth factor”  
 PF4 : facteur 4 plaquettaire  
 PGK : phosphoglycerate kinase  
 PH : progéniteur hématopoïétique  
 PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase  
 PICP : carboxy-terminal peptique du procollagène de type I  
 PIIIP : amino-terminal peptide du procollagène de type III  
 PM : progéniteur multipotent  
 PRL : prolactine  
 Pseudo TK : domaine pseudo tyrosine kinase  
*PU.1* : “spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene *SPI1*”  
 PUMA : “Bcl2 binding component 3”  
 PV : polycythemia vera  
 QRT-PCR : « quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction »  
 RANK : “receptor activator of nuclear factor kappa B”  
 RANKL : “receptor activator of nuclear factor kappa B ligand”  
*RET* : “rearranged during transfection protooncogene”  
 RPL38 : « ribosomal protein L38 »  
 RTK : récepteur à activité tyrosine kinase  
 S1P : sphingosine-1-phosphate  
 SCF : “stem cell factor” ou “kit ligand”  
 SDF-1 : “stromal derived factor-1”, alias CXCL12  
 s-FL : Flt3-ligand soluble  
 SH2 : domaine SRC homologue 2  
 SHC : «SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1  
 SKF : « Src kinase family »  
 SLAM : « signaling lymphocyte activation molecule »  
 SMD : syndrome myélodysplasique  
 SMP : néoplasme myéloprolifératif  
 SNO : “spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup> osteoblasts”  
 SOCS3 : “suppressor of cytokine signaling 3”  
 SRC : “SCID repopulating cell”  
 STAT5 : “Signal transducer and activator of transcription 5”  
 TACE : “TNF-alpha converting enzyme”  
 TE : thrombocythémie essentielle  
*TET2* : “*TET* oncogene family member 2”  
 TF : “transcription factor”  
 TGF-β1 : « transforming growth factor-beta 1 »



Thr : thréonine  
Tie-1 : « tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 »  
Tie-2 : TEK : « angiopoietin-1 receptor »  
TK : tyrosine kinase  
TM : transmembranaire  
TNF : « tumor necrosis factor »  
TPO : thrombopoïétine  
TRE : « TPA-response element »  
TRK : récepteur de la tropomyosine  
TrkA : « tyrosine kinase receptor A »  
TrkB : « tyrosine kinase receptor B »  
TrkC : « tyrosine kinase receptor C »  
TSA : trichostatine A  
Tyr : tyrosine  
UTR : « untranslated region »  
VCAM-1 : « vascular cell adhesion molecule 1 »  
VEGF : « vascular endothelial growth factor »  
VEGFR : "vascular endothelial growth factor receptor"  
VLA-4 : « very late antigen-4»  
VPA : acide valproïque  
VWF : facteur von Willebrand  
WNT : « wingless-related MMTV integration site »  
β2M : beta 2 microglobuline  
β-TG : β-thromboglobuline

# LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Coupe de biopsie ostéo-médullaire</i> .....	24
<i>Figure 2 : Représentation schématique des différents types cellulaires constituant le tissu médullaire</i> .....	27
<i>Figure 3 : Représentation schématique des voies extrinsèque (membranaire) et intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose</i> .....	28
<i>Figure 4 : Points de contrôle apoptotique au cours de la différenciation hématopoïétique</i> ...	31
<i>Figure 5 : Organisation hiérarchique de l'hématopoïèse</i> .....	33
<i>Figure 6 : Principaux tests de mise en évidence des différents types de cellules hématopoïétiques humaines</i> .....	36
<i>Figure 7: Principaux marqueurs des cellules hématopoïétiques au cours de la différenciation lympho-myéloïde chez l'homme</i> .....	39
<i>Figure 8 : Profil d'expression des molécules SLAM chez la souris</i> .....	40
<i>Figure 9 : Transmission du signal de la membrane au noyau</i> .....	43
<i>Figure 10 : Cellules cibles de l'action des cytokines et des facteurs de croissance au cours de la différenciation hématopoïétique</i> .....	45
<i>Figure 11 : Représentation schématique des familles de récepteurs aux cytokines selon la présence de chaînes communes</i> .....	47
<i>Figure 12 : Structure des Janus kinases (Jak)</i> .....	47
<i>Figure 13 : Représentation des familles de RTK exprimés dans le tissu hématopoïétique</i> ....	49
<i>Figure 14 : Principales activités biologiques des chimiokines</i> .....	53
<i>Figure 15 : Les niches ostéoblastiques et vasculaires de la moelle osseuse</i> .....	59
<i>Figure 16 : Régulation de l'équilibre entre quiescence et mise en cycle des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la niche médullaire endostéale</i> .....	64
<i>Figure 17 : Organisation du nucléosome et code histone</i> .....	67
<i>Figure 18 : Effets à court ou long terme liés aux modifications des histones</i> .....	67
<i>Figure 19 : Principaux marqueurs membranaires exprimés au cours de la différenciation mégacaryocytaire</i> .....	71
<i>Figure 20 : Illustration de la maturation mégacaryocytaire</i> .....	73
<i>Figure 21 : Régulation de la mégacaryopoïèse par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de transcription</i> .....	74
<i>Figure 22 : Principales voies de signalisation activées par la thrombopoïétine au cours de la mégacaryopoïèse in vitro</i> .....	79
<i>Figure 23 : Structure du récepteur Flt3</i> .....	81
<i>Figure 24 : Principales voies de signalisation activées par la liaison de Flt3 ligand (FL) à son récepteur Flt3</i> .....	83
<i>Figure 25 : Rôle du Flt3-ligand dans les interactions CSH-microenvironnement au sein de la moelle osseuse</i> .....	87
<i>Figure 26 : Schéma simplifié de la signalisation des MAP Kinases</i> .....	91
<i>Figure 27 : Mécanismes impliqués dans la régulation des MAPKs p38</i> .....	95
<i>Figure 28 : Sénescence induite par p38 dans les cellules normales versus les cellules de patients atteints de LMC exprimant la protéine de fusion BCR-ABL</i> .....	98
<i>Figure 29 : Réponse transcriptionnelle du complexe JUN/AP1 en aval des MAPK</i> .....	101
<i>Figure 30 : Modulation croisée de la voie MAPK p38 avec d'autres voies de signalisation</i>	102
<i>Figure 31 : Classification des néoplasmes myéloprolifératifs</i> .....	104
<i>Figure 32 : Activation des voies de signalisation dans les néoplasmes myéloprolifératifs</i> ...	108
<i>Figure 33 : Altérations cellulaires (sang et moelle osseuse) observées chez un patient atteint de MFP</i> .....	114
<i>Figure 34 : Caractérisation histologique de la fibrose médullaire</i> .....	114

<i>Figure 35 : Eléments anatomo-pathologiques diagnostiques de la Myélobfibrose Primitive.</i>	115
<i>Figure 36 : Caractéristiques physiopathologiques de la myélobfibrose primitive.....</i>	120
<i>Figure 37: Rôle des facteurs de croissance produits par les cellules du clone hématopoïétique dans le processus fibrotique .....</i>	127
<i>Figure 38 : Modèle physiopathologique « Bad Seed in Bad Soil » .....</i>	129
<i>Figure 39 : Schéma expérimental de la CGH array pangénomique.....</i>	146
<i>Figure 40 : Diagramme résumant les variations moyennes quantitatives par chromosomes dans les cellules CD34<sup>+</sup> et polynucléaires chez les patients par rapport aux sujets sains....</i>	147
<i>Figure 41: Cartographie des délétions 13q dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les polynucléaires de patients atteints de MFP par CGH array pan-génomique.....</i>	148
<i>Figure 42 : Transcriptome des cellules CD34<sup>+</sup> de patients atteints de myélobfibrose primitive : .....</i>	150
<i>Figure 43 : Comparaison des données du transcriptome des cellules CD34<sup>+</sup> et des données de CGH array ciblées sur la région de la délétion 13q .....</i>	151
<i>Figure 44 : Organisation du promoteur du gène FLT3 sur le chromosome 13 et prédiction bioinformatique d'îlots CpG et des sites de fixation de facteurs de transcription.....</i>	160
<i>Figure 45 : Effet de la 5-azacytidine sur l'expression membranaire de Flt3 sur les cellules de lignées hématopoïétiques .....</i>	162
<i>Figure 46 : Effet du 5-AZA sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires en réponse au Flt3-ligand (FL) .....</i>	165
<i>Figure 47 : Effet de la trichostatine A (TSA) sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires en réponse au Flt3-ligand (FL) .....</i>	165
<i>Figure 48 : Etude de la modification du pourcentage de précurseurs mégacaryocytaires de patients présentant différents résidus lysine acétylés d'histones en réponse à une stimulation par le Flt3-ligand (FL).....</i>	166
<i>Figure 49 : Rôle de l'activation des MAPK dans la réponse aux cytokines et le contrôle de la prolifération cellulaire .....</i>	179
<i>Figure 50 : La réponse cellulaire aux cytokines et au stress peut induire une régulation transcriptionnelle conduisant à une modification de l'acétylation des histones par l'intermédiaire du complexe AP-1 .....</i>	180
<i>Figure 51: Conséquences du processus inflammatoire au sein d'un tissu .....</i>	180
<i>Figure 52 : Rôle d'une altération de l'axe « Flt3-ligand/Flt3/p38 » dans la dysmégacaryopoïèse des patients atteints de MFP.....</i>	184
<i>Figure 53: Evolution clinique possible des NMP BCR-ABL-1 négatifs .....</i>	189
<i>Figure 54: Hypothèse d'acquisition des événements génétiques et cytogénétiques dans la progression des pathologies myéloïdes.....</i>	189
<i>Figure 55: Gain et perte de fonctions associées à une activation STAT .....</i>	192

# LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Profil phénotypique, fonctionnel et métabolique des populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques chez la souris et chez l'homme au cours du développement</i>	39
<i>Tableau 2 : Comparaison des profils d'expression des molécules SLAM chez l'homme et la souris</i>	40
<i>Tableau 3 : Principaux agents mobilisateurs des CSH/PH</i>	56
<i>Tableau 4 : Fonction des MAPKs en relation avec les phénotypes des souris déficientes</i>	89
<i>Tableau 5 : Protéines MAPK et leurs principaux effecteurs</i>	89
<i>Tableau 6 : Bilan des mutations présentes chez les patients atteints de néoplasmes myéloprolifératifs chroniques BCR-ABL1 négatifs</i>	108
<i>Tableau 7 : Critères diagnostiques de la myélofibrose primitive</i>	113
<i>Tableau 8: Classification des lésions histologiques médullaires dans la MFP</i>	113
<i>Tableau 9: Description des UPD découverts dans les pathologies myéloïdes</i>	188



# **SOMMAIRE**



INTRODUCTION.....	21
1/ L'hématopoïèse .....	25
1.1/ Organisation du tissu hématopoïétique .....	25
1.2/ Les cellules souches hématopoïétiques .....	26
1.3/ Rôle de l'apoptose dans l'homéostasie des cellules hématopoïétiques et l'équilibre survie/différenciation des CSH .....	29
2/ Propriétés et mise en évidence des cellules souches hématopoïétiques.....	32
2.1/ Propriétés des cellules souches hématopoïétiques .....	32
2.2/ Tests de mise en évidence des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques.....	34
2.2.1/ Caractérisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par des tests fonctionnels .....	35
2.2.2/ Caractérisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par leurs propriétés métaboliques.....	37
2.2.3/ Caractérisation des progéniteurs hématopoïétiques par l'expression de marqueurs membranaires .....	37
2.2.3.1/ La molécule de surface CD34 .....	37
2.2.3.2/ Autres marqueurs phénotypiques des progéniteurs hématopoïétiques primitifs .....	38
3/ Régulation de l'hématopoïèse .....	42
3.1/ Les cytokines et facteurs de croissance.....	44
3.2/ Les récepteurs des cytokines .....	44
3.3/ Transduction du signal des récepteurs des cytokines via les Janus tyrosine kinases (Jaks) .....	48
3.4/ Les récepteurs à activité tyrosine kinase .....	50
4/ Les chimiokines et les récepteurs aux chimiokines .....	52
5/ La mobilisation des cellules souches hématopoïétiques .....	52
5.1/ Migration des cellules souches hématopoïétiques au cours de l'ontogénie.....	54
5.2/ Circulation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques adultes .....	54
5.3/ Mobilisation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques.....	55
5.4/ Migration des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques en réponse au ligand de Flt3 .....	55
6/ La niche hématopoïétique .....	57
6.1/ Principales cellules constituant les niches hématopoïétiques .....	58
6.1.1/ Les cellules souches mésenchymateuses .....	58
6.1.2/ Les ostéoblastes.....	60
6.1.3/ Les adipocytes .....	60
6.1.4/ Les ostéoclastes .....	61
6.1.5/ Les cellules endothéliales.....	61
6.2/ Les molécules de la matrice extracellulaire .....	62
6.2.1/ Molécules fibrillaires : collagènes et réticuline .....	62
6.2.2/ Molécules non fibrillaires .....	62
6.3/ Régulation fonctionnelle des cellules souches hématopoïétiques dans la niche médullaire .....	65
7/ Epigénétique et hématopoïèse.....	66
7.1/ La méthylation de l'ADN.....	66
7.2/ Le code des histones et hétérochromatine.....	68
7.3/ Les histones déacétylases (HDAC) et histones acétylases (HAT).....	68
8/ La mégacaryopoïèse.....	70
8.1/ Endomitose mégacaryocytaire .....	72



8.2/ Maturation cytoplasmique.....	72
8.3/ Régulation moléculaire de la mégacaryopoïèse.....	76
9/ Le couple Flt3 ligand/Flt3.....	80
9.1/ Le récepteur Flt3.....	80
9.1.1/ Souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur Flt3.....	82
9.1.2/ Expression du récepteur Flt3 chez l'homme.....	82
9.1.3/ La signalisation induite par Flt3 en réponse au Flt3-ligand.....	82
9.1.4/ Rôle de Flt3 dans les leucémies.....	84
9.2/ Le Flt3-ligand (FL).....	84
9.2.1/ Souris déficientes pour le gène codant pour le Flt3-ligand.....	85
9.2.2/ Activité biologique du Flt3-ligand in vivo et rôle dans la niche hématopoïétique.....	86
10/ La voie des « mitogen-activated protein » kinases.....	88
10.1/ Rôle des « Mitogen-activated protein kinases » p38 dans l'hématopoïèse normale et leucémique.....	96
10.1.1/ Les « Mitogen-activated protein kinases » p38.....	96
10.1.2/ Rôle de p38 dans la niche hématopoïétique.....	97
10.1.3/ Rôle de p38 dans les leucémies.....	99
10.2/ ATF2 effecteur en aval de p38.....	99
10.3/ Réponse transcriptionnelle du complexe AP1 en aval des « Mitogen-activated protein kinases » dont p38.....	100
11/ Des syndromes aux néoplasmes myéloprolifératifs chroniques.....	105
11.1/ Historique des néoplasmes myéloprolifératifs dits « classiques ».....	106
11.2/ Les mutations et les néoplasmes myéloprolifératifs.....	107
12/ La myélofibrose primitive (MFP).....	110
12.1/Diagnostic clinique et anatomopathologique.....	110
12.1.1/ Clinique.....	110
12.1.2/ Hémogramme.....	111
12.1.3/ Augmentation du nombre de progéniteurs circulants CD34 <sup>+</sup> .....	111
12.1.4/ Histologie médullaire et myélofibrose.....	111
12.2/ Diagnostic génétique.....	112
12.2.1/ Anomalies cytogénétiques.....	112
12.2.2/ Clones et mutations.....	116
12.2.3/ Anomalies épigénétiques.....	118
12.3/ Approches thérapeutiques.....	119
12.4/ Caractéristiques physiopathologiques.....	119
12.4.1/ La myéloprolifération.....	121
12.4.2/ La réaction stromale et les altérations du microenvironnement.....	123
12.4.2.1/ Myélofibrose et Contexte inflammatoire.....	123
12.4.2.2/ Importance du TGF-β1.....	124
12.4.2.3/Ostéomyélosclérose et Néoangiogenèse.....	125
12.4.2.4/ Rôle clé du mégacaryocyte.....	125
12.4.3/ Le modèle physiopathologique.....	128
12.5/ Les modèles animaux.....	130
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	131
MATERIEL ET METHODES.....	135
1/ Technique de détection de la mutation Jak2V617F.....	137
2/ Hybridation Génomique Comparative (CGH array).....	137
2.1/ Obtention des populations cellulaires pour la CGHarray.....	138
2.2/ Extraction de l'ADN cellulaire pour la CGH array.....	138
2.3/ Amplification globale du génome des cellules CD34 <sup>+</sup> .....	138

2.4/ Synthèse des sondes de CGH array et hybridation .....	139
2.5/ Normalisation des données et interprétation chromosomique .....	139
3/ Analyse transcriptomique des cellules CD34 <sup>+</sup> .....	140
RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	141
1/ Contexte des travaux .....	143
2/ Recherche d'anomalies moléculaires participant à la pathogenèse de la Myélofibrose primitive .....	144
2.1/ Apport de la CGH array pangénomique.....	144
2.2/ Apport de l'étude transcriptomique .....	145
3/ Etude du rôle du couple Flt3-ligand/Flt3 et de l'activation des « Mitogen activated protein kinases » p38 dans la dysmégacaryopoïèse chez les patients atteints de myélofibrose primitive .....	152
4/ Rôle de la régulation épigénétique dans les anomalies d'expression de Flt3 et la migration des précurseurs mégacaryocytaires; Résultats préliminaires .....	159
4.1/ Prédiction bioinformatique de la présence d'îlots CpG, cibles de la méthylation, dans la région promotrice de Flt3 .....	159
4.2/ Une déméthylation par la 5-azacytidine (AZA) entraîne une augmentation de l'expression membranaire du récepteur Flt3 sur des lignées hématopoïétiques.....	161
4.3/ Approche fonctionnelle de la méthylation du promoteur Flt3 .....	161
4.4/ Approche fonctionnelle de l'acétylation des histones.....	163
4.3.1/ Le Flt3-ligand induit une modification de l'acétylation des histones et plus particulièrement de l'histone H4 en Lysine 8 .....	163
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	167
1/ De la recherche d'anomalies génomiques à l'identification du cluster « FLT » à proximité de la délétion 13q14-13q21 et d'une dérégulation du gène FLT3 .....	169
2/ D'une dérégulation du gène FLT3 à une activation de la voie des MAPKs p38 ; de nouveaux acteurs de la pathogenèse de la myélofibrose primitive ? .....	171
2.1/ Une augmentation de l'expression de Flt3 et de son ligand Flt3-ligand : une « spécificité » de la MFP, quelque soit le statut mutationnel Jak2 des patients.....	172
2.2/ Comment l'activation de la voie Flt3/p38 participe-t-elle à la dérégulation de la mégacaryopoïèse? .....	175
2.3/ Quelle est la place du processus inflammatoire dans la pathogenèse de la MFP ?.....	177
2.4/ Le couple Flt3-ligand/Flt3 est-il un médiateur du dialogue entre les progéniteurs hématopoïétiques et leur niches régulatrices et en quoi étaye-t-il l'hypothèse du « Bad seed in Bad soil »?.....	181
2.5/ Peut-on proposer des approches ciblées sur l'axe Flt3-ligand/Flt3/p38 comme thérapies adjuvantes dans la MFP?.....	185
3/ Comment intégrer nos résultats dans la hiérarchie des événements moléculaires agrégeant les néoplasmes myéloprolifératifs? .....	186
REFERENCES.....	193
ANNEXES .....	223
1/ Implication de l'interleukine 8 et de ses récepteurs dans la dysmégacaryopoïèse des patients atteints de myélofibrose primitive.....	225
2/ Augmentation d'expression du gène HMGA2 dans les leucocytes et les progéniteurs hématopoïétiques CD34 <sup>+</sup> de patients atteints de myélofibrose primitive .....	227
3/ Corrélation entre la présence de la mutation JAK2V617F et le taux de survie chez les patients atteints de MFP .....	229
4/ le gène NOG, un inhibiteur des BMP, est impliqué dans un réarrangement chromosomique chez un patient atteint de myélofibrose.....	231

5/ Le promoteur de CXCR4 est hyperméthylé dans les cellules CD34 <sup>+</sup> des patients atteints de MFP .....	233
6/ L'adaptateur LNK se lie différenciellement à Jak2V617F et modifie la régulation de la signalisation JAK/STAT chez les patients atteints de néoplasmes myéloprolifératifs. ....	235
RESUME.....	238

# AVANT PROPOS

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des hémopathies clonales caractérisées par la dérégulation d'une tyrosine kinase telle qu'Abl ou Jak2. Parmi les NMP, la myélofibrose primitive (MFP) est caractérisée par une myéloprolifération clonale associée à une hématopoïèse ectopique splénique et hépatique et à une anomalie du stroma identifiée par une myélofibrose, une néoangiogenèse et une ostéomyélosclérose. Au cours de cette pathologie, les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSH/PH) CD34<sup>+</sup> prolifèrent et migrent de façon excessive de la moelle osseuse vers la rate et le foie. Ces cellules sont caractérisées par une hypersensibilité aux cytokines, une différenciation subnormale et des anomalies génétiques/cytogénétiques clonales. Les mégacaryocytes des patients sont dystrophiques et produisent de façon anormale de nombreux facteurs de croissance qui contribuent à la réaction stromale définissant cette maladie. La myélofibrose primitive est donc actuellement considérée comme une maladie de la cellule souche hématopoïétique dans laquelle le mégacaryocyte joue un rôle pivot. Malgré la découverte de la mutation Jak2V617F chez environ 50% des patients, la cause primaire de l'anomalie clonale et les mécanismes conduisant au développement du clone pathologique ne sont toujours pas identifiés.

Au cours de ma thèse, j'ai abordé l'étude de la physiopathologie de la myélofibrose primitive grâce à des techniques pangénomiques permettant de cribler les dérégulations géniques et transcriptionnelles des cellules hématopoïétiques des patients. Ces deux approches m'ont permis d'identifier une dérégulation du couple Flt3/FL au niveau des cellules CD34<sup>+</sup> et des mégacaryocytes conduisant à des altérations fonctionnelles de la mégacaryopoïèse, *via* une activation de la MAP kinase p38.

Ce travail a donné lieu à une publication qui vient d'être acceptée en 2011 dans le journal « Cancer Research ». Il a également été sélectionné en communication orale aux congrès suivants: 1) « American School of Hematology » (ASH 2009, Nouvelle-Orléans ; USA), 2) « European School of Hematology » (ESH-MPD 2008, Athènes ; Grèce), 3) « Société Française d'Hématologie » (SFH 2008, Paris); Cette présentation en séance plénière m'a permis d'obtenir le prix de la SFH 2008.

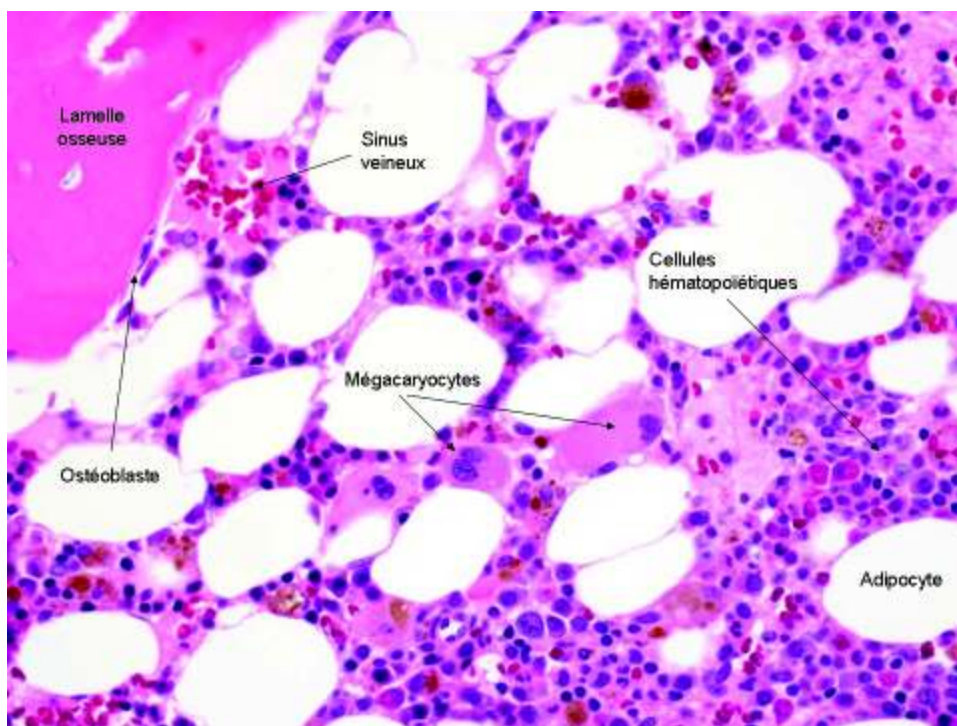


# **INTRODUCTION**









**Figure 1 : Coupe de biopsie ostéo-médullaire**  
(Coloration au May Grunvald Giemsa, grossissement X100)

Le sujet qui fait l'objet de cette thèse nécessite de préciser un nombre important de notions touchant à l'hématopoïèse et à sa régulation ainsi qu'aux néoplasmes myéloprolifératifs. Pour cette raison, nous n'avons pas détaillé de façon exhaustive les différents chapitres de cette introduction.

## **1/ L'hématopoïèse**

L'hématopoïèse est une séquence dynamique et ordonnée d'événements de prolifération et de différenciation permettant le remplacement continu et permanent des cellules sanguines matures à partir d'une population rare de cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes. L'hématopoïèse est finement régulée par des mécanismes intrinsèques (facteurs de transcription) et extrinsèques microenvironnementaux. Au sein du microenvironnement médullaire, des interactions cellulaires et humorales impliquant en particulier des cytokines et des chimiokines, vont conduire, via l'activation de différentes voies de signalisation, à la modulation des gènes cibles impliqués dans l'autorenouvellement, la prolifération et la différenciation des CSH. La connaissance des mécanismes impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse est croissante, cependant leurs rôles respectifs dans l'autorenouvellement et la différenciation des CSH restent encore à définir.

### **1.1/ Organisation du tissu hématopoïétique**

Chez l'adulte sain, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaque) au sein de niches spécifiques. La moelle osseuse est composée de cellules hématopoïétiques et de leurs précurseurs, de cellules stromales dont les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes, les cellules ostéocompétentes (ostéoblastes et ostéoclastes) et de plusieurs molécules comme les collagènes qui forment un réseau de soutien au sein de la matrice extracellulaire. Ce tissu est irrigué par de nombreux vaisseaux sanguins dits fenestrés (Figure 1).

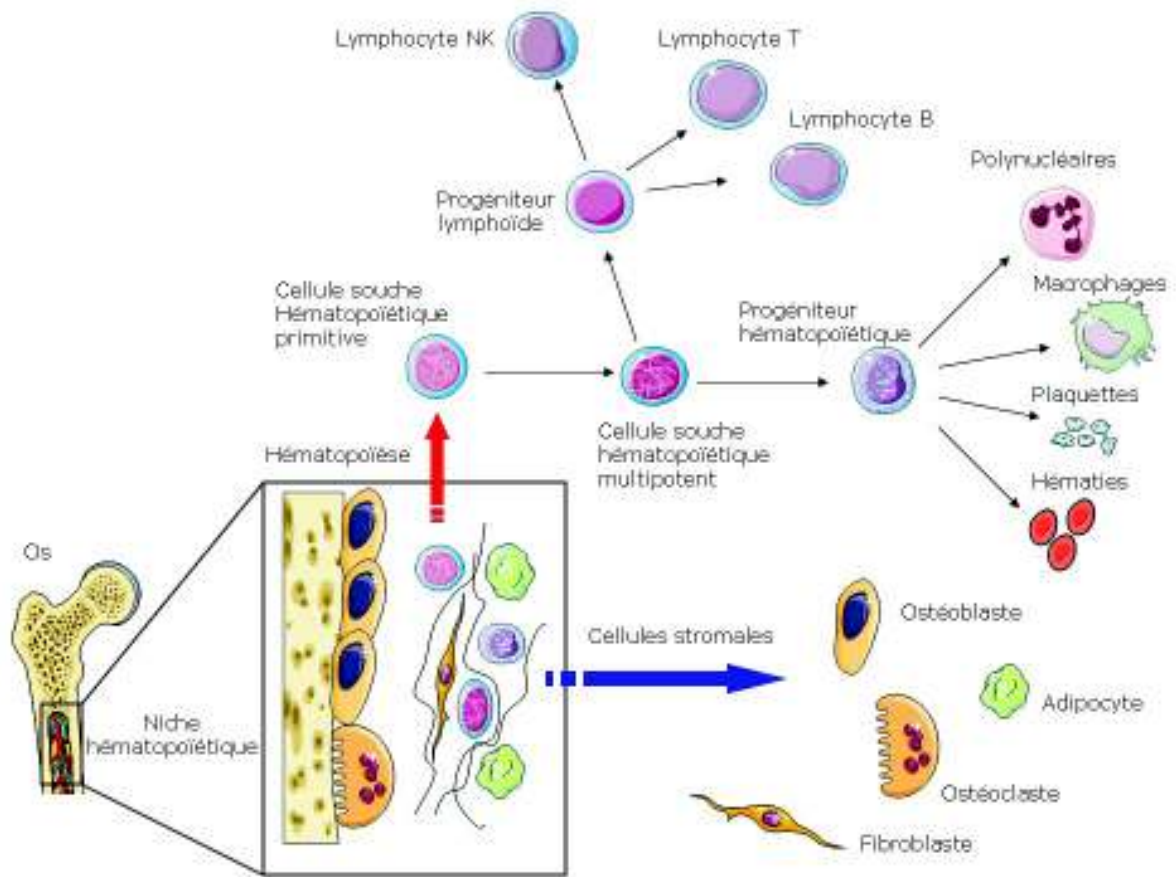
Cet environnement médullaire complexe forme les niches hématopoïétiques (Figure 2) qui régulent, de concert avec les facteurs de transcription, la production des cellules sanguines différenciées fonctionnelles. Ces cellules ne se divisent plus et présentent une faible activité de synthèse protéique (les plaquettes et les érythrocytes ne possèdent pas de noyau). Leur

durée de vie est courte et varie de quelques heures pour les polynucléaires à quelques semaines pour les érythrocytes. Pour des raisons d'homéostasie, l'hématopoïèse doit donc produire de façon régulée une quantité importante de cellules différenciées (Sachs, 1996). De même, lors d'hémorragies ou d'infections, elle doit compenser de façon rapide et efficace les variations importantes qu'il en résulte. Cette considérable activité de production cellulaire est réalisée à partir d'un petit nombre de cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes au sein des niches médullaires chez l'adulte (Morrison, Uchida, & Weissman, 1995) (Watowich et al., 1996) (Arai et al., 2009).

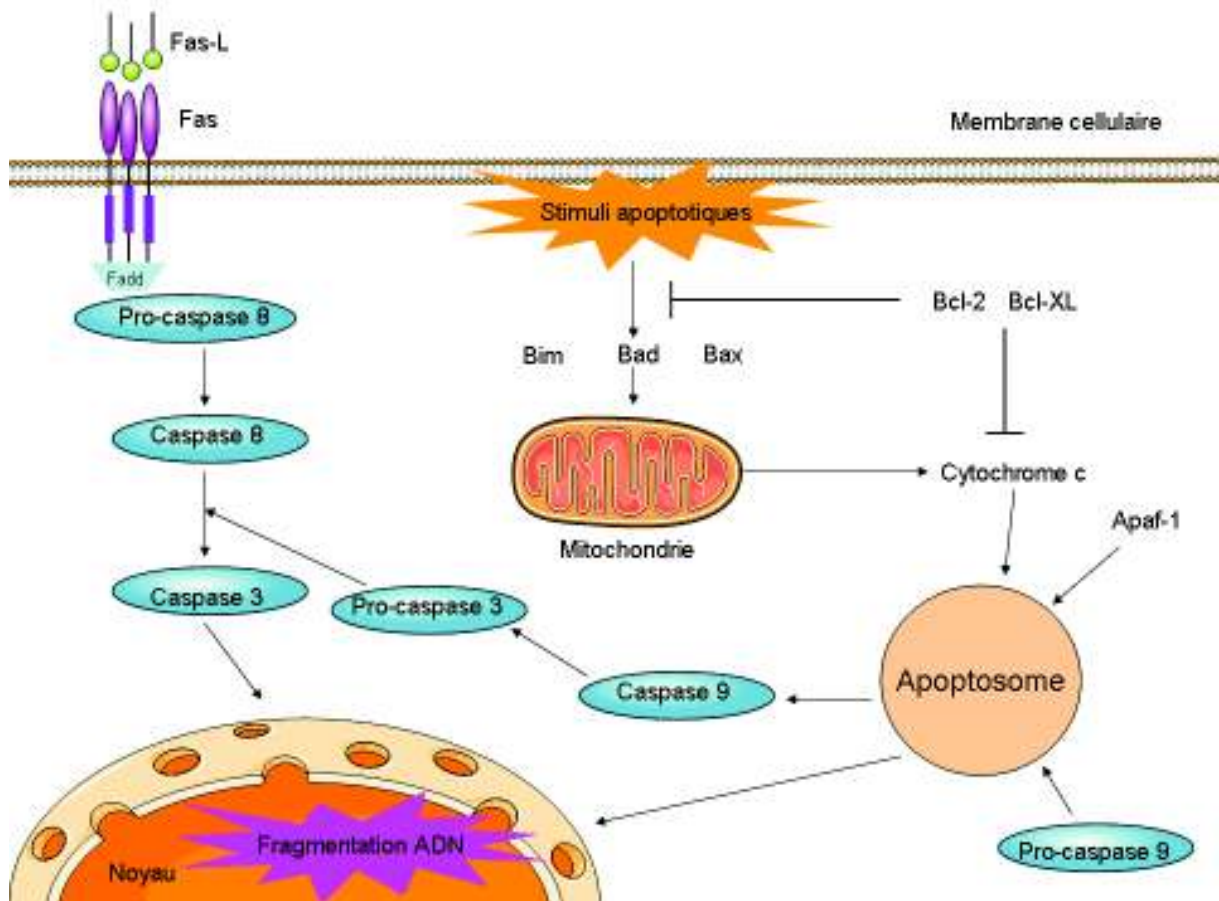
## **1.2/ Les cellules souches hématopoïétiques**

Les cellules souches hématopoïétiques sont caractérisées par : i) leur propriété d'autorenouvellement (capacité à donner naissance à une cellule fille « identique » à la cellule mère, mise en évidence par des greffes sériées chez un animal léthalement irradié) et ii) leur multipotence (capacité à engendrer des cellules appartenant aux différentes lignées hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes).

Comme nous le verrons plus tard, les CSH ont été identifiées par Till et McCulloch en 1961 (Till & McCulloch, 1961) dans la moelle osseuse de souris, site primaire de l'hématopoïèse à l'âge adulte. Les CSH représentent environ 0,05 % des cellules totales de la moelle osseuse. Deux populations cellulaires ont été identifiées chez la souris : une population  $\text{Lin}^- \text{cKIT}^+ \text{SCA}^+ \text{THY1.1}^{\text{low}}$  (fréquence : 1/10000) avec une capacité de repopulation à long terme et une population  $\text{Lin}^{\text{low}} \text{cKIT}^+ \text{SCA}^+ \text{THY1.1}^{\text{low}}$  (fréquence : 1/2000) avec une capacité de repopulation à court terme. Après injection à des souris irradiées, ces cellules ont la capacité de migrer vers un microenvironnement approprié pour proliférer et se différencier. Les cellules capables de reconstitution à court terme confèrent une radioprotection à l'animal en générant les cellules érythroïdes et myéloïdes nécessaires à sa survie. Les cellules capables de reconstitution à court et long terme confèrent une radioprotection à l'animal mais, seules les cellules permettant une reconstitution au delà de 10 semaines greffent à nouveau quand elles sont injectées dans un hôte secondaire ; ces cellules sont appelées « cellules souches hématopoïétiques » (Morrison & Weissman, 1994).



**Figure 2 : Représentation schématique des différents types cellulaires constituant le tissu médullaire**



**Figure 3 : Représentation schématique des voies extrinsèque (membranaire) et intrinsèque (mitochondriale) de l'apoptose**

La voie membranaire d'activation de l'apoptose fait intervenir les signaux de mort membranaire tels que le Fas-ligand et les récepteurs Fas. La voie mitochondriale fait intervenir une régulation intermédiaire par des molécules de signalisation pro et anti-apoptotiques : cette voie a pour conséquence la libération du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytoplasme.

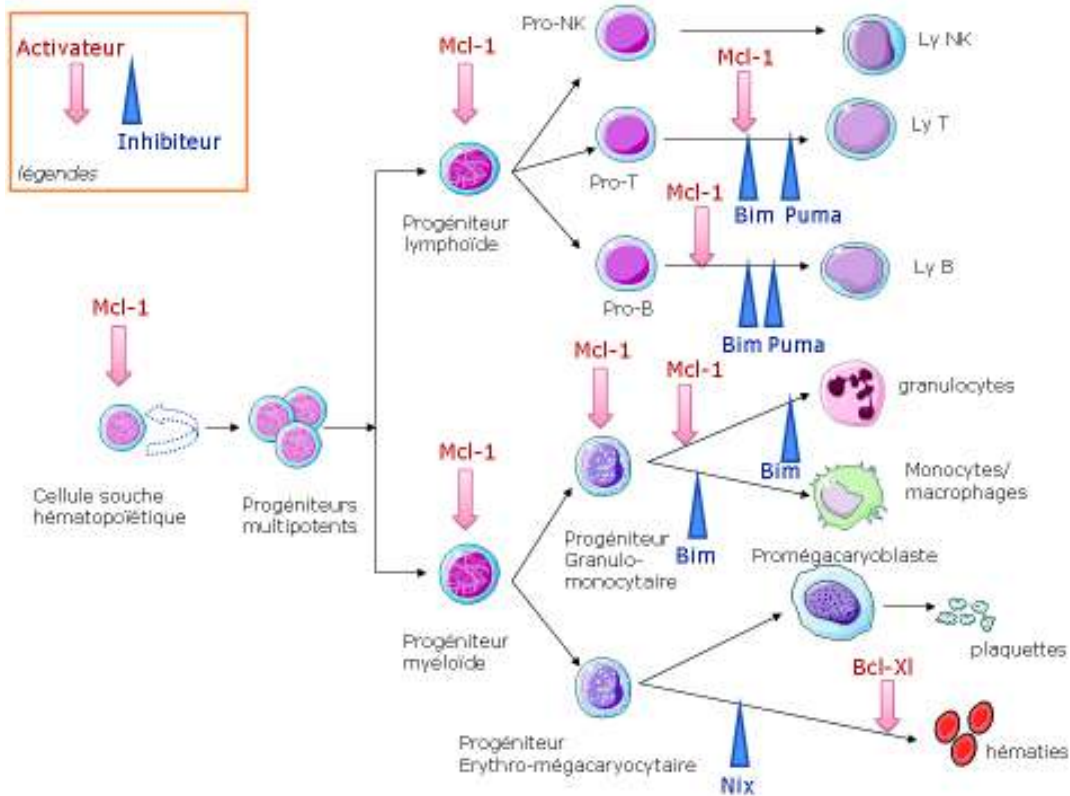
### **1.3/ Rôle de l'apoptose dans l'homéostasie des cellules hématopoïétiques et l'équilibre survie/différenciation des CSH**

L'apoptose (ou mort cellulaire génétiquement programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal de mort. C'est l'une des voies physiologiques de la mort cellulaire, en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. L'apoptose est régulée par des messages pro- et anti-apoptotiques. Cette régulation est importante pour l'homéostasie de l'hématopoïèse comme le montre le rôle d'une expression forcée de l'oncogène *BCL2* sur l'augmentation du nombre de CSH *in vivo* (Domen, Gandy, & Weissman, 1998) et son altération dans les syndromes myélodysplasiques (J. Wang, Fernald, Anastasi, Le Beau, & Qian, 2010).

Le processus apoptotique est orchestré par une famille de protéines très conservées au cours de l'évolution, telles que les protéases à cystéine (caspases) présentes dans la cellule sous forme de précurseurs latents (pro-caspases) (Ghobrial, Witzig, & Adjei, 2005). Parmi les caspases à activité pro-apoptotique, on distingue les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10), à prodomaine long, qui sont actives sous forme monomérique et les caspases effectrices (3, 6 et 7), à petit prodomaine, qui s'hétérodimérisent. Les caspases initiatrices répondent à différents stimuli mitochondriaux ou membranaires. La voie intrinsèque (mitochondriale) implique le relargage du cytochrome C par la mitochondrie ; elle est principalement régulée par la famille des protéines Bcl-2 (Goodsell, 2002) (Figure 3). La voie extrinsèque (membranaire) fait intervenir des récepteurs présents à la surface cellulaire avec un domaine de mort intracellulaire comme le CD95 (Fas). Quelles que soient les voies d'apoptose mises en œuvre, elles conduisent à la fragmentation de l'ADN.

Outre leurs rôles dans la mort programmée, les mécanismes apoptotiques sont également impliqués dans l'équilibre survie/différenciation des CSH/PH. Comme nous l'avons exposé précédemment, les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle essentiel dans cet équilibre. Mcl-1, une molécule anti-apoptotique de la famille Bcl-2 fortement exprimée dans CSH/PH primitifs mais plus faiblement dans PH déterminés. Cette dernière joue un rôle dans la régulation des stades précoces de l'hématopoïèse via une augmentation de la survie des CSH/PH primitifs (Opferman et al., 2005) et intervient dans les stades terminaux de la différenciation granulocytaire (Opferman, 2007) (Leuenroth, Grutkoski, Ayala, & Simms, 2000) (Figure 4).

Dans la lignée érythroïde, Bcl-XL, régulateur anti-apoptotique, est essentiel à la survie cellulaire (Rhodes, Kopsombut, Bondurant, Price, & Koury, 2005). La perte de la molécule pro-apoptotique Bim conduit à l'expansion des progéniteurs et des cellules différenciées myéloïdes et lymphoïdes (Kuribara et al., 2004) et la perte combinée de Bim et Puma favorise la résistance de ces cellules à l'apoptose (Erlacher et al., 2006). L'apoptose joue un rôle majeur dans la différenciation érythroïde notamment via l'action de HSP70 et de Nix (Ribeil et al., 2007) (Diwan et al., 2007) (figure 4).



**Figure 4 : Points de contrôle apoptotique au cours de la différenciation hématopoïétique**

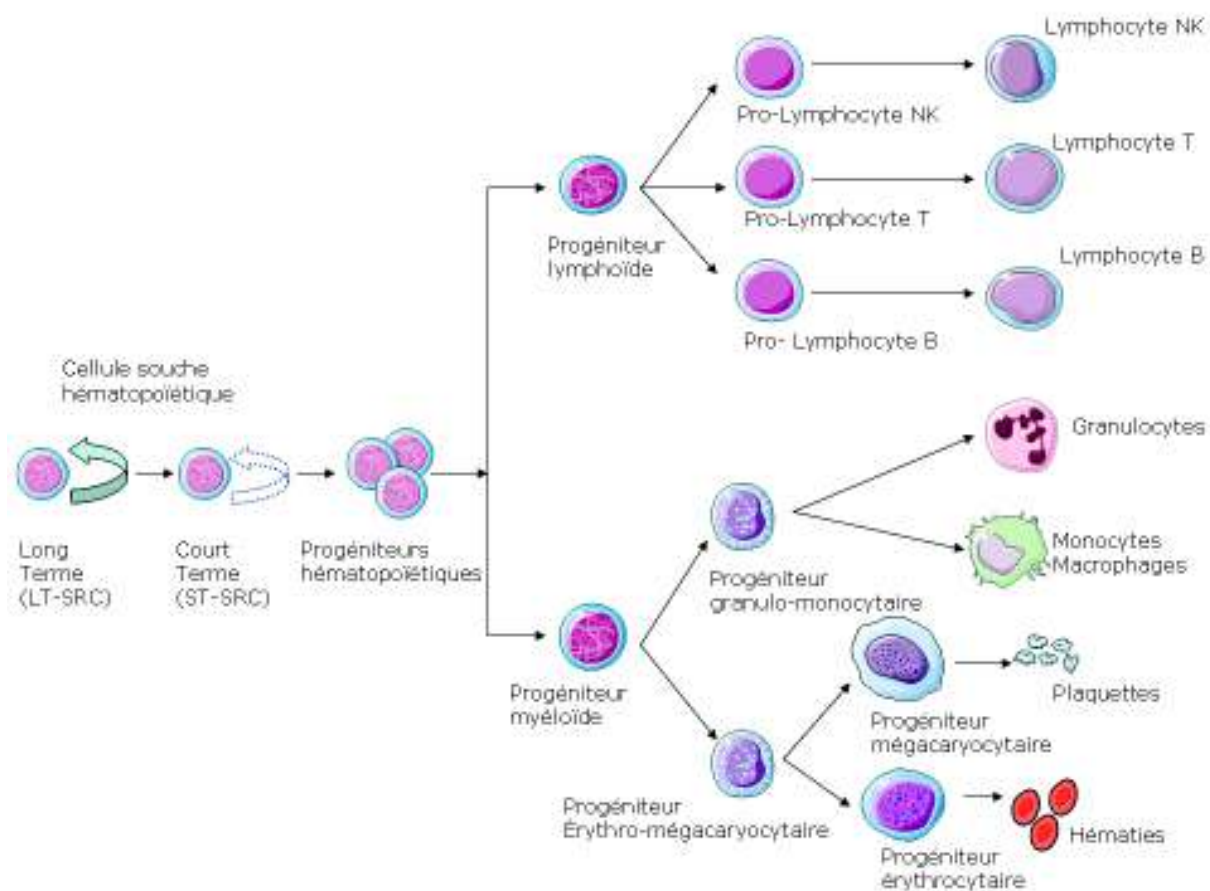
Pour chaque sous-population cellulaire ou pour chaque étape de différenciation, il est représenté les régulateurs apoptotiques inhibiteurs (régulateurs anti-apoptotiques) ou activateurs (régulateurs pro-apoptotiques) (Opferman, 2007)



## **2/ Propriétés et mise en évidence des cellules souches hématopoïétiques**

### **2.1/ Propriétés des cellules souches hématopoïétiques**

Chez l'adulte et en conditions physiologiques, les CSH et PH primitifs sont caractérisées par une activité mitotique peu intense, la majorité d'entre elles sont quiescentes, c'est à dire en phase  $G_0/G_1$  du cycle cellulaire (Nie, Han, & Zou, 2008) (Tipping et al., 2009). Afin de maintenir leur nombre constant, ces cellules sont cependant douées d'une grande capacité de prolifération. Il a été proposé que les CSH se divisent de façon asymétrique, conduisant ainsi à la production d'une cellule fille « identique » à elle-même et une cellule fille différenciée et hautement proliférative. Les mécanismes régissant l'équilibre entre quiescence, auto-renouvellement/prolifération ne sont encore que partiellement identifiés. Parmi les différents facteurs influençant l'auto-renouvellement des CSH, citons : i) les facteurs de transcription tels que HOXB4 (Sauvageau et al., 1995) (Antonchuk, Sauvageau, & Humphries, 2002), ii) les régulateurs du cycle cellulaire tels que p21 (Cheng et al., 2000), iii) les protéines impliquées dans le développement telles que Notch, Sonic Hedgehog et Wnt (Varnum-Finney et al., 2000) (Stier, Cheng, Dombkowski, Carlesso, & Scadden, 2002) (Bhardwaj et al., 2001) et iv) certains gènes modifiant la structure chromatinienne.



**Figure 5 : Organisation hiérarchique de l'hématopoïèse**

Abréviations : LT-SRC : « long term repopulation SCID cells », ST-SRC : « short term repopulation SCID cells », Ly : lymphocyte,

Figure adaptée de : (Reya, Morrison, Clarke, & Weissman, 2001)

## **2.2/ Tests de mise en évidence des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques**

Les techniques d'hématologie expérimentale ont permis de proposer l'existence d'une hiérarchie cellulaire de type pyramidale au sein du système hématopoïétique. Très schématiquement et de façon théorique, on définit trois grands compartiments constitués d'un continuum de cellules avec différents niveaux de maturation (Figures 5 et 6):

Le compartiment des **cellules souches hématopoïétiques**, situé au sommet de la pyramide, représente un pool de cellules capables de se différencier vers les différentes lignées hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes B et T et de reconstituer l'hématopoïèse à long terme après greffes sériées chez la souris irradiée. Ces cellules sont douées d'un potentiel d'autorenouvellement et sont majoritairement quiescentes, bien que présentant une grande capacité de prolifération.

Le compartiment des **progéniteurs hématopoïétiques** comprend les cellules issues de la prolifération et de la différenciation des cellules souches. On y distingue des progéniteurs primitifs, capables d'une prolifération importante et de différenciation vers plusieurs lignages hématopoïétiques et des progéniteurs plus matures, déterminés ou commis vers une, au plus deux, lignées distinctes. Ces cellules ne possèdent plus de capacité d'autorenouvellement.

Les cellules du compartiment des **précurseurs hématopoïétiques** engendrent **les cellules matures**, morphologiquement reconnaissables sur frottis cellulaire et ne se divisant plus. A la fin de ce processus de maturation médullaire, les cellules hématopoïétiques traversent la barrière endothéliale, quittent la moelle et migrent dans la circulation sanguine.

La difficulté majeure rencontrée dans les approches de caractérisation des CSH, réside dans la mise au point de techniques permettant d'étudier l'ensemble des propriétés de ces cellules. A cela s'ajoute, la rareté des CSH (moins de 0,01 à 0,05 % des cellules médullaires), leur hétérogénéité et l'absence de caractère morphologique distinctif. Ainsi, depuis un certain nombre d'années, différentes méthodes d'évaluation *in vivo* et de nombreux tests *in vitro*, associés ou non à des méthodes de caractérisation phénotypique par cytométrie en flux, ont été développées. L'analyse de ces tests *in vivo* ou *in vitro* est cependant rétroactive par étude de la descendance des cellules générées au cours du test. De ce fait, des tests basés sur des caractéristiques fonctionnelles/métaboliques des CSH (fonctionnalité SP et ALDH) ont été récemment développés pour faciliter l'identification, la quantification et surtout l'isolement des CSH.

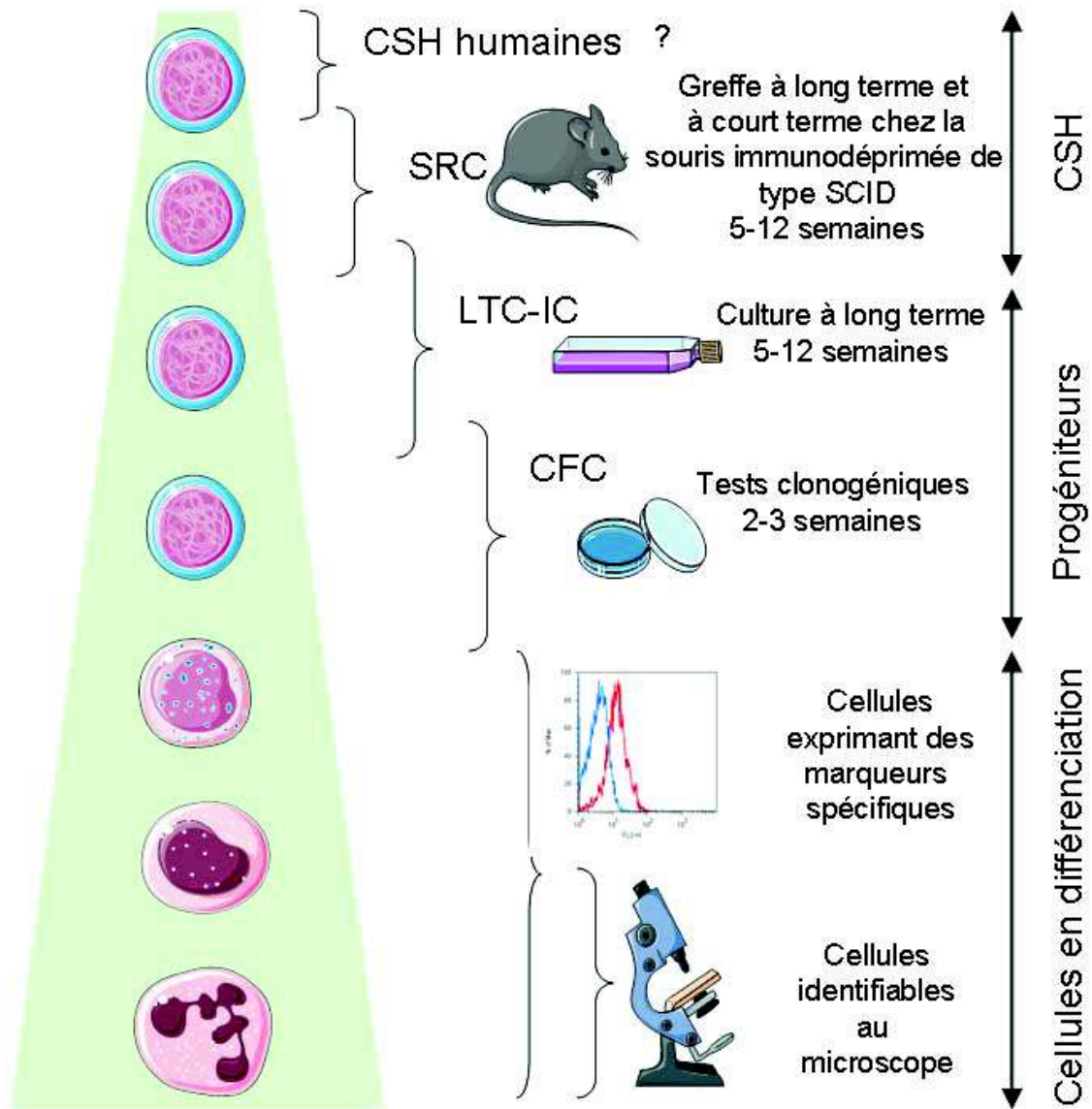
### 2.2.1/ Caractérisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par des tests fonctionnels

La Figure 6 illustre les principaux tests fonctionnels utilisés pour mettre en évidence les différents types de cellules hématopoïétiques.

Les **tests in vivo** les plus couramment utilisés pour identifier les cellules du compartiment souche sont les CFU-S (“Colony Forming Unit Spleen”), chez la souris (Siminovitch, McCulloch, & Till, 1963) et les SRC (SCID Repopulating Cells”) (Bhatia, Bonnet, Murdoch, Gan, & Dick, 1998) que l’on peut subdiviser en « Long term » et « Short term » SRC (LT-SRC et ST-SRC), chez l’homme. Ces tests sont les seuls permettant d’identifier les CSH humaines dans des modèles de souris immunodéficientes (Souris NOD/SCID et autres...) (Coulombel, 2004).

Parmi les **tests fonctionnels in vitro** permettant la caractérisation des PH, trois principaux types de culture ont été développés: i) les cultures de type Dexter où les cellules hématopoïétiques sont mises en culture sur un stroma médullaire (T. D. Allen & Dexter, 1983), ii) les cultures dites « sans stroma » mais en présence de cytokines (Brandt, Srouf, van Besien, Briddell, & Hoffman, 1990) et iii) les cultures de type « stroma non-contact » dans lesquelles les progéniteurs sont séparés du stroma par une membrane microporeuse (C. M. Verfaillie, 1992). On distingue ainsi les tests des « long term culture-initiating cell » (LTC-IC) et les Cobblestone aera-forming cell-assay (CAFC) (Ploemacher, van der Sluijs, van Beurden, Baert, & Chan, 1991) où les cellules hématopoïétiques sont cultivées sur une sous-couche de cellules stromales préalablement irradiées et qui permettent de mesurer la fréquence des progéniteurs hématopoïétiques primitifs dans une suspension cellulaire.

Les **tests en milieu semi-solide** permettent d’identifier et de quantifier les PH plus engagés, de type CFC (“Colony Forming Cells”). Il est ainsi possible de distinguer des colonies issues de progéniteurs primitifs (HPP-CFC, CFU-Blast et CFU-GEMM), des colonies issues de progéniteurs plus engagés de type mégacaryocytaire (CFU-Mk), myélomonocytaire (CFU-GM, CFU-G et CFU-M) ou érythrocytaire (BFU-E “Burst forming unit” et CFU-E) (O'Brien & Horton, 1984).



**Figure 6 : Principaux tests de mise en évidence des différents types de cellules hématopoïétiques humaines**

## **2.2.2/ Caractérisation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques par leurs propriétés métaboliques**

Les CSH et les PH primitifs peuvent également être identifiés et purifiés sur la base de marqueurs métaboliques comme une faible incorporation de colorants vitaux (la Rhodamine 123, le Hoechst-33342) (Wolf, Kone, Priestley, & Bartelmez, 1993) ou de certaines drogues mais aussi une forte expression de l'aldéhyde deshydrogénase.

Cette faible incorporation est liée à l'activité d'une pompe membranaire de type MDR (« Multi-Drug Resistance ») appartenant à la famille des transporteurs ABCG (sous famille ABCG2) qui exfluent le colorant/drogue ayant pénétré dans la cellule (Zhou et al., 2001). En 1996, l'équipe de M. Goodell (Goodell, Brose, Paradis, Conner, & Mulligan, 1996) montrait chez la souris, que les cellules excluant le Hoechst étaient primitives, voire « souches ». Ces cellules, baptisées « SP cells » pour « Side Population », représentent une population cellulaire identifiable en position marginale sur le « côté » d'un cytogramme bi-paramétrique d'exclusion du Hoechst-33342. Depuis, la présence de CSH de type SP a été confirmée dans la moelle osseuse chez l'homme (Arai, Hirao, & Suda, 2005).

L'aldéhyde deshydrogénase (ALDH) est une enzyme de détoxification exprimée dans le foie. Elle est impliquée dans le métabolisme de l'alcool, de la vitamine A et est responsable de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques. Les CSH expriment l'isoforme active l'ALDH1-A1, ce qui leur confère une résistance aux agents alkylants comme le cyclophosphamide (Chute et al., 2006). Dans de nombreux tissus et notamment dans le tissu hématopoïétique, un haut niveau d'activité de l'aldéhyde deshydrogénase est considéré comme un marqueur associé à la nature « souche » d'une cellule (Kastan et al., 1990). Des substrats fluorescents de cette enzyme (BAAA: réactif ALDEFLUOR® ; StemCell technologies) ont récemment été développés dans le but d'identifier et d'isoler, par cytométrie en flux, les CSH humaines.

## **2.2.3/ Caractérisation des progéniteurs hématopoïétiques par l'expression de marqueurs membranaires**

### **2.2.3.1/ La molécule de surface CD34**

La molécule de surface CD34 est une sialomucine exprimée sur les CS et les progéniteurs de nombreux tissus et en particulier dans le tissu hématopoïétique. Son rôle n'est pas connu actuellement mais elle semble participer au processus d'adhésion (Krause, Fackler, Civin, & May, 1996). L'antigène CD34 est exprimé à la surface de 1 à 5 % des cellules

mononucléées de la moelle osseuse humaine. Les cellules CD34<sup>+</sup> représentent une population hétérogène contenant des CSH et des PH, capables de se différencier en cellules myéloïdes (C. Verfaillie, Blakolmer, & McGlave, 1990), en lymphocytes B (Baum, Weissman, Tsukamoto, Buckle, & Peault, 1992), en « natural killer » (Miller, Verfaillie, & McGlave, 1992), en lymphocytes T (Srour et al., 1993). Elles sont capables de greffer (Sutherland, Eaves, Eaves, Dragowska, & Lansdorp, 1989) et de se différencier en cellules sanguines chez des souris immunodéprimées (Bhatia, Wang, Kapp, Bonnet, & Dick, 1997). Toutefois, chez la souris, des cellules hématopoïétiques primitives n'exprimant pas l'antigène CD34 (CD34<sup>-</sup>) sont également capables de reconstituer l'hématopoïèse de souris, démontrant que l'antigène CD34 n'est pas le marqueur « universel » des cellules souches hématopoïétiques (Osawa, Hanada, Hamada, & Nakauchi, 1996).

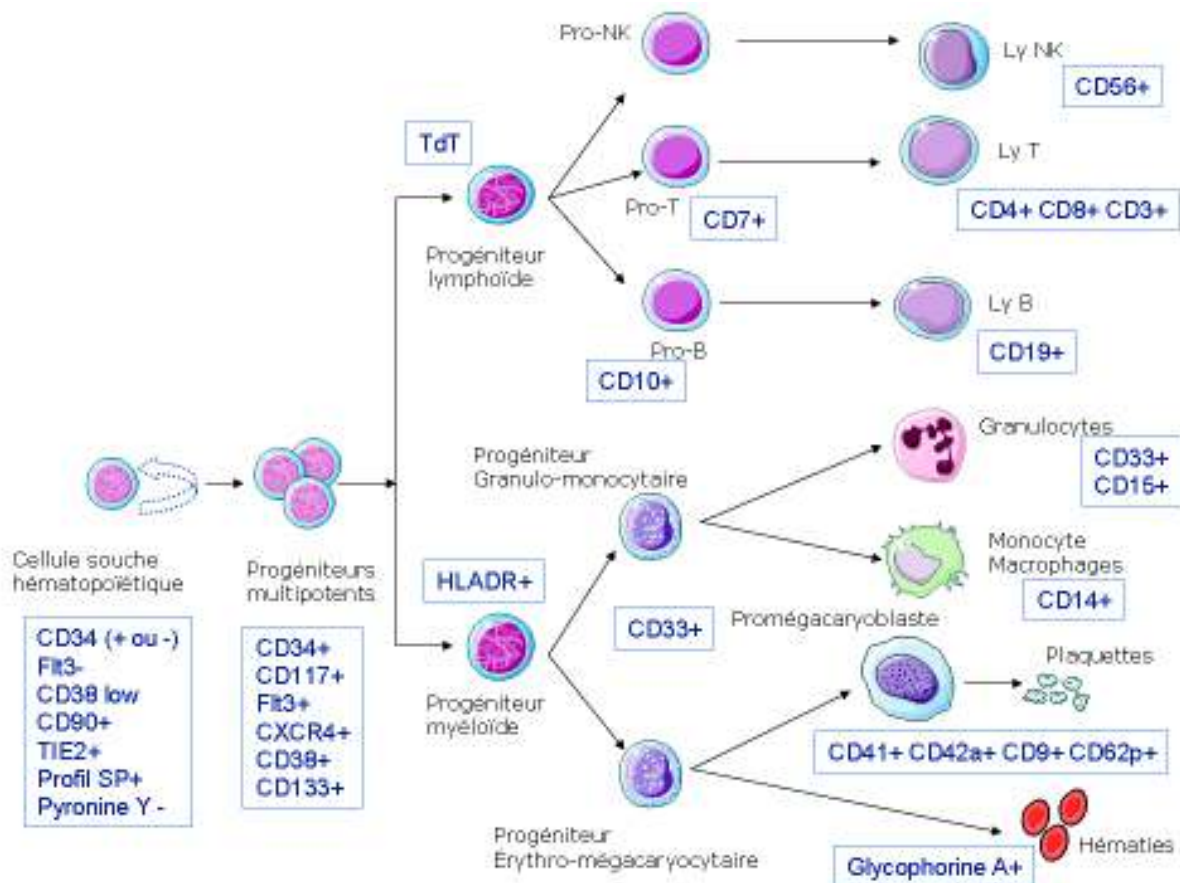
### **2.2.3.2/ Autres marqueurs phénotypiques des progéniteurs hématopoïétiques primitifs**

L'étude du profil d'expression de marqueurs de surface (CD : groupe de différenciation) aide à la caractérisation des progéniteurs hématopoïétiques primitifs et de leur stade de différenciation. Parmi les cellules CD34<sup>+</sup>, la sous fraction CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> est capable de reconstituer le système hématopoïétique de souris immunodéprimées avec des niveaux variables d'efficacité (Hogan, Shpall, & Keller, 2002) (Dick, Bhatia, Gan, Kapp, & Wang, 1997), suggérant la présence de CSH dans cette sous-population. Ainsi, bien que la fraction CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> soit enrichie en CSH, elle ne définit pas la population « souche ». Chez l'homme, l'association du marqueur CD90 (Baum et al., 1992) et du CD105 (endogline), un des récepteurs du TGF-β1 (Pierelli et al., 2001), permet d'enrichir encore cette population en cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques primitifs (Figure 7) (Tableau 1).

CSH	Souris	Homme
hémangioblaste	Fik-1 (Kdr <sup>+</sup> )	ND
pré-CSH (AGM)	CD34 <sup>+</sup> CD41 <sup>+</sup> Sca-1 <sup>-</sup> CD45 <sup>-</sup>	ND
CSH (AGM, placenta)	CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> CD41 <sup>+/-</sup> Sca-1 <sup>+/-</sup>	CD34 <sup>+</sup>
CSH (foie fœtal)	Sca-1 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> Mac1 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup>	CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>
CSH (moelle osseuse)	Sca-1 <sup>+</sup> CD34 <sup>+/-</sup> CD45 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> Rh123 <sup>low</sup> , Hoe3342 <sup>low</sup> PyroninY <sup>low</sup> Aldehyde deshydrogenase <sup>high</sup> Side population cells (SP) CD150 <sup>+</sup> CD48 <sup>-</sup> CD244 <sup>-</sup> (SLAM) 5-FU Résistant Fr25 (small cells) lin <sup>-</sup>	CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>low</sup> CD90 <sup>+</sup> lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CXCR4 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> Rh123 <sup>low</sup> , Hoe3342 <sup>low</sup> , PyroninY <sup>low</sup> ALDH <sup>high</sup> (ALDH <sup>high</sup> CD133 <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup> ) Side population (SP) CD150 <sup>+</sup> CD48 <sup>-</sup> CD244 <sup>-</sup> (SLAM)

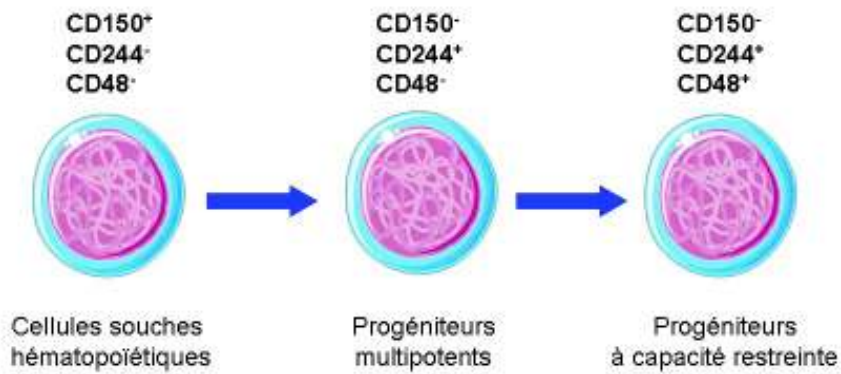
**Tableau 1 : Profil phénotypique, fonctionnel et métabolique des populations enrichies en cellules souches hématopoïétiques chez la souris et chez l'homme au cours du développement**

Abréviations : AGM : aorta gonad mesonephros, ALDH : aldehyde deshydrogénase, 5-FU : fluorouracil, CSH : cellule souche hématopoïétique, ND : le phénotype n'a pas été décrit pour les CSH humaines, SLAM : « signaling lymphocyte activation molecule »



**Figure 7: Principaux marqueurs des cellules hématopoïétiques au cours de la différenciation lypho-myéloïde chez l'homme**





**Figure 8 : Profil d'expression des molécules SLAM chez la souris**  
D'après (Kiel et al., 2005)

Potentiel de repopulation	fort	faible
souris	CSH	PH
CD150	>90%	<2%
CD244	<2%	>90%
CD48	<2%	>90%
homme	CD34+CD38-	CD34+CD38+
CD150	<2%	<2%
CD244	>90%	60-75%
CD48	>90%	60-75%

**Tableau 2 : Comparaison des profils d'expression des molécules SLAM chez l'homme et la souris**  
D'après (Sintes, Romero, Marin, Terhorst, & Engel, 2008)

La famille des « signaling lymphocyte activation molecule » (SLAM) est un groupe de récepteurs de surface de type Ig-like comprenant une dizaine de membres localisés en tandem sur un seul locus du chromosome 1 (Sidorenko & Clark, 2003). C'est la première famille de récepteurs qui, par l'étude de leur expression combinée, permet de distinguer différents types de CSH et de PH primitifs chez la souris : le profil  $CD150^+CD244^-CD48^-$  identifierait les CSH, le profil  $CD150^-CD244^+CD48^-$  est associé aux progéniteurs multipotents et le profil  $CD150^-CD244^+CD48^+$ , aux progéniteurs plus engagés (Kiel et al., 2005) (Figure 8).

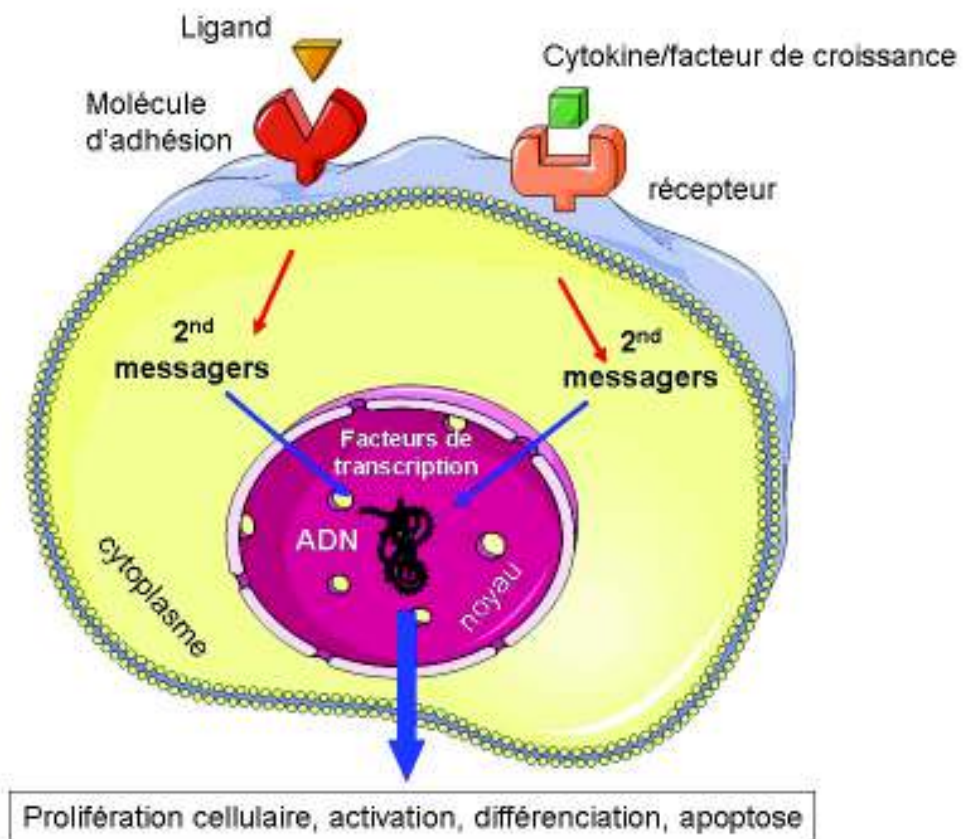
Malgré son expression sur les CSH murines, la molécule CD150 ne semble pas indispensable à l'hématopoïèse car les souris déficientes pour son gène ( $CD150^{-/-}$ ) ne présentent pas d'anomalies hématopoïétiques (N. Wang et al., 2004). Les molécules SLAM sont également exprimées à la surface des CSH/PH humains mais leur profil d'expression est différent de celui de la souris (Sintes et al., 2008) (Tableau 2). Ainsi, les profils SLAM diffèrent entre l'homme et la souris et semblent moins discriminants pour les cellules humaines que pour les cellules murines. Le Tableau (2) et la Figure (8) ci-après, résument les principales caractéristiques phénotypiques, fonctionnelles et métaboliques des CSH humaines et murines ainsi que le profil de différenciation des CSH humaines (Ratajczak, 2008).

En conclusion, de nombreux tests ont été développés au cours des cinquante dernières années, cependant aucun d'entre eux ne remplit l'ensemble des critères permettant d'identifier, de caractériser et surtout de purifier les CSH. La quête d'une possible identification des CSH nécessitera de relier l'ensemble de ces données aux propriétés fondamentales des cellules souches telles que la quiescence, l'autorenouvellement et la capacité de repopulation d'animaux irradiés.

### **3/ Régulation de l'hématopoïèse**

Le système hématopoïétique doit s'adapter à de nombreuses variations qu'elles soient physiologiques, pour maintenir l'homéostasie de l'hématopoïèse ou pathologiques, pour répondre à divers stress comme les hémorragies, les infections, etc... L'hématopoïèse doit donc être finement régulée. Cette régulation fait intervenir des facteurs extrinsèques (interactions cellulaires, cytokines, chemokines et facteurs de croissance) et des facteurs intrinsèques (facteurs de transcription). Les facteurs extrinsèques agissent, par l'intermédiaire de récepteurs ou de contre-récepteurs. Les changements de conformation qui en découlent, induisent l'activation de voies de signalisation, via la génération de seconds messagers. Ces derniers activent à leur tour des facteurs de transcription spécifiques dont l'action coordonnée permet le recrutement de cofacteurs et l'expression des gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie et la différenciation (Rosenbauer & Tenen, 2007) (Figure 9). Des modifications épigénétiques jouent également un rôle important dans la régulation de l'hématopoïèse en modifiant l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN, avec pour conséquence, une modification spécifique de la transcription des gènes (Bottardi, Ghiam, Bergeron, & Milot, 2007).

Si le rôle des différents acteurs de la régulation des CSH a été largement exploré et commence à être mieux connu, il est actuellement difficile de leur attribuer une fonction unique dans la régulation des CSH. Il est, en effet, très vraisemblable que de multiples combinaisons soient à l'origine de leurs actions finales sur l'hématopoïèse et l'orchestration de cette harmonie au sein des niches médullaires reste à préciser.



**Figure 9 : Transmission du signal de la membrane au noyau**

Les facteurs extrinsèques (facteurs de croissance et autres ligands membranaires) agissent, par l'intermédiaire de récepteurs ou de molécules d'adhésion, de concert avec des facteurs intrinsèques pour induire l'activation de seconds (2<sup>nd</sup>) messagers. Il en résulte la fixation des facteurs de transcription sur l'ADN avec, pour conséquence, la transcription de gènes impliqués dans la survie, la prolifération, l'apoptose et la différenciation.

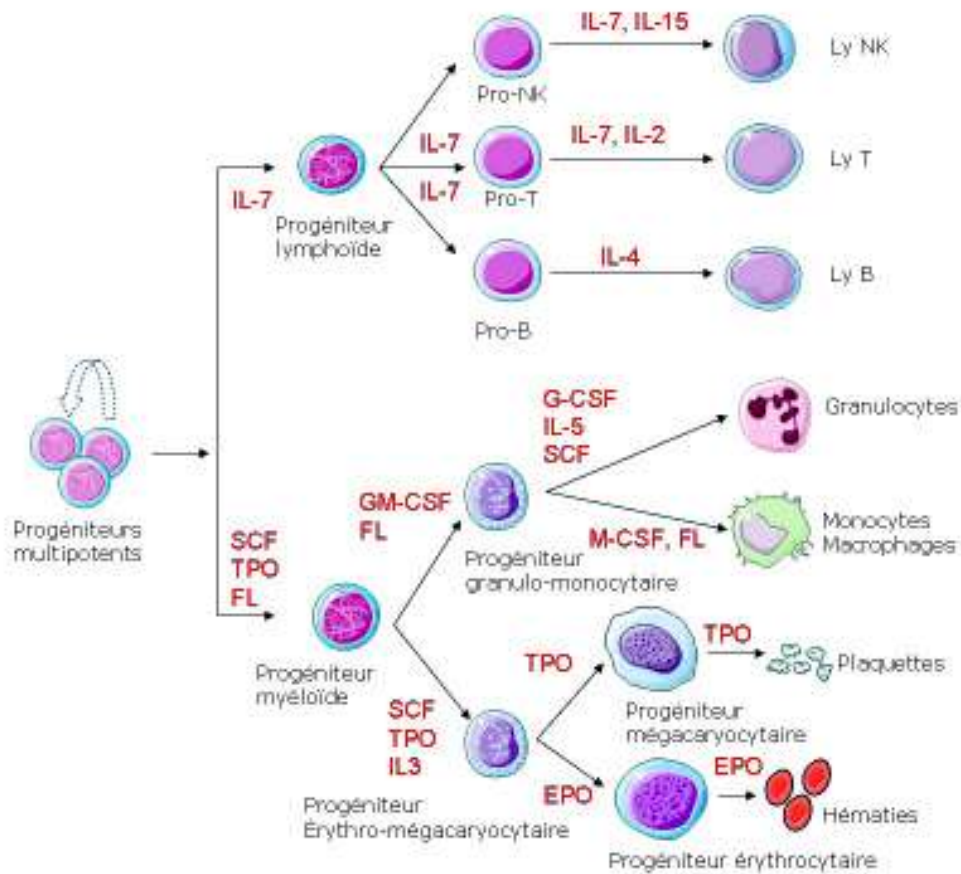
### **3.1/ Les cytokines et facteurs de croissance**

Les cytokines appartiennent à un groupe de facteurs de croissance polypeptidiques de petit poids moléculaire qui se fixent à des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules. Cette fixation entraîne une signalisation intracellulaire conduisant à une modulation de l'expression des gènes (Baker, Rane, & Reddy, 2007) (Robb, 2007). Deux hypothèses principales sont proposées : un modèle « instructif » et un modèle « stochastique ». Dans le modèle instructif, l'acquisition progressive de molécules de surface et de récepteurs détermine l'engagement de la cellule en fonction des messages adressés par son environnement. Dans le modèle stochastique, ou théorie dite permissive, la présence de facteurs de croissance ou de cytokines ne ferait que faciliter ou stabiliser un engagement déjà programmé par la mise en jeu de facteurs de transcription. La Figure (10) illustre le niveau d'action de quelques cytokines clés au cours de la différenciation myéloïde et lymphoïde.

Il existe 3 familles principales de récepteurs de surface : les récepteurs à canaux ioniques, les récepteurs à protéines G et les récepteurs couplés à des enzymes, de type kinase. Cette dernière famille est principalement impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse via des récepteurs à activité kinase (tyrosine ou sérine/thréonine) intrinsèque ou des récepteurs associés à des tyrosine kinases cellulaires.

### **3.2/ Les récepteurs des cytokines**

Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques peuvent être classés en fonction du type de motifs présents dans leur domaine extracellulaire. Ils peuvent également être subdivisés en sous-familles selon le nombre de sous-unités et/ou la présence d'une ou plusieurs sous-unités communes (Stahl & Yancopoulos, 1993).



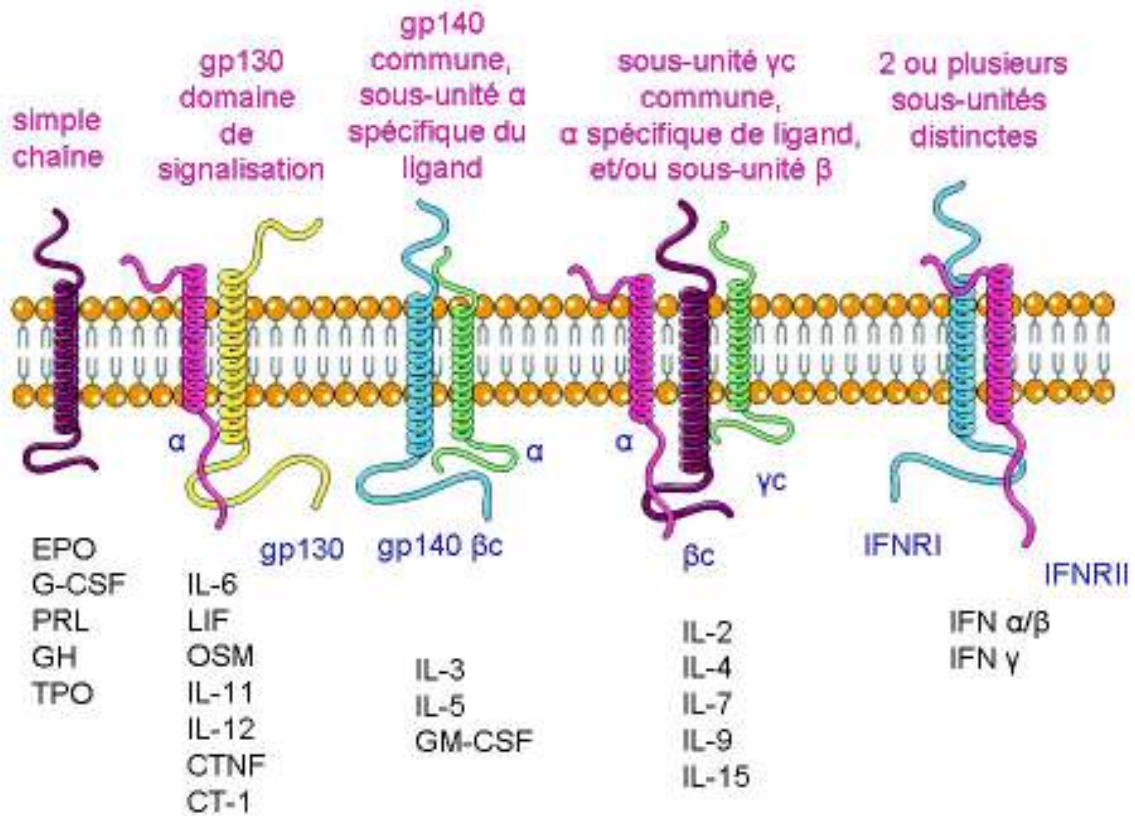
**Figure 10 : Cellules cibles de l'action des cytokines et des facteurs de croissance au cours de la différenciation hématopoïétique**  
 D'après (Robb, 2007)

**La première classification** repose sur la présence de certains motifs protéiques. Ils sont alors classés en récepteur de type I ou II.

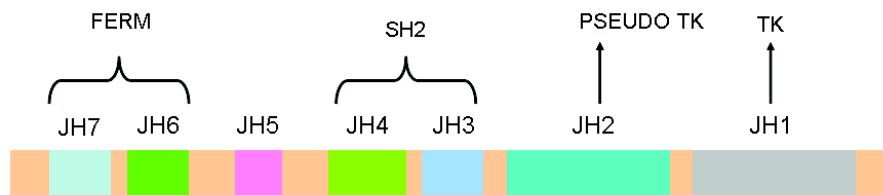
Les récepteurs de type I partagent des propriétés basiques structurales caractérisées par la présence de 4 résidus cystéine conservés, d'un motif tryptophan-serine-x-serine-tryptophan, d'un domaine fibronectine de type III dans la partie extra-cellulaire du récepteur et des régions conservées Box1/Box2 dans le domaine intracytoplasmique proximal à la membrane. Les récepteurs de type I peuvent être homodimériques ou hétérodimériques. Les récepteurs des cytokines sont composés de dimères de récepteurs simples, comme celui du G-CSF, celui de l'EPO (EPO-R) et celui de la TPO (MPL). Ils peuvent également être hétérodimériques avec une chaîne de signalisation commune et une chaîne unique de liaison au ligand. Ces récepteurs hétérodimériques peuvent être classés en plusieurs groupes : i) les récepteurs partageant une chaîne beta commune (GM-CSFR alpha, IL-3R alpha, IL-5R alpha), ii) les récepteurs partageant la chaîne gp130 (IL-6R alpha, LIFR beta, ciliary neurotrophic factor receptor alpha, IL-11R alpha, oncostatin M receptor alpha, cardiotrophin-like cytokine factor 1) et iii) les récepteurs partageant une chaîne gamma commune (IL-2R alpha, IL-2R beta, IL-4R alpha, IL-7R alpha, IL-9R alpha, IL-13R alpha, IL-15R alpha, IL-21R alpha).

Les récepteurs de type II, tels que les récepteurs aux interférons et à l'IL-10, conservent les Box1/2 mais ne possèdent pas le motif tryptophan-serine-x-serine-tryptophan.

**La seconde classification** est basée sur la présence ou non d'une chaîne commune à d'autres récepteurs (Figure 11). Bien que se recoupant, ces deux classifications ne sont pas redondantes car la première, basée sur la présence de motifs protéiques, comprend à la fois des récepteurs homo et hétéro dimériques. En revanche, la seconde est essentiellement basée sur la présence de chaînes communes (sauf pour les récepteurs monomériques).



**Figure 11 : Représentation schématique des familles de récepteurs aux cytokines selon la présence de chaînes communes**  
 D'après (Baker et al., 2007)



**Figure 12 : Structure des Janus kinases (Jak).**

Les protéines Jak possèdent 4 domaines fonctionnels: le domaine FERM, le domaine src homologue 2 (SH2), le domaine pseudo-tyrosine kinase (PSEUDO TK), et le domaine tyrosine kinase (TK) à activité catalytique. Le domaine SH2 régule négativement l'activité de la protéine JAK. Les domaines FERM (liaison des partenaires) et SH2 servent comme domaines d'association et de liaison aux phosphotyrosines.

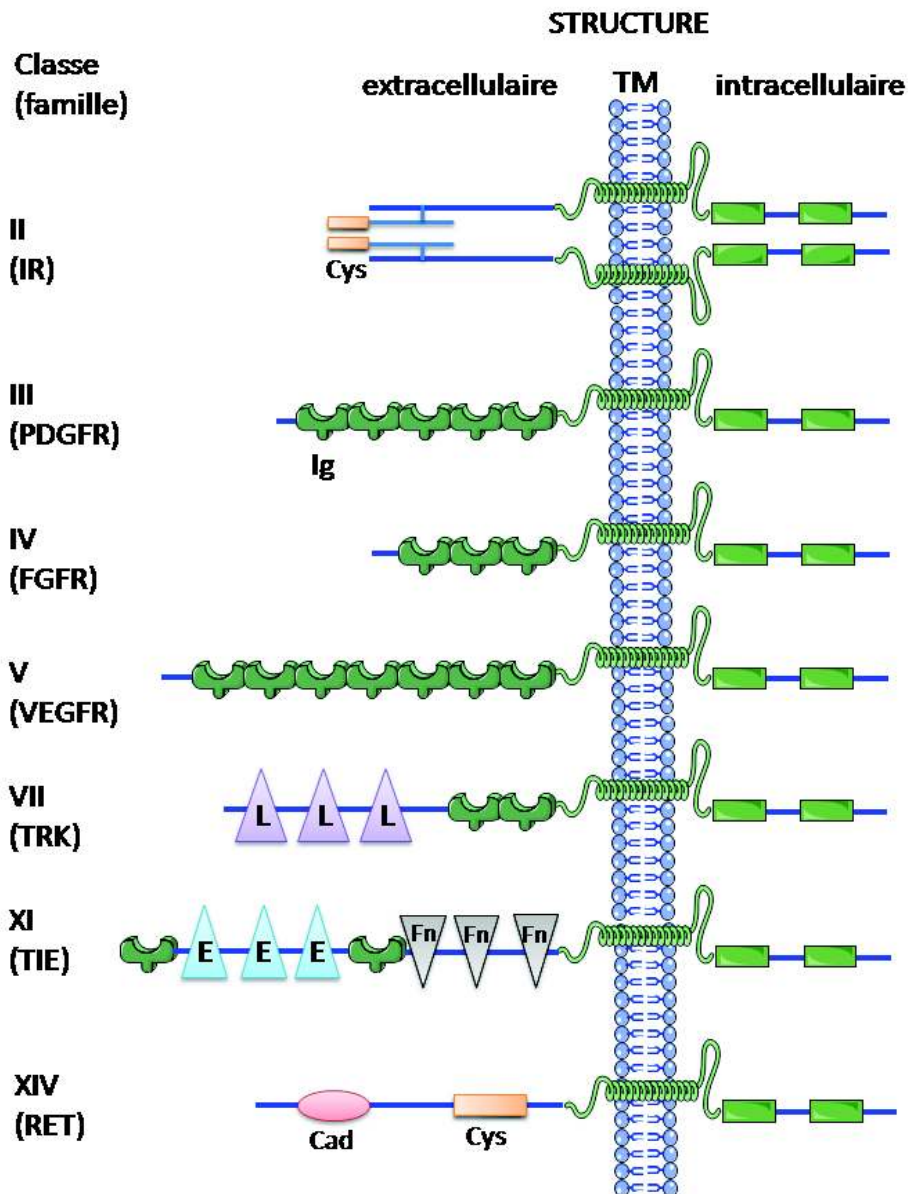


### **3.3/ Transduction du signal des récepteurs des cytokines via les Janus tyrosine kinases (Jaks)**

Les récepteurs des cytokines ont un seul domaine transmembranaire et leur domaine cytoplasmique est dépourvu d'activité kinase. Cependant, la fixation d'une cytokine à son récepteur conduit à la phosphorylation de protéines cellulaires sur des résidus tyrosine. En effet, les tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille Jak sont préassociées à la région juxta-membranaire du domaine cytoplasmique du récepteur aux cytokines et sont activées après fixation du ligand (Kishimoto, Taga, & Akira, 1994). Ainsi, le mode de fonctionnement des récepteurs de cytokines présente de nombreuses similarités avec celui des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) décrits ultérieurement. Chez les mammifères, il n'existe que quatre JAK (JAK-1, -2 et -3, TYK-2) pour un nombre important de récepteurs de cytokines ; chaque JAK est associée dans une combinaison bien établie à plusieurs chaînes de récepteurs, à l'exception de JAK-3 qui ne se fixe qu'à la chaîne  $\gamma_c$ , suggérant l'existence de nombreux carrefours de signalisation.

Les récepteurs des cytokines interagissent avec le domaine FERM des tyrosines kinases Jaks via leurs régions conservées Box1/Box2 dans le domaine intracytoplasmique proximal à la membrane. L'activité tyrosine kinase du récepteur est portée par le domaine JH1. L'importance du domaine JH2 dans la régulation du domaine effecteur tyrosine kinase JH1 a été en particulier soulignée chez les patients présentant un NMP associé à la mutation Jak2V617F. Siégeant au niveau du domaine pseudotyrosine kinase JH2, cette mutation a comme conséquence une perte de l'inhibition du domaine JH2 sur le domaine JH1 (Baker et al., 2007). La Figure (12) représente l'exemple de la protéine Jak2 avec ces différents domaines fonctionnels.

Le signal initié dans le cytoplasme est ensuite transduit dans le noyau par l'intermédiaire d'un groupe de facteurs de transcription nommés les « signal transducers and activators of transcription » (STATs) qui ont activé la transcription de gènes cibles (Darnell, Kerr, & Stark, 1994).



**Figure 13 : Représentation des familles de RTK exprimés dans le tissu hématopoïétique.**

Parmi les familles de récepteurs à activité TK, citons : IR, récepteur l'insuline ; PDGFR, récepteur au « platelet-derived growth factor »; FGFR, récepteur au « fibroblast growth factor »; VEGFR, récepteur au « vascular endothelial growth factor »; TRK, récepteur à la tropomyosine; TIE, tyrosine kinase avec domaines Ig et EGF homologues; RET, « REarranged during Transfection» (Reilly, 2003)

Cad : motif cadhérine ; Cys : région riche en cystéine ; E : répétition EGF homologue ; Fn : répétition fibronectine III ; Ig : répétition immunoglobuline homologue ; L : motif riche en leucine ; TM : transmembranaire.

### **3.4/ Les récepteurs à activité tyrosine kinase**

Outre les récepteurs aux cytokines classiques s'associant aux protéines Jaks intracellulaires, il existe des récepteurs à activité kinase intrinsèque de type tyrosine kinase (RTK) et sérine/thréonine kinase. Le génome humain contient environ 520 gènes codant pour des protéines kinases, une soixantaine d'entre elles correspondent à des récepteurs à activité tyrosine kinase (Manning, Whyte, Martinez, Hunter, & Sudarsanam, 2002). Ces récepteurs sont répartis approximativement dans plus de 20 classes différentes en raison de leurs caractéristiques structurales. Chacun d'eux partage une structure commune qui inclut un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine simple transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (Reilly, 2003).

Les RTK sont majoritairement composés d'une seule chaîne polypeptidique qui comporte un domaine extracellulaire de liaison au ligand et une partie cytoplasmique portant l'activité enzymatique. La fixation du ligand conduit à la dimérisation du récepteur suivie de son activation par modification conformationnelle et par transphosphorylation sur résidu tyrosine.

Différentes classes de RTK ont été définies en fonction des motifs d'affinité protéique présents sur leurs domaines extracellulaires. Certaines classes de RTK (classes II à V, VII, IX et XIV) sont exprimées dans le tissu hématopoïétique et de nombreux sont impliquées dans la pathogénèse des leucémies (Gupta, Knight, & Bain, 2002). La Figure 13 est une représentation simplifiée des différentes classes de récepteurs à activité tyrosine kinase où la classe III regroupe des récepteurs majeurs de l'hématopoïèse tels que c-KIT, c-FMS, les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  du PDGF et Flt3.

Les **RTK de classe II** comprennent le récepteur à l'insuline (IR) qui, contrairement autres RTK, n'est pas monomérique. Les facteurs de croissance « insulin-like » régulent la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques via leurs récepteurs spécifiques présents à la surface des érythrocytes, des monocytes, des lymphocytes B et T (Zumkeller, 2002). L'hypersensibilité à l'IGF-1 est un élément pathogénique important dans la *Polycythemia vera* (Correa, Eskinazi, & Axelrad, 1994).

Les **RTK de classe III** sont caractérisés par 5 domaines homologues aux immunoglobulines dans la partie extracellulaire de liaison au ligand. Ces récepteurs comprennent c-Kit (Yarden et al., 1987), Flt3 (Rosnet et al., 1993), PDGFR $\alpha$  (Claesson-Welsh, Eriksson, Westermarck, & Heldin, 1989), PDGFR $\beta$  (Yarden et al., 1986) et c-FMS

(Coussens et al., 1986). Flt3 et c-KIT jouent un rôle important dans la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques primitifs ; c-FMS, le récepteur pour le « macrophage colony-stimulating factor » (M-CSF) est impliqué dans la croissance et la différenciation des monocytes/macrophages et des précurseurs ostéoclastiques. Le rôle du PDGFR $\beta$  dans l'hématopoïèse est encore mal connu : il joue vraisemblablement un rôle dans la mégacaryopoïèse (M. Yang, Khachigian, Hicks, Chesterman, & Chong, 1997). Nous détaillerons ultérieurement (cf. Chapitre § 9), le rôle du couple FL/Flt3 dans la régulation de l'hématopoïèse.

Les **RTK de classe IV** correspondent à la famille des récepteurs aux « fibroblast growth factors » (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4) caractérisés par la présence de 3 domaines homologues aux immunoglobulines dans la partie extracellulaire. Un remaniement du gène *FGFR-1* (8p11~12) a été décrit dans des néoplasmes myéloprolifératifs atypiques (Macdonald, Aguiar, Mason, Goldman, & Cross, 1995).

Les **RTK de classe V** regroupent la famille des « vascular endothelial growth factor receptor » (VEGFR) comprenant : VEGFR-1 (flt1), VEGFR-2 (KDR/flk-1), VEGFR-3 (flt-4) (Veikkola, Karkkainen, Claesson-Welsh, & Alitalo, 2000). Ils possèdent 7 domaines de type immunoglobulines dans la partie extracellulaire. L'expression des ARNm messagers des VEGFR-1 et VEGFR-2 est retrouvée dans certaines lignées cellulaires leucémiques alors qu'elle est absente dans les progéniteurs normaux (Ratajczak et al., 1998).

Les **RTK de classe VII** identifient la famille des récepteurs « tropomyosin receptor » (TRK) caractérisés par des répétitions riches en leucine dans leur domaine extracellulaire. Ces récepteurs à la neurotrophine sont exprimés sur les érythroblastes immatures (TrkA), métamyélocytes éosinophiles (TrkB), promyélocytes, myélocytes et mégacaryocytes (TrkC) sans que l'on connaisse leur rôle précis sur ces cellules (Labouyrie et al., 1999).

Les **RTK de classe IX** tels que ceux de la famille des récepteurs TIE : Tie-1 et Tie-2 (Tek) sont caractérisés par une région extracellulaire contenant trois répétitions de type fibronectine III, un domaine immunoglobuline homologue et trois répétitions EGF homologues. L'expression élevée de Tie-1 dans les leucémies aiguës et les syndromes myélodysplasiques suggère qu'il joue un rôle important dans l'angiogénèse et l'hématopoïèse pathologique (Verstovsek et al., 2001).

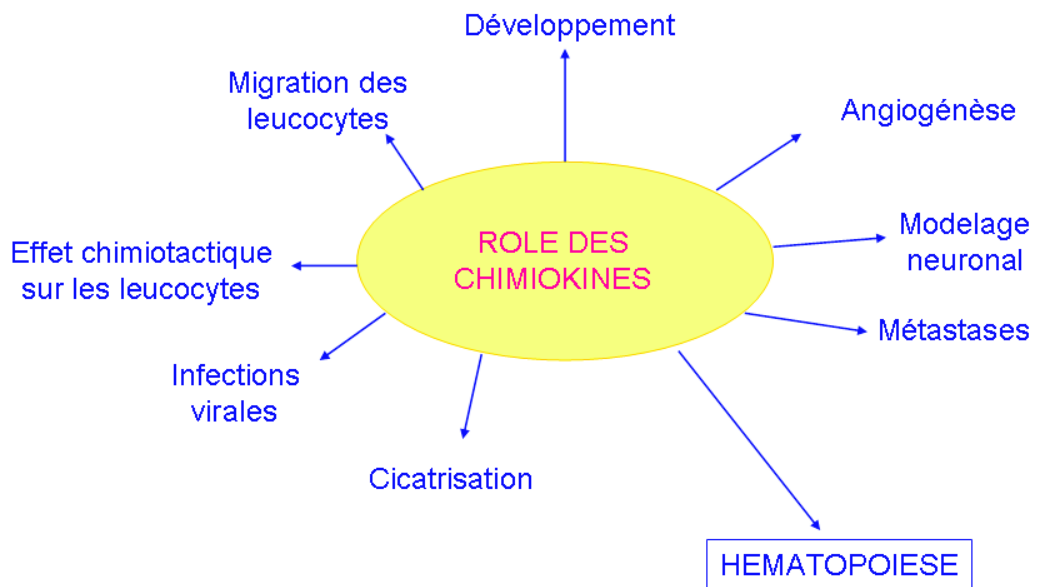
## **4/ Les chimiokines et les récepteurs aux chimiokines**

Les chimiokines peuvent être classées de deux façons selon des critères fonctionnels ou structuraux. Selon leurs fonctions, elles se répartissent en deux groupes : les chimiokines inductibles (inflammation) et les chimiokines constitutives (homéostatiques). Selon leur structure protéique, elles s'individualisent en quatre groupes : les C-, CC-, CXC- et CX<sub>3</sub>C- chimiokines. Cette classification structurale est cohérente avec la cartographie des gènes codant pour ces dernières (Rollins, 1997). La structure quaternaire de ces glycoprotéines fait intervenir des ponts disulfures entre les cystéines présentes à l'extrémité NH<sub>2</sub> et les cystéines centrales. Contrairement aux cytokines, les chimiokines se fixent à des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). De même, à la différence des cytokines à récepteur unique, les chimiokines peuvent avoir plusieurs récepteurs et certains récepteurs aux chimiokines peuvent fixer plusieurs chimiokines.

Les chimiokines appartiennent à une famille de glycoprotéines (40 à 50 membres), de faible poids moléculaire (8 à 12 kDa), décrite au cours des années 1990. Elles présentent des propriétés chimio-attractives sur des populations cellulaires spécifiques, d'où leur nom de « chimiokine » qui résulte de la condensation de « chimiotactisme et cytokine ». D'un point de vue fonctionnel, les chimiokines interviennent dans plusieurs situations physiologiques et physiopathologiques (Figure 14). Dans le chapitre ultérieur (Chapitre §5), nous exposerons plus particulièrement leur rôle dans la mobilisation des CSH.

## **5/ La mobilisation des cellules souches hématopoïétiques**

La mobilisation des cellules souches hématopoïétiques résulte à la fois de la perte des contacts entre les cellules ou avec la matrice extracellulaire (via la sous-expression des molécules d'adhérence) et d'une désensibilisation de la signalisation des chimiokines, en particulier du couple CXCL12 (SDF-1)/CXCR4. A l'inverse, le « nichage », c'est-à-dire le maintien des cellules souches dans leur niche, nécessite la surexpression des molécules d'adhésion et une activation de l'axe CXCL12/CXCR4 (Lapidot, Dar, & Kollet, 2005).



**Figure 14 : Principales activités biologiques des chimiokines**  
D'après (Lortat-Jacob, Grosdidier, & Imberty, 2002)

## **5.1/ Migration des cellules souches hématopoïétiques au cours de l'ontogénie**

Au cours du développement embryonnaire, avant le développement de la vascularisation, les cellules souches hématopoïétiques sont localisées dans le sac vitellin et la région aorta-gonado-mesonephros (AGM), puis elles migrent vers le foie fœtal et la moelle osseuse (Medvinsky & Dzierzak, 1996). Ces cellules peuvent être mobilisées dans la circulation sanguine à l'exception des rares cellules souches qui sont maintenues dans la moelle osseuse à l'âge adulte (Morrison et al., 1995). Immédiatement après la naissance, le sang de cordon humain contient un nombre élevé de progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (environ 0,5%) dont des cellules primitives de type CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>low</sup>, suggérant une migration importante des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques dans les phases tardives du développement (Broxmeyer, 1996).

## **5.2/ Circulation des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques adultes**

A l'état adulte, la majorité des cellules souches hématopoïétiques siègent dans la moelle osseuse où elles s'auto-renouvellent, prolifèrent et donnent naissance à des cellules hématopoïétiques différenciées. Certaines de ces CSH quittent la moelle osseuse et migrent, via le sang, vers les organes périphériques, particulièrement lymphoïdes, où elles se divisent et se différencient. Les CSH circulantes peuvent se lier aux cellules endothéliales grâce aux sélectines vasculaires qui s'associent au CD44 et à la « P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 » (PSGL-1) présents sur les CSH. L'interaction du VCAM-1 endothélial avec l'intégrine VLA-4 permet à la CSH de « rouler » à l'intérieur du vaisseau sanguin. Le gradient de CXCL12/SDF1 active le VLA-4 par un changement conformationnel qui augmente son affinité pour VCAM-1, augmentant la fixation des CSH à la paroi interne du vaisseau et diminue leur roulement. Les CSH traversent alors la paroi endothéliale et migrent dans la moelle osseuse grâce à l'action d'agents chimiotactiques dont le message est transduit via les GPCR présents sur les CSH (Laird, von Andrian, & Wagers, 2008).

### **5.3/ Mobilisation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques**

Une augmentation du taux de cellules souches et progéniteurs circulants peut être observée lors d'une inflammation, d'un traumatisme ou d'une lésion tissulaire (Fu & Liesveld, 2000). Ainsi, le passage des cellules souches et progéniteurs dans la circulation et leur retour vers la moelle osseuse sont des événements séquentiels importants à l'équilibre homéostatique. Le concept de niche occupée par des cellules souches quiescentes dans la moelle osseuse se complexifie par l'existence d'une situation plus dynamique intégrant migration, circulation et nichage dans la moelle osseuse (Lapidot & Petit, 2002). La mobilisation des cellules souches peut être provoquée en réponse à la chimiothérapie mais également après un traitement par des cytokines ou différents agents mobilisateurs tels que le G-CSF ou l'AMD3100, un antagoniste du récepteur CXCR4 de la chimiokine CXCL12 (Tableau 3) (To, Haylock, Simmons, & Juttner, 1997).

Comparativement à la mobilisation induite par les cytokines (de l'ordre de quelques jours), celle provoquée par les chimiokines est très rapide avec un pic de mobilisation dans les 60 minutes suivant l'injection, suggérant des mécanismes différents (Pelus, Horowitz, Cooper, & King, 2002) (Pruijt, Willemze, & Fibbe, 1999).

### **5.4/ Migration des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques en réponse au ligand de Flt3**

Le ligand de Flt3 (FL) facilite la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques *in vivo*. En effet, il stimule la migration des cellules CD34<sup>+</sup> de donneurs sains lorsqu'il est utilisé seul et augmente de façon synergique celle induite par SDF-1/CXCL12 (Fukuda, Broxmeyer, & Pelus, 2005). De façon intéressante, il a été montré, chez les grands sportifs, une augmentation du Flt3-ligand plasmatique pendant l'effort et une élévation du nombre de progéniteurs circulants mais pas immédiatement après l'effort (Bonsignore et al., 2002). Ceci suggère que la cytokine FL pourrait intervenir physiologiquement dans la régulation de la circulation des PH d'une façon relativement lente comme ceci est montré dans le tableau 3 lorsque FL (Flt3-ligand) est utilisé comme agent mobilisateur chez l'homme.



Classe d'agents	Temps maximal de mobilisation	Exemples	Mécanismes
Chimiokines	15 minutes à quelques heures	CCL3, CXCL2, CXCL8, CXCL12, antagoniste CXCR4 (AMD3100)	Activation granulocytaire directe, blocage de la fonction de CXCR4
Stress	1-2 heures	Exercice intense, ACTH	Demargination, activation des granulocytes ?
Polyanions	1-2 heures	Fucoidans	Libération de cytokines et chimiokines du compartiment intracellulaire au compartiment extracellulaire.
	5 jours	Sulfate de Dextran Acide polyméthacrylique Defibrotide	ND ND
Toxines	2-3 jours	Toxine Pertussis	bloque la signalisation CXCR4
	ND	Endotoxines bactériennes	ND
Anticorps	1-2 jours	Anti-CD49d, anti-VCAM-1	Inhibition directe de l'interaction VLA4-VCAM-1
Facteurs de croissance	4-6 jours	G-CSF, G-CSF pegylé, SCF, IL-3, GM-CSF, Flt3-ligand, Thrombopoïétine, hormone de croissance, érythropoïétine, VEGF, angiopoïétine-1	Expansion et activation des granulocytes, Synergie avec le G-CSF, ND
Myélosuppresseurs	1-3 semaines	Cyclophosphamide, 5-FU	Expansion de granulocytes, activation suivant la myélo-suppression

**Tableau 3 : Principaux agents mobilisateurs des CSH/PH**  
(ND : non déterminé) (Winkler & Levesque, 2006)

## 6/ La niche hématopoïétique

Comme nous l'avons précisé en introduction, les CSH résident dans la moelle osseuse au sein de niches spécifiques. Ce concept de niche, initialement proposé par Schofield (1978), repose sur une réalité anatomique et fonctionnelle favorisant le maintien en quiescence et l'auto-renouvellement des CSH.

Bien que controversées, les connaissances actuelles font état de l'existence de 2 types de niches hématopoïétiques : la niche endostéale et la niche vasculaire (Yin & Li, 2006) (Figure 15). La niche endostéale, au contact de l'os, serait impliquée dans le maintien en quiescence des CSH. Elle est constituée d'ostéoblastes, de fibroblastes et d'adipocytes ayant tous pour origine la cellule souche mésenchymateuse (CSM), ainsi que d'ostéoclastes, d'origine hématopoïétique, impliqués dans la résorption osseuse. La niche vasculaire, quant à elle, consiste en un réseau de vaisseaux fenêtrés formés par des cellules endothéliales dérivant de la cellule souche endothéliale (CSE). Bien que participant à la prolifération et différenciation des CSH, des études récentes de l'équipe de Rafii suggèrent que la niche vasculaire aurait également un rôle dans leur autorenouvellement (Kobayashi et al., 2010).

Les CSH entretiennent un dialogue constant avec leur niche où elles sont régulées via des contacts directs avec les différentes cellules stromales et les molécules de la matrice extracellulaire (Stier et al., 2005), ainsi que *via* des interactions avec des facteurs diffusibles et environnementaux tels que le calcium (G. B. Adams et al., 2006) et l'oxygène. Un certain nombre de couples ligands/récepteurs (Calvi et al., 2003) (Arai et al., 2004) et de molécules d'adhérence sont impliqués dans les interactions entre l'ostéoblaste et la CSH et réguleraient l'équilibre quiescence/auto-renouvellement de ces dernières. Les facteurs diffusibles sont, quant à eux, représentés par certaines hormones, des BMPs (bone morphogenic protein), des cytokines et chimiokines (Levesque, Helwani, & Winkler, 2010). En dehors de ces interactions cellulaires et humorales, l'importance du système nerveux sympathique dans la régulation des CSH au sein des niches médullaires a été récemment suggérée (Lapidot & Kollet, 2010).

En condition physiologique, les CSH résident aussi bien dans la niche ostéoblastique que dans la niche vasculaire. En réponse à une diminution du taux de SDF-1/CXCL12 dans la moelle osseuse, certaines CSH vont quitter leur niche et circuler. Le nichage des CSH est le processus inverse de la mobilisation et apparaît en particulier lors d'une augmentation du gradient de SDF-1 dans la moelle osseuse. Le processus de recrutement des progéniteurs

hématopoïétiques (PH) au niveau de la niche vasculaire semble dépendre de la production de FGF-4 et SDF-1 par la cellule endothéliale. Le gradient en oxygène et en FGF-4 entre la niche ostéoblastique et la niche vasculaire joue également un rôle dans le recrutement, la prolifération et la différenciation des CSH. Sous l'effet d'un stress, SDF-1 et VEGF activent la MMP9 qui clive le SCF membranaire et favorise l'entrée en cycle des CSH, leur mobilisation vers la niche vasculaire et leur différenciation (Yin & Li, 2006) (Lataillade et al., 2000) (Lataillade et al., 2002).

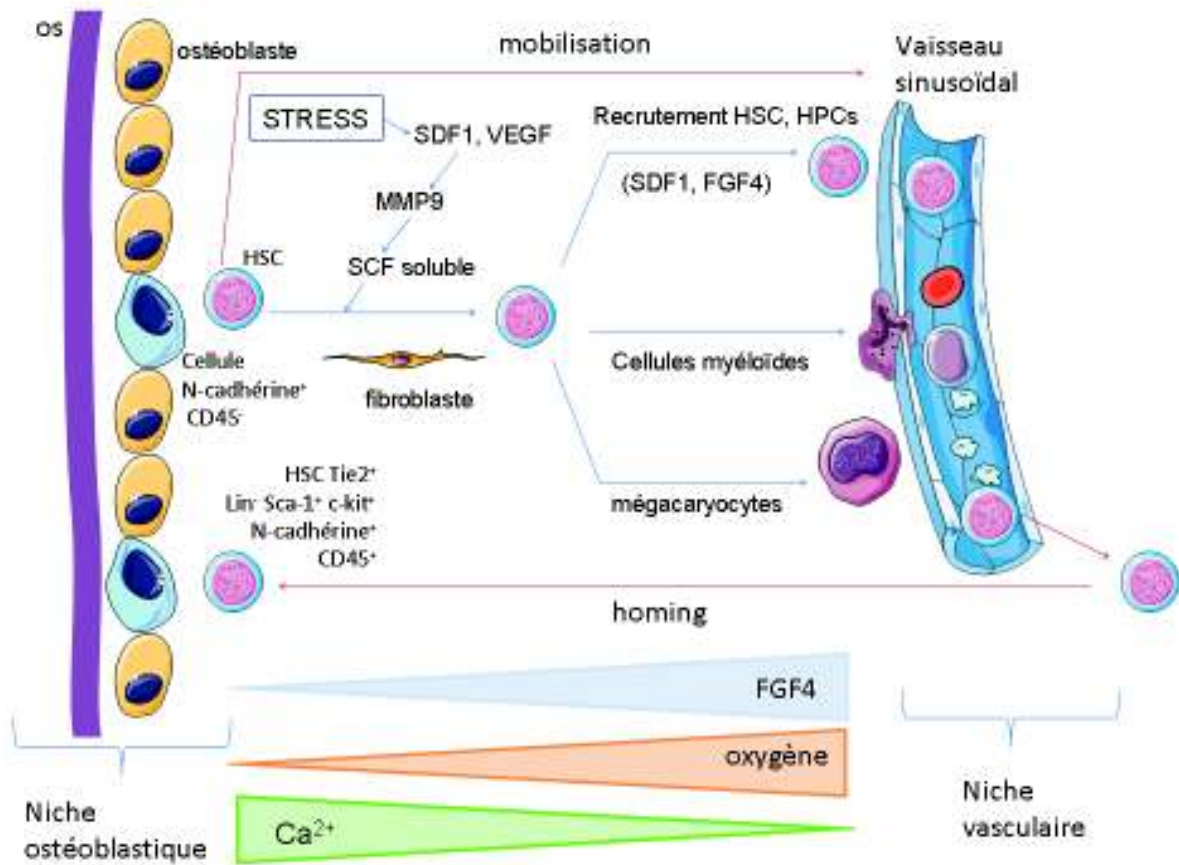
Les niches médullaires sont donc un environnement « critique » pour le maintien en quiescence et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Ce sont des sanctuaires des CSH ; leur altérations peuvent conduire et/ou participer à la genèse des hémopathies (Raaijmakers & Scadden, 2008).

## **6.1/ Principales cellules constituant les niches hématopoïétiques**

### **6.1.1/ Les cellules souches mésenchymateuses**

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des CS multipotentes d'origine non hématopoïétique qui représentent une population rare (0,001% à 0,01%) des cellules médullaires. Elles ont une capacité de différenciation importante puisqu'elles peuvent donner naissance *in vitro* à des cellules spécialisées de type musculaire, ostéoblastique, chondrocytaire, adipocytaire et neurale (Pittenger, 2008). Elles sont également caractérisées par leurs propriétés immunomodulatrices et trophiques (Garrett & Emerson, 2009; Gotherstrom, 2007).

Les CSM participent au fonctionnement de la niche médullaire et au soutien de l'hématopoïèse via des interactions entre les cellules et avec la matrice extracellulaire ainsi que par la production de nombreux facteurs de croissance. Les CSM synthétisent également de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène, la laminine, la fibronectine, les protéoglycans. Elles expriment également des molécules d'adhérence telles que les intégrines  $\beta$ -1 VLA-4 et VLA-5 ainsi que diverses protéines contractiles telles que l'actine  $\alpha$ -SM (ASMA) (Chen, Dusevich, Feng, Manolagas, & Jilka, 2007). Des cellules ASMA<sup>+</sup> sont retrouvées dans différentes localisations médullaires telles qu'au niveau des capillaires (péricytes), des sinus et en bordure de l'endosteum.



**Figure 15 : Les niches ostéoblastiques et vasculaires de la moelle osseuse**  
 Organisation spatiale des éléments cellulaires et acellulaires des niches médullaires

Au cours de l'ontogénie hématopoïétique, les cellules mésenchymateuses sont présentes au niveau du foie foetal et de la moelle osseuse juste avant l'apparition de l'hématopoïèse définitive dans chacun de ces sites (Romanov, Darevskaya, Merzlikina, & Buravkova, 2005) (Mendes, Robin, & Dzierzak, 2005). Dans les expériences de culture à long terme de type Dexter, les cellules stromales de moelle osseuse sont capables de soutenir l'hématopoïèse pendant plus de 6 mois et de permettre la différenciation myéloïde et lymphoïde des CSH (Charbord, Tavian, Humeau, & Peault, 1996). De façon intéressante, l'injection simultanée de CSM avec les CSH accélère la reprise de l'hématopoïèse après une irradiation dans plusieurs modèles expérimentaux (Dexter, Allen, & Lajtha, 1977) (Noort et al., 2002).

### **6.1.2/ Les ostéoblastes**

L'os est un organe complexe qui participe au métabolisme minéral, maintient l'intégralité structurale du corps et soutient l'hématopoïèse. La balance ostéoblaste/ostéoclaste permet de réguler l'équilibre osseux. Les ostéoblastes sont d'origine mésenchymateuse : au-delà de leur rôle établi dans le remodelage osseux, ce sont des composants clés de la niche hématopoïétique (Zhou et al., 2008) (J. Zhang et al., 2003) (Calvi et al., 2003). En effet, les interactions entre CSH et ostéoblastes sont critiques pour le maintien des propriétés d'autorenouvellement, de différenciation et de mobilisation des CSH (Visnjic et al., 2004). Les ostéoblastes sont absents du foie et de la rate, qui peuvent être cependant le siège d'une hématopoïèse ectopique chez l'homme, en situation pathologique. Ainsi, si leur rôle est crucial dans l'hématopoïèse médullaire, la composante ostéoblastique n'est pas le support unique de l'hématopoïèse (Arai & Suda, 2007).

### **6.1.3/ Les adipocytes**

A la naissance, la moelle rouge hématopoïétique occupe virtuellement la totalité de l'espace de la moelle osseuse et la moelle blanche, non hématopoïétique, augmente progressivement avec l'âge. En effet, dans la moelle osseuse adulte, le nombre d'adipocytes est inversement corrélé à l'activité hématopoïétique, suggérant une relation étroite entre les adipocytes et les cellules hématopoïétiques.

*In vitro*, les adipocytes inhibent l'expansion des cellules hématopoïétiques en libérant des facteurs inhibiteurs de l'hématopoïèse comme la neuropiline-1, la lipocaline-2 et

l'adiponectine (Bryon, Gentilhomme, & Fiere, 1979) (Belaid-Choucair et al., 2008) (Miharada et al., 2008). Leur rôle spécifique, *in vivo*, au sein de la niche médullaire n'est toujours pas clairement établi.

Ainsi, le tissu adipeux médullaire n'est plus considéré comme un simple tissu de remplissage, mais comme un tissu adaptable et pourvu d'une activité métabolique sécrétoire très vraisemblablement impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse (Naveiras et al., 2009).

#### **6.1.4/ Les ostéoclastes**

L'ostéoclaste est l'unique type cellulaire capable de résorber l'os. D'origine hématopoïétique, il dérive d'un précurseur monocytaire/macrophagique qui se différencie en pré-ostéoclastes. Leur fusion va donner naissance à l'ostéoclaste multinucléé fonctionnel, spécialisé dans la résorption osseuse. La différenciation ostéoclastique requiert un contact direct entre les précurseurs ostéoclastiques et les ostéoblastes. Ces derniers expriment les formes membranaires des cytokines RANKL et M-CSF alors que les précurseurs ostéoclastiques expriment leurs récepteurs respectifs (Tanaka, Nakamura, Takahasi, & Suda, 2005). L'interaction entre ces cellules est régulée par l'ostéoprotégérine (OPG) qui, en fixant le RANKL, joue le rôle de récepteur « leurre », bloquant l'interaction RANK/RANK-L et inhibant l'ostéoclastogenèse (Novack & Teitelbaum, 2008).

#### **6.1.5/ Les cellules endothéliales**

La moelle osseuse est un organe extrêmement vascularisé. Les capillaires sinusoides sont constitués d'une seule couche de cellules endothéliales disjointes. Ces cellules interviennent dans la constitution des niches vasculaires où elles régulent les fonctions des CSH. L'administration *in vivo* d'un anticorps anti-VE-cadhérine conduit à une altération de l'hématopoïèse en réduisant la différenciation mégacaryocytaire (Li, Johnson, Shelley, & Yoder, 2004). De même, comme nous l'avons précisé plus haut, elles semblent jouer un rôle clé dans l'auto-renouvellement des CSH.

Un certain nombre d'autres types cellulaires participent également à la régulation des CSH/PH au sein des niches hématopoïétiques ; parmi celles-ci, citons les cellules CD146<sup>+</sup> (Avecilla et al., 2004), les cellules nestin<sup>+</sup> (Mendez-Ferrer et al., 2010), les cellules CAR (CXCL12 Abondant Reticular cells) (Sacchetti et al., 2007), les ostéomacs (Winkler et al., 2010), localisées au niveau subendothélial et/ou proche de l'endosteum. Leur rôle respectif au sein de ces niches est actuellement exploré par de nombreuses équipes.

## **6.2/ Les molécules de la matrice extracellulaire**

La Matrice Extracellulaire ou MEC est une structure dynamique composée de protéines, protéoglycanes et glycanes représentés par : i) des fibres de collagènes principalement de types I, III et IV produits par les cellules stromales (ostéoblastes, endothéliales..), ii) des protéines des membranes basales (laminine, entactine) et iii) d'autres composants interstitiels comme la fibronectine, la ténectine, l'ostéopontine... Ces molécules sont de nature fibrillaire ou non fibrillaire.

### **6.2.1/ Molécules fibrillaires : collagènes et réticuline**

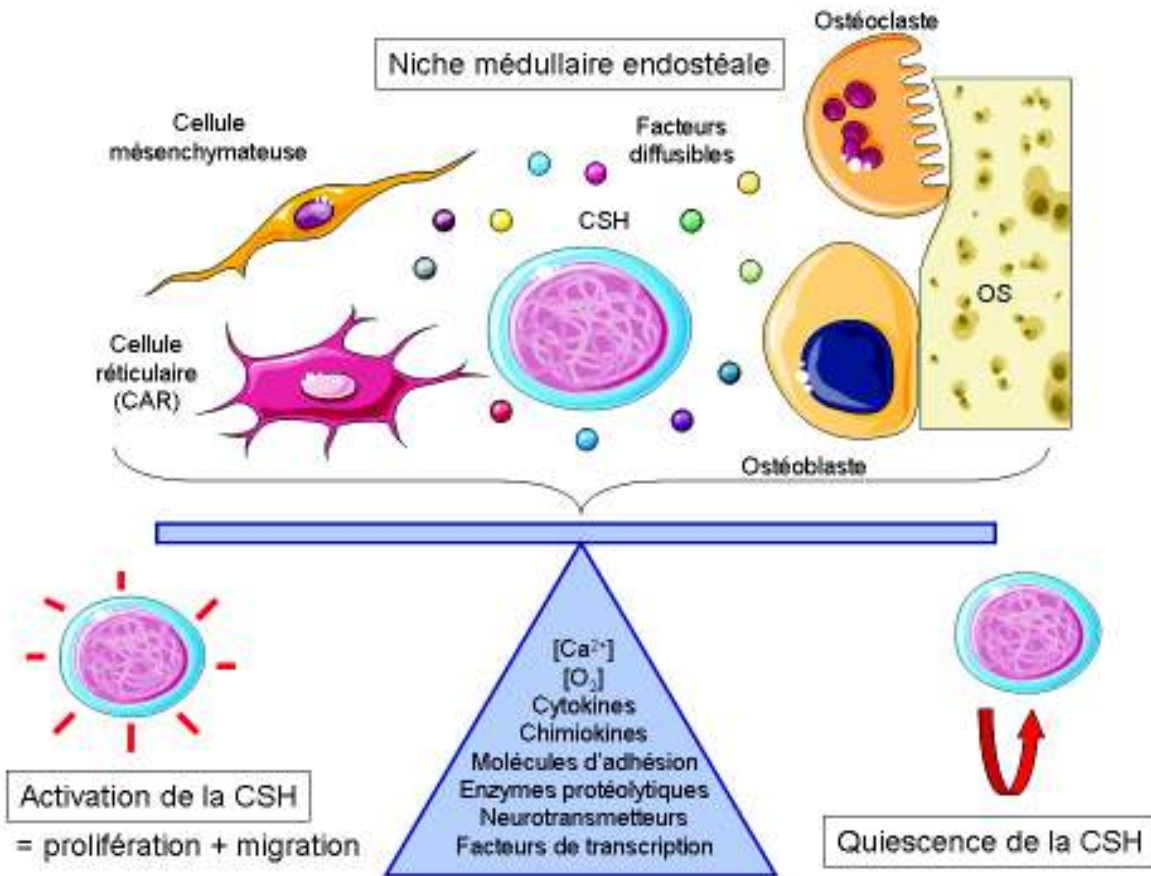
Les fibres de collagène I et de réticuline sont rares, nettement moins abondantes dans la moelle osseuse que dans les autres organes hématopoïétiques et presque exclusivement situées dans les zones périvasculaires des gros vaisseaux. Les fibres de collagène I deviennent abondantes à la suite d'une activation des fibroblastes médullaires comme dans les cas de myélofibroses. Le collagène IV, synthétisé par les cellules endothéliales, est le composant majeur des membranes basales bordant la face externe de l'endothélium des cellules endothéliales. Le réseau, de fibres dites de réticuline, correspond à des glycoprotéines associées aux fibrilles de collagène III. Ce réseau renferme les cellules hématopoïétiques bordant les sinus et encerclant les adipocytes.

### **6.2.2/ Molécules non fibrillaires**

De nombreux composants matriciels non fibrillaires ont été identifiés à partir de la fraction adhérente des cultures de moelle à long terme parmi ceux-ci on peut citer :

glycosaminoglycanes, héparanes sulfates, le perlecan, la fibronectine, l'hémonectine, la laminine. Ces macromolécules forment, par leurs charges polyanioniques, des agrégats jouant un rôle dans les mouvements de l'eau, régulant les phénomènes de diffusion interstitielle, stabilisant les fibres de collagène, intervenant dans l'adhérence des précurseurs hématopoïétiques au stroma et pouvant se lier aux facteurs de croissance pour potentialiser leur action in situ.





**Figure 16 : Régulation de l'équilibre entre quiescence et mise en cycle des cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans la niche médullaire endostéale.**

Les niches endostéales sont composées d'éléments cellulaires (cellules mésenchymateuses, ostéoblastes, ostéoclastes, cellules réticulaires dont les cellules CAR « CXCL12 abondent reticular cells ») en étroit contact avec les CSH qui favorisent un réseau de signalisation par l'intermédiaire de molécules telles que: cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, enzymes protéolytiques, neurotransmetteurs, facteurs de transcription...  
 Figure adaptée d'après (Cheng et al., 2000) (Nakamura et al., 2010).

### **6.3/ Régulation fonctionnelle des cellules souches hématopoïétiques dans la niche médullaire**

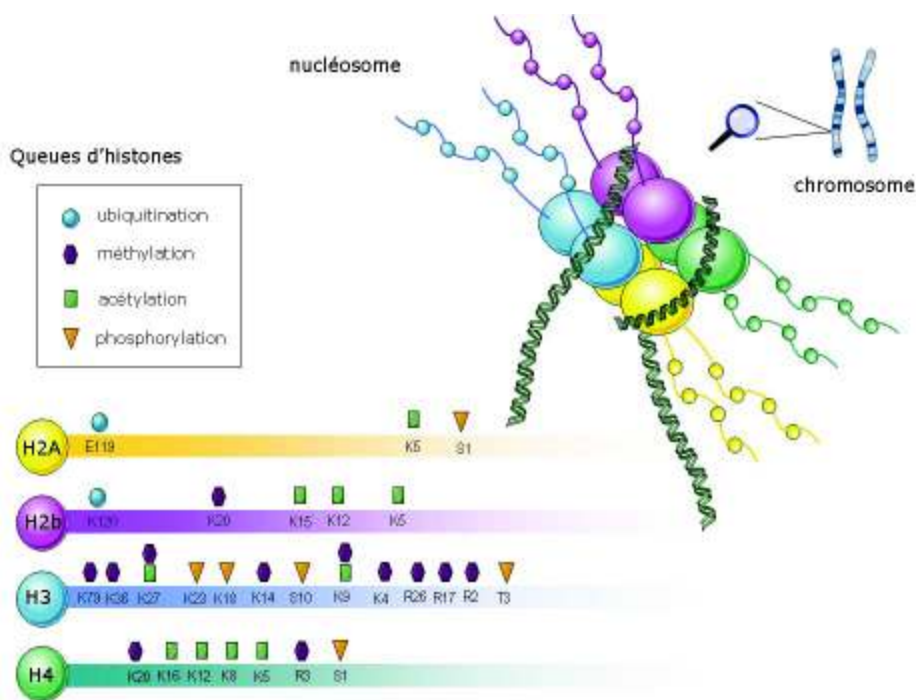
La quiescence est une propriété importante des cellules souches hématopoïétiques ; en effet, plus de 75% des CSH de la moelle osseuse sont en G0 (Hosokawa et al., 2010). Les niches médullaires jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre « quiescence-activation » et « autorenouvellement-prolifération ». Cet équilibre permet de conserver un pool constant de CSH au long de la vie, tout en maintenant une hématopoïèse efficace (Cheshier, Morrison, Liao, & Weissman, 1999). La Figure (16) décrit les principaux protagonistes qui interviennent dans le maintien à l'équilibre du pool des CSH au sein de la niche endostéale (Arai & Suda, 2007) (Wilson & Trumpp, 2006) (Trumpp, Essers, & Wilson, 2010). Malgré de nombreux travaux réalisés récemment, les mécanismes moléculaires impliqués dans la quiescence des CSH restent encore mal connus. Il a été rapporté que l'expression de la protéine c-Myc était faible dans les CSH quiescentes. Les actions de c-Myc sur la quiescence des CSH sont multiple puisque celui-ci induit l'expression de nombreux régulateurs positifs du cycle cellulaire et diminue celle de régulateurs négatifs (Morrison & Spradling, 2008) (Wilson et al., 2004). De plus, c-Myc diminue l'expression de nombreuses molécules d'adhésion incluant la N-cadhérine et les intégrines beta-1, alpha-2 et alpha-5 dans les CSH et régule ainsi le processus d'adhésion des CSH à la niche médullaire. Un défaut de quiescence des CSH conduisant à une diminution de leur capacité de repopulation à long terme est observé chez les souris déficientes pour le gène CDKN1A (p21), confirmant l'importance du contrôle de la division cellulaire dans la conservation de la capacité « souche » (Baena, Ortiz, Martinez, & de Alboran, 2007). De nombreux autres acteurs moléculaires interviennent dans la régulation fonctionnelle des CSH au sein des niches médullaires. Parmi ceux-ci, citons : l'annexine II (anx2), une molécule d'adhésion qui semble intervenir de façon importante dans l'interaction osteoblaste-CSH (Jung et al., 2007), l'angiopoïétine I (Morrison & Spradling, 2008) (Arai et al., 2004), le Steel Factor (Thoren et al., 2008), la chimiokine SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 (Sugiyama, Kohara, Noda, & Nagasawa, 2006), la thrombopoïétine (Yoshihara et al., 2007), Wnt (Fleming et al., 2008), Jagged1 (Calvi et al., 2003), l'ostéopontine (Stier et al., 2005), la N-cadhérine (Hosokawa et al., 2010) et leurs récepteurs ou contre-récepteurs. Cette liste n'est pas exhaustive ; elle tend à s'étendre et à se complexifier compte tenu de l'hétérogénéité d'action de ces couples ligands-récepteurs dans la régulation des CSH in vitro et in vivo, au sein des niches hématopoïétiques.

## **7/ Epigénétique et hématopoïèse**

L'épigénétique étudie les modifications réversibles de l'expression génique transmissibles d'une génération à l'autre sans altération des séquences nucléotidiques et l'influence de l'environnement sur l'expression des gènes. Les marqueurs épigénétiques actuellement connus sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Ils participent de façon dynamique au développement et aux processus de différenciation en particulier hématopoïétique.

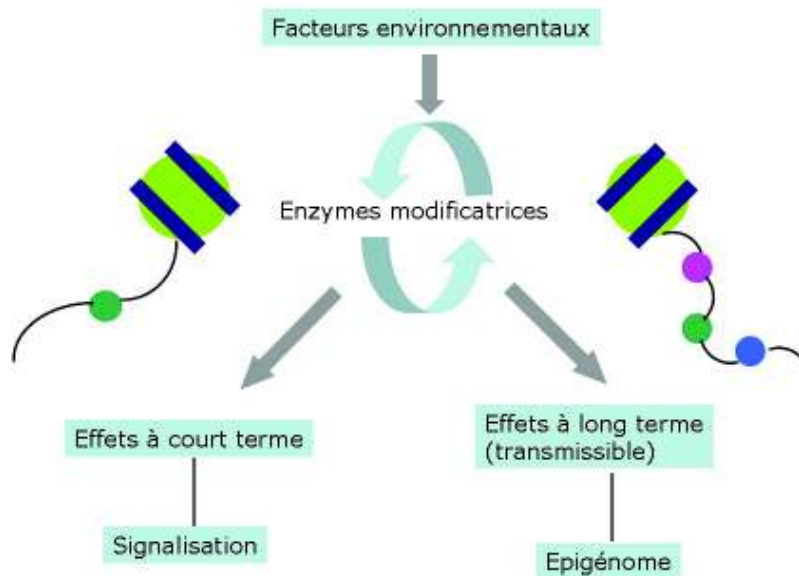
### **7.1/ La méthylation de l'ADN**

Les « CpG Islands » sont des régions riches en CpG (Cytosine poly Guanine) présentes dans 50-70 % des promoteurs des gènes humains (Bird, 1986). Les enzymes DNA-méthyltransférases transfèrent des groupements méthyles sur les cytosines des motifs CpG situés dans les régions promotrices des gènes. Ces méthylations ont comme conséquence la répression de la transcription du gène en aval. La méthylation des gènes intervient dans la différenciation cellulaire (Taylor & Jones, 1979). L'étude du profil de méthylation de l'ADN des cellules sanguines montre que 4% des promoteurs étudiés (5549 gènes) sont totalement méthylés (Shen et al., 2007). Il a été montré que la méthylation de l'ADN par la Dnmt1 (DNA-méthyltransférase 1) réprime les programmes de différenciation en interférant sur l'autorenouvellement et la multipotence (Broske et al., 2009).



**Figure 17 : Organisation du nucléosome et code histone**

Chaque nucléosome comprend un octamère de molécules d'histones qui est constitué d'un tétramère (H3)<sub>2</sub>-(H4)<sub>2</sub> et de deux dimères H2A-H2B. La queue amino-terminale des histones se projette en dehors du corps du nucléosome. Ces queues d'histones peuvent être modifiées épigénétiquement. La régulation de chaque site de modifications se fait indépendamment et l'intégration de « tags » épigénétiques peuvent finement modifier la réponse transcriptionnelle agissant sur la condensation chromatiniennne et modifier l'accès des facteurs de transcription aux sites de régulation de l'ADN (Luger, Mader, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997)



**Figure 18 : Effets à court ou long terme liés aux modifications des histones**

D'après (Gregoret, Lee, & Goodson, 2004)

## **7.2/ Le code des histones et hétérochromatine**

Le nucléosome représente l'unité structurale de la chromatine qui est essentielle à l'empaquetage de l'ADN. Cet octamère d'histones est constitué d'un tétramère (H3)<sub>2</sub>-(H4)<sub>2</sub> et de deux dimères H2A-H2B autour duquel l'ADN s'enroule 1,75 fois (Richmond & Davey, 2003). Au niveau des queues d'histones, des sites de modifications, situés en surface des nucléosomes, sont exposés à l'action catalytique d'enzymes (méthylases, acétylases...). Ces modifications, appelées « le code des histones », interviennent dans la condensation de la chromatine et modulent l'expression des gènes. La Figure (17) représente l'organisation structurale du nucléosome et illustre le code des histones.

Les modifications des queues des histones par des enzymes modificatrices peuvent être influencées par des signaux environnementaux ou intrinsèques. Ces modifications peuvent entraîner des effets à court terme (transcription, réplication ou réparation de l'ADN) ou à long terme (hétérochromatine constitutive et facultative...) (Levenson & Sweatt, 2005). La Figure (18) schématise l'influence des facteurs microenvironnementaux sur les modifications des histones.

A titre d'exemple, l'acétylation des queues des histones H3 et H4 est reliée à un état activé de la transcription des gènes (Allfrey, Faulkner, & Mirsky, 1964; B. M. Turner, 2007). L'acétylation des histones est également associée à d'autres fonctions cellulaires comme la réparation de l'ADN et la recombinaison. Il a été aussi démontré que l'acétylation des histones retarde la réplication de certaines régions du génome. L'hétérochromatine constitutive est pauvre en gènes, riche en séquences répétées et silencieuse du point de vue transcriptionnel. Cette région est caractérisée par un groupe de modifications d'histones incluant un enrichissement en histone H3 tri-méthylé en lysine 9 (H3K9me<sub>3</sub>), en histone H4 tri-méthylé en lysine 20 (H4K20me<sub>3</sub>) et par une diminution de l'acétylation globale des histones (Mateescu, England, Halgand, Yaniv, & Muchardt, 2004).

## **7.3/ Les histones déacétylases (HDAC) et histones acétylases (HAT)**

Les histones déacétylases (HDAC) et histones acétylases (HAT) sont des enzymes responsables respectivement de la déacétylation et de l'acétylation des queues aminoterminales des histones. Ces changements chromatinien interviennent dans la régulation de la transcription. Les HDACs appartiennent à une famille d'enzymes conservées au cours de

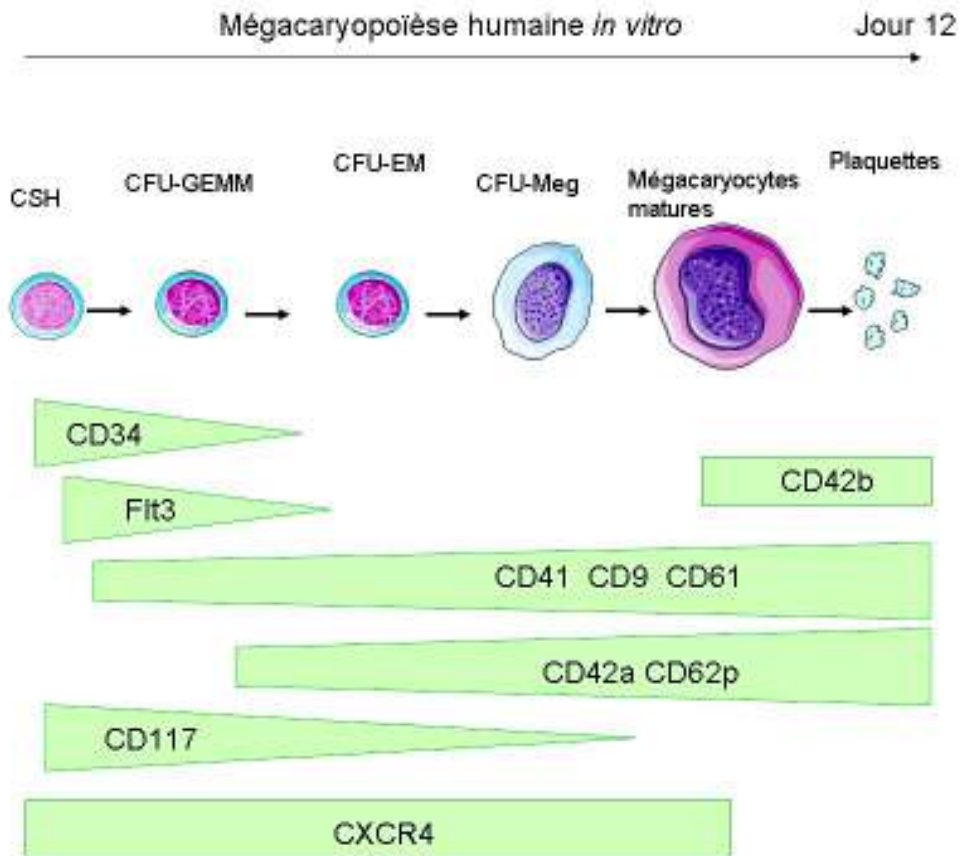
l'évolution qui peuvent acétyler d'autres substrats que les histones (Gregoretta et al., 2004). Quatre classes de HDACs ont été identifiées. Compte tenu de l'implication potentielle des HDACs dans la pathogénèse de certains cancers et leucémies, les inhibiteurs des HDACs (HDACi) sont actuellement de plus en plus souvent utilisés en thérapie.

## 8/ La mégacaryopoïèse

Chaque jour, environ  $10^{11}$  plaquettes sont produites par fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes, leurs précurseurs médullaires. La mégacaryopoïèse s'individualise des autres lignées hématopoïétiques car, au cours des phases tardives de différenciation, la cellule réalise des endomitoses (mitoses interrompues sans cytokinèse) conduisant à une polyploïdisation nucléaire. L'augmentation du volume cytoplasmique suivie de la fragmentation du cytoplasme donne naissance aux plaquettes, *via* la formation de nombreuses extensions proplaquetogènes (Wickrema & Crispino, 2007).

Les mégacaryocytes dérivent de la CSH ; ils partagent un progéniteur commun avec les cellules de la lignée érythroïde. Ce progéniteur va progressivement se différencier en mégacaryocytes sous l'influence d'un réseau complexe de molécules intégrant facteurs de transcription et cytokines, dans lequel la TPO joue un rôle majeur.

Au cours des étapes de différenciation mégacaryocytaire, les cellules expriment un panel de marqueurs de différenciation qui varie en fonction de leur stade de maturation. La Figure (19) résume la cinétique d'expression des principales molécules membranaires au cours de la mégacaryopoïèse humaine. Ainsi, l'expression de molécule de surface CD34 est perdue au cours des étapes de différenciation mégacaryocytaire (Salati et al., 2008). Il en est de même pour le récepteur Flt3, dont l'expression est réprimée au cours de la différenciation myéloïde, à l'exception des cellules monocytaires/macrophages. L'expression de CD117 (c-Kit) persiste plus tardivement que celle de Flt3 (Masson & Ronnstrand, 2009). Celle du récepteur CXCR4 persiste tout au long de la différenciation mégacaryocytaire et son rôle dans le chimiotactisme des MK en réponse à CXCL-12/SDF1 est fortement suggéré (Avecilla et al., 2004). D'autres glycoprotéines membranaires telles que CD42a, CD62p, CD61 et plus tardivement le CD42b sont également exprimées de façon séquentielle au cours de la différenciation MK (Lepage et al., 2000). Plus récemment, notre laboratoire a mis en évidence l'expression de la tétraspanine CD9 au cours de la différenciation des MK et son augmentation parallèlement à celle de l'intégrine CD41 (Clay et al., 2001).



**Figure 19 : Principaux marqueurs membranaires exprimés au cours de la différenciation mégacaryocytaire**

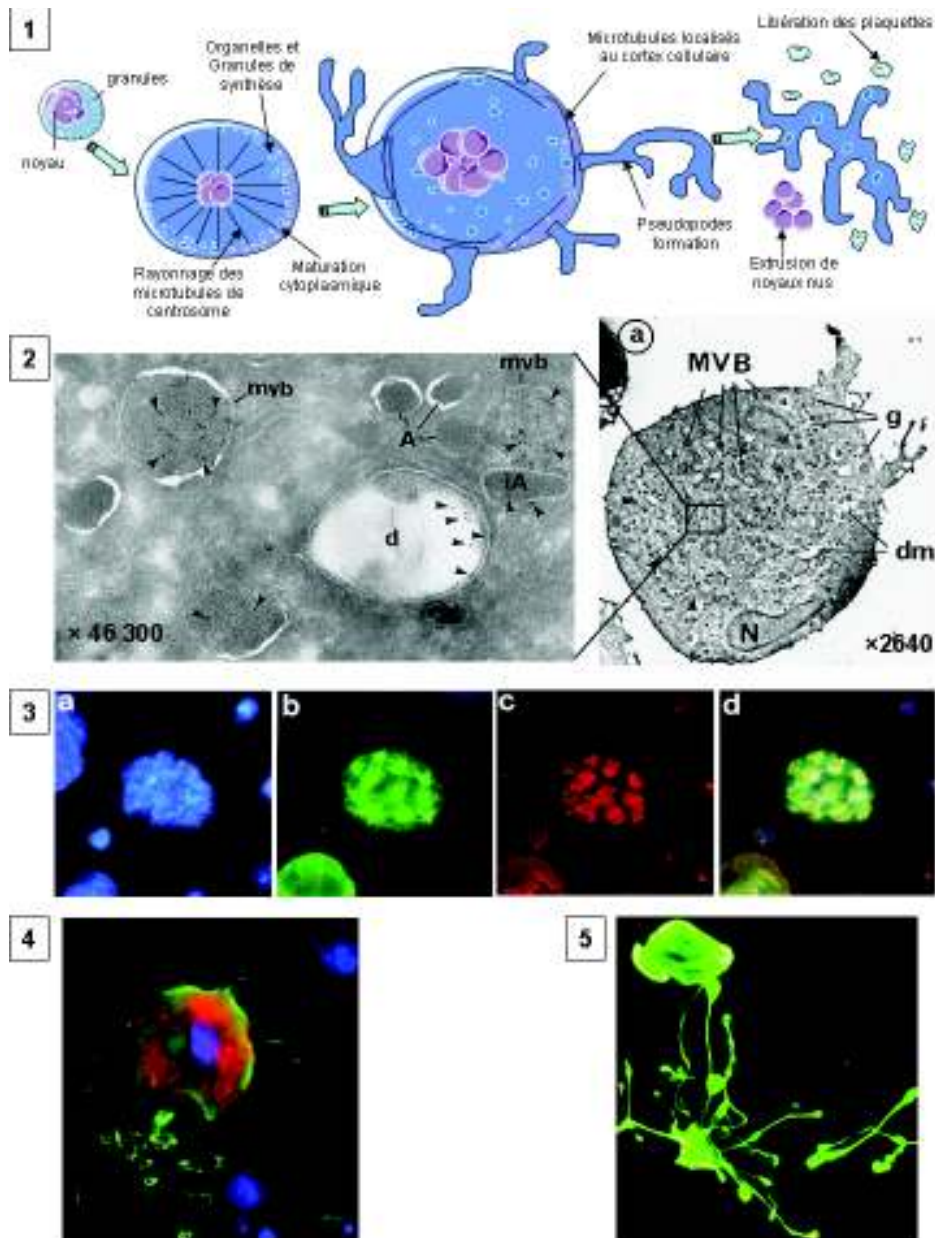


## **8.1/ Endomitose mégacaryocytaire**

Au cours de la différenciation mégacaryocytaire, les promégacaryoblastes augmentent progressivement leur ploïdie et leur contenu en ADN. Cette polyploïdisation permet d'augmenter la production de plaquettes car le volume cytoplasmique du MK croît parallèlement à celui du noyau. Le terme d'endomitose a été donné au processus de ploïdisation car celle-ci s'effectue sans rupture de l'enveloppe nucléaire (Youssefian & Cramer, 2000). L'endomitose est caractérisée par un arrêt de la mitose en anaphase B (Ravid, Lu, Zimmet, & Jones, 2002) (Nagata, Muro, & Todokoro, 1997) et plus précisément lors de la cytokinèse tardive (Vitrat, Cohen-Solal, Pique et al., 1998) (Geddis & Kaushansky, 2006). Au cours de la polyploïdisation, le cycle cellulaire se caractérise par une succession de phase G1, S, G2 et d'une phase M incomplète; après celle-ci, les MKs rentrent à nouveau en G1, réinitient un cycle cellulaire et dupliquent ainsi leur contenu en ADN (Lordier et al., 2008)

## **8.2/ Maturation cytoplasmique**

Au cours de la différenciation, le développement d'un système complexe de membranes appelé système de démarcation membranaire, et de différents types de granules incluant des lysosomes, des granules denses et des granules- $\alpha$  sont observés dans le cytoplasme des mégacaryocytes (Figure 20). Ces derniers sont spécialisés dans la sécrétion de nombreuses protéines. Les protéines PF4 et VWF sont détectées précocément, au stade 2N, dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique des cellules exprimant le CD41 (GPIIB/IIIa) et le CD42 (GPIb); leur expression augmente au cours de la différenciation. Ces protéines sont ensuite localisées dans les granules- $\alpha$  qui contiennent des inhibiteurs et des activateurs de l'angiogénèse (Bluteau et al., 2009) et les granules denses riches en molécules comme la sérotonine, les catécholamines, l'adénosine et le calcium. Les corps multivésiculaires correspondraient à un stade de développement commun aux granules denses et aux granules- $\alpha$  (Italiano et al., 2008).



**Figure 20 : Illustration de la maturation mégacaryocytaire**

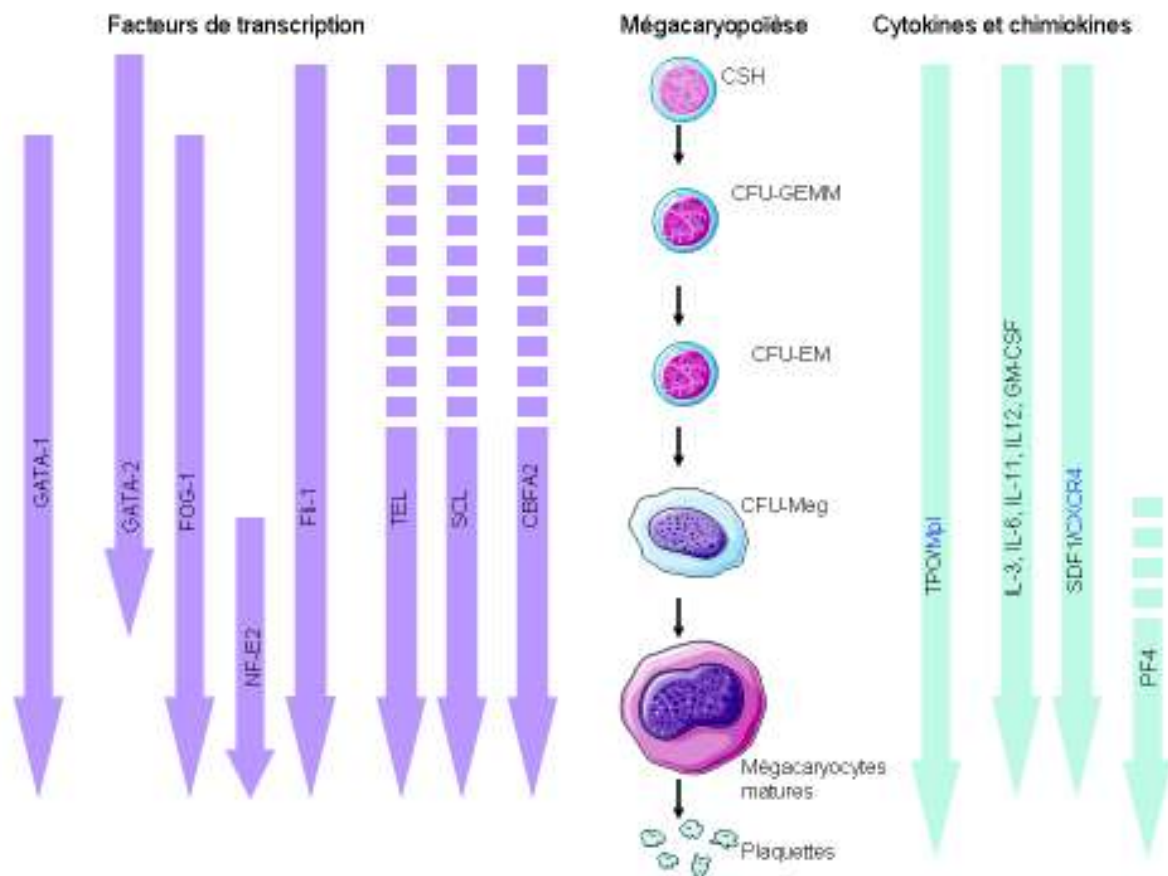
1 : Représentation schématique des différentes étapes de la maturation mégacaryocytaire (Patel, Hartwig, & Italiano, 2005)

2 : Ultrastructure des mégacaryocytes en microscopie électronique. En 2a (grossissement X 2640), on observe la structure générale du MK (dm: membranes de démarcation, mvb: corps multivésiculaires, n : noyau, g : granules). Le zoom sur la gauche correspond à un grossissement du cytoplasme mégacaryocytaire montrant les différents types de granules sécrétoires (d : granules denses, mvb : corps multivésiculaires, A: granules alpha, iA : granule alpha immature, les pointes de flèches correspondent au marquage de la granulophysine, un marqueur membranaire des granules denses) (Youssefian & Cramer, 2000)

3 : Mégacaryocyte polyploïde en anaphase A marqué au DAPI (3A), un anticorps anti-alpha-tubuline-FITC (3B) et un anticorps anti-centrosome (3C). L'image 3D représente la superposition des images 3A, 3B et 3C (Nagata et al., 1997)

4 : Mégacaryocyte murin avec formation d'extensions plaquetto-gènes *in vitro*. Marquages : bleu : DAPI, Rouge : Actine, Vert : Tubuline (Geddis, 2009)

5 : Localisation des microtubules de tubuline dans les extensions plaquetto-gènes des mégacaryocytes en culture (Patel et al., 2005)



**Figure 21 : Régulation de la mégacaryopoïèse par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de transcription.**

Représentation schématique de la mégacaryopoïèse (CSH : cellule souche hématopoïétique, CFU-GEMM : « colony forming unit » mixte, BFU-EM : « burst forming unit » érythro-mégacaryocytaire, CFU-EM : « colony forming unit » érythro-mégacaryocytaire, CFU-Meg : « colony forming unit » mégacaryocytaire). Les cytokines et les chimiokines qui influencent ce processus sont schématisées sur la droite par les flèches vertes et les facteurs de transcription par les flèches violettes sur la gauche (Vitrat, Cohen-Solal, Norol et al., 1998) (Geddis, 2010).

La libération des plaquettes semble être liée à un processus apoptotique augmentant en fin de différenciation. En effet, une activation des caspases serait impliquée dans la formation des MK pro-plaquetto-gènes et la surexpression de Bcl-XL conduirait à une altération de la fragmentation plaquettaire (Kaluzhny et al., 2002). En fin de maturation, les mégacaryocytes forment des longues extensions cytoplasmiques appelées extensions proplaquettaires (Patel et al., 2005) à l'origine des futures plaquettes. Les principaux acteurs impliqués dans la libération des plaquettes sont le système de démarcation membranaire (DMS) (Schulze et al., 2006), les microtubules et les filaments d'actine (Junt et al., 2007).

### **8.3/ Régulation moléculaire de la mégacaryopoïèse**

Comme nous l'avons précisé dans un chapitre précédent, la mégacaryopoïèse est régulée par de nombreux facteurs de transcription dont l'identification progresse toujours et qui président à l'expression de gènes souvent spécifiques de cette lignée (Goldfarb, 2007). Parmi ces derniers, citons trois acteurs principaux tels que GATA-1, FLI-1 et NF-E2 (Figure 21). GATA-1 joue un rôle majeur dans les étapes précoces de la mégacaryopoïèse en agissant sur le programme transcriptionnel mégacaryocytaire comprenant les gènes : GPIIb, PF4, GPIIb $\alpha$ ,  $\beta$ -TG, GPIX ou GPV (Ravid, Beeler, Rabin, Ruley, & Rosenberg, 1991) (Martin, Prandini, Thevenon, Marguerie, & Uzan, 1993). L'un des co-facteurs les plus importants de GATA-1 est FOG-1 (« Friend Of GATA ») (Tsang et al., 1997). Son rôle a été en particulier souligné dans la thrombocytopénie humaine congénitale liée au chromosome X au cours de laquelle il est observé dans les macroplaquettes. Dans cette maladie, des mutations du gène GATA-1 modifient sa liaison à FOG-1 conduisant à une altération de la mégacaryopoïèse. Parmi les facteurs de transcription de la famille ETS, FLI-1 coopère également avec GATA-1 au cours de la différenciation mégacaryocytaire ; il est impliqué, via un mécanisme d'haploinsuffisance, dans la thrombocytopénie de Paris-Trousseau. Enfin, NF-E2 contrôle l'expression de la tubuline b1 au niveau transcriptionnel et participe ainsi à la formation des proplaquettes et à leur libération.

L'état de condensation de la chromatine via les histones deacéthylases intervient dans l'accessibilité des facteurs de transcription aux régions promotrices sur l'ADN et donc dans la régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse. En effet, chez le rat, l'injection journalière d'un inhibiteur des HDAC (FR235225) entraîne une répression transcriptionnelle de GATA-1 associée à une thrombopénie. Les inhibiteurs de HDAC hyperacétylent GATA-1, modifiant ainsi ses différentes propriétés : affinité de liaison à l'ADN, activité transcriptionnelle, stabilité protéique et interactions protéine-protéine (Matsuoka et al., 2007).

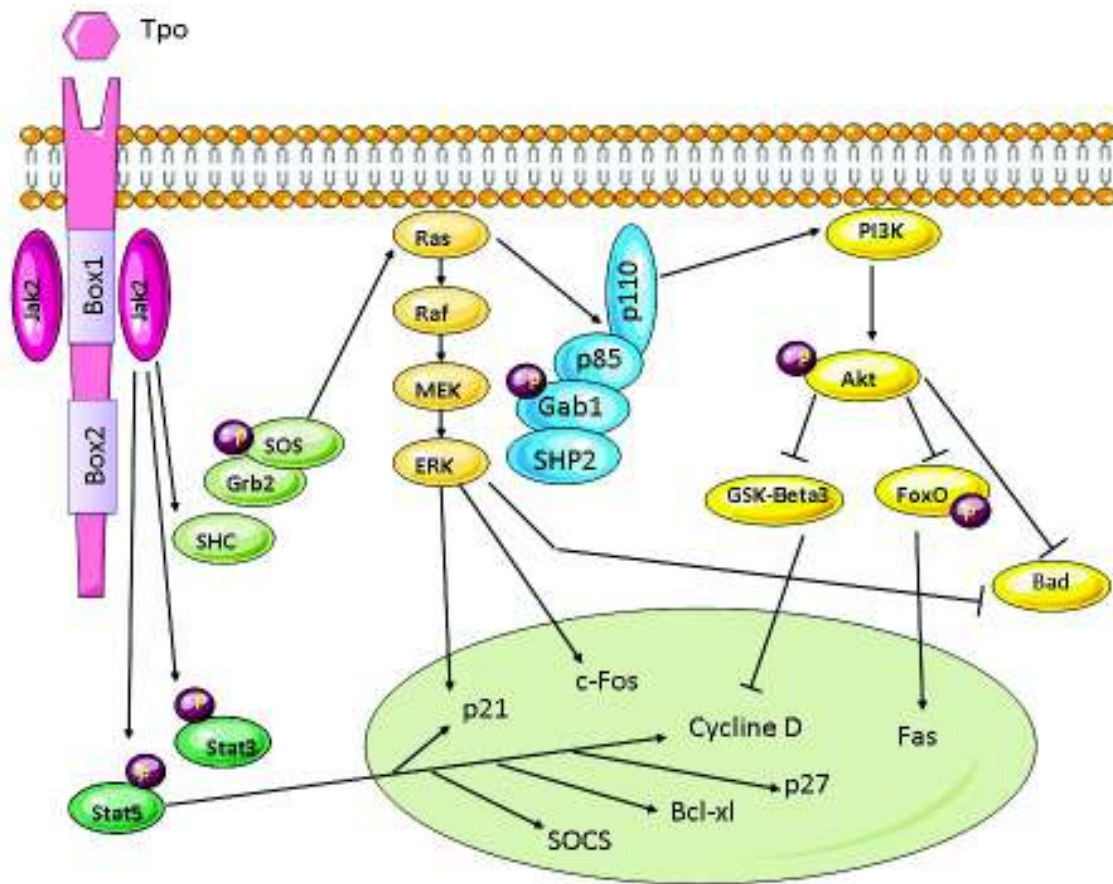
Parmi les facteurs de croissance impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse, la thrombopoïétine (TPO) et son récepteur (Mpl) joue un rôle majeur. L'inactivation de Mpl et de la Tpo chez la souris laisse apparaître que la Tpo est le seul ligand de Mpl (Alexander, 1999) (Gainsford et al., 2000) (Carver-Moore et al., 1996). La Tpo est active à tous les niveaux de la mégacaryopoïèse, de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs jusqu'à la production de plaquettes (Cohen-Solal, Debili, Vainchenker, & Wendling, 1997).

Elle favorise également la survie, l'auto-renouvellement et l'expansion des CSH, assurant ainsi une reconstitution à long terme de l'hématopoïèse de souris irradiées (Yoshida et al., 1997) (Seita et al., 2007) (Rongvaux et al., 2011). Dans la CSH, la Tpo est capable d'induire l'expression de HOXB4 d'une manière p38 dépendante (Kirito, Fox, & Kaushansky, 2003).

Il est aussi reconnu que Mpl est exprimé sur les populations primitives de CSH humaines comme les CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> et que ces cellules exprimant c-mpl ont un potentiel de greffe important chez la souris immuno-déprimée (Solar et al., 1998). De plus, les souris invalidées pour Mpl présentent un déficit en cellules souches hématopoïétiques (Kimura, Roberts, Metcalf, & Alexander, 1998). Plusieurs études récentes suggèrent également que les MAPKs pourraient participer aux effets de la TPO sur les CSH et que la durée, l'intensité et la localisation du signal ERK varient d'un contexte cellulaire et d'un stimulus à l'autre (Garcia, de Gunzburg, Eychene, Gisselbrecht, & Porteu, 2001).

La Tpo, principalement exprimée dans le foie et les reins, est également produite par les cellules stromales de la moelle osseuse. C'est une molécule de 70 kDa comprenant 2 régions. La région N-terminale, qui présente une homologie marquée avec l'érythropoïétine, comprend 4 hélices alpha. Cette région englobe le domaine de liaison au récepteur et est suffisante à l'activité biologique du ligand. La région C-terminale est fortement glycosylée et participe à la sécrétion de la molécule. Comme les autres récepteurs aux cytokines, Mpl possède une seule région trans-membranaire. Seule la forme N-glycosylée de Mpl est exprimée sur la membrane cytoplasmique. Cette glycosylation est altérée dans des pathologies hématologiques comme dans la Polycythemia vera (PV) où une diminution de la glycosylation semble jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie (Molitero, Hankins, & Spivak, 1998). L'interaction directe des mégacaryocytes avec ces cellules module la formation de proplaquettes (Drachman, Rojnuckarin, & Kaushansky, 1999), suggérant le rôle des interactions cellulaires avec les cellules stromales dans la différenciation et maturation mégacaryocytaire.

La Figure 22 schématise les principales voies de signalisation mises en œuvre lors de l'activation de Mpl par son ligand : la voie des STAT, celle de PI3K/AKT/mTOR, la cascade des MAPK par Erk1/2, plus indirectement, la voie NF- $\kappa$ B (Drachman et al., 1999) (Y. Zhang et al., 2002). L'activation soutenue et à long terme de la cascade des MAPK ERK est indispensable à l'induction de la différenciation mégacaryocytaire par la Tpo. La Tpo active Ras (Matsumura et al., 1998) puis Erk1/2 au cours de la mégacaryopoïèse et agit ainsi sur le processus de ploïdisation (Rojnuckarin, Drachman, & Kaushansky, 1999). Des anomalies de la voie d'activation des MAP kinases au cours des cancers et leucémies souligne l'importance de cette voie et suggère son rôle potentiel dans le processus pathogénique. Nous détaillerons les principales molécules de la voie de signalisation des MAPK dans un chapitre ultérieur (Chapitre § 10).



**Figure 22 : Principales voies de signalisation activées par la thrombopoïétine au cours de la mégacaryopoïèse in vitro.**

La fixation de la Tpo sur son récepteur spécifique Mpl déclenche une cascade de signaux intracellulaires activant principalement les voies STAT, PI3K et MAPK.

Figure adaptée de (Drachman et al., 1999)

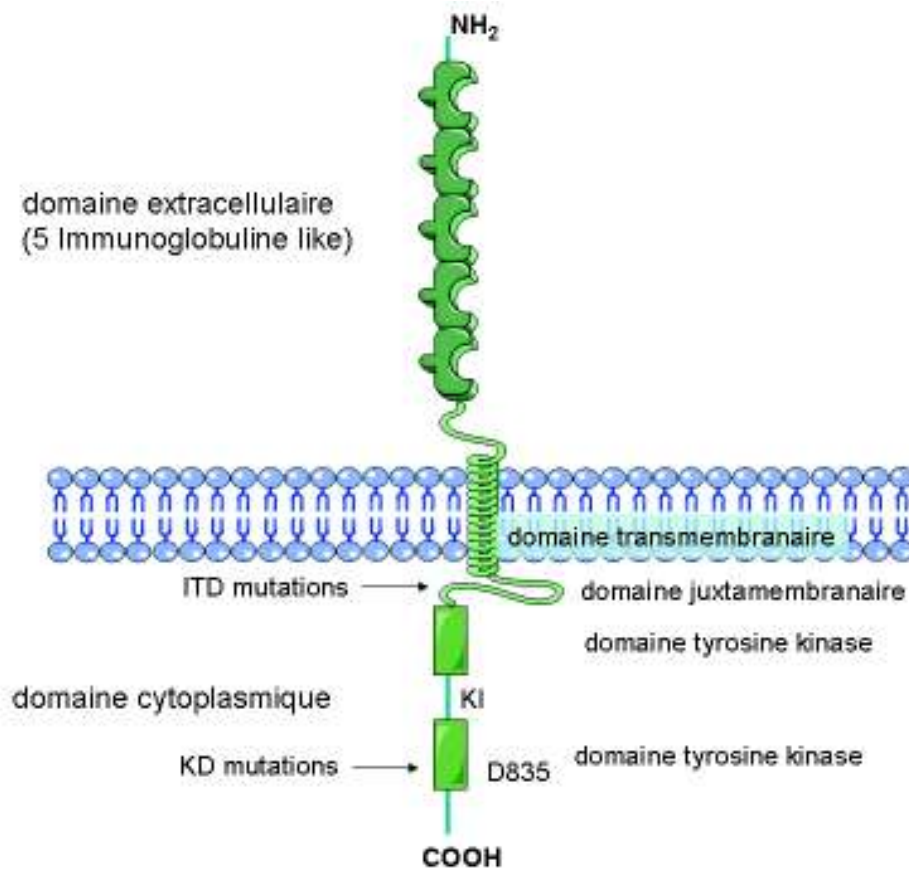


## 9/ Le couple Flt3 ligand/Flt3

La cytokine Flt3-ligand (fms-like tyrosine kinase 3 ligand ou FL) est une cytokine pléiotrope à action précoce : elle intervient dans la survie et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, la migration cellulaire et la réponse immunitaire, notamment en interaction avec les cellules dendritiques. Au regard de la production ubiquitaire de FL, l'expression de son récepteur Flk2/Flt3 est restreinte aux cellules hématopoïétiques et lymphoïdes immatures (Rappold et al., 1997) chez la souris (Matthews, Jordan, Wiegand, Pardoll, & Lemischka, 1991) comme chez l'homme (Rosnet et al., 1993).

### 9.1/ Le récepteur Flt3

A la suite du clonage murin de la molécule par deux groupes différents, le récepteur a été appelé Flt3 pour « FMS-like tyrosine kinase 3 », ou Flk2 pour « fetal liver kinase 2 ». Chez l'homme, le récepteur a aussi été appelé STK1 pour « Stem cell tyrosine kinase 1 » ou CD135. Communément, le récepteur est actuellement nommé Flt3. Il appartient à une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase RTK III comprenant également FMS, c-kit et PDGFR $\alpha$  et  $\beta$ . Le gène *FLT3*, localisé en 13q12-13 chez l'homme (Carow et al., 1995), comporte 24 exons répartis sur 96 kb. Le récepteur Flt3 humain, composé de 993 acides aminés, existe sous une forme faiblement glycosylée immature de 130-140 kD, et une forme fortement glycosylée de 155-160 kD exprimée à la membrane plasmique (Drachman et al., 1999). La Figure (23) illustre la structure du récepteur Flt3 et montre certaines des mutations retrouvées dans plusieurs hémopathies humaines. La partie extra-cellulaire du récepteur comporte cinq domaines « immunoglobulin-like », avec les trois domaines distaux impliqués dans le site de liaison au Flt3 ligand et les deux domaines proximaux impliqués dans la dimérisation du récepteur. Une partie transmembranaire et deux domaines tyrosine kinase séparés par un domaine interkinase sont également décrits (Rosnet, Mattei, Marchetto, & Birnbaum, 1991) (Dasil, Wang, & Lemischka, 1993). La partie intracytoplasmique de la molécule comporte 23 résidus tyrosine.



**Figure 23 : Structure du récepteur Flt3**

La localisation des principales mutations impliquées en pathologie humaine est indiquée par des flèches (ITD mutations : « internal tandem duplication » ; KD mutations : mutation du domaine kinase et principalement de l'acide aspartique en position 835) (Rappold et al., 1997)

KI : Kinase Insert

### **9.1.1/ Souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur Flt3**

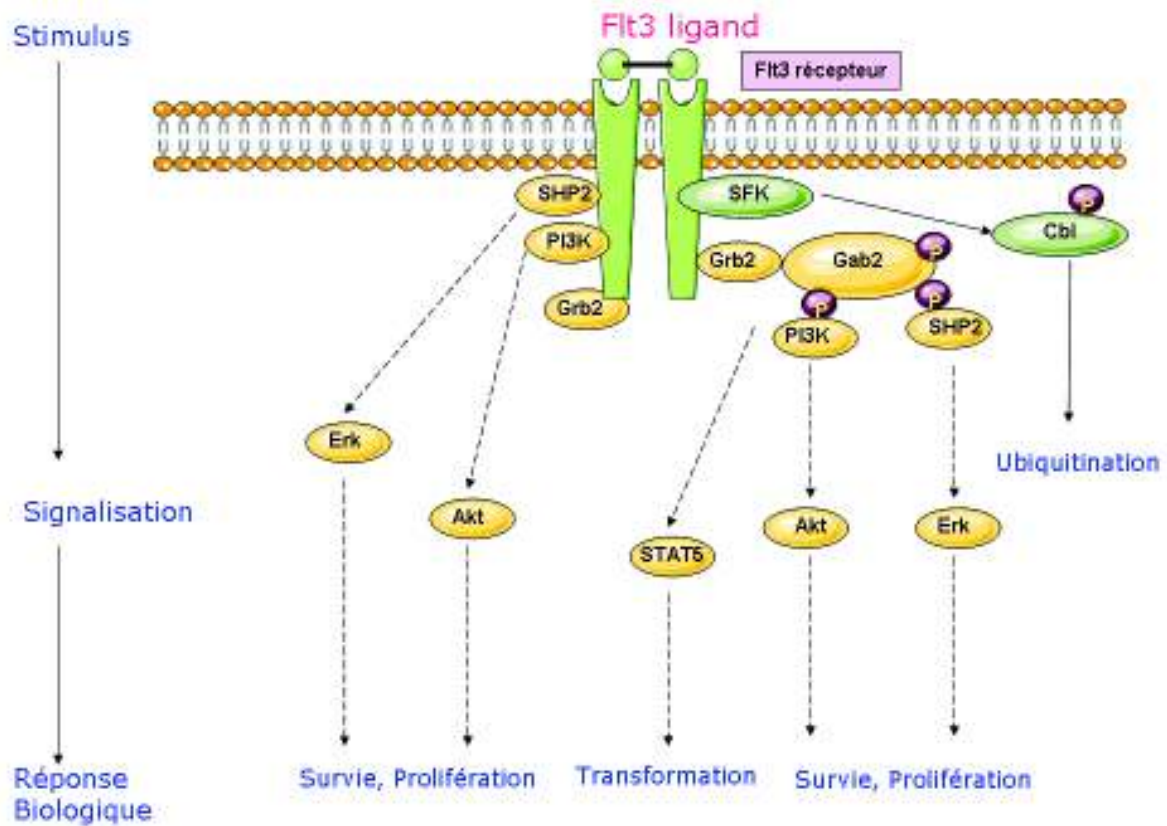
Les souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur Flt3 (Flt3<sup>-/-</sup>) présentent des anomalies de l'hématopoïèse telles qu'une diminution des précurseurs lymphoïdes B médullaires mais sans altération du nombre de lymphocytes B périphériques. Les cellules Flt3<sup>-/-</sup> ne reconstituent pas l'hématopoïèse à long terme de souris sauvages irradiées, ce qui suggère l'importance du récepteur Flt3 dans la régulation de l'hématopoïèse primitive et des CSH (Mackarehtschian et al., 1995).

### **9.1.2/ Expression du récepteur Flt3 chez l'homme**

L'expression de Flt3 est restreinte aux tissus hématopoïétiques : l'ARNm est présent dans les organes hématopoïétiques et lymphoïdes chez l'adulte comme chez le fœtus, notamment au niveau de la rate et des ganglions (Lyman et al., 1993). Contrairement à la souris, chez l'homme, l'expression de Flt3 est restreinte à un faible pourcentage de cellules hématopoïétiques primitives exprimant également c-Kit (A. M. Turner, Lin, Issarachai, Lyman, & Broudy, 1996). Flt3 est également exprimé dans les cellules du compartiment des progéniteurs myéloïdes et lymphoïde B, avec une expression maximale sur les CFU-GM et les progéniteurs pré-B. Au niveau du compartiment des précurseurs, l'expression de Flt3 est maintenue tout au long de la différenciation monocyttaire (Rosnet et al., 1993).

### **9.1.3/ La signalisation induite par Flt3 en réponse au Flt3-ligand**

La cytokine Flt3-ligand étant produite de façon ubiquitaire dans l'organisme, c'est l'expression restreinte de son récepteur qui gouverne son spectre d'activité. La liaison du ligand à son récepteur conduit à la dimérisation de celui-ci, la juxtaposition des domaines intracytoplasmiques rend alors possible la transphosphorylation des domaines cytoplasmiques sur les résidus tyrosines du dimère. Cette phosphorylation constitue un événement crucial initiant l'activité kinase intrinsèque du récepteur. Les résidus tyrosines activés de Flt3 se lient ensuite aux domaines SH2 de protéines cytoplasmiques cibles telles que p85, GRB2, p115 (CBL), p52 (SHC) dont la phosphorylation est impliquée dans la transduction du signal (Lavagna-Sevenier, Marchetto, Birnbaum, & Rosnet, 1998). Le signal est alors transmis soit par la voie des inositol phosphates 3' kinases (PI3K), soit par d'autres voies PI3K indépendantes (Rosnet et al., 1996). La Figure 24 représente les principales voies de signalisation activées en aval du récepteur Flt3.



**Figure 24 : Principales voies de signalisation activées par la liaison de Flt3 ligand (FL) à son récepteur Flt3**

SKF : Src kinase famille.

d'après (Masson & Ronnstrand, 2009)

#### **9.1.4/ Rôle de Flt3 dans les leucémies**

Une possible implication du couple Flt3-ligand/Flt3 dans la pathogenie de certaines leucémies repose sur plusieurs arguments. Le récepteur Flt3 est fréquemment surexprimé en ARN et en protéine dans les leucémies de type B et les leucémies aiguës myéloïdes (Carow et al., 1996); la surexpression de son ligand induit une boucle d'autocrine/paracrine contribuant à l'activation du récepteur Flt3 (Small, 2006). La structure du gène *FLT3* peut être également modifiée par l'insertion de régions dupliquées en tandem dans la partie correspondant au domaine juxtamembranaire (FLT3-« internal tandem duplication » (ITD)); celles-ci sont retrouvées dans 30% des leucémies aiguës myéloïdes. On peut également observer des mutations ponctuelles, telles que la mutation « Asp835 » chez 3 à 8% des patients (Figure 23). L'anomalie FLT3-ITD est également retrouvée dans les syndromes myélodysplasiques avec une fréquence inférieure à 5% (Yokota et al., 1997). Chez la souris, la transformation de cellules hématopoïétiques par FLT3-ITD provoque un néoplasme myéloprolifératif oligoclonal caractérisé par une hématopoïèse extra-médullaire, une splénomégalie et une hyperleucocytose (Kelly et al., 2002). Ces différents types de mutations conduisent à l'activation constitutive du récepteur (Zheng et al., 2004) et sont corrélées à un pronostic péjoratif.

Bien que l'intensification des thérapies basées sur l'utilisation de cytarabine semble apporter des résultats intéressants, des inhibiteurs chimiques des kinases du récepteur Flt3 ont été récemment développés sans pour autant être très spécifiques. Parmi ceux-ci, citons : le SU11248 dérivé de la molécule SU5416 (Sugen) qui inhibe également les récepteurs au PDGF alpha et beta, ainsi que les VEGFR1, VEGFR2 et le c-Kit (John, Thomas, Mufti, & Padua, 2004) (O'Farrell et al., 2003).

#### **9.2/ Le Flt3-ligand (FL)**

Le Flt3-ligand a été cloné en 1993-1994 par deux groupes distincts. C'est un homodimère qui peut exister sous forme soluble et membranaire. Ces différentes formes résultent d'un épissage alternatif et/ou d'un clivage protéolytique (Hannum et al., 1994) (Lyman et al., 1993). La forme membranaire et la forme soluble sont toutes les deux biologiquement actives et capables d'activer son récepteur spécifique (Lyman et al., 1995). La forme soluble du Flt3-ligand a été purifiée et séquencée en 1994 à partir du milieu conditionné de cellules stromales thymiques (Lyman et al., 1994). Bien que l'expression de l'ARN messager du Flt3-ligand soit ubiquitaire, l'expression de la protéine est limitée aux

cellules stromales et lymphoïdes de la moelle osseuse (Lyman & Jacobsen, 1998). Plus récemment, il a été montré que le Flt3-ligand est également produit par les cellules endothéliales (Solanilla, Grosset et al., 2000). La production de Flt3-ligand est constitutive mais elle peut également être induite par différents facteurs tels que le TGF- $\beta$  et l'IFN-alpha (Solanilla, Grosset et al., 2000) ou le ligand du CD40 (le CD154) (Solanilla, Dechanet et al., 2000).

Le taux plasmatique de Flt3-ligand est faible chez les sujets sains mais il peut être élevé dans certaines maladies hématologiques comme l'anémie de Fanconi et l'anémie aplasique acquise où une déficience en CSH/PH est observée (Wodnar-Filipowicz et al., 1996). Dans ces pathologies, il a été proposé que l'élévation du taux de Flt3-ligand permettrait de compenser cette déficience (Lyman et al., 1995).

Flt3-ligand agit essentiellement en stimulant la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures des lignées myéloïdes (Lyman et al., 1993) (Hannum et al., 1994) (Lyman et al., 1994) et lymphoïdes (Hunte, Hudak, Campbell, Xu, & Rennick, 1996) (Ray, Paige, Furlonger, Lyman, & Rottapel, 1996) (Bertho et al., 2000) et ceci en synergie avec d'autres cytokines comme le SCF et l'IL-7, par exemple. Il est intéressant de noter que le Flt3-ligand et le SCF sont tous deux ligands de récepteurs à tyrosine kinase de classe III et existent sous forme soluble et membranaire (Flt3-ligand) ou liée à la matrice (SCF). Flt3-ligand et SCF exercent également des actions similaires sur les CSH/PH mais, à la différence de SCF, le Flt3-ligand n'a pas d'activité biologique sur les cellules mastocytaires (Lyman et al., 1995). De même, en synergie avec la thrombopoïétine, le Flt3-ligand ralentit la maturation des mégacaryocytes en augmentant la prolifération des progéniteurs MK et en diminuant leur apoptose via une augmentation de Bcl-2 et un changement conformationnel de p53 (Lyman et al., 1995).

Comme nous le verrons ci-dessous, l'importance du Flt3-ligand dans la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures et dans la différenciation de certaines lignées cellulaires a été confirmée chez les souris déficientes pour le gène *FLT3LG*.

### **9.2.1/ Souris déficientes pour le gène codant pour le Flt3-ligand**

Les souris *FLT3LG*<sup>-/-</sup> présentent un nombre réduit de leucocytes dans la moelle osseuse, le sang périphérique, les ganglions lymphatiques et la rate sans modification de l'hématocrite ni du nombre de plaquettes. La diminution significative du nombre des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes B dans la moelle osseuse, de cellules NK dans la rate ainsi que de cellules dendritiques dans la rate, les ganglions lymphatiques et le thymus,

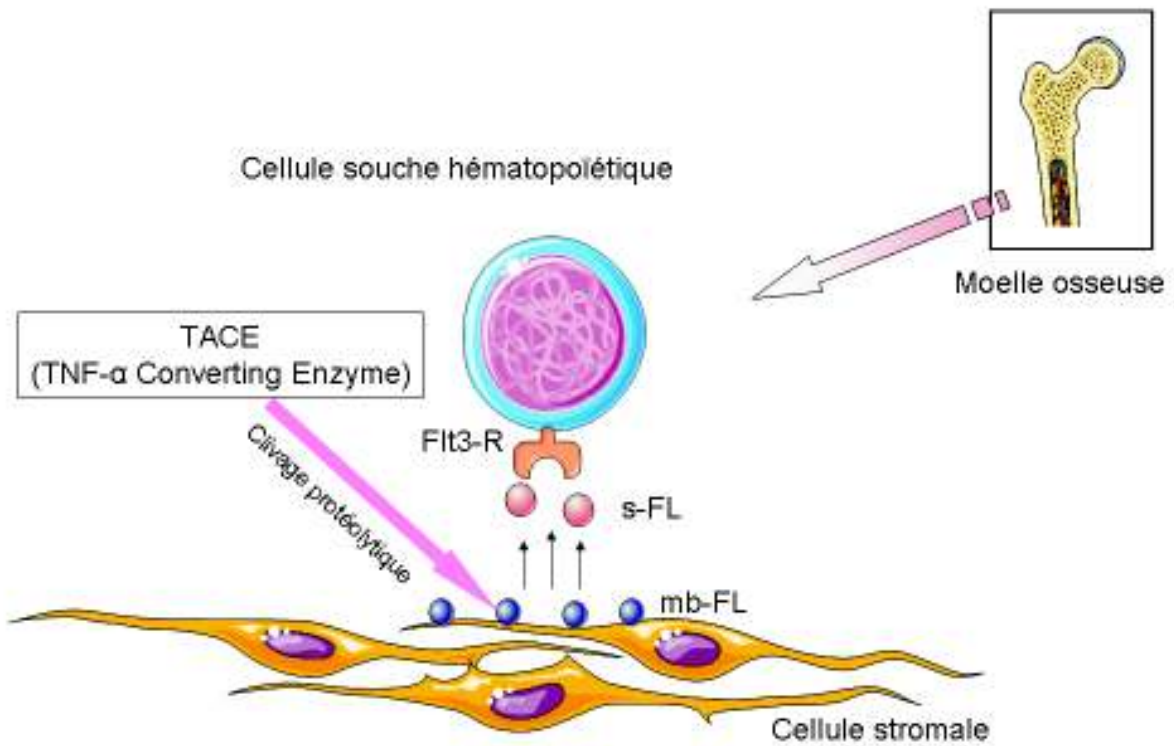
suggère que le Flt3-ligand intervient dans l'expansion des progéniteurs primitifs et la génération des leucocytes matures. De façon intéressante, les anomalies de l'hématopoïèse observées chez les souris déficientes pour FLT3LG sont plus intenses que celles observées chez les souris FLT3<sup>-/-</sup>, suggérant une action complexe et vraisemblablement de type synergique de la cytokine sur la régulation de l'hématopoïèse (Sigurjonsson, Gudmundsson, Haraldsdottir, Rafnar, & Gudmundsson, 2002).

### **9.2.2/ Activité biologique du Flt3-ligand in vivo et rôle dans la niche hématopoïétique**

L'administration de Flt3-ligand à la souris, entraîne une expansion des progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse et la rate ainsi qu'une mobilisation des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique et la rate (augmentation de près de 500 fois du nombre de CFU-GEMM et CFU-GM dans le sang 10 jours après le début du traitement) (Brasel et al., 1996). La mobilisation par le Flt3-ligand concerne également des cellules avec un potentiel de reconstitution à long terme et de différenciation « multilignée », démontrant leur nature de cellules souches (Brasel et al., 1997). De même, comme nous l'avons précisé dans un chapitre précédent, une mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques dans la circulation peut être obtenue après traitement (5 à 7 jours) par Flt3-ligand, seul ou en association avec du G-CSF ou du GM-CSF, chez la souris comme chez l'homme (Brasel et al., 1996) (Papayannopoulou, Nakamoto, Andrews, Lyman, & Lee, 1997).

Comme le SCF, le Flt3-ligand est exprimé de façon transmembranaire et peut être clivé par un processus protéolytique, au sein des niches médullaires. Le clivage de Flt3-ligand est dépendant de l'action de métalloprotéases. Cette activité protéolytique est abolie dans les fibroblastes dans lesquels le gène de la métalloprotéase TNF- $\alpha$  Converting Enzyme (*TACE*) est délété et peut être restituée en réintroduisant TACE, démontrant le rôle du clivage protéolytique dans l'activation de Flt3-ligand. Ainsi libéré dans le microenvironnement, le Flt3-ligand peut alors agir sur les CSH (Horiuchi et al., 2009) (Figure 25). A ce titre, il est intéressant de noter que le Flt3-ligand est capable de fixer les CSH/PH au sein de la moelle via un mécanisme VLA-4 et -5-dépendant (Solanilla et al., 2003).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que le couple Flt3-ligand/Flt3 participe, comme d'autres récepteurs tels que c-Kit ou CXCR4, au nichage des CSH au sein des niches médullaires et qu'une altération des interactions adhésives induite par leurs ligands est en partie responsable de la mobilisation des progéniteurs hors de la moelle osseuse.



**Figure 25 : Rôle du Flt3-ligand dans les interactions CSH-microenvironnement au sein de la moelle osseuse**

D'après (Wodnar-Filipowicz et al., 1996).

La protéine du Flt3-ligand existe sous deux formes dans la moelle osseuse : une forme ancrée dans la membrane (mb-FL) des cellules stromales et une forme sécrétée dans le microenvironnement (s-FL). Les deux formes sont actives. La forme mb-FL peut être clivée par la protéine TACE (TNF- $\alpha$  Converting Enzyme) (Horiuchi et al., 2009)



## 10/ La voie des « mitogen-activated protein » kinases

Les « Mitogen-Activated Protein » Kinases (MAPK) sont des sérine/thréonine kinases très conservées au cours de l'évolution. Elles sont présentes dans tous les types cellulaires et leurs activités diffèrent d'un type cellulaire à l'autre en réponse à des stimuli spécifiques. Ce sont des relais intracellulaires entre les récepteurs de surface et leurs cibles régulatrices qui sont majoritairement des facteurs de transcription. Les différentes voies des MAPKs participent à des fonctions importantes dans la cellule telles que : la prolifération, la différenciation, l'apoptose...etc. L'expérience de l'utilisation de souris déficientes pour les divers isoformes des MAPKs a révélé des phénotypes bien particuliers pour chacun d'entre eux comme en témoigne le tableau (4) (Aouadi, Binetruy, Caron, Le Marchand-Brustel, & Bost, 2006) et le travail du groupe (Gaudry M. et Porteu F.) sur les souris ERK1<sup>-/-</sup> (Guihard et al., 2010).

Les MAP Kinases peuvent induire des réponses cellulaires spécifiques telles que : la prolifération, l'apoptose, la survie, la migration et la régulation transcriptionnelle en interagissant avec de nombreux stimuli (cytokines, facteurs de croissance, antigènes, toxines, médicaments, stress, changement de température, irradiation, changement de conformation cellulaire, interactions avec la matrice extracellulaire, interactions cellule-cellule...).

À ce jour, six groupes distincts de MAPK ont été identifiés dans les cellules de mammifères : 1) les ERK 1 et 2 (Extracellular signal-Regulated Kinase), 2) les JNK 1, 2 et 3 (c-Jun aminoterminal Kinase), 3) la p38 et ses isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , 4) les ERK 3 et 4, 5) ERK 5 et 6) ERK 7/8. Chaque groupe de MAPK est activé par une cascade de phosphorylation qui lui est propre suivant une organisation qui est conservée. Ainsi, les MAPK sont activées et phosphorylées par les MAPKK qui sont elles-mêmes phosphorylées par les MAPKKK (Dhanasekaran & Johnson, 2007) (Chang & Karin, 2001) (Tableau 5).

MAPKs	Roles	Souris	Phénotypes	Références
ERK1	Prolifération différenciation	C57BL/6	Viables, fertiles, réduction maturation des cellules T. Augmentation de la plasticité synaptique	(Pages et al., 1999)  (Mazzucchelli et al., 2002)
ERK2	Prolifération différenciation	C57BL/6 BALB/C	Léthalité embryonnaire, petite taille Défaut ectodermique Défaut mesodermique	(Saba-El-Leil et al., 2003) (Yao et al., 2003)
JNK1	Réponse au stress, prolifération, différenciation, apoptose, inflammation	C57BL/6	fertile, taille normale, défaut de la différenciation lymphocytaire T, diminution de l'adiposité et augmentation de la sensibilité à l'insuline	(Dong et al., 1998) (Hirosumi et al., 2002)
JNK2	Réponse au stress, prolifération, différenciation, apoptose, inflammation	C57BL/6	Fertile, taille normale, défaut de maturation et d'activation lymphocytaire T	(Sabapathy et al., 1999) (D. D. Yang et al., 1998)
JNK3	Réponse au stress, prolifération, différenciation, apoptose, inflammation	C57BL/6	Souris fertile, sans phénotype apparent, résistance à l'apoptose des neurones en culture	(D. D. Yang et al., 1997)
p38 $\alpha$	Réponse au stress, prolifération, différenciation, apoptose, inflammation	C57BL/6	létalité embryonnaire avec à un défaut de développement du placenta, diminution de l'expression de l'érythropoïétine, défaut d'angiogénèse, défaut du développement du myocarde	(Tamura et al., 2000) (Mudgett et al., 2000) (M. Allen et al., 2000) (R. H. Adams et al., 2000)
p38 $\beta$ , p38 $\gamma$	Réponse au stress, prolifération, différenciation, apoptose, inflammation	C57BL/6	viable, fertile, aucun défaut apparent	(Beardmore et al., 2005) (Sabio et al., 2005)
ERK5	Prolifération, différenciation	C57BL/6	létalité embryonnaire due à un défaut de développement cardiovasculaire et vasculaire	(Hayashi & Lee, 2004) (Regan et al., 2002) (Sohn, Sarvis, Cado, & Winoto, 2002)

**Tableau 4 : Fonction des MAPKs en relation avec les phénotypes des souris déficientes.**

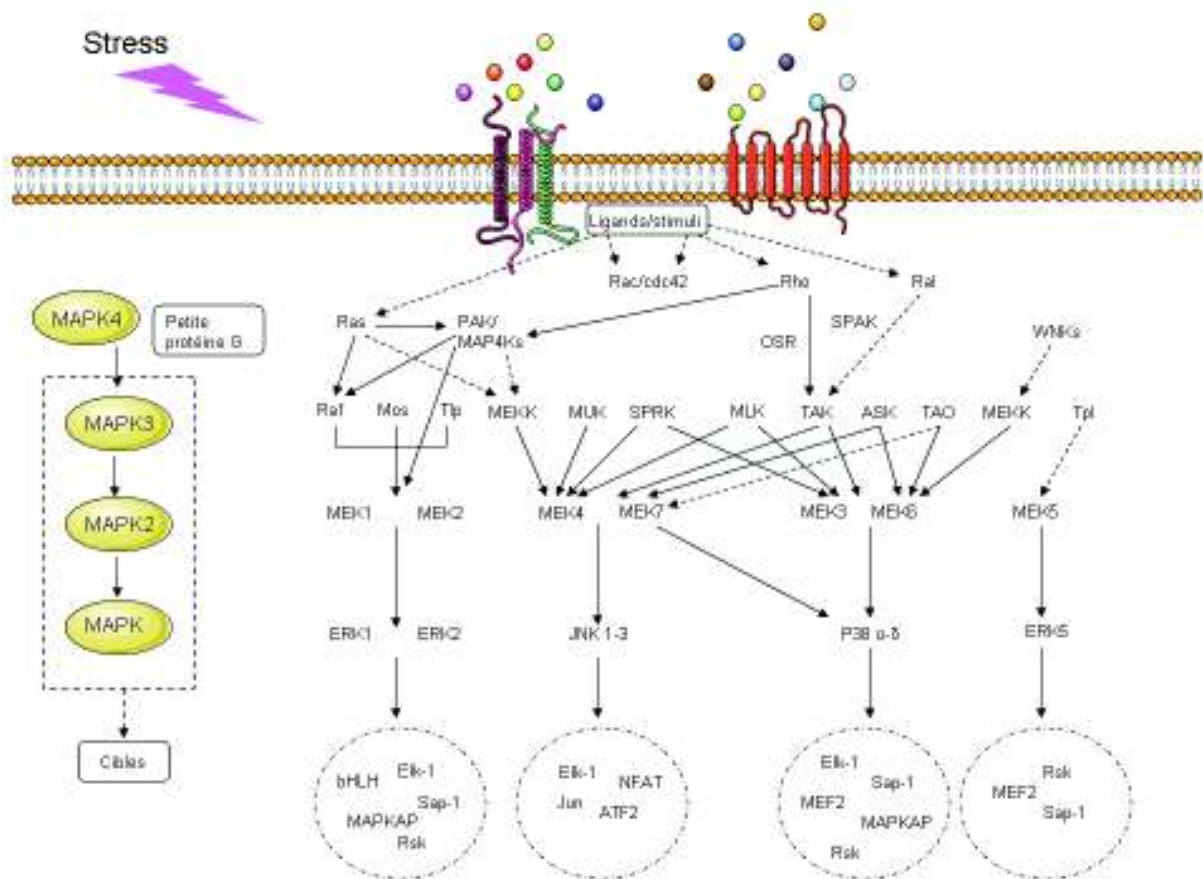
étape de cascade	voie ERK	voie p38	voie JNK
MAPKKK	Raf, Tpl2, Mos	Ask1, Tak1, Mlk3, Mekk4, Dlk	Ask1, Tak1, Mekk1-5, Mlk1-4, Dlk, Lzk
MAPKK	Mkk1, Mkk2	Mkk3, Mkk6, Mkk4	Mkk4, Mkk7
MAPK	Erk	p38	JNK

**Tableau 5 : Protéines MAPK et leurs principaux effecteurs**

D'après (Platanias, 2003). Les principaux effecteurs des voies des MAPK sont classés par type MAPKs activées.

Les MAPKKK sont le plus souvent activées par phosphorylation mais également par interaction avec les GTPases des familles Ras ou Rho, en réponse à des signaux extracellulaires. Leur activation conduit à la phosphorylation et à l'activation des MAPKK qui, par la suite, stimulent l'activité MAPK à travers une double phosphorylation sur un résidu thréonine et tyrosine situé dans la boucle d'activation de la kinase. Ainsi activées, les MAPK catalysent la phosphorylation d'une série de substrats sur des résidus sérine ou tyrosine. Les protéines de la cascade des MAPK interagissent également avec des protéines de cascades de signalisation, apportant un niveau supplémentaire de spécificité. Les MAP kinases exercent leur fonction par phosphorylation de divers substrats tels que phospholipases, facteurs de transcription, protéines du cytosquelette... Elles catalysent aussi la phosphorylation et l'activation de différentes protéines kinases appelées « MAPK activated protein kinase », ajoutant un échelon supplémentaire dans l'amplification de la réponse cellulaire aux facteurs de croissance et au stress (Chang & Karin, 2001) (Schaeffer & Weber, 1999) (Figure 26).

Alors que l'activation des MAPKKs et des MAPKKKs se fait par phosphorylation, l'inhibition ou la modulation de leur fonction se fait par déphosphorylation *via* l'action de phosphatases. La régulation de la déphosphorylation des MAPKs joue un rôle important dans l'intensité et la durée de l'activation des kinases. Chez les mammifères, ceci est principalement régi par la famille des « Dual-specificity MAPK phosphatases » (DUSP) comprenant 10 membres (Keyse, 2000). Les DUSP ont des niveaux de spécificité pour leurs différents substrats suivant les membres de cette famille. En effet, DUSP6 a un rôle inactivateur préférentiel pour Erk1/2 (Groom, Sneddon, Alessi, Dowd, & Keyse, 1996) (Muda et al., 1996). D'autre part, les DUSP 8, 10, 16 peuvent inactiver p38 et JNK mais n'agissent pas sur ERK (Tanoue, Moriguchi, & Nishida, 1999) (Tanoue, Yamamoto, Maeda, & Nishida, 2001). D'autres phosphatases n'appartenant pas à la famille des DUSP sont importantes pour la régulation des MAPKs, comme par exemple PP2A peut agir en inactivant ERK (Letourneux, Rocher, & Porteu, 2006) ou bien la protéine phosphatase 1 (PP1) peut agir en déphosphorylant p38 (Kitatani et al., 2006).



**Figure 26 : Schéma simplifié de la signalisation des MAP Kinases**  
 D'après (Raman, Chen, & Cobb, 2007)

**La voie MAPK de type ERK**, activée en aval de Ras, est une des voies de signalisation majeure relayant les fonctions des cytokines, des morphogènes et des molécules d'adhésion. Les kinases ERK1-2 sont des acteurs clés de la régulation, de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire. L'activation de la voie ERK est initiée par la liaison d'un ligand à un récepteur membranaire comme les récepteurs à tyrosine kinase ou les récepteurs couplés aux petites protéines G. Le récepteur activé recrute un certain nombre de protéines telles que Shc, le complexe Grb2/SOS-1 et le facteur d'échange SOS-1 qui permettent l'activation des GTPases Ras. Une fois les protéines Ras activées, elles recrutent à la membrane plasmique, la protéine MAPKKK Raf effectrice. Chez les mammifères, la famille Raf est constituée de trois membres : A-Raf, B-Raf et Raf-1 (ou C-Raf). Les protéines Raf vont, à leur tour, activer leurs effecteurs MEK1/2 qui, eux-même, vont phosphoryler leurs cibles uniques ERK1 et ERK2 qui vont alors activer leurs substrats cytoplasmiques et nucléaires. MEK1 participe à la régulation de la localisation d'ERK1/2 dans la cellule en les maintenant sous forme non phosphorylée dans le cytoplasme (Adachi, Fukuda, & Nishida, 2000). L'importation nucléaire d'ERK1/2 est régit par des mécanismes différents selon l'état actif ou non des isoformes.

Les isoformes ERK1 et ERK2 sont ubiquitaires, elles partagent 83 % d'identité en acides aminés et sont exprimés dans la totalité des tissus. Elles sont très fortement activées par les facteurs de croissance, les esters de phorbol et, dans une moindre mesure, par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), les cytokines, le stress osmotique et la désorganisation du cytosquelette microtubulaire (Yoon & Seger, 2006). En contribuant à la progression du cycle cellulaire via les points de contrôle G1/S et G2/M, les kinases ERK participent à la stimulation de la prolifération. Il a été récemment suggéré que le rôle des ERK1/2 dans la prolifération était lié au seuil d'activation de la voie et non à la spécificité de fonction des isoformes (Voisin, Saba-El-Leil, Julien, Fremin, & Meloche, 2010). Comme nous le précisons ci-dessus, leur activation est généralement associée à la survie cellulaire mais, dans certaines conditions, ERK1/2 peuvent intervenir dans l'apoptose. L'activation d'ERK1/2 joue un rôle clé dans la différenciation des CSH vers la lignée granulomonocytaire (Hsu, Kikuchi, & Kondo, 2007). Les travaux du groupe de F. Porteu ont également montré l'importance de la voie ERK dans la transition prolifération/différenciation induite par la TPO dans les cellules mégacaryocytaires (Rouyez, Boucheron, Gisselbrecht, Dusanter-Fourt, & Porteu, 1997) (Fichelson et al., 1999) (Filippi et al., 2002). Enfin, dans les cellules ES et les PH CD34<sup>+</sup>, l'intensité du signal ERK semble interférer dans l'équilibre entre

autorenouvellement et différenciation. Le rôle spécifique de chaque isoforme ERK1 et ERK2 reste en cours de caractérisation, en particulier en raison de la non viabilité des souris invalidées pour ERK2. En utilisant le modèle des souris invalidées pour ERK1 qui sont viables, les travaux récents du groupe de F. Porteu et M. Gaudry suggèrent qu'ERK1 est un inhibiteur de l'érythropoïèse splénique via un mécanisme BMP4-dépendant (Guihard et al., 2010) et que cette isoforme intervient dans la régulation de l'ostéogenèse au sein des niches endostéales.

Parmi les MAPK, **le groupe JNK** est principalement impliqué dans les processus de réponse au stress, de différenciation et d'apoptose. La protéine Jnk joue un rôle important dans le cancer par le fait qu'il induit l'apoptose TNF dépendante en bloquant la voie NFkB *via* l'inhibition de c-FLIP qui régule la caspase 8 (Chang et al., 2006). JNK1, JNK2 et JNK3 existent sous la forme d'au moins dix variants d'épissage et sont exprimés de manière relativement ubiquitaire, sauf JNK3 dont l'expression est plutôt restreinte au cerveau. Les JNK sont fortement activés en réponse aux cytokines inflammatoires aux agents endommageant l'ADN, après radiations UV ou privation en facteurs de croissance, et de manière moins importante, après activation de récepteurs couplés aux protéines G. Comme celle d'ERK et de p38, l'activation de JNK nécessite une double phosphorylation sur tyrosine et thréonine sur le motif très conservé TPY. Les MAPKK qui catalysent cette réaction sont connues sous le nom de MEK4 et MEK7. Dans certaines conditions, ces deux effecteurs ont également la capacité d'activer p38 (Ganiatsas et al., 1998). Elles sont elles-mêmes phosphorylées par diverses MAPKKK (Haeusgen, Herdegen, & Waetzig, 2011) (Kyriakis & Avruch, 2001). Les JNKs vont phosphoryler les facteurs de transcription c-Jun, ATF-2, p53, Elk-1 et les « nuclear factor of activated T cells » (NFAT) qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation cellulaire ou l'apoptose.

L'activité de JNK peut être inhibée par des phosphatases qui sont les « dual phosphatases » MKP ; en effet, MKP-7 et VH5 déphosphorylent JNK et p38 $\alpha\beta$  (Alonso et al., 2004). Ces phosphatases agissent sur les effecteurs en amont des MAPKK et MAPKKK. Enfin, l'activation de JNK peut aussi être régulée par l'ubiquitinylation des MAPKKK (Witowsky & Johnson, 2003).

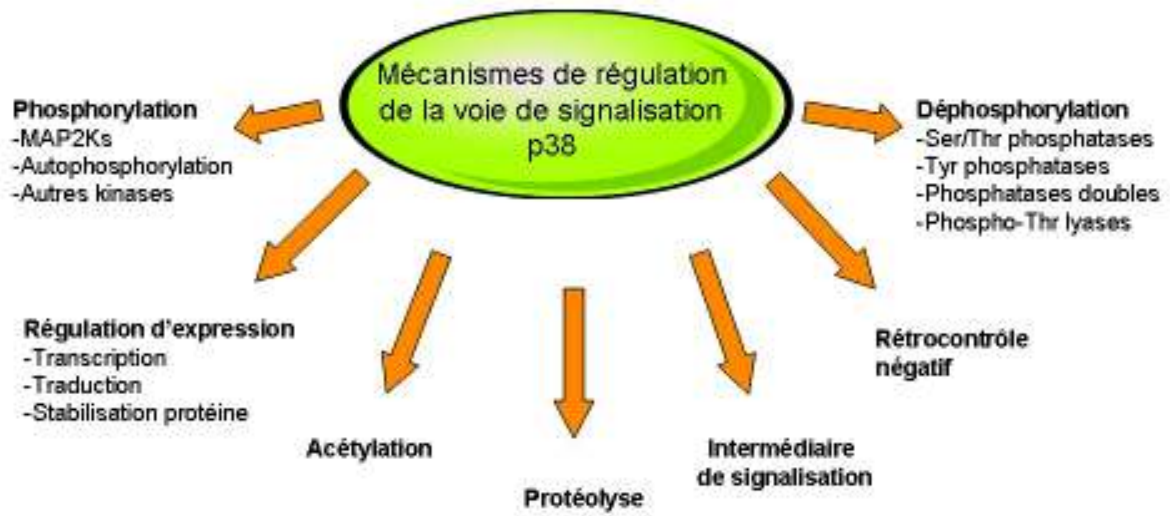
Dans les cellules de mammifères, **la voie p38**, « archétype de la seconde voie MAPK », est composée des MAPKKK telles que les MEKK1-4, les MAPKK MEK3 et MEK6, et les quatre isoformes de p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . L'expression des isoformes p38  $\alpha$  et  $\beta$  est

ubiquitaire, contrairement à celle des isoformes p38  $\gamma$  et  $\delta$  qui est restreinte à certains tissus. Il est intéressant de souligner que l'isoforme p38 $\gamma$  est activée par l'hypoxie d'une manière calcium dépendante et qu'elle régule négativement l'expression de la cycline D1 (Conrad, Millhorn, & Beitner-Johnson, 2000), suggérant un possible rôle de cette isoforme au sein de la niche endostéale en réprimant la mise en cycle des CSH dans un contexte hypoxique et riche en calcium. Les différentes isoformes sont fortement activées par les stress environnementaux et les cytokines inflammatoires. La plupart des stimuli qui activent p38, activent également JNK. L'activation de la MAPK p38 intervient dans de nombreuses et importantes fonctions cellulaires telles que l'activation de facteurs de transcription, la production de cytokines, le cycle cellulaire, la différenciation, la mobilité, l'apoptose et la mort cellulaire (Chang & Karin, 2001) (Schaeffer & Weber, 1999). La protéine p38 qui régule principalement ses effecteurs par phosphorylation et déphosphorylation, est aussi capable d'agir indirectement par d'autres modifications telles que l'acétylation comme c'est le cas avec USF-1 (Corre et al., 2009) et la protéolyse en agissant sur la « ring finger ubiquitin ligase » Siah2 qui contrôle la stabilité de nombreux substrats impliqués dans le stress (Khurana et al., 2006) (figure 27).

p38 est principalement activée par ses effecteurs en amont (MEK3 et MEK6) qui sont eux-mêmes activés par de multiples MAPKKKs incluant MEKK1-4, TAOs, TAK, et ASK. Cependant, en absence de MEK3-6, p38 peut également être phosphorylée par MEK4 (Brancho et al., 2003). L'activation des isoformes de p38 se fait avec une certaine sélectivité. En effet, alors que les isoformes  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  sont phosphorylés par MEK3 et MEK6, l'isoforme  $\beta$  est préférentiellement activée par MEK6 (Enslin, Raingeaud, & Davis, 1998).

Certaines protéines de la voie de signalisation de JNK telles que JIP et JSAP, participent également à la signalisation p38. Ainsi, en se liant à p38 $\alpha$  et p38 $\delta$ , JIP2 augmente la signalisation de p38 (Buchsbaum, Connolly, & Feig, 2002), il en est de même pour JIP4 qui est un substrat de p38 (Kelkar, Standen, & Davis, 2005).

Enfin, de nombreuses phosphatases régulent la signalisation p38. Parmi celles-ci, citons : DSPs, DSP2, MKP1, MKP5, VH5 et MKP7. A titre d'exemple, les souris déficientes pour MKP1 sont plus sensibles aux chocs endotoxiques et présentent des taux élevés de cytokines proinflammatoires (Chi et al., 2006).



**Figure 27 : Mécanismes impliqués dans la régulation des MAPKs p38**

Les MAPKs p38 sont principalement régulées par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation mais des mécanismes additionnels ont été décrits. D'après (Cuadrado & Nebreda, 2010)



## **10.1/ Rôle des « Mitogen-activated protein kinases » p38 dans l'hématopoïèse normale et leucémique**

Il a été suggéré que des anomalies de la voie d'activation Ras/MAPK, notamment une activation constitutive de celle-ci, pouvait participer à la pathogenèse de certaines hémopathies, soulignant l'importance de la voie des MAPK dans le processus de leucémogénèse.

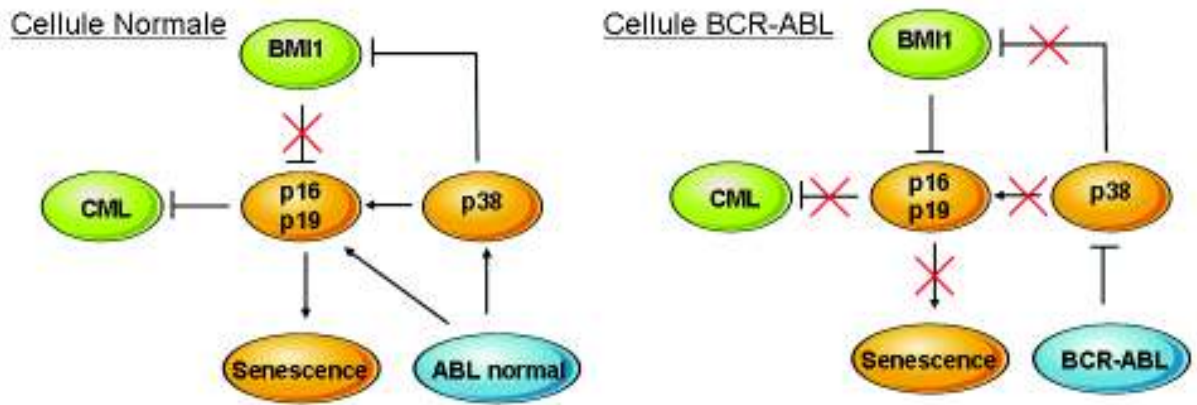
Dans le paragraphe suivant, nous développerons le rôle de la voie p38 dans la régulation de l'hématopoïèse et nous montrerons, grâce aux travaux qui font l'objet de cette thèse, comment la persistance de son activation contribue, dans un contexte inflammatoire, à la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la myélofibrose primitive.

### **10.1.1/ Les « Mitogen-activated protein kinases » p38**

La fonction de p38 dans l'hématopoïèse normale humaine est principalement de type inhibitrice de la croissance cellulaire, via des signaux répresseurs de prolifération et des signaux pro-apoptotiques. Par exemple, p38 est activée dans les lignées cellulaires hématopoïétiques en réponse aux cytokines telles que les interférons de type I (IFN-alpha et -beta) et de type II (Verma et al., 2002), le TNF-alpha (Uddin et al., 1999) (Uddin et al., 2000), le TGF- $\beta$  (Verma et al., 2002) qui sont connues pour diminuer la croissance cellulaire et/ou provoquer l'apoptose des cellules hématopoïétiques. De plus, la protéine p38 régule l'expression de cytokines qui peuvent en retour auto-activer la voie de signalisation p38, créant ainsi une boucle de régulation complexe. Par exemple, l'érythropoïétine est sous le contrôle de p38 $\alpha$  et l'activation de p38 est essentielle pour médier les effets de cette cytokine (Tamura et al., 2000).

### 10.1.2/ Rôle de p38 dans la niche hématopoïétique

Le rôle de la signalisation et plus particulièrement de la voie des MAPK dans la niche hématopoïétique est actuellement mal connu. Il a été suggéré que la signalisation p38 participait à la régulation de la quiescence des CSH au sein de la niche ostéoblastique. En effet, une augmentation de la phosphorylation de p38 entraîne une diminution de la quiescence des CSH. La protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated) modifie la capacité de repopulation à long terme des CSH murines sachant que les souris ATM<sup>-/-</sup> présentent un défaut de maintien en quiescence des CSH. Il n'y a pas d'altération de leur prolifération et de leur différenciation dans ce modèle murin (Ito et al., 2006). Les souris ATM<sup>-/-</sup> présentent une sensibilité accrue au stress oxydatif (Rotman & Shiloh, 1997) qui, comme les autres stress cellulaires, active la voie de signalisation p38 MAPK et altère la quiescence des CSH dans la niche ostéoblastique (Ito et al., 2004).



*Figure 28 : Sénescence induite par p38 dans les cellules normales versus les cellules de patients atteints de LMC exprimant la protéine de fusion BCR-ABL*  
 D'après (Savona & Talpaz, 2008)

### **10.1.3/ Rôle de p38 dans les leucémies**

Jusqu'à présent il existe peu d'études démontrant le rôle de l'activation de p38 dans la pathogénèse des leucémies aiguës. La MAPKAPK-2 kinase, un effecteur en aval de p38, est activée lors de la différenciation des cellules de la lignée NB4 (modèle de LAM avec translocation t(15;17)) par de l'ATRA « all trans retinoic acid ». Cette dernière est inhibée par SB203580, un inhibiteur pharmacologique de p38. L'inhibition de p38 augmente la différenciation de NB4 induite par l'ATRA suggérant que p38 participe à l'inhibition de la différenciation et donc au maintien de l'état indifférencié des cellules leucémiques. Dans d'autres circonstances, p38 et ERK peuvent coopérer pour induire la réponse aux cytokines. En particulier, il a été montré que p38 et ERK régulent la prolifération des cellules OCI-AML5 (lignée cellulaire issue d'une AML5 myélomonocytaire) en réponse au Flt3-ligand et G-CSF (Srinivasa & Doshi, 2002).

Dans une cellule normale, ABL exerce un effet stimulateur sur p38 et sur les inhibiteurs des kinases cyclines dépendantes (CDKIs), p16 et p19, qui orientent la cellule vers la sénescence. La protéine p38 phosphorylée inhibe BIM1, un répresseur épigénétique de p16 et p19. En revanche, chez les patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la protéine de fusion BCR-ABL conduit à la déphosphorylation de p38. Le rôle inhibiteur de p38 sur BIM1 étant diminué, voire interrompu, il en résulte une réduction de la sénescence des cellules leucémiques (Figure 28) (Savona & Talpaz, 2008).

L'ensemble de ces données suggère que les voies des MAPK et en particulier la voie p38 sont impliquées dans la physiopathologie des leucémies (Feng, Wen, & Chang, 2009). Notamment le rôle de p38 activé dans les syndromes myélodysplasiques a été suggéré en réponse aux cytokines myélosuppressives telles que TNF $\alpha$  et TGF $\beta$  (Katsoulidis et al., 2005). La MAPK p38 est donc une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des processus prolifératifs tels que les leucémies et cancer (Yong, Koh, & Moon, 2009). De façon intéressante, dans la leucémie aiguë lymphoblastique dont la prolifération cellulaire est en partie dépendante du stroma, une thérapie ciblant p38 réduit la production de cytokines par les cellules stromales médullaires et diminue la prolifération leucémique (Gaundar, Bradstock, & Bendall, 2009)

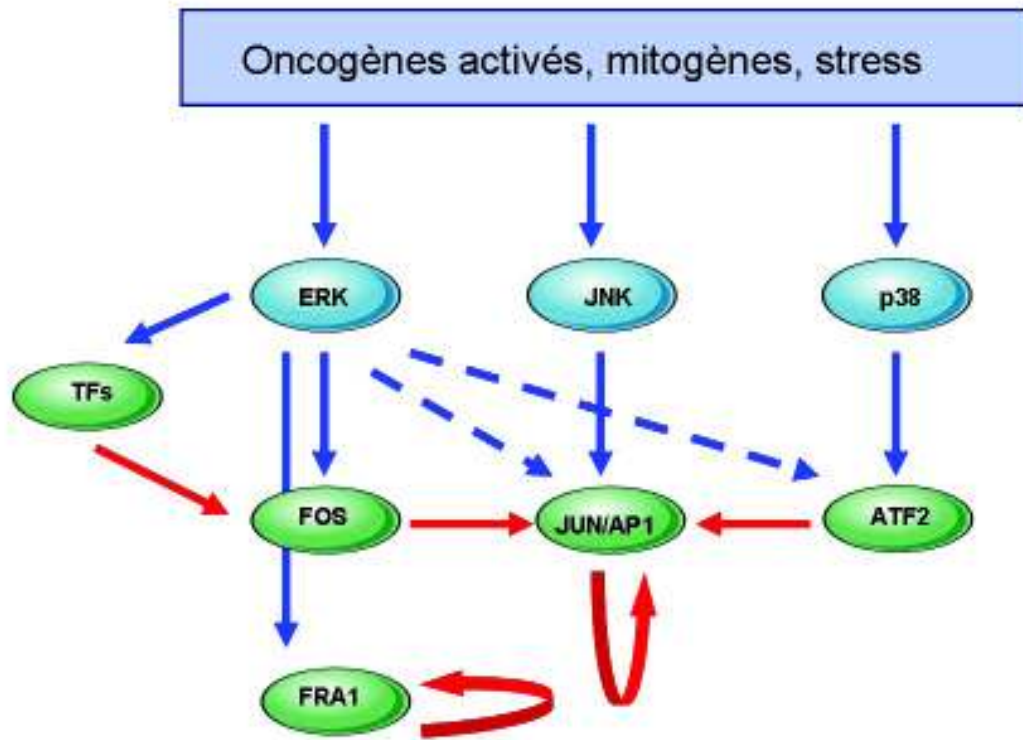
### **10.2/ ATF2 effecteur en aval de p38**

ATF2 est l'un des 16 membres du groupe ATF CREB, des facteurs de transcription de type bZIP intervenant dans la réponse cellulaire au stress ou au dommage de l'ADN

(Wisdom, 1999). La phosphorylation d'ATF2 par p38 et JNK, en réponse au stress ou aux stimuli induits par certaines cytokines, provoque son homodimérisation ou son hétérodimérisation avec d'autres facteurs de la famille AP1 comme JUN (Eferl & Wagner, 2003) (Ouwens et al., 2002). ATF2, protéine exprimée de façon ubiquitaire, est impliquée dans le remodelage de la chromatine. Elle est nécessaire à la déacétylation de H3 et H4, un prérequis à la méthylation en lysine 9 de H3 et l'assemblage de l'hétérochromatine (Bhoumik, Lopez-Bergami, & Ronai, 2007) et à l'acétylation de H2B et H4 *in vivo* (Kim, Choi, Shin, Jang, & Park, 2004) (Bruhat et al., 2007).

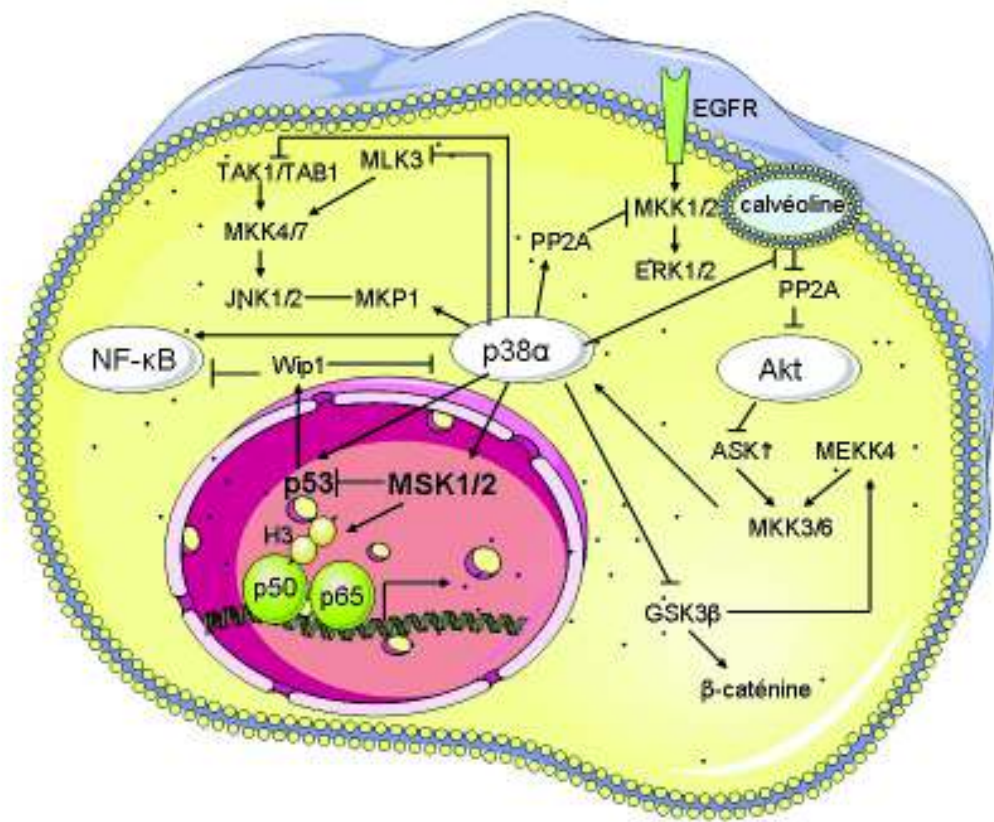
### **10.3/ Réponse transcriptionnelle du complexe AP1 en aval des « Mitogen-activated protein kinases » dont p38**

L'activation de ERK, JNK et p38 est responsable de la phosphorylation de Fos, Jun et Atf2 en réponse au stress, aux agents mitogènes et à l'activation des oncogènes (Figure 29). Erk et JNK participent, tout comme p38, à l'activation du facteur de transcription Jun et d'Atf2. Erk induit également la transcription de FOS via l'activation de facteurs de transcription non-AP1. La transcription des protéines de la famille AP1 est aussi régulée par des « crosstalks » entre les complexes AP1 et par autophosphorylation.



**Figure 29 : Réponse transcriptionnelle du complexe JUN/AP1 en aval des MAPK**

ERK, JNK et p38 sont responsables de la phosphorylation de FOS, JUN et ATF2 en réponse au stress et aux agents mitogènes (flèches pleines). ERK et JNK participent, tout comme p38, à l'activation de AP1 et ATF2 (flèches pointillées). ERK induit aussi la transcription de FOS via l'activation de facteurs de transcription non-AP1 (TFs). La transcription des protéines AP1 est régulée par des « crosstalks » entre les complexes AP1 (flèches rouges) mais aussi par autophosphorylation (flèches rouges circulaires) (Sunters, McCluskey, & Grigoriadis, 1998)



**Figure 30 : Modulation croisée de la voie MAPK p38 avec d'autres voies de signalisation**  
 D'après (Cuadrado & Nebreda, 2010)

*JUN* est un gène induit par un stimulus mitogénique, un stress ou un dommage à l'ADN. Le niveau d'expression d'AP1 est finement contrôlé via la demi-vie courte de son ARNm (20 à 25 minutes) et la présence de séquences AU-riches en 3'UTR. Jun transactive de nombreux gènes contrôlant le cycle cellulaire et notamment la transition G1-S, comme la cycline D1. JUN contrôle également des gènes régulateurs du cycle cellulaire comme TP53 (Schreiber et al., 1999). La surexpression de JUN *in vitro* est suffisante à la transformation de certaines cellules de mammifères (Bakiri, Lallemand, Bossy-Wetzel, & Yaniv, 2000). Chez ces derniers, le complexe AP-1 est constitué d'homodimères ou d'hétérodimères composés de protéines des familles Jun et Fos, Atf, et des sous familles CREB et Maf. Ce sont des protéines comprenant des domaines bZIP (basic leucine zipper) composés de leucine zipper et de domaines basiques qui permettent à la protéine de se fixer à l'ADN. (Lopez-Bergami, Lau, & Ronai, 2010) Les protéines Jun forment des dimères reconnaissant les motifs ADN 5'-TGAC/GTCA-3' ou TPA-response elements (TRE). Les protéines ATF forment des dimères avec AP1 reconnaissant les éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE, 5'-TGACGTCA-3') (Vogt, 2001). Les protéines du complexe AP1 sont généralement activées en réponse à de multiples signaux extracellulaires provenant de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans le stress et l'inflammation (Angel et al., 1987) (van Dam & Castellazzi, 2001).

Dans un modèle murin, l'expression transgénique de Fos induit la transformation des chondroblastes et des ostéoblastes et est à l'origine de la formation de tumeurs chondrogéniques et ostéogéniques (Goralczyk et al., 1990). De même, la surexpression de FRA1 accélère l'ostéoblastogénèse et induit une ostéosclérose chez la souris (Jochum et al., 2000), suggérant une implication des membres de la famille AP1 dans la différenciation de cellules ostéocompétentes composant la niche endostéale.

Tous ces exemples montrent l'intrication complexe entre les différentes voies MAPK, puisque c'est la combinaison entre différents facteurs de transcription activés par ERK, JNK et p38 qui va dicter la réponse cellulaire. Il existe aussi de nombreux exemples dans lesquels les MAPK et en particulier p38 peuvent moduler l'activation d'autres voies de signalisation comme NFkB (Chang et al., 2006), Akt (Zuluaga et al., 2007), SMAD (Demange, Ferrand, Prunier, Bourgeade, & Atfi, 2009).



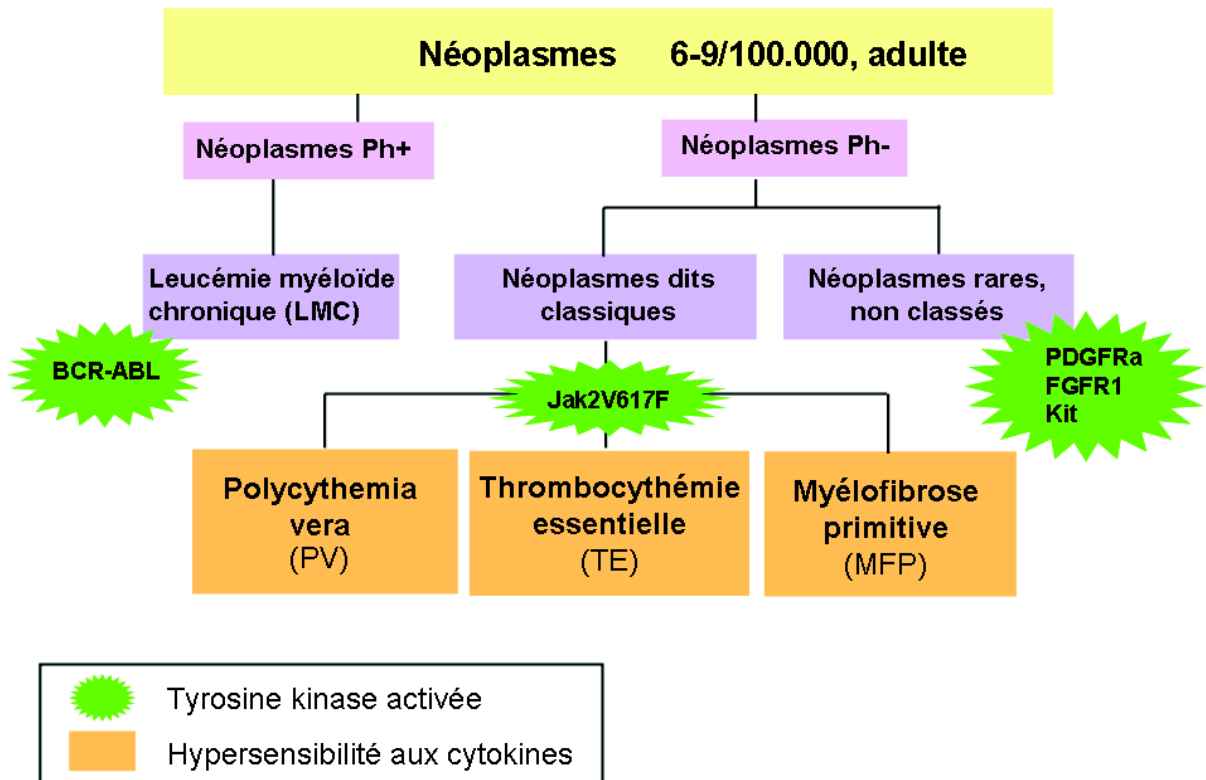


Figure 31 : Classification des néoplasmes myéloprolifératifs

## 11/ Des syndromes aux néoplasmes myéloprolifératifs chroniques

Les Néoplasmes MyéloProlifératifs (NMP), anciennement appelés syndromes myéloprolifératifs (SMP), sont considérés comme des maladies clonales de la cellule souche hématopoïétique pluripotente. Les SMP rassemblaient différentes hémopathies telles que la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polycythemia vera (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP) (Dameshek, 1951) (Cf. Chapitre suivant §11).

Plus récemment, des avancées importantes dans la pathogenèse de ces hémopathies ont permis de regrouper ces NMP selon d'autres critères tels que la présence d'une dérégulation de protéines de la famille des tyrosines kinases soit par mutations (Jak2V617F) ou de translocations (*BCR-ABL1* ou autres tyrosines kinases plus rarement). La Figure 31 reprend cette classification.

La classification des néoplasmes myéloprolifératifs fait intervenir un premier groupe représenté par la Leucémie Myéloïde Chronique caractérisée par le gène de fusion *BCR-ABL*, un second groupe intègre les néoplasmes myéloprolifératifs classiques associés à la mutation Jak2V617F, comprenant la PV, la TE et la MFP et un dernier groupe rassemble les néoplasmes plus rares impliquant les gènes codant pour des protéines à activité tyrosine kinase. La mastocytose a récemment été rattachée aux néoplasmes myéloprolifératifs en raison de sa pathogénèse et de la présence de mutations dans le gène *C-KIT*. Au cours de l'année 2008, la classification des néoplasmes myéloprolifératifs a été redéfinie par l'organisation « World Health Organization » (WHO) et intègre actuellement les NMP suivants (Vardiman et al., 2009) :

- la leucémie myéloïde chronique
- la polycythemia vera
- la thrombocytémie essentielle
- la myélofibrose primitive
- la leucémie chronique neutrophile
- la leucémie chronique éosinophile
- la mastocytose
- les néoplasmes myéloprolifératifs inclassables.

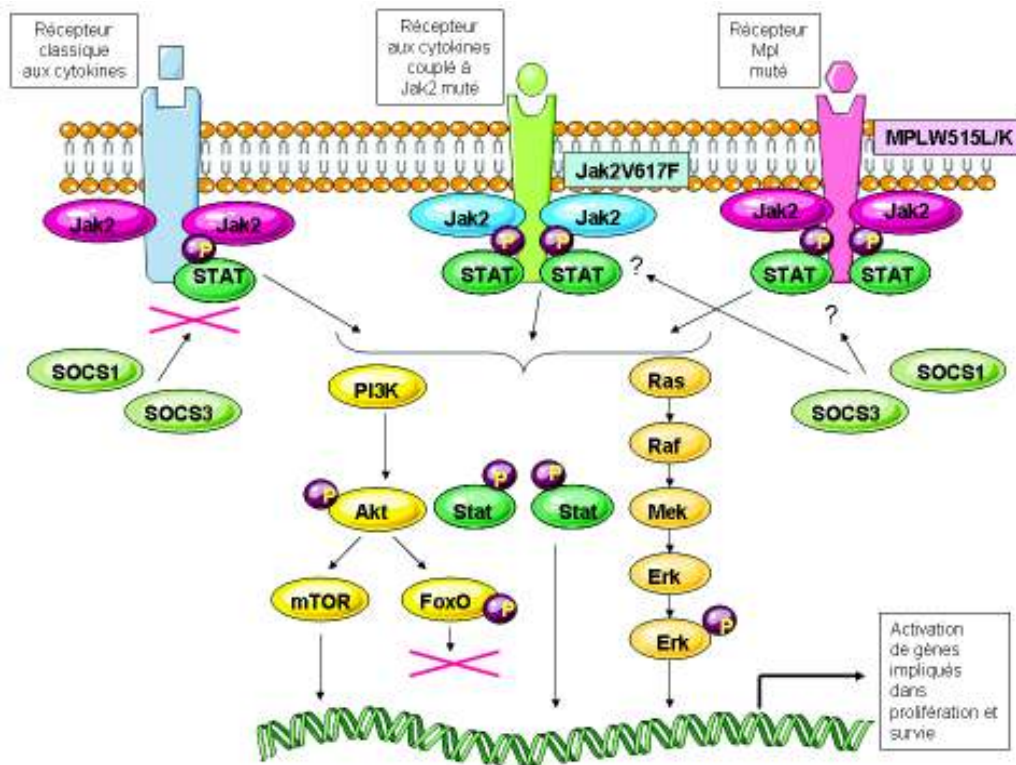
Dans cette partie de l'introduction, je ferai un état de l'art sur les connaissances acquises sur la myélofibrose primitive en intégrant les articles auxquels j'ai participé et qui sont mis en annexes.

### **11.1/ Historique des néoplasmes myéloprolifératifs dits « classiques »**

L'histoire commence en 1879, lorsque le médecin allemand Gustave Heuck rapporta le cas de deux patients avec une splénomégalie majeure, des cellules érythroblastiques circulantes et un taux élevé de leucocytes (Heuck, 1879). Ce tableau clinique différait de celui de la LMC par une fibrose médullaire et une hématopoïèse extramédullaire. Louis Henri Vaquez décrivit ensuite l'existence d'une polyglobulie (Polycythemia vera) chez un patient présentant une érythrocytose importante et une hépatomégalie (Vaquez, 1892). En 1903, William Osler proposa le nom de « maladie de Vaquez » pour définir cette nouvelle entité clinique caractérisée par une cyanose chronique associée à une polyglobulie et une splénomégalie (Osler, 1903). La myélofibrose primitive a été décrite par Gustave Heuck, un médecin allemand qui a noté la présence d'une fibrose médullaire et d'une hématopoïèse extramédullaire chez ces patients. En 1934, Epstein et Goedel identifient des patients présentant une thrombocytose, sans érythrocytose, comme un syndrome clinique distinct : la thrombocythémie essentielle (Epstein & Goedel, 1934). C'est enfin William Dameshek qui, en 1951, proposa de regrouper ces différentes hémopathies sous le terme unique de « néoplasme myéloprolifératif » (Dameshek, 1951) (Tefferi, 2008a).

## **11.2/ Les mutations et les néoplasmes myéloprolifératifs**

La découverte récente de la mutation Jak2V617F dans les cellules hématopoïétiques des patients atteints de néoplasmes myéloprolifératifs chroniques *BCR-ABL1* négatifs a ajouté un aspect génétique supplémentaire à cette classification. Cette découverte a été faite par plusieurs groupes et en particulier le groupe de W. Vainchenker en France, en utilisant deux approches différentes: 1/ une approche cellulaire basée sur le fait que les cellules hématopoïétiques de ces patients prolifèrent en l'absence de cytokines comme l'érythropoïétine (James et al., 2005), 2/ une approche génétique, par typage microsatellite, identifiant une zone de perte d'hétérozygotie sur le bras court du chromosome 9 au niveau du locus du gène de la tyrosine kinase Jak2 (Kralovics et al., 2005). Jak2 est une protéine cytoplasmique clé dans la transmission du signal en réponse aux stimuli de nombreuses cytokines hématopoïétiques. La mutation Jak2V617F est présente dans le domaine pseudotyrosine kinase (JH2) qui est un régulateur du domaine tyrosine kinase (JH1). C'est une mutation somatique dont l'acquisition semble restreinte au compartiment hématopoïétique. L'allèle Jak2V617F a été retrouvé dans le compartiment des cellules souches hématopoïétiques de la majorité (96%) des patients atteints de *Polycythemia vera* (Baker et al., 2007) ainsi que chez environ 50 à 60% des patients atteints de TE ou de MFP (Tefferi & Vainchenker, 2011). L'importance de la mutation Jak2 dans la pathogenèse des NMP a été fortement suggérée dans des modèles expérimentaux. En effet, les souris greffées avec des cellules médullaires transduites par un rétrovirus codant pour la protéine mutée Jak2V617F développent une polyglobulie qui évolue vers une fibrose médullaire, reproduisant l'évolution naturelle d'une myélofibrose secondaire à une PV (Lacout et al., 2006). Le rôle direct de cette mutation dans la physiopathologie de la MFP ne semble pas aussi évident puisque la moitié des patients dépourvus de la mutation présentent un tableau clinique similaire à celui des patients Jak2V617F (Levine et al., 2006). Il est actuellement suggéré que le tableau clinique serait lié à la quantité de la protéine mutée par cellule, intégrant la notion d' « allele burden » dans le phénotype de la maladie.



**Figure 32 : Activation des voies de signalisation dans les néoplasmes myéloprolifératifs**

D'après (Grimwade et al., 2009).

Les mutations Jak2V617F et MPLW515L/K activent en continu les voies de signalisation Jak/STAT, PI3K et MAPK dans les cellules hématopoïétiques.

mutations	nom complet	localisation chromosomique	fréquence mutationnelle	contribution aux processus pathogéniques
Jak2V617F exon 14	Janus kinase 2	9p24	PV ~ 96% TE ~ 55% MFP ~ 65% Crise Blastique ~ 50%	contribue à la myéloprolifération hypersensibilité des progéniteurs aux facteurs de croissance
Jak2 exon 12	Janus kinase 2	9p24	PV ~ 3% TE ~ rare MFP ~ rare Crise Blastique ~ ?	contribue à la myéloprolifération érythroïde primaire
Mpl exon 10 (MPL 515W>L/K)	Myeloproliferative Leukemia Virus oncogene	1p34	PV ~ rare TE ~ 3% MFP ~ 10% Crise Blastique ~ ?	contribue à la myéloprolifération mégacaryocytaire
TET2 mutations dispersées	TET oncogene family member 2	4q24	PV ~ 16% TE ~ 5% MFP ~ 17% Crise Blastique ~ 17%	contribue à des modifications épigénétiques qui modulent la transcription
ASXL1 exon 12	Additional Sex Combs-Like 1	20q11.1	PV ~ ? TE ~ ? MFP ~ ? Crise Blastique ~ 19%	modifie la régulation transcriptionnelle modifie la signalisation RAR (récepteur acide rétinoïque)
CBL exon 8 et 9	Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene	11q23.3	PV ~ rare TE ~ rare MFP ~ 6% Crise Blastique ~ ?	défaut d'ubiquitinylation des oncoprotéines
IDH1/IDH2 exon 4/exon 4	Isocitrate deshydrogenase	2q33.3/15q26.1	PV ~ rare TE ~ rare MFP ~ 4% Crise Blastique ~ 20%	induit l'accumulation de 2-hydroxyglutarate
IKZF1	IKAROS family zink finger 1	7p12	PV ~ rare TE ~ rare MFP ~ 4% Crise Blastique ~ 20%	altère l'activité suppresseur de tumeur de la protéine wild-type

**Tableau 6 : Bilan des mutations présentes chez les patients atteints de néoplasmes myéloprolifératifs chroniques BCR-ABL1 négatifs**

Adapté d'après (Tefferi, 2010).

Abbréviations : PV : Polycythemia vera, TE : Thrombocytémie Essentielle, MFP : Myélofibrose Primitive.

La mutation Jak2V617F active plusieurs voies de signalisation en aval des récepteurs aux cytokines, comprenant notamment les facteurs de transcription de la famille STAT, les MAPK (mitogen activated protein kinases) et la voie PI3K-AKT (Levine, Pardanani, Tefferi, & Gilliland, 2007) (Figure 32). Plus précisément, la mutation induit une activation de la signalisation intracellulaire de façon indépendante du ligand, conduisant à la phosphorylation du signal en aval de JAK/STAT et PI3K. Par l'activation continue des voies de signalisation habituellement sollicitées en réponse aux cytokines, la mutation Jak2V617F induit la phosphorylation de STAT5 et Akt dans les cellules hématopoïétiques. La dérégulation de la voie de signalisation Jak2 peut également entraîner des modifications épigénétiques. En effet, l'activation constitutive de Jak2, via la mutation Jak2V617F, permet la phosphorylation directe de l'histone H3 sur le résidu Y41 et l'exclusion de HP1alpha de la chromatine (Dawson et al., 2009). Il en résulte une activation de la transcription et une accumulation de protéines oncogéniques induisant des signaux de prolifération.

En dehors de la mutation Jak2V617F, le séquençage à haut débit a permis de mettre en évidence la présence d'autres mutations chez les patients atteints de néoplasmes myéloprolifératifs *BCR-ABL1* négatifs. Le Tableau (6) fait le bilan de ces différentes mutations dont les principales sont *JAK2* Exon 12, *MPLW515K* et *515L*, *TET2*, *ASXL1*... (Tefferi, 2010). Ces mutations ne sont pas spécifiques et sont retrouvées dans d'autres pathologies myéloïdes comme les syndromes myélodysplasiques ou les leucémies aigües. Alors que les mutations *JAK2* et *MPL* participent très vraisemblablement au développement du clone hématopoïétique, ces autres mutations, beaucoup moins fréquentes, pourraient contribuer à l'hétérogénéité clinique de ces NMP.

## **12/ La myélobiose primitive (MFP)**

Néoplasme myéloprolifératif (NMP) le plus rare, cette maladie associe, avec une intensité variable, une splénomégalie (résultant d'une métaplasie myéloïde), des anomalies caractéristiques de l'hémogramme et de la moelle osseuse (myélobiose notamment). Les nombreux synonymes, utilisés jusqu'à présent (Splénomégalie Myéloïde, Métaplasie Myéloïde avec Myélobiose ...) témoignent de la difficulté de définir cette hémopathie de façon simple. Les experts internationaux s'accordent désormais à leur préférer le terme de « Myélobiose Primitive » (MFP), la distinguant ainsi des fibroses secondaires à une évolution des PV et TE (Mesa et al., 2007). L'incidence de la maladie représente 3 à 7 nouveaux cas/million d'habitant/an avec un âge moyen au diagnostic de 60 ans. Le sexe ratio de la maladie est équilibré. Des facteurs favorisants ont été décrits comme une exposition prolongée aux dérivés benzéniques (Hu, 1987) et les radiations ionisantes (Anderson, Hoshino, & Yamamoto, 1964).

La découverte récente de la mutation Jak2V617F, redéfinissant le cadre des NMP *BCR-ABL1* négatifs a relancé l'intérêt des hématologues pour cette pathologie chronique. En effet, le développement récent de nombreux travaux et essais thérapeutiques, permettent d'espérer améliorer le pronostic de cette maladie dont la médiane de survie reste, à ce jour, d'environ cinq ans.

### **12.1/Diagnostic clinique et anatomopathologique**

#### **12.1.1/ Clinique**

Sur le plan clinique, la MFP se traduit par la présence d'une splénomégalie plus ou moins associée à un syndrome anémique, une asthénie, des douleurs abdominales et un amaigrissement. La splénomégalie de taille variable, parfois volumineuse, est un signe constant ; elle apparaît précocement dans la maladie (Dupriez et al., 2008).

L'anémie est le principal facteur pronostique de la maladie : le score pronostique de Dupriez en tient compte (Dupriez et al., 1996). L'hépatomégalie est présente dans 50% des cas, en particulier chez les patients splénectomisés (Tefferi, Mesa, Nagorney, Schroeder, & Silverstein, 2000). Des adénopathies sont palpables dans environ 10% des cas.

Récemment, deux nouveaux scores pronostiques, le score IPSS (Cervantes et al, Blood 2009) et le DIPSS (Passamonti et al, Blood 2010), sont venus s'ajouter au score de référence de Dupriez et Demory (Dupriez et al., 1996). Ces nouveaux scores utilisent 5

facteurs péjoratifs indépendants permettant une stratification en 4 groupes pronostiques, ne tenant pas compte cependant des données cytogénétiques et du nombre plaquettes comme le propose récemment Caramazza et al (Caramazza et al., 2011).

### **12.1.2/ Hémogramme**

L'anémie est une caractéristique fréquente puisqu'elle concerne 75% des cas. Elle s'accompagne de nombreuses anomalies morphologiques des érythrocytes comme l'anisocytose, la poïkilocytose, la dacryocytose, la schizocytose et la sphérocytose. Une érythromyélie se traduisant par la présence d'érythroblastes acidophiles et polychromatophiles est souvent observée (Figure 33). Cette érythromyélie est plus importante chez les patients splénectomisés. Une hyperleucocytose modérée peut s'accompagner d'une myélémie mais aussi de la présence de quelques blastes. La numération des plaquettes est très variable parfois normale, augmentée ou diminuée ou associée à une anisothrombocytose.

### **12.1.3/ Augmentation du nombre de progéniteurs circulants CD34<sup>+</sup>**

L'immunophénotypage des cellules mononucléées circulantes des patients montre une augmentation du nombre de progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup>. Bien que celui-ci puisse atteindre jusqu'à 100 fois la valeur normale et qu'il évolue avec la progression de la maladie (Barosi et al., 2001), il n'est pas actuellement considéré comme un critère diagnostique selon la classification de l'OMS (Vardiman et al., 2009) (Tableau 7).

### **12.1.4/ Histologie médullaire et myélofibrose**

L'aspiration médullaire est en général infructueuse en raison de la fibrose et de la dureté de l'os. La biopsie ostéomédullaire s'avère alors d'un grand intérêt pour évaluer la prolifération myéloïde en particulier mégacaryocytaire, la désorganisation vasculaire et la myélofibrose.

Les mégacaryocytes sont généralement hypertrophiques et dystrophiques. Ils ont un aspect morphologique caractéristique avec une taille variable, des noyaux mal segmentés, nuageux et sont regroupés en grappes.

Les remaniements vasculaires sont caractérisés par une augmentation du nombre et de la taille des sinusoides. Ils sont mis en évidence précocément par immunohistochimie grâce à des antigènes endothéliaux (CD34, CD31...).

La fibrose médullaire résulte d'une augmentation de synthèse et du dépôt de plusieurs glycoprotéines interstitielles ou de membrane basale tels que les collagènes de types I, III, IV,



V, VI, de fibronectine, de vitronectine, de laminine et de ténascine, par les cellules fibroblastiques (Kuter, Bain, Mufti, Bagg, & Hasserjian, 2007). Dans la MFP, les collagènes de type I et III ainsi que la réticuline sont les composants extracellulaires prépondérants de la fibrose médullaire (Bock et al., 2006). La myélofibrose est dite de type réticulinique puis collagénique avec une désorganisation de l'architecture du tissu hématopoïétique (Figures 33 et 34). Le tissu fibreux est souvent colonisé par les cellules ostéo-compétentes qui concourent à l'installation d'une ostéosclérose résultant de la formation de trabécules osseux désorganisés. L'observation histologique de la BOM permet de définir différents stades de fibrose (Tableau 8). Récemment, lors de la révision de la classification de l'OMS (WHO 2008), le stade histologique 0 correspondant à un état préfibrotique a été débattu et doit être pris en compte lors du diagnostic différentiel avec la thrombocythémie essentielle (Vardiman et al., 2009) (Thiele & Kvasnicka, 2003). Ces différents stades sont identifiés après coloration des coupes de biopsies ostéo-médullaires (BOM) par l'hémalin eosine safran (morphologie cellulaire), la coloration argentique (fibres de réticuline) et le trichrome de Masson (fibres de collagène) (Figures 34 et 35).

## **12.2/ Diagnostic génétique**

### **12.2.1/ Anomalies cytogénétiques**

A la différence de la leucémie myéloïde chronique au cours de laquelle on retrouve une anomalie cytogénétique bien caractérisée (remaniement BCR-ABL), les patients atteints de myélofibrose primitive ne présentent pas d'anomalies cytogénétiques spécifiques. Dans l'étude de Reilly et *al* comprenant 106 cas, 35% des sujets possédaient une anomalie caryotypique clonale (37/106), notamment des délétions 13q (9/106), des délétions 20q (8/106), des trisomies partielles du chromosome 1 (7/106) et des trisomies 9.

Classification référente	Ordre des critères diagnostiques	Description des critères
Polycythemia Vera Study Group (PSVG 1975)		Splénomégalie
		Fibrose sur plus d'un tiers de la biopsie médullaire
		Erythromyéémie
		Absence de chromosome Philadelphie
Révision OMS 2008	critères majeurs	Prolifération de mégacaryocytes atypiques habituellement associés à une fibrose réticulinique et/ou collagène. Si pas de fibrose réticulinique alors les mégacaryocytes doivent être associés à une hypercellularité médullaire.
		Ne recouvre pas les critères OMS de la Polycythemia vera, de la leucémie myéloïde chronique, des syndromes myélodysplasiques et des autres néoplasies myéloïdes
		Présence de la mutation jak2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité comme MPL515. Si absence pas de myélofibrose inflammatoire ou due à autre néoplasie
	critères mineurs	Erythromyéémie
		Augmentation des lactico-déshydrogénases (LDH)
		Anémie
		Splénomégalie palpable

### Tableau 7 : Critères diagnostiques de la myélofibrose primitive

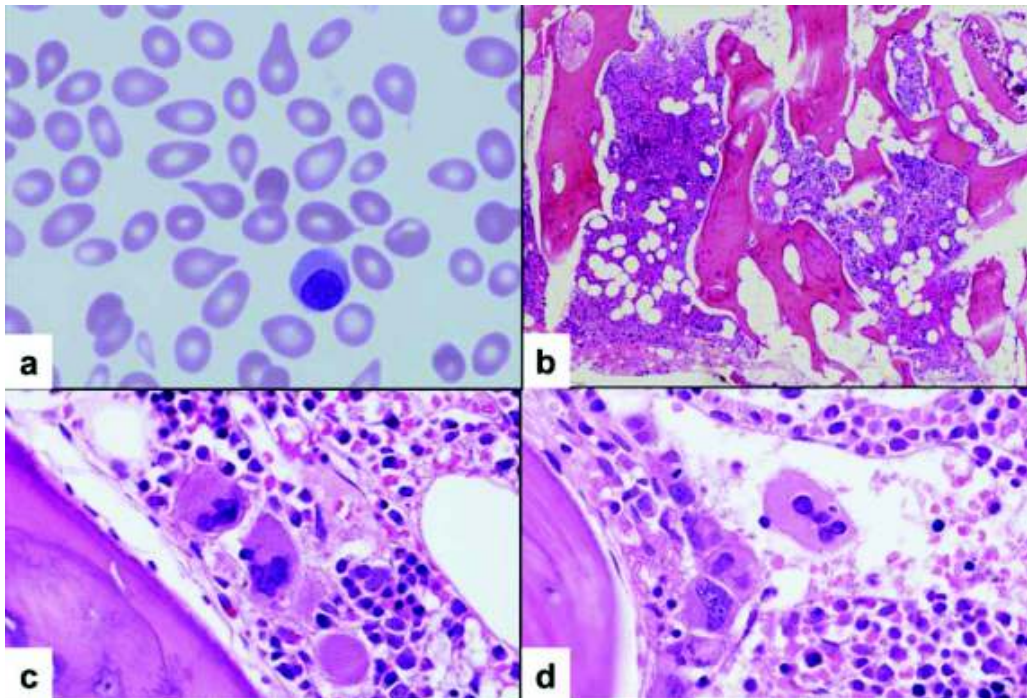
Selon la classification de l'OMS/WHO, le diagnostic de MFP est réalisé lors de l'association de 3 critères majeurs et de 2 critères mineurs

D'après (Laszlo, 1975) (Vardiman et al., 2009)

Stade	Description de la fibrose	Anomalies du tissu hématopoïétique
0 (préfibrotique)	Fibres éparées dans toutes les directions	Hyperplasie myéloïde globale, mégacaryocytes dystrophiques, néo-vaisseaux, sinus dilatés
I	Réseau dense de réticuline avec renforcement périvasculaire, absence de collagène	Hyperplasie myéloïde globale, mégacaryocytes dystrophiques, néo-vaisseaux, sinus dilatés
II	Réseau dense de réticuline avec intersections et fibres de collagène, néo-ossification localisée	Moelle riche mais dissociée par travées parallèles de fibres de collagène
III	Réseau de réticuline très dense avec faisceaux marqués de collagène, néo-ossification	Néo-ossification anarchique avec une fibrose dense et des îlots myéloïdes résiduels

### Tableau 8: Classification des lésions histologiques médullaires dans la MFP

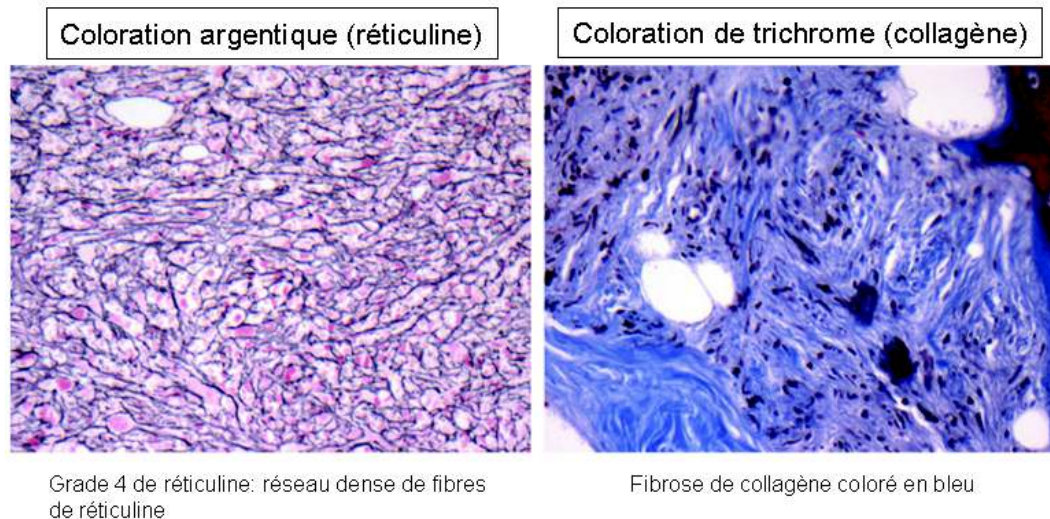
D'après (Thiele, Kvasnicka, Zankovich, & Diehl, 2001)



**Figure 33 : Altérations cellulaires (sang et moelle osseuse) observées chez un patient atteint de MFP**

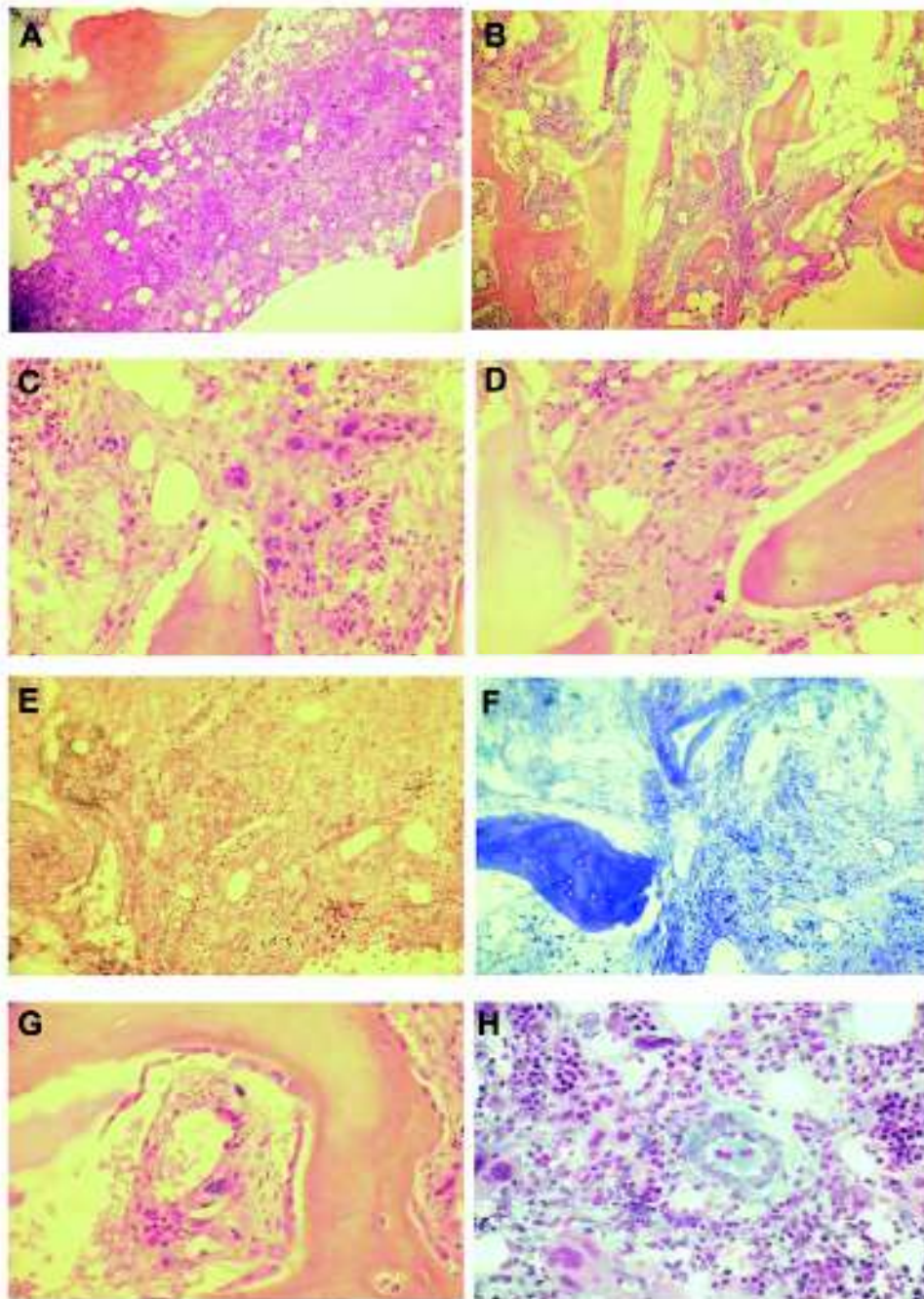
(Naresh, 2010)

A/ Sang périphérique : présence de nombreux dacryocytes et érythromyélémie avec érythroblastes acidophiles. B/ Biopsie ostéomédullaire : hypercellularité et présence de nombreux trabécules irréguliers (ostéosclérose). C et D/ Présence de nombreux mégacaryocytes localisés en grappe, de taille variable, avec des anomalies dans la segmentation nucléaire. Présence de sinus dilatés avec une hématopoïèse intra-sinusoïdale.



**Figure 34 : Caractérisation histologique de la fibrose médullaire**

A gauche : coloration argentique des fibres de réticuline (grade 4) : à droite : coloration du collagène (en bleu) par le trichrome de Masson (Kuter et al., 2007)



**Figure 35 : Eléments anatomo-pathologiques diagnostiques de la Myélofibrose Primitive**

(Photographies obtenues avec le concours du Dr Solène-Florence Jacquet). A/ Hyperplasie myéloïde observée dans les stades précoces de la MFP (coloration Hémalin Eosine Safran (HES), grossissement X100) ; B/ Importantes zones d'ostéosclérose avec de nombreuses lamelles osseuses aux contours irréguliers (coloration HES, grossissement X100) ; C/ Présence de mégacaryocytes dystrophiques groupés en amas, critère observable dès le stade 0 préfibrotique (coloration HES, grossissement X200) ; D/ Présence de mégacaryocytes avec une morphologie nucléaire anormale dite hyperchromatique (coloration HES, grossissement X200) ; E/ Présence de fibres réticuliniques avec de nombreuses intersections témoignant d'un stade avancé de la fibrose (coloration argentique, grossissement X100) ; F/ Présence de faisceaux de fibres de collagène témoignant d'un stade avancé de la fibrose (coloration Trichrome de Masson, grossissement X100) ; G/ Présence de sinus veineux d'aspects dilatés (coloration HES, grossissement X200) ; H/ Intensification de la répartition du collagène périnusoidal (coloration trichrome de Masson, grossissement X200)

Dans cette étude, un caryotype anormal était associé à un mauvais pronostic tout comme l'âge du diagnostic (âge supérieur à 68 ans), l'anémie, la thrombocytopénie et l'hyperleucocytose (Reilly et al., 1997). Trois grandes études comprenant 256 sujets (Demory et al., 1988) (Reilly et al., 1997) (Tefferi et al., 2001) et une étude de revue de la littérature compilant 157 cas (Bench, Nacheva, Champion, & Green, 1998) ont révélé que les délétions 13q, 20q, les trisomies 8 et les anomalies des chromosomes 1, 7, 9 représentaient 80% des anomalies chromosomiques observées dans la MFP. La délétion 13q est l'anomalie la plus couramment observée dans la MFP. Une étude récente sur 433 patients considère deux groupes d'anomalies cytogénétiques dites favorables telles que : remaniements du chromosome 1, trisomie 9, délétions 13q et 20q, caryotype normal, une anomalie isolée ou deux anomalies autres que les défavorables telles que : trisomie 8, monosomie 7/délétion 7q, monosomie 5/délétion 5q, caryotype complexe (Caramazza et al., 2011).

### **12.2.2/ Clones et mutations**

La clonalité de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques a été initialement suggérée par des études portant sur l'inactivation du chromosome X et le polymorphisme du gène de la G-6-PD (Jacobson, Salo, & Fialkow, 1978) (Kahn, Bernard, Cottreau, Marie, & Boivin, 1975). L'appartenance des lignées B et T lymphoïdes au clone pathologique a été mise en évidence grâce aux mutations N-RAS, renforçant ainsi l'hypothèse de l'atteinte clonale d'une cellule souche pluripotente (Buschle et al., 1988). Hormis les mutations ponctuelles, diverses anomalies du caryotype sont également retrouvées et correspondent probablement à des sous-clones qui émergent secondairement du fait de l'instabilité génétique du clone mutant qui pourrait être induit en particulier par l'acquisition de la mutation Jak2V617F (Tefferi & Vainchenker, 2011).

Les techniques de biologie moléculaire ont également permis d'identifier différentes anomalies récurrentes. Une hyperexpression du gène *HMGA2* chez des patients présentant ou non un remaniement de la région 12q15 (Andrieux et al., 2006) et un remaniement du gène *NOG* (17q22) ont été décrit chez plusieurs patients présentant une myélofibrose primitive ou secondaire (Andrieux et al., 2007) (Travaux auxquels j'ai participé et dont les articles sont mis en annexes). L'hybridation génomique comparative (CGH) démontre également un gain chromosomique concernant les régions 9p, 2q, 3p, le chromosome 4, 12q et 13q17, chez 50% des patients (Al-Assar et al., 2005).

La perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 9, retrouvée dans 30% des MFP, recouvre une région contenant 33 gènes dont le gène *JAK2* (9p24) (Kralovics et al.,

2005). La mutation ponctuelle de Jak2V617F (transversion G>T au niveau de l'exon 14) a été mise en évidence dans 50 à 65% des cas à l'état hétérozygote et environ 13% à l'état homozygote (Campbell et al., 2006) (article mis en annexe). La conséquence de cette mutation est la perte de fonctionnalité du domaine auto-inhibiteur de la famille des Janus kinases (JAK) (James et al., 2005).

Deux mutations activatrices du gène du récepteur de la thrombopoïétine (TPO) *MPL* (MPLW515L et 515K) ont été identifiées chez 5 à 15% des patients. Retrouvées initialement chez les patients ne présentant pas la mutation Jak2, elles semblent pouvoir coexister (Pikman et al., 2006). En 2008, tout en gardant une place prépondérante aux critères histologiques dans le diagnostic de la maladie (Tefferi et al., 2007), la nouvelle classification de l'OMS a inclus ces données moléculaires dans le diagnostic de MFP (Tableau 6) (Vardiman et al., 2009).

Des variants du gène *TET2* ont été également retrouvés dans les cellules de patients atteints de différentes hémopathies myéloïdes (SMDs, SMPs, AML) et de MFP (Delhommeau et al., 2009).

Plus récemment, il a été découvert des mutations faux sens dans les domaines ring et linker de la protéine Cbl chez les patients atteints de MFP ou présentant une leucémie myélomonocytaire chronique (Grand et al., 2009). Les mutations de *CBL* entraînent une perturbation de l'activité ubiquitine ligase de la protéine. Le variant Cbl(R420Q) est la forme anormale la plus fréquemment observée chez les patients atteints de MFP. Cette mutation est peu fréquemment associée aux mutations Jak2V617F et MPL515 ; cependant, chez un patient porteur de deux mutations *CBL* et *JAK2*, il a été montré que l'apparition de la mutation Cbl était postérieure à celle de Jak2V617F et conférait un avantage prolifératif aux cellules mutées de *CBL* (Grand et al., 2009).

Enfin d'autres mutations ont été plus récemment décrites; parmi celles-ci citons les mutations *ASXL1*, *IDH1* et *IDH2*, *EZH2*, *LNK*.... (Tefferi, 2010) (Baran-Marszak et al., 2010) (Article mis en annexe).

Ainsi, chez les patients atteints de MFP, la coexistence de plusieurs clones porteurs d'anomalies différentes suggère que l'hématopoïèse pathologie est vraisemblablement d'origine polyclonale ou oligoclonale.

Les fibroblastes et les cellules endothéliales présentent un caryotype normal (Jacobson et al., 1978) (J. C. Wang, Lang, Lichter, Weinstein, & Benn, 1992). Cependant, alors que les fibroblastes ne présentent pas la mutation Jak2V617F, sa présence dans les cellules endothéliales reste toujours très controversée (Piaggio et al., 2009) (Teofili et al., 2011).

L'absence d'anomalies récurrentes décelables au niveau des cellules stromales ne permet donc pas à ce jour, de conclure sur leur appartenance ou non au(x) clone(s) pathologique(s).

### **12.2.3/ Anomalies épigénétiques**

Au cours des cancers, il est fréquemment observé une hyper méthylation des « CpG islands » et une désacétylation des histones interférant avec la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs ou des gènes de différenciation. Ces altérations conduisent en particulier à la survie des cellules cancéreuses par diminution de l'apoptose.

Dans la MFP, le promoteur de certains gènes comme ceux codant pour la calcitonine (Ihalainen, Juvonen, Savolainen, Ruutu, & Palotie, 1994), les gènes régulateurs du cycle cellulaire p15 et p16 (J. C. Wang, Chen, Nallusamy, Chen, & Novetsky, 2002), le récepteur  $\beta 2$  de l'acide rétinoïque (L. C. Jones et al., 2004) sont hyperméthylés. Plus récemment, des altérations de la méthylation du promoteur de SOCS3, impliqué dans le rétro-contrôle de la voie Jak/STAT (Fourouclas et al., 2008) (Chaligne et al., 2009), ont été également décrites.

Il en est de même pour le récepteur CXCR4 du SDF1/CXCL12 dont la diminution d'expression sur les PH CD34<sup>+</sup> est impliquée dans le mécanisme de migration anormale de ces cellules (Bogani et al., 2008) (Article mis en annexe). Le traitement séquentiel des PH de patients MFP par les agents modificateurs de la chromatine tels que TSA/5-AZA, restaure l'expression de CXCR4 ainsi que l'adressage des cellules vers la moelle osseuse chez les souris greffées (X. Wang et al., 2009). Malgré des résultats prometteurs chez la souris, l'utilisation d'agents déméthylants n'a cependant donné que des résultats limités chez l'homme (Quintas-Cardama et al., 2008) (Mesa et al., 2009).

L'inhibition du clone Jak2V617F par l'addition séquentielle d'un agent déméthylant et de trichostatine *in vitro* suggère également une possible implication des histones dans les dérégulations épigénétiques liées à la MFP (Shi et al., 2007). La mise en évidence d'une augmentation de l'activité des HDAC dans les progéniteurs hématopoïétiques des patients est en faveur de cette hypothèse. Cependant, le niveau des HDAC ne corrèle ni avec la présence de la mutation Jak2V617F ni avec le degré de fibrose, mais avec la taille de la rate (J. C. Wang et al., 2008). L'administration d'inhibiteurs des HDAC (comme l'acide valproïque) inhibe la croissance des cellules pathologiques comme le montre l'amélioration de la fonction médullaire chez un patient MFP échappant aux thérapies conventionnelles. Il a été suggéré que, chez ce patient, l'acide valproïque entraînerait une accumulation des histones acétylées modulant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Inoue et al., 2005). Bien qu'encore très préliminaires, l'ensemble de ces résultats

ouvre la voie à une possible utilisation thérapeutique d'agents modulant la régulation épigénétique dans cette pathologie. Cette approche thérapeutique pourrait venir en complément des thérapies actuellement utilisées.

### **12.3/ Approches thérapeutiques**

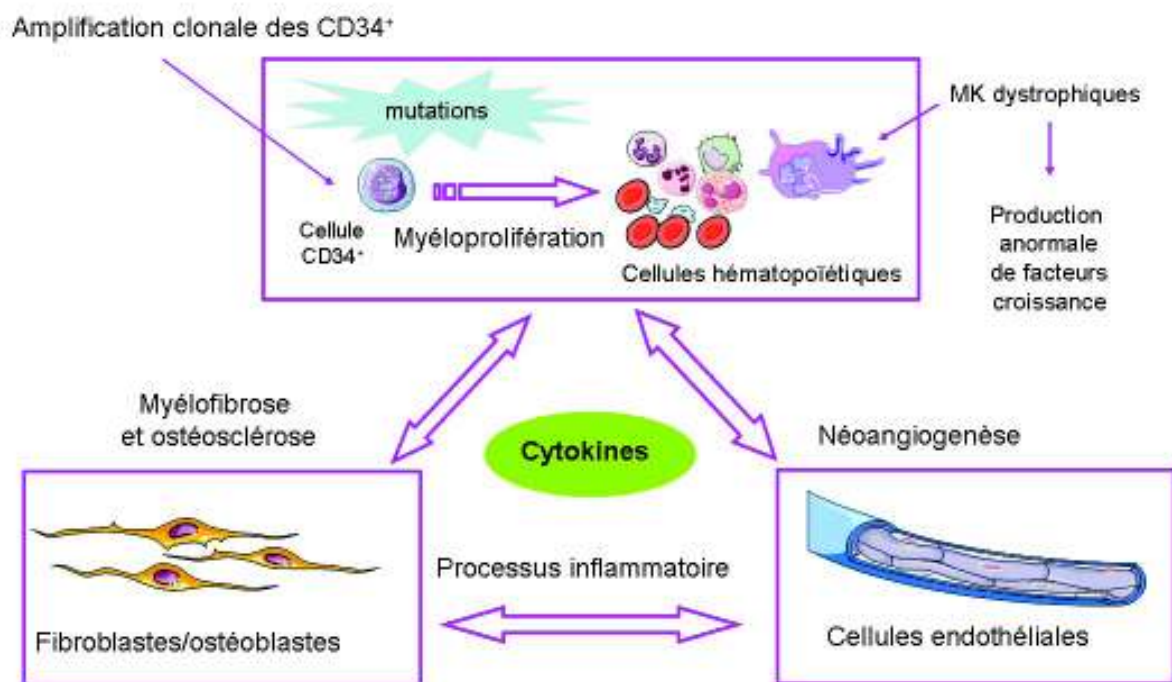
Sous l'égide de l'European LeukemiaNet, deux conférences de consensus regroupant un certain nombre d'experts ont établi des recommandations concernant la conduite thérapeutique à suivre pour les patients atteints de NMP et plus particulièrement de MFP (Barbui et al., 2011). Ces recommandations, basées sur le score pronostique péjoratif de l'IPSS, intègrent également des facteurs de risques généraux tels que diabète, risque de thromboses, hypertension artérielle... Dans le cas de la MFP, les anomalies cytogénétiques et le taux de CD34<sup>+</sup> circulants, marqueur de l'agressivité de la maladie, sont également pris en compte. Parmi les différents traitements : les corticoïdes, angrogènes, érythropoïétine, transfusions, immunomodulateurs ciblent l'anémie ; l'hydroxyurée est le traitement myélofreinateur de choix ; la splénectomie est indiquée lors d'une hypertension portale symptomatique ou d'une splénomégalie douloureuse réfractaire ; la greffe allogénique de CSH est justifiée chez les patients éligibles dont la médiane de survie est inférieure à 5 ans et/ou qui sont réfractaires aux autres traitements. Des essais thérapeutiques de phase I/II utilisant un inhibiteur de JAK1/JAK2, ont montré une nette amélioration de la qualité de vie et des signes cliniques (réduction importante de la splénomégalie..) mais sans qu'aucune modification objective de la myélofibrose ne soit observée. Deux essais de phase III sont actuellement en cours d'évaluation.

Ces nouvelles stratégies thérapeutiques, dont nous n'avons repris que les grandes lignes, reposent sur les avancées significatives de la compréhension de la physiopathologie de la maladie que nous exposons dans le chapitre suivant.

### **12.4/ Caractéristiques physiopathologiques**

Comme nous l'avons exposé précédemment, la myélofibrose primitive associe une myéloprolifération et une réaction stromale définie par une myélofibrose, une ostéomyélosclérose et une néoangiogénèse (Figure 36).





**Figure 36 : Caractéristiques physiopathologiques de la myéofibrose primitive**

Adaptée d'après (Le Bousse-Kerdiles & Martyre, 2001) (Lataillade et al., 2008) (Le Bousse-Kerdiles, Praloran, Martyré, & Membres du réseau de recherche clinique Inserm sur la myéofibrose, 2002)

### **12.4.1/ La myéloprolifération**

La myéloprolifération se caractérise par une augmentation dans le sang et dans la rate, du nombre de progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> (Thiele, Kvasnicka, & Czieslick, 2002). Le nombre élevé de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes (jusqu'à 2000 fois) a été initialement considéré comme un marqueur diagnostique de la maladie (Barosi et al., 2001). Contrairement aux lymphocytes, dont l'appartenance au clone malin reste discutée, celle des cellules CD34<sup>+</sup> est clairement établie (Delhommeau et al., 2007).

Les cellules CD34<sup>+</sup> des patients se différencient quasi normalement le long des trois lignées hématopoïétiques myéloïdes avec, cependant, une prédominance mégacaryocytaire. Leur prolifération et différenciation *in vitro* ne sont pas autonomes. Sans qu'elles soient spécifiques, plusieurs anomalies cellulaires ont été identifiées : i/ prolifération anormale d'une cellule souche pathologique avec un avantage sélectif sur l'hématopoïèse normale, ii/ hypersensibilité des PH vis-à-vis des cytokines et chimiokines régulatrices (Taksin et al., 1999). Parmi celles-ci, citons TGF- $\beta$ , PDGF et b-FGF, impliquées dans la pathogénèse de la myélofibrose mais également SCF, HGF, VEGF, IL-6, IL-8, et SDF-1 participant à l'amplification des CSH et à leur mobilisation (Lataillade et al., 2008), iii/ hyperplasie et dysmaturation mégacaryocytaire associées à une expression altérée de l'IL-8 et de ses récepteurs (Emadi et al., 2005) (Article mis en annexe), des mutations dans le gène du récepteur Mpl (Pikman et al., 2006) et de l'immunophiline FKBP51 (Giraudier et al., 2002) iv/ surexpression du gène HMGA2 (Andrieux et al., 2006) (Article en annexe).

Bien que certains marqueurs moléculaires et en particulier la mutation Jak2V617F, aient été identifiés dans une proportion variable de patients, l'événement moléculaire initial et les mécanismes responsables de l'avantage prolifératif du clone hématopoïétique ne sont encore que partiellement connus. La mutation Jak2V617F étant responsable d'une activité kinase dérégulée (James et al., 2005), son rôle pathogénique dans la prolifération et l'hypersensibilité des PH dans les MFP est donc vraisemblable. Cette mutation est également retrouvée dans deux autres SMP, la PV et la TE, qui peuvent évoluer vers un tableau de myélofibrose secondaire. Plusieurs hypothèses sont actuellement proposées pour expliquer comment une mutation unique pourrait conduire à trois maladies de phénotypes différents. Parmi celles-ci, citons : i/ la survenue d'évènements génétiques secondaires résultant ou générant une instabilité génétique, ii/ des polymorphismes génétiques comme l'haplotype 46/1 (A. V. Jones et al., 2010), iii/ des différences dans le niveau d'activité de la kinase Jak2

mutée (conséquence du nombre de copies de l'allèle muté) ou encore de la persistance de l'allèle normal responsable d'une compétition entre les kinases Jak2 normales et mutées (James et al., 2005). Cependant la mutation Jak2V617F ne peut expliquer à elle seule la physiopathologie de la fibrose médullaire, car d'une part, la moitié des patients atteints de myélofibrose primitive ne présentent pas cette mutation, et d'autre part, Jak2V617F est également retrouvée dans d'autres hémopathies sans fibrose médullaire.

Depuis longtemps, plusieurs éléments plaident en faveur du rôle de MPL dans la pathogenèse de la myélofibrose primitive : l'hyperplasie mégacaryocytaire et l'autonomie de croissance d'une partie des mégacaryocytes observées chez les patients ainsi que la fibrose expérimentale obtenue par surexpression de la TPO chez la souris (Taksin et al., 1999). Une étude réalisée sur une cohorte importante de patients a confirmé le lien de Mpl avec la maladie en identifiant deux mutations activatrices situées dans le domaine juxta-membranaire, Mpl<sup>W515L</sup> et Mpl<sup>W515K</sup>, chez environ 5 à 15% des patients atteints de MFP (Pardanani et al., 2006).

Plusieurs résultats illustrent également le rôle déterminant du microenvironnement hématopoïétique et plus particulièrement des interactions entre cellules hématopoïétiques et cellules stromales (fibroblastes) dans la dérégulation des cellules CD34<sup>+</sup>. Les fibroblastes spléniques des patients présentent des modifications importantes du profil d'expression de constituants de la matrice extracellulaire, de molécules d'adhérence et de cytokines/chimiokines (Brouty-Boye et al., 2001). Des expériences de co-cultures croisées entre cellules CD34<sup>+</sup> et fibroblastes de sujets sains et de patients démontrent également la contribution de ces derniers dans l'expansion du compartiment mégacaryocytaire et la déficience en cellules lymphocytaires observées chez les patients (Briard et al., 2003). Enfin, la forte mobilisation des cellules CD34<sup>+</sup> et des CS endothéliales (Oppliger Leibundgut et al., 2006) de la moelle osseuse vers la rate et le foie suggère une altération de leur adhésion au stroma médullaire. Les mécanismes à l'origine de la mobilisation des PH hors de la moelle osseuse sont difficiles à étudier au niveau de cet organe compte tenu de la fibrose limitant l'aspiration cellulaire. Parmi les altérations mises en évidence au niveau sanguin, les taux plasmatiques élevés de protéases (métalloprotéase MMP9, élastase neutrophile) et de VCAM-1 soluble (Xu et al., 2005) ainsi qu'une activation des granulocytes (Passamonti et al., 2006) suggèrent qu'une modification de l'environnement protéolytique de la moelle osseuse participe très vraisemblablement à cette mobilisation. Comme mentionné précédemment, une diminution de l'expression du CXCR4 (Rosti et al., 2007) résultant, en partie, d'une altération épigénétique de son promoteur (Bogani et al., 2008) (Article mis en annexe) et une rupture de

l'axe SDF-1/CXCL12 par un environnement médullaire devenu extrêmement protéolytique, pourrait également expliquer leur plus faible rétention dans la moelle osseuse.

### **12.4.2/ La réaction stromale et les altérations du microenvironnement**

L'importance des altérations du stroma médullaire dans la pathogenèse de la maladie est étayée par le lien entre le degré de fibrose médullaire, la néoangiogenèse et le pronostic des patients (Mesa, Hanson, Rajkumar, Schroeder, & Tefferi, 2000) (Boveri et al., 2008) (Vener et al., 2008). Il a été en effet montré une corrélation entre le nombre d'ostéo-progénéiteurs CD146<sup>+</sup> et le degré de fibrose dans la moelle (Tripodo et al., 2009). De même, le degré de fibrose ainsi que le nombre des cellules CD146<sup>+</sup> sont associés à un taux d'hémoglobine faible, suggérant que la progression de la réaction stromale médullaire est concomitante au déclin d'une hématopoïèse fonctionnelle (Thiele & Kvasnicka, 2006). Alors que la quantification de la réticuline dans la moelle osseuse n'est pas corrélée à la sévérité de la maladie, la présence de collagène de type I est souvent associée à un pronostic moins favorable.

#### **12.4.2.1/ Myélofibrose et Contexte inflammatoire**

Il est actuellement admis qu'un déséquilibre entre la synthèse accrue de collagène et une diminution de sa dégradation joue un rôle clé dans le développement de la fibrose. Contrairement à la myéloprolifération clonale ou oligoclonale, la prolifération des fibroblastes médullaires à l'origine de la fibrose médullaire est polyclonale (Thiele & Kvasnicka, 2005). La réaction du stroma médullaire est un processus multifactoriel qui apparaît secondaire à la sécrétion inappropriée de cytokines par les cellules hématopoïétiques du clone et en particulier par les mégacaryocytes, les monocytes activés et les CD34<sup>+</sup> pathologiques (Rameshwar, Denny, Stein, & Gascon, 1994) (Martyre et al., 1994) (Reilly, 2003) (Lataillade et al., 2008) (Figure 37). Parmi les cytokines potentiellement impliquées, citons le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), le TGF-β1 (*Transforming Growth Factor*), le FGF basique (*Fibroblast Growth Factor*), le PF-4 (*Platelet Factor*), le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'IL-1 (*Interleukin-1*), l'IL-8 (*Interleukin-8*) et l'ostéoprotégérine (OPG) (Martyre et al., 1994) (Martyre, Magdelenat,

Bryckaert, Laine-Bidron, & Calvo, 1991) (Martyre et al., 1997) (Emadi et al., 2005) (J. C. Wang et al., 2004). Ces facteurs sont non seulement de puissants régulateurs de la biosynthèse de la matrice extracellulaire mais également des médiateurs de la prolifération des fibroblastes, des ostéoblastes et des cellules endothéliales.

Cet orage cytokinique qui caractérise la MFP est le lit d'un processus inflammatoire important dont nous tenterons d'expliquer le rôle dans la pathogenèse de la maladie (§ Chapitre « Résultats »).

#### **12.4.2.2/ Importance du TGF- $\beta$ 1**

Le TGF- $\beta$ 1 est un puissant facteur fibrogénique ; il stimule l'expression génique des collagènes de types I, III et IV, de fibronectine et de protéoglycanes. De plus, son rôle sur la production d'inhibiteurs de protéases tels que le PF4 favorise le développement de la matrice extracellulaire. Plusieurs études ont rapporté des taux élevés de TGF- $\beta$ 1 intra-plaquettaire et montré que les mégacaryocytes circulants des patients produisaient des quantités accrues de TGF- $\beta$ 1 sous forme latente (Martyre et al., 1991) (Martyre et al., 1994) (Zauli et al., 1993). Alors que son expression n'est pas modifiée dans les cellules CD34<sup>+</sup> de patients, celle de son récepteur de type II est diminuée dans ces cellules (Le Bousse-Kerdiles et al., 1996). Il en résulte une dérégulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ 1 à l'origine d'une diminution de la sensibilité des CSH/PH à l'action inhibitrice du TGF- $\beta$ 1. La raison de cette diminution d'expression n'est pas identifiée car le gène TGF- $\beta$ 1RII ne présente pas de mutations et son promoteur ne semble pas hyperméthylé (Hemavathy et al., 2006).

Plus récemment, le rôle majeur du TGF- $\beta$ 1 dans la promotion de la fibrose a été confirmé dans un modèle murin de myélofibrose obtenue par sur-expression de la thrombopoïétine (TPO) (Villevall et al., 1997) (Chagraoui et al., 2002). Ces résultats démontrent que mégacaryocytes et TGF- $\beta$  sont étroitement liés à la pathogenèse de la fibrose ; compte tenu de son activité angiogénique, le TGF- $\beta$ 1 pourrait également participer à la néoangiogenèse observée dans la maladie.

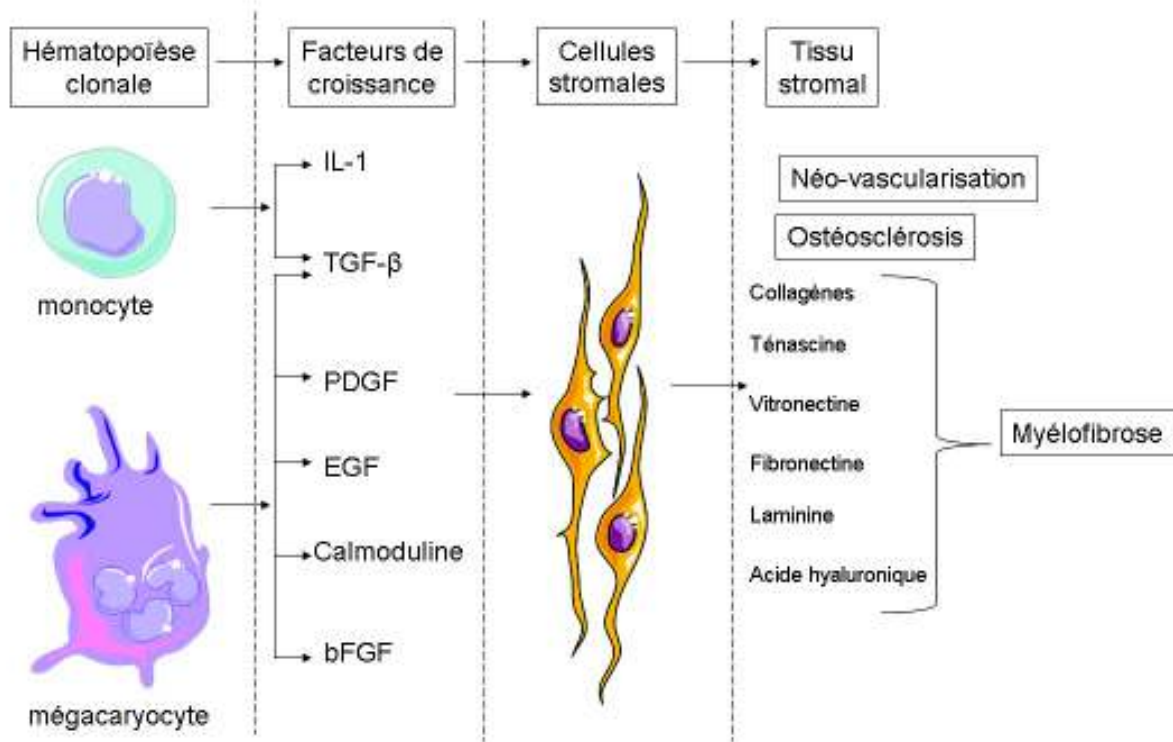
### **12.4.2.3/Ostéomyélosclérose et Néoangiogenèse**

Les mécanismes à l'origine de l'ostéosclérose et de la néoangiogenèse, qui font partie intégrante de la réaction stromale, sont actuellement moins bien connus que ceux de la fibrose médullaire. Une augmentation de la production d'ostéoprotégérine (OPG), une protéine clé de l'ostéogenèse, par les cellules stromales, les ostéoblastes et cellules endothéliales a été décrite chez les patients (J. C. Wang et al., 2004) et dans le modèle TPO (Chagraoui et al., 2003). En bloquant l'interaction entre RANK et RANKL, l'ostéoprotégérine inhibe l'ostéoclastogenèse, participant ainsi au mécanisme de l'ostéosclérose (J. C. Wang et al., 2004). L'implication potentielle de l'OPG dans les complications vasculaires fréquemment observées chez les patients renforce l'hypothèse du rôle de cette molécule dans la pathogenèse de la MFP. Les BMP (Bone Morphogenetic Protein), synthétisées par les MK et les cellules stromales, pourraient également jouer un rôle dans la prolifération des ostéoblastes. La mise en évidence d'une altération de l'expression de gènes codant pour les BMP et/ou leurs récepteurs chez les patients conforte cette hypothèse (Bock et al., 2008) (résultats non publiés MC. Le Bousse-Kerdilès et al.; 2011). De même, il a été proposé qu'une production augmentée de VEGF et de bFGF par les MK pathologiques pourrait expliquer la néovascularisation qui accompagne la réaction stromale. Enfin, une mobilisation précoce des progéniteurs endothéliaux dans le sang périphérique participerait à la néoangiogenèse observée dans la rate (Massa et al., 2005).

### **12.4.2.4/ Rôle clé du mégacaryocyte**

Le mégacaryocyte est une cellule clé du processus fibrotique et de la réaction stromale qui caractérise la MFP. Comme nous l'avons précisé ci-dessus, il secrète, de façon anormalement élevée, de nombreux facteurs tels que le PDGF, TGF- $\beta$ 1, EGF, bFGF et calmoduline qui exerce un rôle déterminant dans la genèse de la fibrose (Figure 37). En effet, le TGF- $\beta$ 1 régule la synthèse de la matrice extracellulaire et augmente la transcription de gènes codant pour la fibronectine, les collagènes de types I, III, IV et la ténascine. Le PDGF également produit par les mégacaryocytes des patients stimule la prolifération, la division cellulaire et la migration des fibroblastes (Castro-Malaspina, 1984). La calmoduline, principalement secrétée par les plaquettes, est anormalement élevée dans les urines de patients et joue un rôle mitogène sur le fibroblaste (Dalley, Smith, Reilly, & Neil, 1996). De même, le

bFGF, fortement exprimé dans les plaquettes et les mégacaryocytes des patients (Martyre et al., 1997) stimule la prolifération des fibroblastes (Gospodarowicz, Ferrara, Schweigerer, & Neufeld, 1987) et l'angiogénèse (Schelling, 1991). En dehors des MK, les monocytes jouent également un rôle actif dans cette production cytokinique, en particulier dans celle du TGF- $\beta$ 1 et de l'IL-1 (Rameshwar, Chang, & Gascon, 1996). Il en résulte une augmentation des glycoprotéines interstitielles et membranaires ainsi qu'une augmentation de la concentration sérique du carboxy-terminal peptique du procollagène de type I (PICP), de l'amino-terminal peptide du procollagène de type III (PIIIP), du collagène du type IV, des peptides relatifs à la laminine.



**Figure 37: Rôle des facteurs de croissance produits par les cellules du clone hématopoïétique dans le processus fibrotique**

D'après (Le Bousse-Kerdiles & Martyre, 2001) (Reilly, 2003)

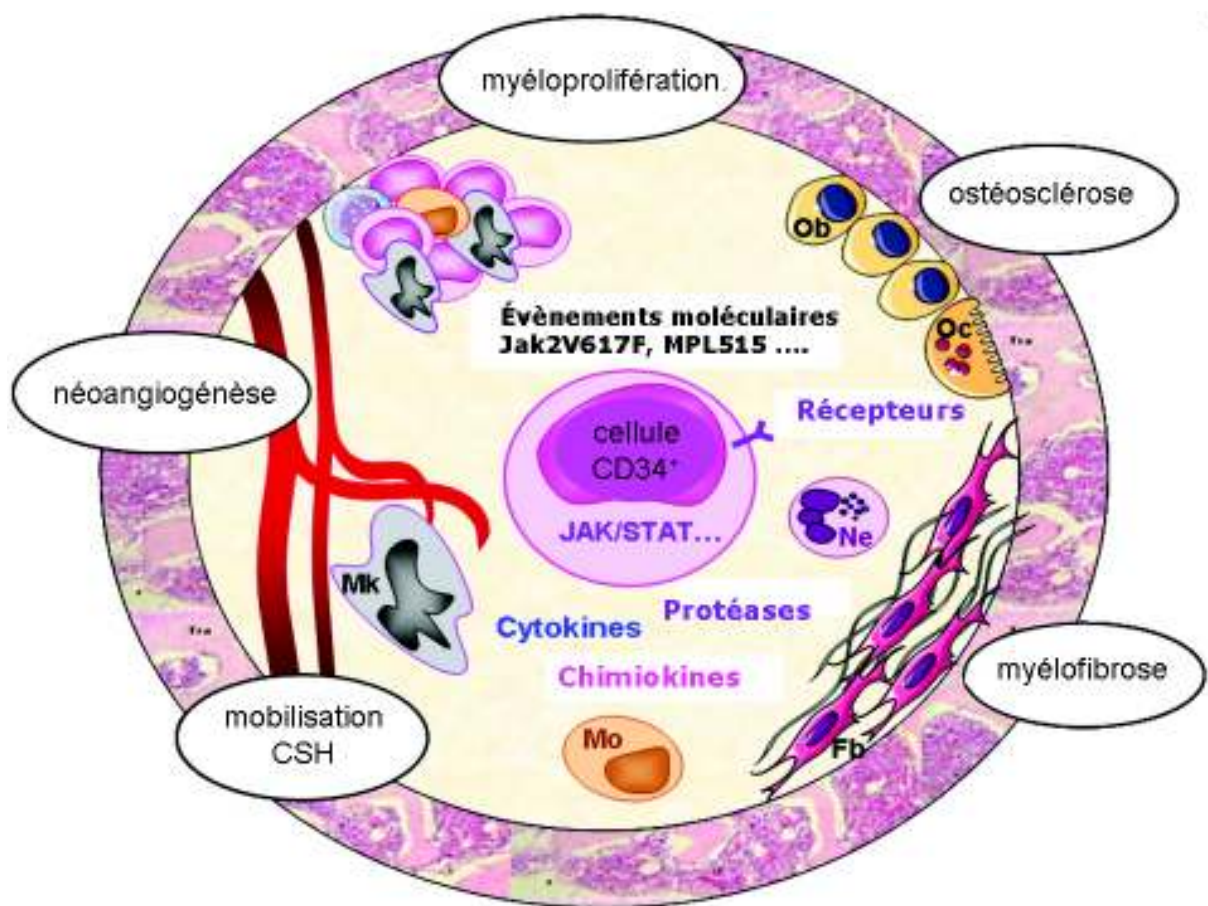


### **12.4.3/ Le modèle physiopathologique**

Alors que l'évènement moléculaire initial à l'origine de l'apparition du clone pathologique reste encore inconnu, l'altération des voies de signalisation (Jak/STAT, Tpo/MPL..) associées aux récepteurs à tyrosine kinase, consécutives en particulier aux mutations Jak2 et MPL, participe très vraisemblablement à l'amplification du clone pathologique. Des altérations de l'expression et/ou de la transcription des facteurs de transcription érythro-mégacaryocytaires et en particulier de GATA-1, interviendraient également dans la myéloprolifération et la dysmégacaryopoïèse qui caractérisent la MFP (Steunou et al., 2003) (Vannucchi et al., 2002).

Une altération du dialogue entre les CSH pathologiques et les cellules stromales des niches hématopoïétiques serait à l'origine de la tempête cytokinique initiée par les cellules du clone et en particulier, les mégacaryocytes. L'augmentation de la production de facteurs de croissance hématopoïétiques, fibrogéniques et angiogéniques par ces cellules stimulerait la réaction stromale conduisant à la myélofibrose, l'ostéosclérose et la néoangiogenèse. En retour, les cellules stromales activées participeraient à la prolifération des cellules du clone hématopoïétique et en particulier à l'expansion du compartiment mégacaryocytaire au détriment du lymphocytaire (Briard et al., 2003). Un déséquilibre des niches endostéales et vasculaires interviendrait alors dans la prolifération clonale des cellules souches hématopoïétiques et leur mobilisation de la moelle osseuse vers le sang. Ce déséquilibre conduirait à une augmentation des cellules souches circulantes et à un déplacement de l'hématopoïèse médullaire vers les sites d'hématopoïèse extra-médullaires tels que la rate et la foie. Dans ces organes, les cellules souches mésenchymateuses/fibroblastes et les progéniteurs endothéliaux contribueraient à la création d'un microenvironnement favorable à la prolifération et à la différenciation de CSH pathologiques (Lataillade et al., 2008) (Figure 38).

Ainsi, la MFP peut être considérée comme une maladie de la CSH (bad seed) dans laquelle une altération des niches hématopoïétiques participe très vraisemblablement au développement du clone pathologique (bad soil), d'où le concept de « Bad seed in bad soil » que nous avons revisité (Lataillade et al., 2008).



**Figure 38 : Modèle physiopathologique « Bad Seed in Bad Soil »**

D'après (Lataillade et al., 2008) ;

Abréviations : Oc (ostéoclaste), Ob (ostéoblaste), Fb (fibroblaste), Mk (mégacaryocyte).

## 12.5/ Les modèles animaux

On ne peut conclure ce chapitre sur la MFP sans parler des modèles murins expérimentaux qui ont permis d'apporter des éléments importants dans la compréhension de cette maladie. Parmi les modèles les plus anciens, celui des souris infectées par le rétrovirus sarcomatogène myéloprolifératif (MPSV). La néoplasie qu'il provoque partage de nombreuses caractéristiques cliniques et biologiques avec la pathologie humaine, notamment une myéloprolifération accompagnée d'une myélofibrose et d'une néoangiogenèse (Le Bousse-Kerdiles et al., 1992). Plus récemment, d'autres modèles murins induits par la surexpression de la TPO, la sous-expression de GATA-1 ou bien encore la transfection des mutations Jak2V617F ou MPL515 ont été développés.

Les modèles de surexpression de la Tpo provoquent une hyperplasie mégacaryocytaire avec une hématopoïèse extramédullaire conduisant à une splénomégalie, une thrombocytose importante et une myélofibrose réversible à l'arrêt des injections (Villeval et al., 1997) (Wagner-Ballon et al., 2006).

Compte tenu du rôle de GATA-1 dans la MFP (Martyre, Steunou, LeBousse-Kerdiles, & Wietzerbin, 2003), un modèle de souris transgéniques avec une sous-expression de GATA-1 (facteur de transcription important pour la mégacaryopoïèse), appelées GATA-1<sup>low</sup>, a été développé (Vannucchi et al., 2002). Les souris exprimant trop de GATA-1 présentent une augmentation de la différenciation érythroïde (Farina, Girard, Vanin, Nienhuis, & Bodine, 1995) alors que les souris déficientes pour le gène GATA-1 meurent *in utero* d'une anémie sévère (Pevny et al., 1991). Les souris GATA-1<sup>low</sup> sont viables et présentent après 12 à 18 mois de vie, une maladie proche de la MFP avec notamment une anémie, une fibrose médullaire, une ostéosclérose et une hématopoïèse extramédullaire hépatosplénique. Les mégacaryocytes de la moelle de ces souris sont hyperplasiques, dystrophiques et groupés en amas (Vannucchi et al., 2002).

Plus récemment, différentes équipes ont développé des modèles de souris transgéniques pour les mutations Jak2V617F et MPL515 qui miment un néoplasme myéloprolifératif plus ou moins rapide et de phénotypes différents : les souris Jak2V617F présentent une pathologie proche de la PV alors que les souris MPL515 développent un SMP rapide évoluant vers une fibrose médullaire (Pikman et al., 2006) (Tefferi, 2008b). Enfin, l'expression constitutive de la mutation JakV617F à l'état hétérozygote provoque un SMP de type PVet non, de type TE comme attendu, évoluant avec l'âge des souris, vers une myelofibrose secondaire (Marty et al., 2010).

## **OBJECTIFS DU TRAVAIL**



La myélofibrose primitive est un néoplasme myéloprolifératif chronique *BCR-ABL1*-négatif associant une myéloprolifération et une altération du stroma hématopoïétique dans laquelle le mégacaryocyte est un acteur majeur, *via* une production exacerbée de cytokines et facteurs fibrosants.

Plusieurs travaux récents sont en faveur de l'implication d'anomalies géniques telles que les mutations JAK2V617F et MPL515L/K dans la dérégulation de l'hématopoïèse et de la dysmégacaryopoïèse. Cependant, seuls 50% des patients atteints de MFP présentent la mutation JAK2V617F et un plus faible pourcentage encore portent les mutations MPL, suggérant que ces mutations ne sont pas l'événement initial de ces hémopathies. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que les premiers essais cliniques réalisés avec des inhibiteurs de Jak2 montrent une efficacité remarquable sur la splénomégalie et l'état général des patients sans pour autant augmenter leur durée de vie ni diminuer les anomalies du stroma. Ces résultats soulignent l'importance de rechercher d'autres anomalies, géniques ou non, impliquées dans le processus pathogénique et en particulier dans la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la MFP.

L'objectif de mon travail de thèse a été de rechercher de telles autres anomalies en développant, parallèlement à deux approches génomiques complémentaires (transcriptome et CGH array), une démarche de biologie cellulaire ciblée sur le rôle du microenvironnement. Après avoir comparé les profils génomiques obtenus par ces deux techniques, nous nous sommes orientés vers la région 13q pour les raisons suivantes : 1) elle est délétée de façon récurrente mais non spécifique chez les patients et 2) elle comprend le gène *FLT3* dont le transcrit est dérégulé dans la MFP. Compte tenu de l'action de Flt3 et de son ligand Flt3-ligand sur l'hématopoïèse, j'ai ensuite recherché si le couple Flt3-ligand/Flt3 était impliqué dans la dérégulation de l'hématopoïèse chez les patients.

Les résultats que j'ai obtenus m'ont permis de montrer que le couple Flt3-ligand/Flt3 participe à la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la MFP, via une activation soutenue des MAPK et en particulier des MAPKs p38. Ces résultats font l'objet d'une publication qui vient d'être acceptée dans le journal « Cancer Research » en 2011 et qui est le sujet principal de ma thèse. Cette publication s'intègre dans un ensemble de 6 autres manuscrits (cf. annexes), abordant la recherche de différents marqueurs biologiques de la maladie, auxquels j'ai participé et qui ont été évoqués dans l'introduction.



# **MATERIEL ET METHODES**





Dans ce chapitre ne sont détaillées que les techniques non décrites dans les publications intégrées à ce mémoire.

## **1/ Technique de détection de la mutation Jak2V617F**

La détection de la mutation *JAK2V617F* a été réalisée sur la fraction ADN de l'extraction au TRIZOL (Invitrogène, France) des cellules myéloïdes de patients (Cellules mononucléées circulantes, cellules CD34<sup>+</sup>, plaquettes, mégacaryocytes). Pour ceci, 1ml d'éthanol a été ajouté à la phase phénolique après l'étape d'extraction du trizol par l'isopropanol. Le mélange a été centrifugé 5 minutes à 4000 tours/minutes, puis après lavage, le culot a été dissout dans 10 µl de tampon Tris/EDTA 10/1 (TE). A partir de 10 ng d'ADN, une amplification spécifique par polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel a été réalisée par la technologie Lightcycler (Roche) en utilisant les amorces sens 5'-ggCAGAgAgAATTTTCTgACC et antisens 5'-gCTTTCCTTTTTCACAAgATA. Des sondes spécifiques placées sur la position de la mutation ont été utilisées pour effectuer le transfert d'énergie des fluorochromes nécessaire à la détection du « fluorescence resonance energy transfert » (FRET) pour révéler la réaction : une amorce sensitive sur la séquence sauvage gTCTCCACAgACACATACTCCATAA-FITC et une sonde d'ancrage juxtaposée LC640-AAAACCAAATgCTTgTgAgAAAgC-Phosphate. La réaction de PCR a été réalisée en utilisant le kit Fast Start Hybridization Probe Kit (Roche) avec une concentration de MgCl<sub>2</sub> de 3,5 µM, 5 pmol de chaque sonde et 5 pmol de chaque primer. L'analyse des courbes de fusion des réactions a été faite sur le lightcycler après 35 cycles d'amplification : 95°C pour la dénaturation, 60°C pour l'hybridation, 72°C pour l'élongation. L'ADN de la lignée cellulaire HEL a été utilisé comme contrôle positif (*JAK2V617F*) et l'ADN de la lignée cellulaire K562 comme contrôle négatif (*JAK2* non muté).

## **2/ Hybridation Génomique Comparative (CGH array)**

Cette technique repose sur une hybridation comparative de l'ADN extrait de cellules normales vs. pathologiques et permet une analyse génomique quantitative.

## **2.1/ Obtention des populations cellulaires pour la CGH array**

Le sang périphérique des patients MFP est prélevé sur EDTA. Les cellules mononucléées ont été obtenues par centrifugation sur un gradient de densité de type Ficoll et congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  à raison de 10 millions de cellules/ampoule.

Les cellules érythrocytaires contenues dans le culot cellulaire du Ficoll sont lysées et les cellules polynucléées (PN) sont récupérées par centrifugation. Les PN sont lavés 3 fois dans du NaCl 9 g/l puis le phénotype  $\text{CD15}^{+}$  des PN est vérifié par cytométrie en flux. Les cellules (10 millions/ampoule) sont ensuite congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les cellules mononucléées sont mises à adhérer en milieu RPMI+10% de SVF pendant 16 heures en atmosphère humide avec 5% de  $\text{CO}_2$  pour éliminer les cellules adhérentes. Après un marquage avec un anticorps anti-CD34 couplé à des billes magnétiques, une sélection positive sur colonne immuno-magnétique (Miltenyi) a été réalisée sur la suspension cellulaire afin d'isoler les PH  $\text{CD34}^{+}$  du sang circulant. Un contrôle de pureté des cellules ainsi purifiées est effectué au cytomètre en flux et des culots secs contenant 1 million de cellules  $\text{CD34}^{+}$  sont directement congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.2/ Extraction de l'ADN cellulaire pour la CGH array**

Les culots secs sont décongelés puis lysés pendant 16 heures en présence du tampon de lyse suivant : 1 ml par million de cellules (NaCl 200 mM, EDTA 20 mM, Tris 40 mM pH = 8.0, dodécyl sulfate de sodium 0.5%) et 10  $\mu\text{l}$  de protéinase K à 20 mg/ $\mu\text{l}$  (Roche, Meylan). Deux volumes de phénol/chloroforme/alcool isoamylique : 25/24/1 (Invitrogen, Cergy Pontoise) sont ajoutés. Après homogénéisation manuelle pendant 5 min, une centrifugation de 10 min à 3000 rpm est réalisée. La phase supérieure est transférée dans un nouveau tube en y ajoutant 2 volumes de chloroforme. Après une centrifugation de 10 min à 3000 rpm, la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube en y ajoutant 0.1 volume d'acétate de sodium 3M (pH = 5.0) et 3 volumes d'éthanol à  $96^{\circ}$  froid. Une agitation manuelle est réalisée pour précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 10 min à 3000 rpm, la phase liquide est éliminée et 3 volumes d'éthanol à  $70^{\circ}$  froid sont ajoutés. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 3000 rpm, la phase liquide est éliminée. Les culots d'ADN sont séchés 5 min à l'air libre et re-suspendus dans 50  $\mu\text{l}$  de Tris 10mM/EDTA 1 mM (TE 10/1). Les ADN sont quantifiés au Nanodrop (Nyxor) et leur qualité est vérifiée en gel d'agarose à 1%.

## **2.3/ Amplification globale du génome des cellules $\text{CD34}^{+}$**

L'analyse du génome des cellules  $\text{CD34}^{+}$  par CGH array nécessite une quantité initiale de 1.5 $\mu\text{g}$  d'ADN. Pour atteindre cette quantité de matériel, l'ADN des cellules  $\text{CD34}^{+}$

purifiées a été soumis à une amplification globale par la polymérase Phi29 (GenomiPhi, Amersham). L'analyse de la mutation Jak2V617F a été réalisée avant et après amplification et a révélé un biais allélique inférieur à 0.5%.

#### **2.4/ Synthèse des sondes de CGH array et hybridation**

Une quantité de 1.5 µg d'ADN par échantillon est digérée à l'aide 10 unités d'enzyme de restriction DpnII (Biolabs) pendant 1 heure à 37°C deux fois consécutivement, puis l'enzyme est inactivée par une incubation de 10 min à 65°C. Les ADN digérés sont purifiés sur colonne Qiaquick (Qiagen, Courtaboeuf). La digestion est contrôlée en gel d'agarose à 0.8%. Le marquage des sondes avec les cyanines (Cy3 : contrôle normal et Cy5 : ADN patients MMM) est effectué au cours de la réaction de « random priming » avec le kit Bioprime DNA labelling System (Invitrogen). Les cyanines employées au cours de l'incorporation sont la cyanine 3 NEL576 (Perkin) (3 nmol) pour l'ADN normal et la cyanine 5 NEL577 (Perkin) (3 nmol) pour l'ADN pathologique. Les sondes marquées sont purifiées sur un concentrateur Microcon YM30 (Millipore). La sonde « normale » (Cy3) et la sonde « pathologique » (Cy5) sont précipitées en présence de DNA Cot-1 humain (Invitrogen), 0.1 volume d'acétate de sodium 3M et 2.5 volumes d'éthanol à 95°. La sonde est ensuite reprise dans du tampon d'hybridation (50% formamide, 2X SSC pH = 6.8, 1X Denhardt, 1% SDS, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH = 7, 10% Dextran sulfate) puis incubée à 37°C. Elle est alors déposée sur une lame CGH array de type BAC (Institut Curie, Paris) prétraitée puis recouverte d'une lamelle. La lame est ensuite incubée dans une chambre d'hybridation à 37°C pendant 20 à 24 heures. Le lendemain, les lames sont lavées dans le tampon 0.5X SSC 0.03% SDS pendant 5 min à 65°C, puis séchées par centrifugation et lues grâce à un scanner Axon 4000B avec le logiciel Genepix.

#### **2.5/ Normalisation des données et interprétation chromosomique**

Sur le serveur de l'institut Curie, l'étape de normalisation des données de la lame scannée est double : il s'agit en premier lieu d'exclure de l'analyse ultérieure les dépôts incorrectement analysés et de corriger les biais dus aux défauts d'incorporation des cyanines. Les dépôts en triplicate doivent avoir un coefficient de variation inférieur à 0.1 et le rapport signal sur bruit de fond doit être supérieur à 3. Les clones normalisés sont alors croisés avec une base de données permettant d'identifier la marche chromosomique pour chaque dépôt interprétable.

### **3/ Analyse transcriptomique des cellules CD34<sup>+</sup>**

L'ARN total des cellules CD34<sup>+</sup> des différents échantillons a été extrait par la méthode utilisant le réactif Trizol (Initrogène). En détail, 100.000 à 1.000.000 cellules CD34<sup>+</sup> purifiées ont été lysées dans 500 µl de Trizol puis congelées à -80°C jusqu'à utilisation. Après décongélation, 100 µl de chloroforme a été ajouté sur la phase du trizol et les échantillons ont été homogénéisés. Après décantation durant 5 minutes, les suspensions ont été centrifugées à 11500 tours/minutes pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube auquel il a été ajouté 250 µl d'isopropanol froid et les échantillons ont été homogénéisés. Après décantation à -20°C durant 2 heures, les suspensions ont été centrifugées à 11500 tours/minutes pendant 15 minutes à 4°C. Les culots ont ensuite été lavés avec 500 µl d'éthanol 70% froid puis centrifugés à 11500 tours/minutes pendant 15 minutes à 4°C. Les culots ont été dissous dans 10 µl d'eau RNase free. L'ARN total a été dosé grâce à la technologie Nanodrop et la qualité des échantillons a été vérifiée sur le bioanalyseur (Agilent Technologies).

Les sondes microarrays ont été synthétisées à l'aide du kit d'amplification linéaire (Agilent Technologies) et marquées par la cyanine 5 pour les échantillons individuels et par la cyanine 3 pour la sonde de référence (mélange de l'ensemble des échantillons). Ces sondes ont permis d'hybrider des biopuces 22k A version 1 Human (Agilent Technologies). Les données ont été extraites et normalisées par le logiciel Features Extraction (Agilent Technologies) en utilisant l'algorithme « Locally Weighted Scatter Plot Smoothing » (LOWESS). Les analyses des données de microarray ont ensuite été traitées en utilisant le logiciel MultiExperiment Viewer (Mev 3.0, Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA). Les gènes exprimés différemment ont été identifiés en utilisant l'algorithme « Significance Analysis for Microarray » (SAM) avec un « False Discovery Rate » (FDR) inférieur à un 1 et un « Fold Change » supérieur à 1. La classification des gènes sélectionnés a été réalisée avec l'algorithme HCL « Hierarchical Clustering » au sein du logiciel Mev 3.0. L'interprétation fonctionnelle des données microarray a été effectuée grâce au site Web DAVID du NIH (Washington).

# **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## 1/ Contexte des travaux

La myélofibrose primitive est un néoplasme myéloprolifératif caractérisé par une myéloprolifération clonale impliquant les trois lignées myéloïdes (érythroïde, mégacaryocytaire, granulo-monocytaire) associée à une myélofibrose, une néoangiogenèse et une ostéomyélosclérose. Les techniques cytogénétiques classiques (Caryotypes, FISH, CGH sur métaphase) n'ont permis d'identifier une anomalie cytogénétique que dans 30 à 50 % des cas. De plus, la présence de la mutation JAK2 V617F chez seulement la moitié des patients suggère que d'autres anomalies moléculaires sont très probablement impliquées dans la pathogenèse de la maladie.

J'ai tout d'abord recherché l'existence de modifications chromosomiques, non détectées par les techniques cytogénétiques classiques, dans différentes populations cellulaires appartenant au clone pathologique (cellules mononucléées, polynucléaires CD15<sup>+</sup> et cellules CD34<sup>+</sup> sanguins). Ceci a été réalisé par hybridation génomique comparative (1 mégabase) sur puces de type BAC (Bactériel Artificial Chromosome). Nos résultats ont permis de caractériser des zones d'intérêts, majoritairement des zones de délétions, dans l'ADN des polynucléaires de patients MFP. La région chromosomique 12q14.1-21.33 semble particulièrement impliquée, confirmant les données cytogénétiques de 2 patients où une translocation récurrente a été détectée dans la région chromosomique 12q15 et plus particulièrement dans le gène *HMGA2*. Ce travail a conduit à étudier l'expression du gène *HMGA2* dans les granulocytes CD15<sup>+</sup> et les PH CD34<sup>+</sup> circulants et à montrer que, contrairement aux sujets sains, une augmentation de l'expression du transcrite est observée dans dans les cellules de patients (n=24) quelque soit leur stade de différenciation. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication que je cosigne en 8<sup>e</sup> auteur dans le journal « *Leukemia and Lymphoma* » (Annexe n°3 ; Andrieux et al. Sept 2006 ; 47 (9) : 1956-1959).

Nous avons ensuite réalisé une étude en CGH array sur les granulocytes CD15<sup>+</sup> (appartenant au clone pathologique) de 11 patients atteints de MFP afin d'étudier la région chromosomique encadrant le locus *HMGA2* et de rechercher la présence d'autres anomalies fines de type « gain/délétion », ne pouvant être décelées en cytogénétique conventionnelle. La mutation JAK2 n'ayant pas encore été décrite lorsque ce travail a été initié, cette étude a été complétée par une recherche de polymorphismes de type SNP afin d'identifier des pertes



d'hétérozygotie. En parallèle, une analyse transcriptomique a été réalisée dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les mégacaryocytes des patients pour tenter d'établir ainsi un lien transcriptionnel à nos observations génomiques.

Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, l'étude en CGH array (cf. paragraphe §2.1.) a révélé que 4 patients sur les 11 analysés et dont l'index de myéloprolifération était élevé, présentaient plusieurs délétions associées à la délétion 12q14-q21 telles que des délétions 12p13.1-13.2 (impliquant ETV6 et P27), 13q12-13q14 (impliquant Rb) et 20q11-q13 (impliquant P107). Le transcriptome (cf. paragraphe §2.2.), a identifié plusieurs gènes, dont *FLT3*, avec une expression dérégulée chez les patients quelque soit leur status JAK2 (analysé rétrospectivement).

## **2/ Recherche d'anomalies moléculaires participant à la pathogenèse de la Myélofibrose primitive**

### **2.1/ Apport de la CGH array pangénomique**

La myélofibrose primitive étant une maladie « clonale » de la cellule souche hématopoïétique, nous avons respecté la hiérarchie hématopoïétique en analysant l'ADN de progéniteurs CD34<sup>+</sup> et de cellules différenciées, les polynucléaires CD15<sup>+</sup>. Ces ADN ont été utilisés comme sondes, marqués à l'aide de fluorochromes et hybridés différenciellement sur une puce de type BAC. Ces puces ont été conçues par le programme national de « Carte d'identité tumorale » (CIT) de la Ligue contre le Cancer (Alain Aurias). La figure 39 illustre la démarche expérimentale que nous avons suivie.

Nous avons observé des variations quantitatives moyennes d'ADN dans les deux types cellulaires étudiés (CD34<sup>+</sup> et polynucléaires) chez les patients MFP. Certaines de ces anomalies ne sont retrouvées que dans un seul type cellulaire ; il s'agit essentiellement d'amplifications dans les régions subtélomériques principalement observées dans les cellules CD34<sup>+</sup>. D'autres anomalies, majoritairement des trisomies 1q, des délétions 12q, 13q, 17p et 17q, 20q et des amplifications du chromosome 22, sont retrouvées dans les deux types cellulaires (figure 40). Toutes ces anomalies ont déjà été décrites et répertoriées précédemment par des techniques de cytogénétique conventionnelle comme le caryotype (§ Introduction). Les amplifications du chromosome 22 correspondent à des anomalies

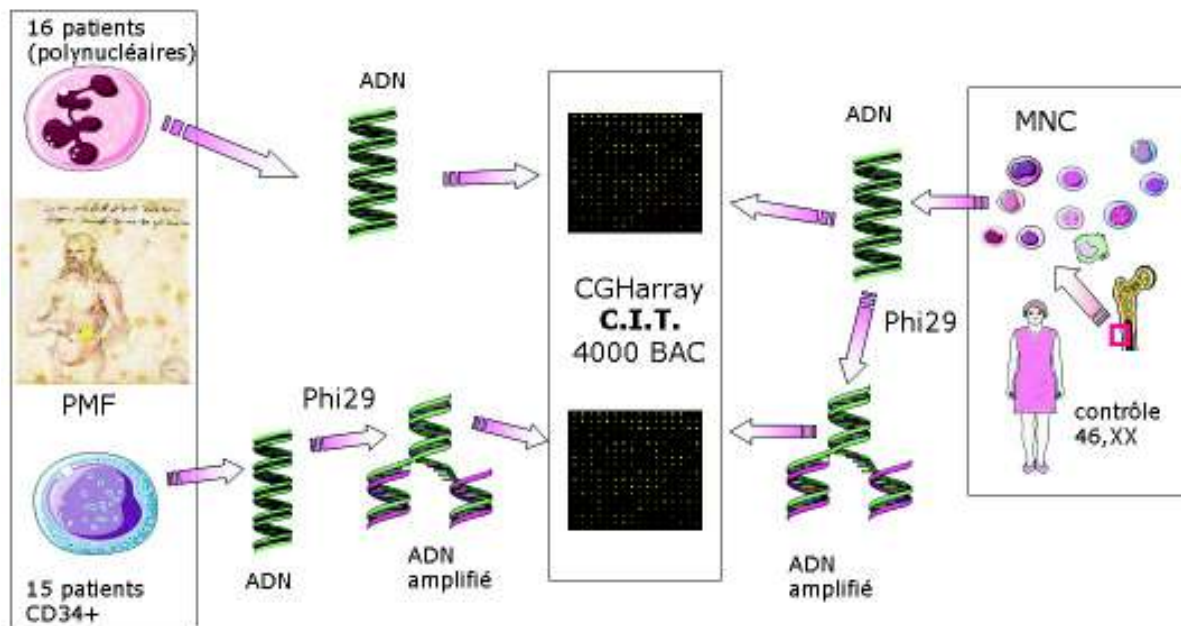
d'hybridation des BAC sur des régions de duplications importantes et répertoriées dans cette partie du génome.

Cette approche peut être considérée comme décevante car nous n'avons pas identifié d'anomalies génomiques autres que les délétions 12q situées aux bornes des sites de cassure de la translocation localisée en 12q15 (*HMGA2*) décrites précédemment (§ annexe 2). Cependant, elle s'est avérée utile dans notre démarche scientifique car nous avons pu préciser les bornes des régions chromosomiques délétées, en particulier en 13q, dans les deux types cellulaires. Ces délétions 13q, présentes chez environ 25% des patients (4/11), sont hétérogènes en taille (30 à 68 mégabases) et en position, selon les patients et le type cellulaire analysé (Figure 41). La fréquence de cette anomalie confirme les données de la littérature (Bilhou-Nabera et al., 2003) et sa présence dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les polynucléaires des patients suggère un rôle potentiel dans la pathogénie de la MFP. L'interrogation de la banque de données génomiques UCSG met en évidence que le cluster *FLT*, contenant le gène *FLT3* ainsi que des gènes homéotiques, est situé 2 mégabases en amont de la borne centromérique de cette délétion.

## **2.2/ Apport de l'étude transcriptomique**

Afin d'étudier le profil d'expression génique des cellules CD34<sup>+</sup> circulantes de patients MFP, nous avons réalisé une étude transcriptomique sur des puces Agilent 22k comparant les cellules CD34<sup>+</sup> de patients en fonction de la présence de la mutation Jak2V617F à celles de sujets sains (sang périphérique et moelle normale). Les gènes avec un fold change supérieur à 2 en valeur absolue entre la moelle normale et le sang normal ont été exclus de l'analyse.

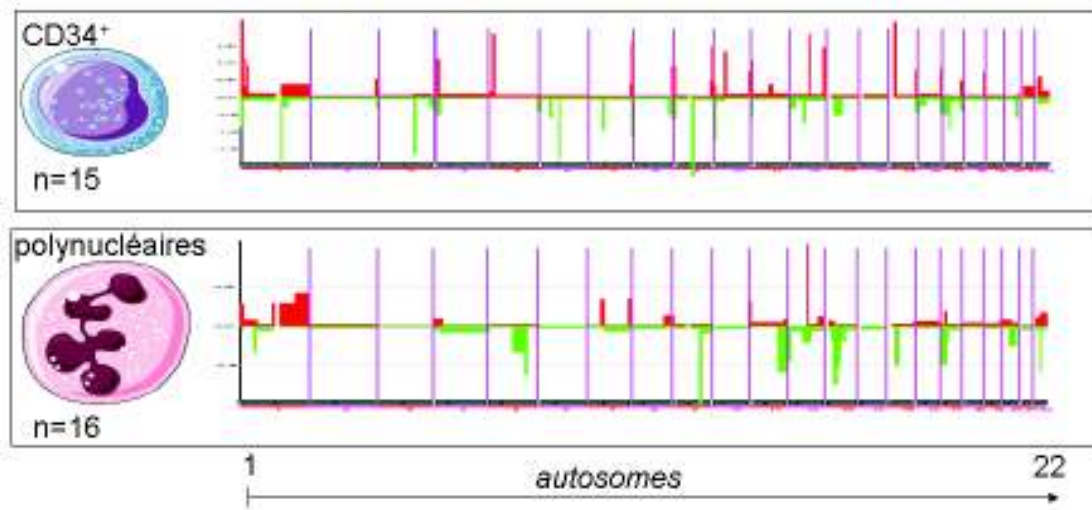
Cette étude a mis en évidence que 69 gènes étaient significativement différentiellement exprimés chez les patients quelque soit le status mutationnel Jak2 par rapport aux sujets sains contrôles. Une analyse bioinformatique des gènes impliqués dans les voies de signalisation, réalisée grâce au siteweb DAVID du NIH, a révélé que les gènes de la voie des MAP kinases sont parmi les gènes les plus différentiellement exprimés chez les patients MFP, quelque soit le status mutationnel Jak2. La Figure (42) représente les résultats obtenus et le traitement informatique des données du transcriptome des cellules CD34<sup>+</sup> (Diagramme de Venn).



**Figure 39 : Schéma expérimental de la CGH array pangénomique.**

L'ADN des cellules CD34<sup>+</sup> et des polynucléaires circulants de patients MFP a été hybridé différemment à celui de cellules mononucléées de moelle osseuse de sujet sain. Au préalable, l'ADN des cellules CD34<sup>+</sup> a été amplifié par l'ADN polymérase Phi29 afin d'obtenir la quantité d'ADN requise.

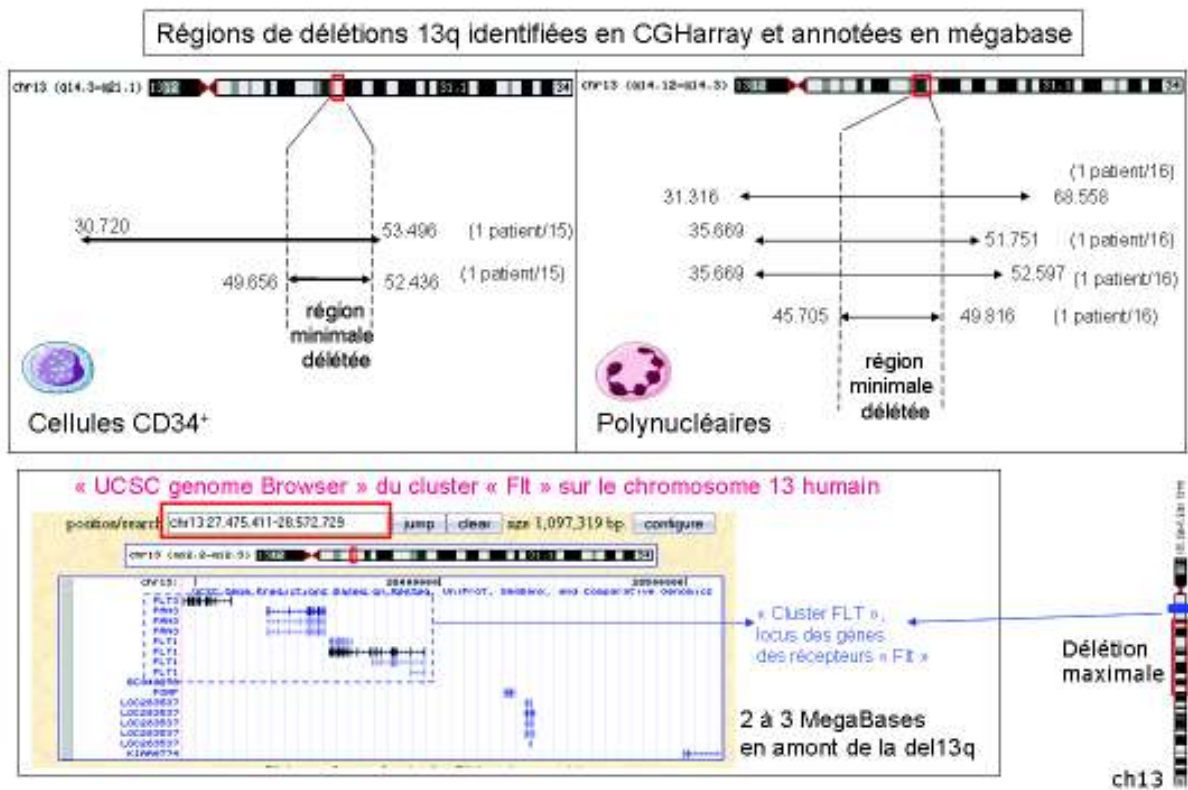
Abréviations : BAC : « bacterial artificial chromosome », CIT : programme Carte d'Identité des Tumeurs, MNC : cellules mononucléées.



**Figure 40 : Diagramme résumant les variations moyennes quantitatives par chromosomes dans les cellules  $CD34^+$  et polynucléaires chez les patients par rapport aux sujets sains**

Les graphiques d'en haut et d'en bas représentent respectivement les ratios moyens des 15 échantillons de cellules  $CD34^+$  et des 16 échantillons de cellules polynucléaires des patients en comparaison avec ceux obtenus sur des cellules mononucléées de sujets sains.

Les variations correspondent soit à des gains (en rouge), soit à des pertes (en vert). Les autosomes sont numérotés en abscisse de 1 à 22 et chaque chromosome est orienté du bras court (p) à gauche, vers le bras long (q) à droite.



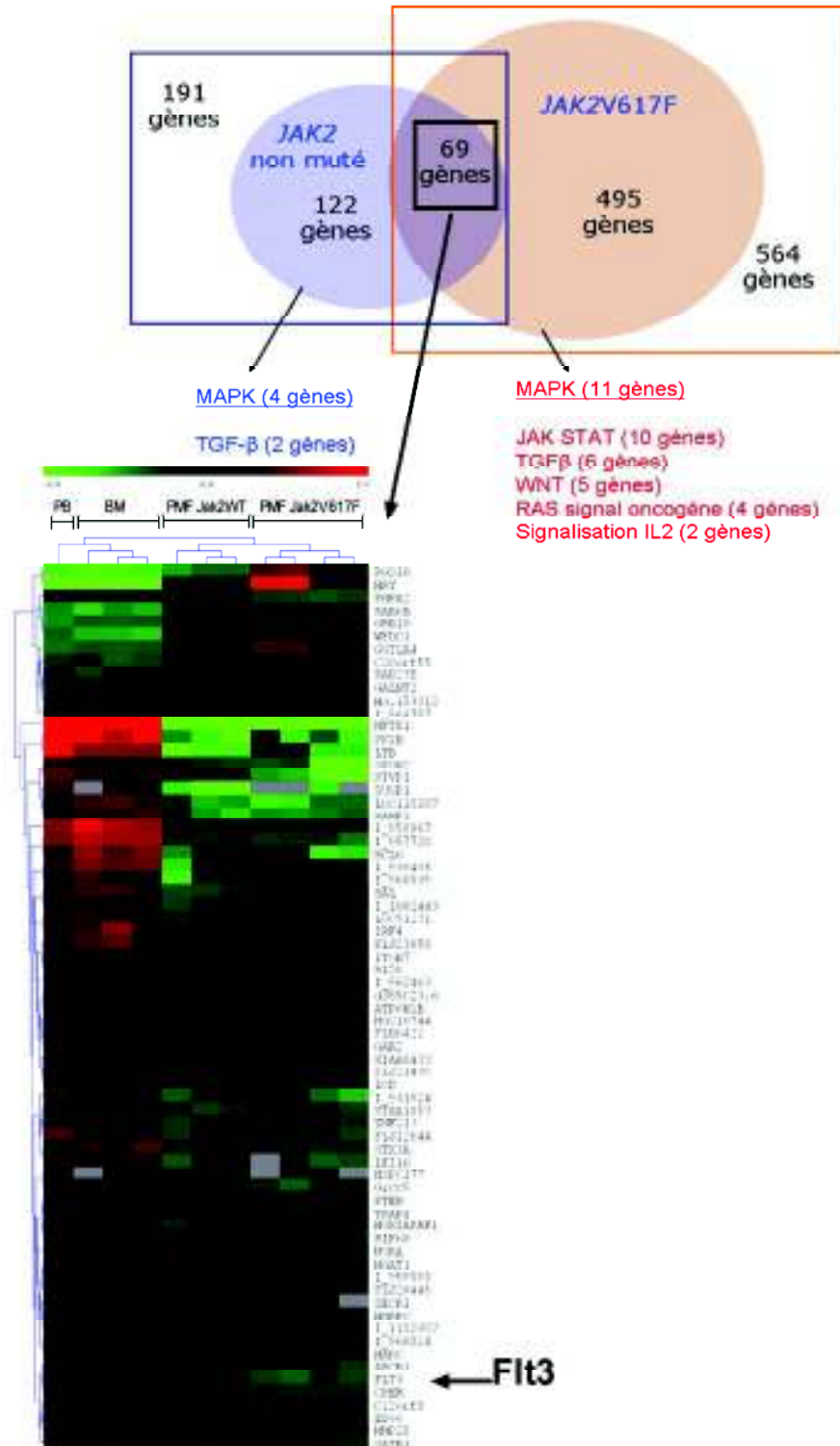
**Figure 41: Cartographie des délétions 13q dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les polynucléaires de patients atteints de MFP par CGH array pan-génomique**

Le cluster génomique « FLT » délimité sur le site internet « génomique UCSG genome browser » comprenant notamment le gène *FLT3*, est localisé en amont des délétions 13q cartographiées en CGH array.

Parmi ces 69 gènes, nous retrouvons notamment le transcript *Flt3*, sous-exprimé dans les  $CD34^+$  de patients MFP. En collaboration avec le groupe de Stéphane Giraudier (U1009; IGR, Villejuif), nous avons réalisé en parallèle une analyse transcriptomique sur les mégacaryocytes, des cellules clés du processus pathogénique (§ Introduction). De façon intéressante, *FLT3* est l'un des rares gènes impliqués dans l'hématopoïèse dont l'expression était modulée dans les deux types cellulaires (diminuée dans les  $CD34^+$  et augmentée dans les mégacaryocytes). *Flt3* est le récepteur du facteur de croissance *Flt3*-ligand, produit principalement par les cellules stromales. Alors que son rôle dans la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques primitifs est bien connu, son action sur la mégacaryopoïèse est controversée.

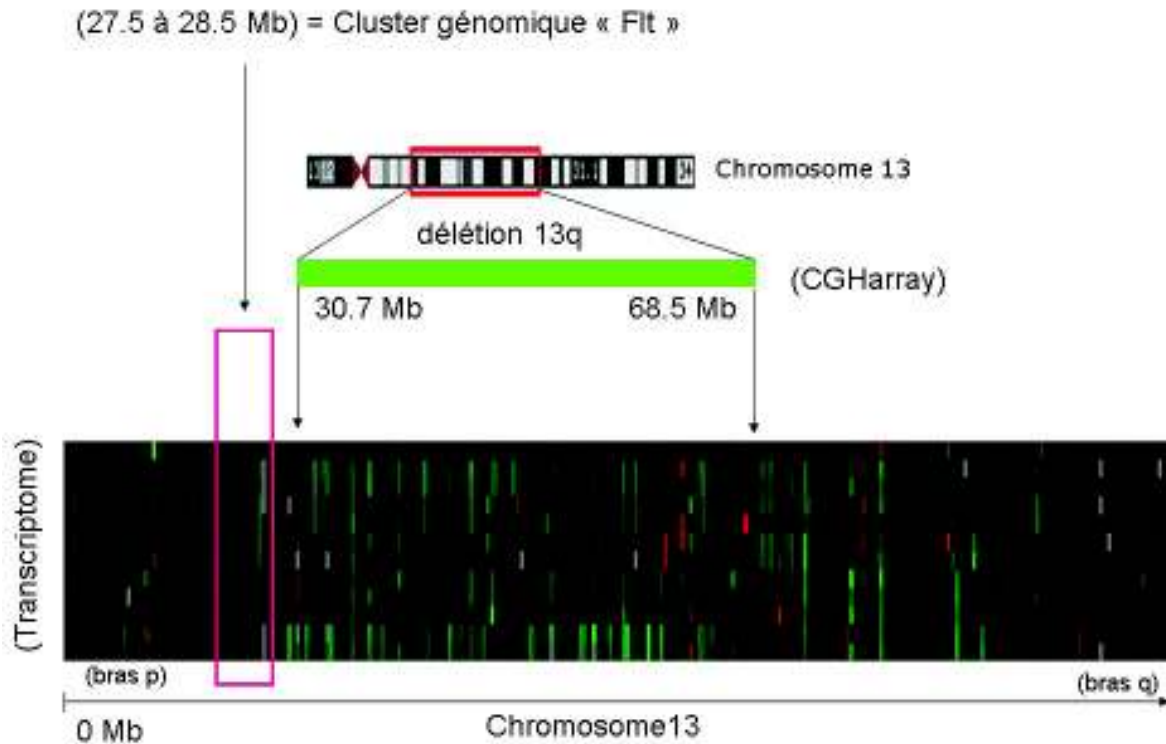
Lorsque nous avons comparé les données de CGH array et du transcriptome ciblé sur la région 13q, nous avons mis en évidence que l'expression des gènes inclus dans la zone de délétion 13q (Figure 43) ainsi que ceux du cluster « FLT » et en particulier *FLT3*, était modulée dans les cellules  $CD34^+$  des patients. Le fait que le gène *FLT3* soit situé 2 mégabases en amont de la borne de délétion suggère que la dérégulation de son expression n'est vraisemblablement pas la conséquence directe d'une anomalie génétique quantitative. D'autres mécanismes tels qu'une dérégulation de type épigénétique pourraient être impliqués. Nous avons initié une étude portant sur le rôle potentiel de la méthylation et de l'acétylation sur l'expression de *Flt3* et sur la migration des mégacaryocytes (*Flt3*-ligand)-dépendante.

L'ensemble de ces données a orienté mon travail vers l'étude du rôle de *Flt3* et de son ligand *Flt3*-ligand, dans la dérégulation de l'hématopoïèse et plus particulièrement dans la dysmégacaryopoïèse chez les patients atteints de myélofibrose primitive. Les résultats que nous avons obtenus sont exposés dans le manuscrit suivant qui vient d'être accepté pour publication dans le journal « Cancer Research ».



**Figure 42 : Transcriptome des cellules CD34<sup>+</sup> de patients atteints de myélofibrose primitive :**

A/ Diagramme de Venn représentant la répartition des gènes différemment exprimés chez les patients atteints de MFP en fonction de leur statut *JAK2* ; 69 gènes sont communs aux deux groupes ; B/ Liste des 69 gènes communs présentés selon une classification ascendante hiérarchique.



**Figure 43 : Comparaison des données du transcriptome des cellules CD34<sup>+</sup> et des données de CGH array ciblées sur la région de la délétion 13q**

Dans la partie supérieure du graphique est figurée la délétion 13q cartographiée en CGH array. La zone rouge encadrée représente la région du cluster « Flt » localisée grâce au site internet « UCSG genome browser ». les flèches noires représentent les bornes de la délétion 13q.

Les données du transcriptome ciblé sur la région 13q sont figurées sur le graphique inférieur (en rouge, sur-expression chez patient ; en vert, sous-expression; en noir, absence de modulation).



### **3/ Etude du rôle du couple Flt3-ligand/Flt3 et de l'activation des « Mitogen activated protein kinases » p38 dans la dysmégacaryopoïèse chez les patients atteints de myélofibrose primitive**

L'analyse comparative du transcriptome des progéniteurs hématopoïétiques CD34<sup>+</sup> de patients atteints de myélofibrose primitive vis-à-vis des cellules de sujets sains a mis en évidence une dérégulation de la voie de signalisation des MAP Kinases ainsi qu'une modulation d'expression du récepteur Flt3. Ce dernier est sous exprimé dans les PH CD34<sup>+</sup> de patients MFP, indépendamment de la présence de la mutation Jak2V617F, contrairement aux mégacaryocytes dans lesquels, il est surexprimé. Cette surexpression est également retrouvée dans les cellules mononucléées des patients et semble spécifique de la MFP puisqu'elle n'est pas observée chez des patients atteints de Polycythemia vera ou de Thrombocythémie essentielle. La surexpression du transcrit *FLT3* dans les mégacaryocytes est associée à une augmentation du pourcentage de progéniteurs mégacaryocytaires CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> dans le sang des patients et uniquement chez ceux atteints de MFP. On observe également une augmentation de phosphorylation de Flt3, témoin de son activation dans ces cellules. Contrairement aux sujets sains, l'expression de Flt3 persiste au cours de la différenciation mégacaryocytaire chez les patients avec une expression maximale entre le J6 et J10 de culture. Enfin, cette surexpression est associée à une augmentation des taux sériques du ligand (Flt3-ligand), produit par les progéniteurs eux-mêmes ainsi que par les cellules stromales de la moelle et de la rate des patients, quelque soit leur statut mutationnel Jak2.

La liaison de Flt3-ligand à son récepteur active différentes voies de signalisation dont celle des MAPK. L'analyse bioinformatique des voies de signalisation sur le transcriptome des cellules CD34<sup>+</sup> a mis en évidence une dérégulation des gènes codant pour des protéines de la voie MAPK et des facteurs de transcription p38-dépendants impliqués dans les processus inflammatoires tels que *API* et *FOS*. Nous avons donc analysé la dérégulation de la voie MAPK dans les cellules CD34<sup>+</sup> des patients et au cours de leur différenciation mégacaryocytaire *in vitro*. Nos résultats ont montré que le niveau de phosphorylation des MAPK p38, Jnk et p42/44 et de leurs effecteurs est augmenté dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les MK exprimant Flt3 chez les patients et ceci quelque soit leur statut Jak2.

Nous avons ensuite concentré notre étude sur la voie p38, compte tenu de son rôle dans la réaction inflammatoire qui caractérise la MFP. Par des approches d'inhibition/neutralisation de la protéine p38 par des si-ARN, des anticorps neutralisants et des inhibiteurs chimiques, nous avons montré que son activation dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les MK en culture était dépendante de l'activation du récepteur Flt3. Il en est de même après stimulation des progéniteurs mégacaryocytaires en présence de son ligand Flt3-ligand qui provoque l'augmentation d'expression des gènes cibles de p38 tels que *NFATC4*, *p53*, *API* et en stabilisant les transcrits de l'IL8. Il est intéressant de noter que l'Il-8, chimiokine impliquée dans l'inflammation et dont les transcrits sont stabilisés par p38 (Clark, Dean, & Saklatvala, 2003), participe à la dysmégacaryopoïèse chez les patients (cf. Article en annexe). Nos résultats montrant que la surexpression de l'Il-8 observée chez les patients est diminuée après « silencing » de Flt3 ou de p38 renforcent le rôle de la voie Flt-3/p38 dans cette régulation.

Nos résultats ayant montré que l'axe FLT3/MAPK était dérégulé dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les MK des patients, nous avons alors recherché s'il participait à la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la maladie. Le ciblage thérapeutique *in vitro* de la voie des MAPK et en particulier de p38, ou du récepteur Flt3 par des agents chimiques, des anticorps monoclonaux ou des si-ARN restaure la différenciation et la maturation des MK en culture. Nous avons montré l'implication de la voie de signalisation Flt3/p38 dans le contrôle de l'expression des facteurs de transcription mégacaryocytaires (*GATA-1*, *FOG-1*, *FLI-1*, et *NFE2..*) et de marqueurs de différenciation (TGF-β1, PF4, CD9...). En utilisant la même démarche, nous avons également mis en évidence le rôle de la voie Flt3/p38 dans la migration *in vitro* des MK en réponse au Flt3-ligand.

En résumé, ce travail a mis en évidence une dérégulation de Flt3 et des MAPKs p38 dans les PH CD34<sup>+</sup> et les MK des patients atteints de PMF, quelque soit leur statut mutationnel Jak2 et démontre que la persistance de la stimulation de l'axe Flt3-ligand/Flt3/p38 participe à la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la maladie.

En conclusion, nos résultats ont permis de proposer un modèle physiopathologique dans lequel une augmentation de production de la cytokine Flt3-ligand par le stroma médullaire et les cellules CD34<sup>+</sup> participe à la dysmégacaryopoïèse via une activation persistante de son récepteur Flt3 et de la voie de signalisation p38. Ce dialogue altéré entre les cellules hématopoïétiques pathologiques sur-exprimant Flt3 et en particulier les cellules mégacaryocytaires, et les cellules stromales s'intègre dans notre hypothèse

physiopathologique globale de la maladie et renforce le concept du « Bad seeds in Bad soil » évoqué précédemment.

Nos résultats pourraient expliquer, au moins en partie, l'efficacité thérapeutique de certains inhibiteurs non spécifiques de Jak2, agissant également sur les kinases associées à Flt3 et ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour restaurer une mégacaryopoïèse plus fonctionnelle. A ce titre, nous avons montré que chez des patients porteurs de la mutation Jak2, le traitement des précurseurs hématopoiétiques et en particulier mégacaryocytaires par des inhibiteurs de Flt3 ne modifie pas leur charge allélique Jak2V617F. Ceci suggère que de tels inhibiteurs ne ciblent pas uniquement le clone muté et pourraient donc être utilisés quelque soit le statut Jak2 des patients. Enfin, le modèle prédictif de réponse aux inhibiteurs de Flt3 intégrant les données clinico-biologiques (myéloprolifération, score de Dupriez et statut mutationnel Jak2) que nous proposons dans ce travail devrait permettre, une fois validé sur un plus grand nombre de patients, d'aider le clinicien dans sa décision thérapeutique.

## FLT3-Mediated p38–MAPK Activation Participates in the Control of Megakaryopoiesis in Primary Myelofibrosis

Christophe Desterke<sup>1,2</sup>, Chrystele Bilhou-Nabéra<sup>7</sup>, Bernadette Guerton<sup>1,2</sup>, Christophe Martinaud<sup>1,8</sup>, Carole Tonetti<sup>9</sup>, Denis Clay<sup>1,2</sup>, Paola Guglielmelli<sup>10</sup>, Alessandro Vannucchi<sup>10</sup>, Dominique Bordessoule<sup>11</sup>, Hans Hasselbalch<sup>12</sup>, Brigitte Dupriez<sup>13</sup>, Nassima Benzoubir<sup>3</sup>, Marie-Françoise Bourgeade<sup>3,4</sup>, Olivier Pierre-Louis<sup>1,2</sup>, Vladimir Lazar<sup>5</sup>, William Vainchenker<sup>5</sup>, Annelise Bennaceur-Griscelli<sup>4,6</sup>, Heinz Gisslinger<sup>14</sup>, Stéphane Giraudier<sup>5,9</sup>, and Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès<sup>1,2,4</sup> on behalf of the French Intergroup of Myeloproliferative Disorders, the French INSERM, and the European EUMNET Networks on Myelofibrosis

### Abstract

Primary myelofibrosis (PMF) is characterized by increased number of hematopoietic progenitors and a dysmegakaryopoiesis which supports the stromal reaction defining this disease. We showed that increased ligand (FL) levels in plasma, hematopoietic progenitors, and stromal cells from PMF patients were associated with upregulation of the cognate Flt3 receptor on megakaryocytic (MK) cells. This connection prompted us to study a functional role for the FL/Flt3 couple in PMF dysmegakaryopoiesis, as a route to reveal insights into pathobiology and therapy in this disease. Analysis of PMF CD34<sup>+</sup> and MK cell transcriptomes revealed deregulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway along with Flt3 expression. In PMF patients, a higher proportion of circulating Flt3<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> cells exhibited an increased MAPK effector phosphorylation independently of Jak2<sup>V617F</sup> mutation. Activation of FL/Flt3 axis in PMF MK cell cultures, in response to FL, induced activation of the p38–MAPK cascade, which is known to be involved in inflammation, also increasing expression of its target genes (*NFATC4*, *p53*, *AP-1*, *IL-8*). Inhibiting Flt3 or MAPK or especially p38 by chemical, antibody, or silencing strategies restored megakaryopoiesis and reduced phosphorylation of Flt3 and p38 pathway effectors, confirming the involvement of Flt3 in PMF dysmegakaryopoiesis via p38 activation. In addition, in contrast to healthy donors, MK cells derived from PMF CD34<sup>+</sup> cells exhibited an FL-induced migration that could be reversed by p38 inhibition. Taken together, our results implicate the FL/Flt3 ligand–receptor complex in PMF dysmegakaryopoiesis through persistent p38–MAPK activation, with implications for therapeutic prospects to correct altered megakaryopoiesis in an inflammatory context. *Cancer Res*; 71(8); 2901–15. ©2011 AACR.

### Introduction

Primary myelofibrosis (PMF) is a Ph (Philadelphia)-negative myeloproliferative neoplasm (MPN) characterized by extrame-

dullary hematopoiesis with splenomegaly, myelofibrosis, and neoangiogenesis. The clonal myeloproliferative process is illustrated by an increased number and mobilization of hematopoietic stem cells/progenitors (HSC/HP) with a hypersensitivity to cytokines partly resulting from Jak2<sup>V617F</sup> or MPL<sup>515L/K</sup> mutations (1–6). A prominent proliferation of megakaryocytes (MK) with a dysmegakaryopoiesis characterized by dysplastic MK with plump lobulation of nuclei and disturbance of nuclear/cytoplasmic maturation is observed in patients (7). Previous studies (8–10) have suggested that bone marrow fibrosis was secondary to fibroblast activation by inflammatory and fibrogenic growth factors including TGF- $\beta$  produced by the necrotic and dysplastic MKs (11, 12). Recently, evidences have been accumulating that stromal cells also contribute to the hematopoietic clone development through specific and mutually dependent interactions with pathologic HSCs (13).

FL, the ligand for the tyrosine kinase receptor Flt3 (14), is mainly expressed in stromal cells, including fibroblasts, likely stimulated by TGF- $\beta$ . FL is of paramount importance in the proliferation of primitive hematopoietic progenitors (15–17) as confirmed by the reduced myeloid and B-lymphoid progenitor content observed in FL<sup>-/-</sup> and Flt3<sup>-/-</sup> mice (18, 19).

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>INSERM U972, <sup>2</sup>Paris-11 University, Institut André Lwoff, <sup>3</sup>INSERM U785, <sup>4</sup>AP-HP, Paul Brousse Hospital, <sup>5</sup>INSERM U1009, IGR, <sup>6</sup>INSERM U935, Villejuif, France; <sup>7</sup>Hematology Laboratory, CHU Kremlin-Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, France; <sup>8</sup>Centre de Transfusion Sanguine des Armées, Clamart, France; <sup>9</sup>Hematology Laboratory, Henri Mondor Hospital, Créteil, France; <sup>10</sup>Department of Hematology, Firenze University, Firenze-Italy; <sup>11</sup>CHU Dupuytren, Limoges, France; <sup>12</sup>Hematology Department, Roskilde University Hospital, Copenhagen, Denmark; <sup>13</sup>Hematology Department, CH Dr Schaffner, Lens, France; <sup>14</sup>Hematology Department, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org>).

S. Giraudier and M-C. Le Bousse-Kerdilès contributed equally to this study.

**Corresponding Author:** Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, INSERM U972, Paris 11 University, Paul Brousse Hospital, 14, Avenue Paul-Vaillant Couturier, Villejuif Cedex 94807, France. Phone: 33(0)1-45595303; Fax: 33(0)1-47260319; E-mail: caroline.le-bousse-kerdiles@inserm.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1731

©2011 American Association for Cancer Research.

However, role of FL on normal megakaryopoiesis appears controversial because it does not stimulate, as a single agent, MK progenitors (20), but it enhances their proliferation in association with cytokines such as thrombopoietin (TPO; ref. 21). Its cognate receptor, Flt3, is expressed by HSC and myeloid progenitors (22) in which it signals through several downstream pathways including the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (16). Alterations of Flt3 are frequently observed in leukemic cells and mutations have been detected in about 30% of patients with acute myelogenous leukemia as well as in patients with acute lymphocytic leukemia or myelodysplastic syndrome. Mutations most often involve small tandem duplications within the juxtamembrane domain of the receptor (Flt3-ITD), resulting in constitutive tyrosine kinase activity. The recent demonstration that expression of Flt3-ITD in murine marrow cells results in a lethal MPN (23) strengthens the role of FL/Flt3 deregulation in leukemia and encourages us to investigate its possible contribution to human MPN pathogenesis and especially in PMF, in which a deregulation of primitive hematopoiesis is strongly associated with profound alterations of stroma.

In this study, we evidenced that the FL plasma level is increased in PMF patients and is overexpressed by stromal and CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells. FL augmentation is associated with an aberrant Flt3 expression in CD34<sup>+</sup> and MK cells and with an alteration of the MAPK pathway and especially of p38, in patients, independently of their Jak2 mutational status. We further showed that the persistence of Flt3 signaling, which elicits activation of MAPK, known to be involved in MK polyploidization (24), participates in the dysmegakaryopoiesis that characterizes PMF. Taken together, our results implicate the "FL/Flt3" couple in PMF MK deregulation through persistent p38–MAPK activation.

## Materials and Methods

### Patients

One hundred twenty-six PMF patients [Jak2<sup>V617F</sup> ( $n = 51$ ), Jak2<sup>WT</sup> ( $n = 45$ ), and Jak2 status not determined ( $n = 30$ )], obtained from clinicians of the French and European networks, and 90 unmobilized healthy donors (HD) were enrolled. Samples were obtained with the informed consent of subjects according to the Helsinki declaration.

### Cell selection

CD34<sup>+</sup> cell selection was carried out on mononuclear cells (MNC) from peripheral blood (PB) or bone marrow (BM) samples from PMF patients and HD as previously described (purity > 97%; ref. 25). Stromal cells obtained from osteomedullar biopsies or hip surgery from PMF patients and HD, respectively, were cultivated for 3 to 4 passages in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) + 10% FCS (fetal calf serum). FL plasma level was quantified using Quantikine ELISA (R&D Systems).

### Microarray analysis and quantitative RT-PCR

For microarray technique, see Supplementary Material. For quantitative reverse transcription PCR (QRT-PCR), total RNAs

were subjected to RNase-free DNase and converted into cDNA by using the Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). cDNA (2  $\mu$ L) was added to the QuantiTect SYBR Green amplification reaction (QIAGEN) in a 20  $\mu$ L final volume and 10 pmol of each primer (Supplementary Table S1) were added to carry out specific amplification. *RPL38* was used as housekeeping gene and relative quantification was based on the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (26).

### Phenotypic analysis of CD34<sup>+</sup> cells

Cells ( $5 \times 10^4$ ) were labeled with 2  $\mu$ g/mL of the following monoclonal antibodies (mAb): CD38-fluorescein isothiocyanate (FITC; clone-T16) or CD41-FITC (clone-P2; Beckman Coulter) versus IgG1-FITC isotype; Flt3-PE (CD135, clone-4G8; BD Pharmingen) or CD41-PE (clone-5B12; Dako) versus IgG1-PE isotype; CD34-PerCP (clone-8G12) versus IgG1-PerCP isotype; CD41-APC (clone-386629) versus IgG1-APC isotype (BD Pharmingen). Membrane antigen fluorescence was quantified by using CellQuest software on a FACScalibur (Becton Dickinson). Live cells ( $5 \times 10^3$ ) were analyzed.

### MK derived from CD34<sup>+</sup> cultures

CD34<sup>+</sup> cells ( $5 \times 10^4/500 \mu$ L per well) were cultured for 10 to 14 days in MK differentiation medium [SYN.H serum-free medium containing Recombinant human stem cell factor (rhSCF): 5 ng/mL; rhIL-3: 2 ng/mL; rhIL-6: 1 ng/mL; rhIL-11: 40 ng/mL, rhTpo: 50 ng/mL; AbCys Synergie] with or without inhibitors and viability was evaluated by trypan blue. For RNA silencing, cells were cultured for 6 days and distributed in 24 well per plate per 250  $\mu$ L with or without control or specific siRNA (1  $\mu$ g) and a vector MISSION II (1/50; Sigma). Biological effect of siRNA was evaluated after 48-hour incubation.

### Megakaryocyte ploidy measurement

DNA content was measured by incorporation of propidium iodide (PI). Megakaryocytes obtained at day 12 (D12) of culture were fixed with 70% ethanol ( $-20^\circ\text{C}$ ), centrifuged and treated with RNase (500  $\mu$ g/mL) and PI (50  $\mu$ g/mL; Sigma). Live cells ( $3 \times 10^4$ ) were analyzed and the percentage of polyploid cells (8N-256N) was determined on FACScalibur with CellQuest software. The B/S ratio (big/small MK proportion) was calculated as following:  $\Sigma(64N + 128N + 256N)/\Sigma(8N + 16N + 32N) \times 100$ .

For cyclin D3 expression, MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> culture (D10) were labeled with a cyclin D3-FITC mAb (MOPC-21; BD Pharmingen) and analyzed by fluorescence microscopy (400 $\times$ ).

### MAPK and effector phosphorylation analysis by flow cytometry

Cells were fixed in PBS with formalin (2%) for 1 hour and in 70% ethanol overnight ( $4^\circ\text{C}$ ). After washes in PBS–0.5% BSA–Triton 0.25 $\times$  (PBT), cells were incubated with either anti-MAPK mAbs [Cell Signaling; phospho-p38 Thr180/Tyr182 (clone-12F8), phospho-p42/44 Thr202/Tyr204 (clone-20G11), phospho JNK/SAPK (c-jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase) T183/Y185 (clone-98-F2)] or rabbit IgG isotype for 45 minutes ( $4^\circ\text{C}$ ). Cells were washed and incubated with a

secondary anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 488 nm (Invitrogen). Phosphorylation levels of Raf, p38 effectors, and Flt3 on gated CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>FLT3<sup>+</sup> cells were determined after labeling with rabbit mAbs included in Raf Family Antibody or Phospho-p38 MAPK Pathway Sampler Kits (nos. 2330 and 9913, respectively) or Tyr591-Flt3 from Cell Signaling, followed by a secondary GAR-Alexa Fluor 633 nm antibody (Invitrogen). About 10<sup>4</sup> events were analyzed on a FACScalibur.

#### **In vitro migration assay**

Transwell migration assays were carried out on MK derived from CD34<sup>+</sup> cultures (D6) as previously described (27). Cells (10<sup>5</sup>) were loaded on the top chamber and rhFL (10–100 ng/mL) was added or not to the bottom chamber, with or without rhSDF-1 (100 ng/mL), and incubated for 48 hours at 37°C in RPMI/0.5%BSA. In some experiments, Flt3 inhibitor IV (42 nmol/L; Calbiochem) or p38 inhibitors (SB203580, 1 μmol/L, SB202190, 40 nmol/L; Sigma) were added to the culture. The percentage of migrating cells was calculated after quantification of live cells in top and bottom chambers.

#### **Western blot**

Total cell lysates (10/30 μg), obtained as previously described (28), were subjected to SDS-PAGE, electrophoretically transferred into nitrocellulose membranes, and blotted using primary mAbs similar to those used for cytometric analysis or using actin antibody (Santa Cruz Biotechnology). Membranes were revealed with anti-mouse or anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked antibodies and a chemiluminescence detection kit (ECL-Plus; GE-Healthcare); signals were quantified by using ImageJ software.

#### **Patient group prediction model**

Upstream p38 effectors and *C-MYC* expression modulation in MK derived from CD34<sup>+</sup> (D6) in response to 18-hour FL stimulation kinetics was quantified by QRT-PCR. Ratio at each time point of kinetics was normalized as compared with quantification at the starting point of stimulation. Cumulative scores of each kinetic time ratio were included in a multivariate model composed of a principal component analysis associated to a hierarchical clustering in which patient clinical information were reported.

#### **Statistical analysis**

Results were expressed as mean ± SD. Statistical differences between patients and controls were validated by unpaired *t* test with a significant *P* < 0.05. Statistical differences between conditions were validated by paired *t* test with significant *P* < 0.001 (\*\*\*) *P* = 0.001 to 0.01 (\*\*); and *P* = 0.01 to 0.05 (\*). Fisher ANOVA test with 2 factors (samples and time of differentiation) was also used; a *P* < 0.05 was significant. NS, not significant.

## **Results**

### **FL plasma level is increased in PMF patients and is overexpressed in CD34<sup>+</sup> hematopoietic and stromal cells**

We first showed that FL plasma level was significantly increased in PMF patients as than in HDs (Fig. 1A; 130.1 ±

78.41, *n* = 52 vs. 69.84 ± 30.94, *n* = 28; *P* = 0.0001) with no significant difference between PMF patients according to their Jak2 status (181.4 ± 70.8 pg/mL, *n* = 7 vs. 128.8 ± 81.9 pg/mL, *n* = 18 for Jak2<sup>V617F</sup> and Jak2<sup>WT</sup>, respectively). The increased FL level appears to be restricted to PMF patients, as it was statistically different from that of polycythemia vera (PV; *n* = 17) and essential thrombocytopenia (ET; *n* = 17) patients.

We further analyzed the nature of FL producing cells and showed that fibroblasts from PMF BM expressed higher FL level than those from HD (1.17 ± 0.4, *n* = 8 vs. 0.56 ± 0.17, *n* = 6, respectively; *P* = 0.002). As CD34<sup>+</sup> and MK cells from PMF patients are known to produce cytokines (13, 29), we analyzed whether they expressed FL. Whereas we did not detect FL transcript in PMF or HD MK cells (data not shown), a 2-fold increase in FL mRNA level was observed in PMF CD34<sup>+</sup> cells as compared with that in HD cells (Fig. 1A; 0.080 ± 0.218, *n* = 22 vs. -0.294 ± 0.242, *n* = 6; *P* = 0.0006).

### **Flt3 expression and phosphorylation are increased in PBMNC, MK, and CD34<sup>+</sup> cells from PMF patients**

Figure 1B shows that Flt3 mRNA level was increased in mononuclear cells from peripheral (PBMNC) from PMF patients than in HD (0.69 ± 0.96, *n* = 11 vs. -0.06 ± 0.47, *n* = 16, respectively; *P* < 0.006). Similar to FL, Flt3 overexpression was restricted to PMF because Flt3 mRNA level was statistically different in PMF as compared with ET and PV. We further analyzed Flt3 expression on PBMNC by flow cytometry and showed that the percentage of cells coexpressing the CD41<sup>+</sup> MK antigen and Flt3 was higher in PMF than in HD (Fig. 1B). Western blot analysis confirmed the Flt3 increased expression and evidenced its phosphorylation in PBMNC from PMF patients (Fig. 1B). As Flt3 is reported to be expressed in HP, we analyzed its distribution on freshly purified CD34<sup>+</sup> cells. Figure 1C showed that the percentage of CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup> cells was increased in PMF compared with that in HD cells (17.77 ± 14.98, *n* = 11 vs. 4.72 ± 7.09, *n* = 10, respectively; *P* = 0.01). Flt3 was mainly expressed on PMF MK progenitors, as the proportion of CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> cells was significantly increased in Jak2<sup>WT</sup> and Jak2<sup>V617F</sup> patients than in HD (76.11 ± 14.49, *n* = 4 and 43.37 ± 23.86, *n* = 12 vs. 9.11 ± 10.97, *n* = 11; *P* < 0.0001 and *P* = 0.0001, respectively; Fig. 1D) with a higher proportion in Jak2<sup>WT</sup> patients (*P* = 0.01). To assess Flt3 activation on this cell subset, we quantified the percentage of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup> cells expressing phospho-Flt3 and showed that it was increased in PMF patients (Jak2<sup>WT</sup> and Jak2<sup>V617F</sup>) versus HD (28.21 ± 22.67, *n* = 5 and 18.35 ± 24.81, *n* = 4 vs. 0.22 ± 0.34, *n* = 10; *P* = 0.007 and *P* = 0.01, respectively; Fig. 1D). In accordance with these results, Western blot analysis also evidenced the presence of the Flt3 protein and of its phosphorylated form in freshly isolated CD34<sup>+</sup> cells and in MK-derived CD34<sup>+</sup> cells from PMF patients (Fig. 1E).

The increased percentage of PMF CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> MK progenitors expressing Flt3 and its activated form motivated us to analyze its expression during *in vitro* megakaryopoiesis. We quantified by QRT-PCR the Flt3 transcript in MK derived from CD34<sup>+</sup> culture (D10) and showed that it was significantly overexpressed in PMF patients as compared with

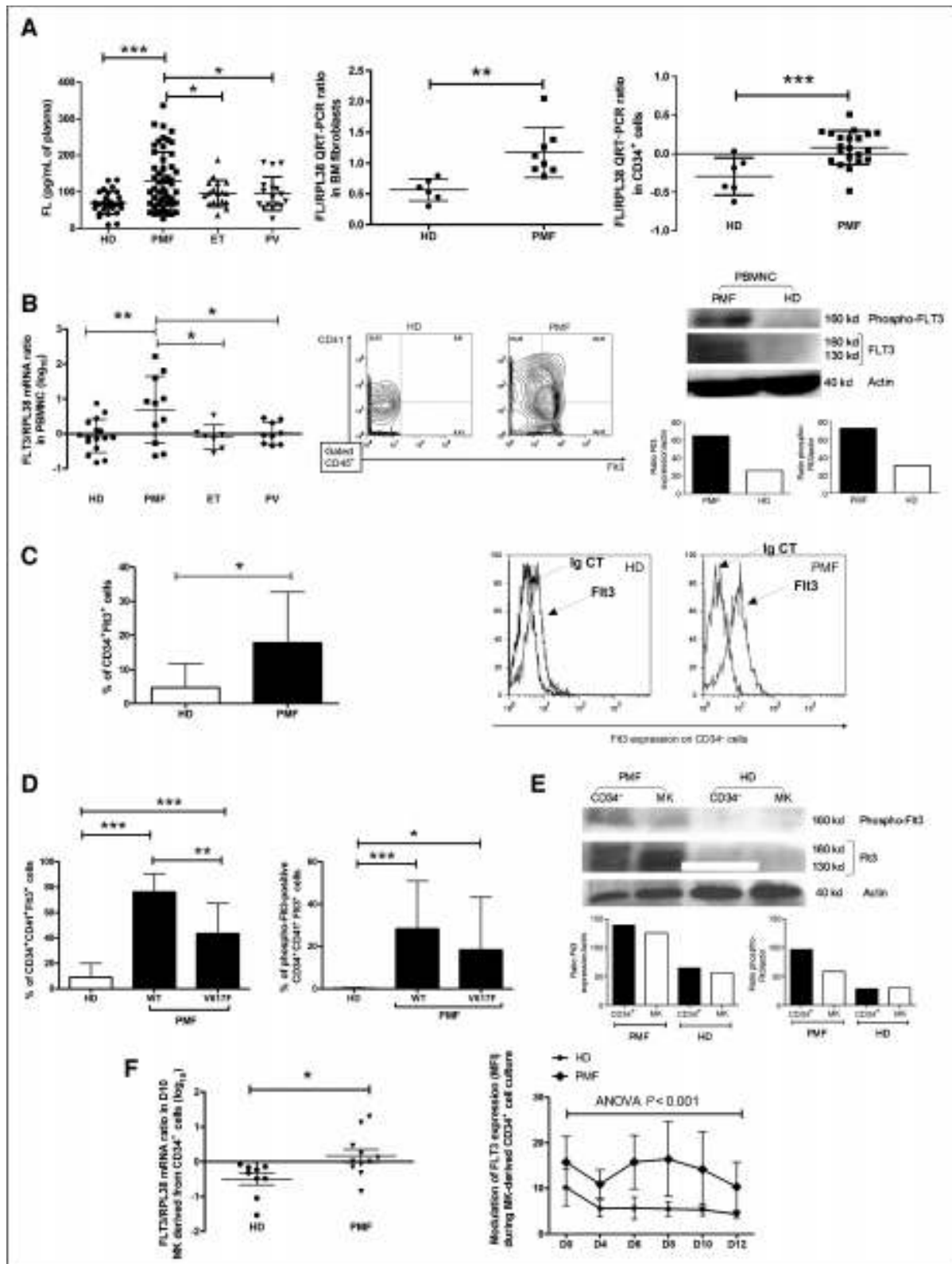


Figure 1. Increased FL level, Fit3 expression, and phosphorylation in PMF patients. A, FL plasma level in HD, PMF, ET, and PV; FL mRNA expression in BM fibroblasts and CD34<sup>+</sup> cells from HD and PMF. B, Fit3 mRNA expression in PBMC from HD, PMF, ET, and PV, Fit3 membrane expression in CD41<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> PBMC and Fit3 protein expression and phosphorylation in PBMC determined by Western blot analysis. C, percentage of circulating CD34<sup>+</sup>Fit3<sup>+</sup> cells and cytogram of Fit3 expression. D, CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>Fit3<sup>+</sup> cells and of phospho-Fit3-positive CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>Fit3<sup>+</sup> cells in HD and PMF, according to their Jak2 status. E, Fit3 expression and phosphorylation in CD34<sup>+</sup> and MK derived from CD34<sup>+</sup> cells determined by Western blot analysis. F, Fit3 mRNA expression in MK and modulation of its membrane expression during MK-derived CD34<sup>+</sup> culture. \*, *P* = 0.01 to 0.05; \*\*, *P* = 0.001 to 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

HD ( $0.168 \pm 0.615$ ,  $n = 11$  vs.  $-0.498 \pm 0.488$ ,  $n = 9$ ;  $P = 0.008$ ; Fig. 1F). We further analyzed the variation of Flt3 membrane expression at different time points during *in vitro* MK differentiation. In contrast to HD, Flt3 expression persisted in patients throughout the culture with a maximal expression between days 6 and 10; the ANOVA/Fisher test showed a significant difference ( $P < 0.001$ ) between HD (BM,  $n = 10$ ; PB,  $n = 12$ ) and PMF patients ( $n = 16$ ; Fig. 1F).

Altogether, these data indicate that Flt3 expression and phosphorylation are increased in PMF CD34<sup>+</sup> cells and are maintained during MK differentiation.

### MAPK phosphorylation is increased in PMF CD34<sup>+</sup> and MK cells and is related to cells expressing Flt3

Binding of FL to Flt3 triggers several downstream signals mainly including PI3K and Ras/MAPK pathways. A profiling gene expression of PMF CD34<sup>+</sup> cells had allowed us to generate 2 lists of differentially expressed genes (HD vs. PMF Jak2<sup>WT</sup> and HD vs. PMF Jak2<sup>V617F</sup>; Gene Expression Omnibus, GEO, no. GSE12234). These lists were used to carry out a functional representation based on a pathway annotation using NIH DAVID software (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). This analysis indicated that several genes involved in the MAPK pathway are commonly deregulated in PMF patients (Fig. 2A and Supplementary Table S2). We also evidenced that MAPK pathway gene and especially p38-dependent transcription factors involved in inflammatory process, such as AP-1 and Fos, were altered in PMF MK cells (Supplementary Table S3). We further investigated MAPK pathway deregulation in CD34<sup>+</sup> cells and during *in vitro* megakaryopoiesis in PMF patients.

Figure 2B shows that p38, Jnk, and p42/p44 phosphorylation levels were significantly increased in PMF CD34<sup>+</sup> cells, independently of their Jak2 status, as compared with that in HD cells: p38 (HD:  $7.74 \pm 3.67$ ,  $n = 21$  vs. PMF Jak2<sup>WT</sup>:  $21.08 \pm 12.05$ ,  $n = 8$ ;  $P < 0.0001$  and vs. PMF Jak2<sup>V617F</sup>:  $16.78 \pm 8.11$ ,  $n = 12$ ;  $P < 0.0001$ ), p42/p44 (HD:  $6.8 \pm 2.97$ ,  $n = 22$  vs. PMF Jak2<sup>WT</sup>:  $16.58 \pm 9.84$ ,  $n = 8$ ;  $P = 0.0001$  and vs. PMF Jak2<sup>V617F</sup>:  $12.11 \pm 11.76$ ,  $n = 12$ ;  $P = 0.02$ ), and JNK (HD:  $6.17 \pm 4.54$ ,  $n = 24$  vs. PMF Jak2<sup>WT</sup>:  $26.76 \pm 19.56$ ,  $n = 8$ ;  $P < 0.0001$  and vs. PMF Jak2<sup>V617F</sup>:  $13.87 \pm 12.15$ ,  $n = 12$ ,  $P = 0.005$ ).

We then analyzed whether MAPK activation was maintained during *in vitro* MK differentiation and showed that, similar to CD34<sup>+</sup> cells, increased phosphorylation levels of p38 and Jnk were observed in D10 MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> culture irrespectively of their Jak2 status (p38:  $18.34 \pm 11.62$ ,  $n = 10$  and  $18.27 \pm 12.09$ ,  $n = 18$ , for PMF Jak2<sup>WT</sup> and Jak2<sup>V617F</sup>, respectively vs.  $8.99 \pm 5.11$ ,  $n = 17$  for HD,  $P = 0.0038$  and  $P = 0.0030$ , respectively; JNK:  $21.95 \pm 20.98$ ,  $n = 10$  and  $22.76 \pm 25.35$ ,  $n = 16$  for PMF Jak2<sup>WT</sup> and Jak2<sup>V617F</sup>, respectively vs.  $6.91 \pm 3.96$ ,  $n = 17$  for HD,  $P = 0.0038$  and  $P = 0.0079$ , respectively; Fig. 2B). A modest increased p42/p44 phosphorylation was also observed in PMF MK cells.

We further studied the phosphorylation of up- and downstream p38, JNK, and p42/p44 effectors in PMF cells and whether this phosphorylation was associated with Flt3 expression. Figure 2C showed that the percentage of CD34<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup> cells expressing phospho-a/b/c-Raf or

phosphorylated forms of p38 effectors such as MKK3-6, MAPKAPK2, and ATF2 as well as of MSK1 and HSP27 were significantly increased in PMF patients whatever their Jak2 status (Jak2<sup>V617F</sup>,  $n = 4$  and Jak2<sup>WT</sup>,  $n = 5$ ) as compared with HD (PB,  $n = 6$  and BM,  $n = 3$ ).

Therefore, our data showed that MAPK phosphorylation is increased in PMF CD34<sup>+</sup> and MK cells and is related to Flt3 expressing cells.

### Flt3-dependent p38-MAPK pathway deregulation in PMF CD34<sup>+</sup> and MK cells

Among MAPKs, p38 is strongly responsive to stress and inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-8 known to be highly expressed in PMF (30); so, we further focused our study on p38-MAPK and on its main up and downstream effectors. We confirmed that p38 was phosphorylated in CD34<sup>+</sup> and MK cells from patients by Western blot analyses (Fig. 3A), and that p38 phosphorylation was associated with MK expressing Flt3 (Fig. 3B). p38 phosphorylation was associated with activation of its upstream MKK3-6 effector and with upregulation of downstream AP-1 target gene expression in both CD34<sup>+</sup> and CD41<sup>+</sup>MK derived from CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 3C and D) reinforcing the notion that p38 axis is activated in PMF cells.

To analyze the role of Flt3 in p38-MAPK pathway activation in PMF CD41<sup>+</sup>MK derived from CD34<sup>+</sup> culture, we quantified the phosphorylation of p38-MAPK effectors after addition of a neutralizing Flt3 antibody (10  $\mu$ g/mL) to PMF cells from 6 patients. We showed that such treatment reduced phosphorylation of up- and downstream targets of p38 (Fig. 2E). Finally, to ascertain the implication of Flt3 in p38-MAPK activation, we showed that silencing 50% of Flt3 protein expression (Fig. 3F) and 80% of its transcript (data not shown) in MK derived from CD34<sup>+</sup> resulted in a decreased percentage of phospho-p38<sup>+</sup> cells (Fig. 3G).

Altogether these data showed that p38-MAPK pathway effectors are activated in CD34<sup>+</sup> and MK cells from patients and that Flt3 expression/phosphorylation participates in this activation process.

### *In vitro* FL stimulation activates p38 and modulates downstream regulator expression in PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cells through Flt3 axis

To further show that MAPKs and especially p38 were activated in PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cells in response to FL, we compared the effect of 18-hour dose-dependent FL stimulation on MAPK phosphorylation in MK precursors obtained from PMF or HD CD34<sup>+</sup> cultures (D6). Figure 4A shows that no variations were observed for p42/p44 or JNK phosphorylations either in PMF or HD cells at 50 ng/mL FL. This result was identical whatever the dose of FL added (data not shown). In contrast, 50 ng/mL FL stimulation induced a progressive increase of phospho-p38 level in PMF MK as compared with HD (ANOVA;  $P = 0.002$ ). This increased p38 phosphorylation level in PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cells after FL stimulation was confirmed by Western blot analysis and implication of Flt3 activation was supported by a reduced p38 phosphorylation by addition of Flt3 inhibitor IV (Fig. 4B). To



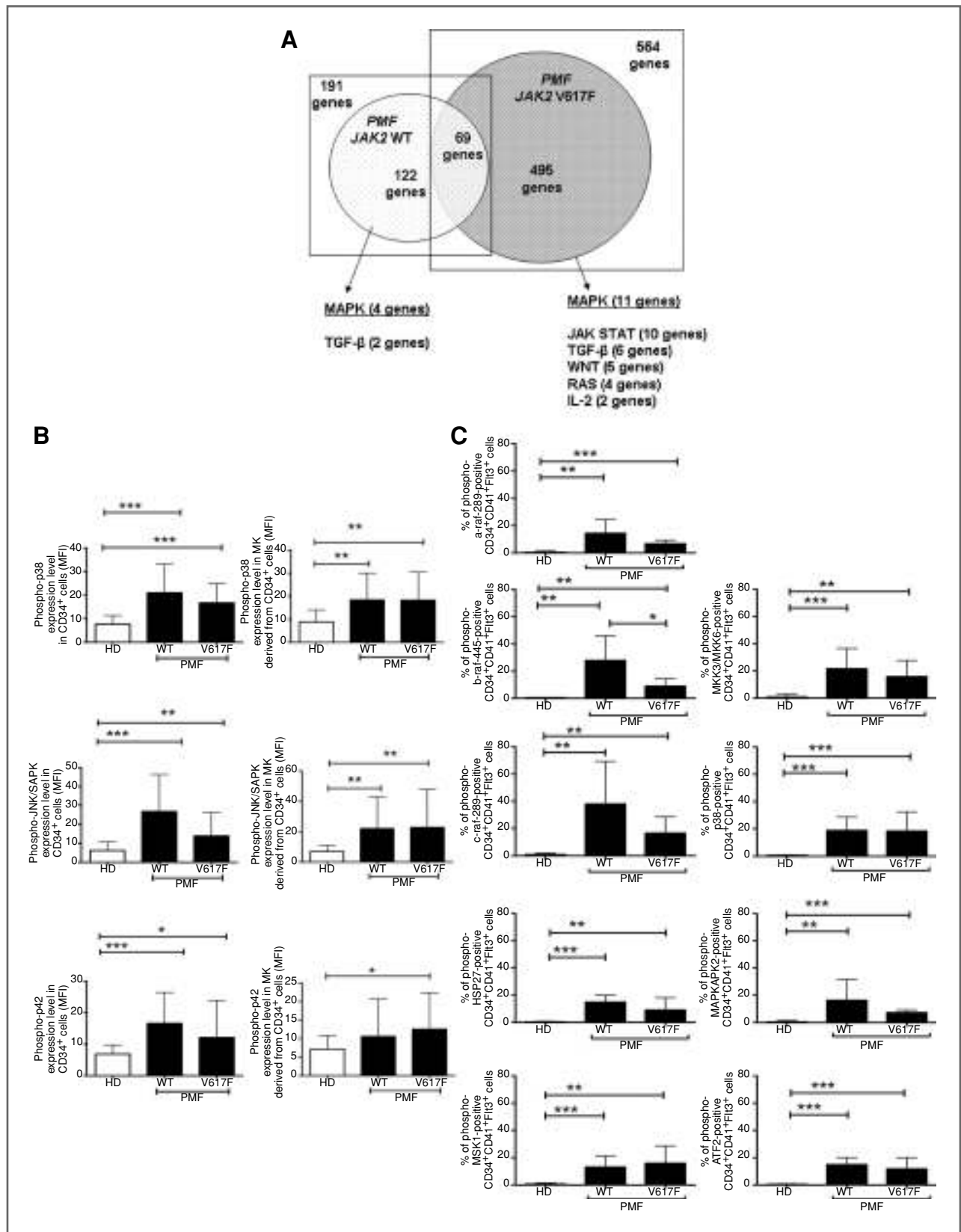
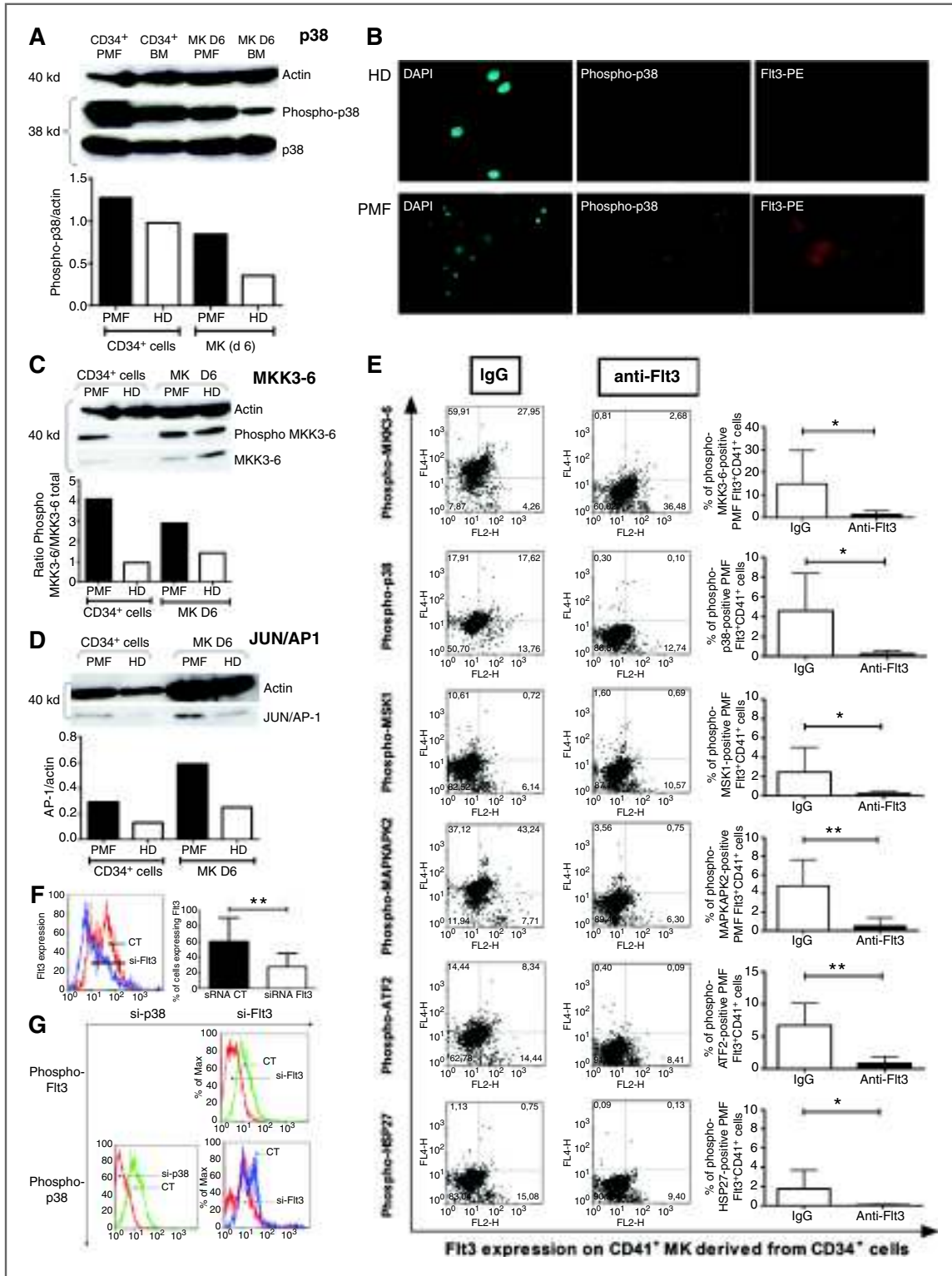


Figure 2. MAPK effector expression and phosphorylation in CD34<sup>+</sup> cells and MK cells from PMF patients. A, Venn diagram showing MAPK deregulation in PMF CD34<sup>+</sup> cell transcriptome. Phosphorylation level (MFI) of p38, JNK/SAPK, and p42/p44 in CD34<sup>+</sup> and MK derived from CD34<sup>+</sup> cells (B) of Raf (a-raf-289, b-raf-445, c-raf-289) and p38 pathway effectors (MKK3/6, MSK1, MAPKAPK2, ATF2, and HSP27) in CD34<sup>+</sup>Fit3<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> MK progenitors (C) from HD and PMF patients according to their Jak2 status. \*,  $P = 0.01$  to  $0.05$ ; \*\*,  $P = 0.001$  to  $0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .



**Figure 3.** Fit3-dependent p38-MAPK effector phosphorylation in PMF megakaryopoiesis. **A**, phospho-p38 determined by Western blot analysis. **B**, p38 phosphorylation and Fit3 expression in MK derived from HD or PMF CD34<sup>+</sup> cells (day 10) by immunocytochemistry (650 $\times$ ). **C**, phospho-MKK3-6 determined by Western blot analysis. **D**, expression level of JUN/AP-1 determined by Western blot analysis. **E**, effect of anti-Fit3 mAb on p38 effector phosphorylation (MKK3-6, MSK1, MAPKAPK2, ATF2, and HSP27) in Fit3<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> cells (day 10). **F**, Fit3 expression in MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> cells after Fit3 silencing as determined by flow cytometric analysis. **G**, effect of p38 and Fit3 RNA silencing on their respective phosphorylations in MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> cells (day 8). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. \*, *P* = 0.01 to 0.05; \*\*, *P* = 0.001 to 0.01.

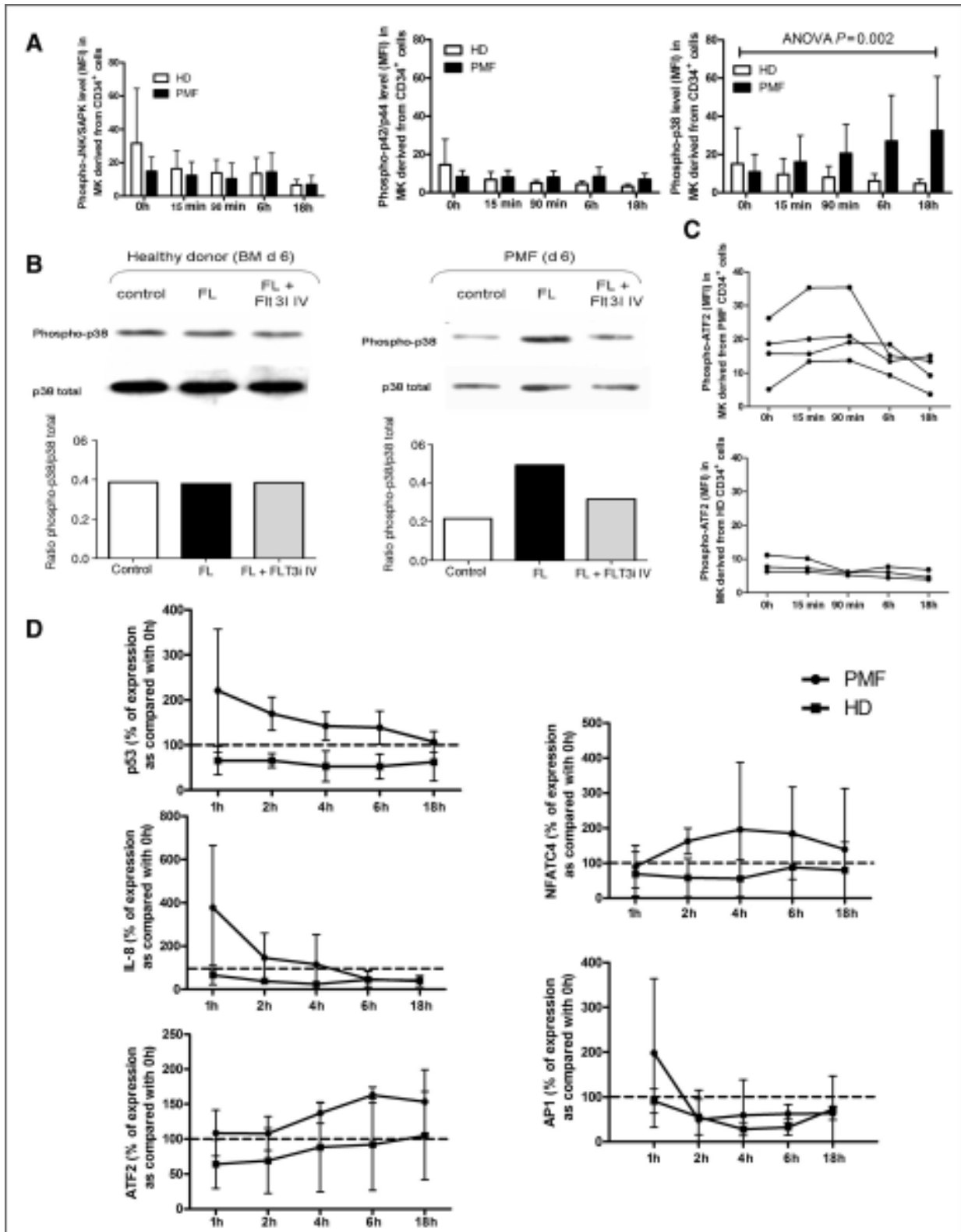


Figure 4. Modulation of p38-MAPK effector phosphorylation and MAPK downstream regulator expression in PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cells in response to FL stimulation. These stimulations were carried out at 50 ng/mL. A, effect of 18-hour FL kinetic on the phosphorylation level (MFI) of p-38, JNK/SAPK, and p42/p44 in PMF MK derived from CD34<sup>+</sup> cells (day 6). B, phospho-p38 in HD and PMF MK derived from CD34<sup>+</sup> cells (day 6) in response to 18-hour FL stimulation and Flt3 inhibitor treatment determined by Western blot analysis. C, modulation of ATF2 phosphorylation in response to a time-dependent FL stimulation determined by flow cytometric analysis. D, transcriptional regulation of MAPK effector (ATF2) and transcription factors as well as IL-8 after 18-hour FL kinetic in HD and PMF MK derived from CD34<sup>+</sup> cells (day 6).

confirm the triggering effect of FL/Flt3 on p38 pathway, we further analyzed by flow cytometry the activation of ATF2, a key cross-talk molecule for p38 transcriptional activity, in response to FL stimulation. Figure 4C shows that ATF2 phosphorylation level is increased in MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> in response to FL in a time-dependent manner. In contrast, there is no ATF2 phosphorylation in response to FL stimulation in HDs.

We further analyzed whether the expression of MAPK-associated downstream transcription factors was modulated in response to FL. Figure 4D shows that p38-associated p53, NFATc4/NFAT3, AP-1, and ATF2 transcripts are upregulated after FL stimulation in PMF but not in HD samples. In contrast, MSK2, PARK, MK3, MNK1, MNK2, and MSK1 transcripts that are Erk (extracellular signal-regulated kinase)-dependent transcriptional factors were not affected by FL stimulation either in HD or in PMF (Supplementary Table S4). Interestingly, the transcript of IL-8, known to be involved in PMF dysmegakaryopoiesis (30) and to be stabilized by p38 (31), showed a rapid increase in response to FL in PMF cells (Fig. 4D). This IL-8 overexpression was reduced after Flt3 or p38 silencing (data not shown) strengthening the role of the Flt3/p38 signaling in IL-8 regulation.

Altogether our data confirm that FL *in vitro* activates p38 cascade and increases its target gene expression through Flt3 in PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cells.

#### Modulation of upstream MAPK linker expression in response to FL allows definition of PMF patient group prediction

We further searched whether p38-MAPK upstream linker expression was modified in response to FL in PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cells and whether modulation of their expression could predict exaggerated FL/MAPK axis response. We have principally selected upstream MAPK linkers proximal to Flt3, minimizing the influence of other pathways such as PI3K and JAK/STAT (Fig. 5A) and quantified their mRNA expression at different time points of FL kinetics, by QRT-PCR. Data (Supplementary Table S5) were used to draw a gene neuronal network that shows a good correlation between genes selected and validates their choice for the predictive model (Fig. 5B). A three-dimensional (3D) projection plot of principal component multivariate analysis (PCA) showed that HD samples (BM, PB) are closely related in the centre of the plot. The PMF4 patient, who is *de novo* diagnosed, is close to the HD aggregate, in contrast to the 3 other patients (PMF1, PMF2, and PMF3) who were earlier diagnosed (Fig. 5C). These PCA dispersion data incited us to build a hierarchical classification plot correlating this clustering to clinicobiological data (Fig. 5D). This classification allowed to distinguish HD and PMF groups and to identify PMF subgroups correlated with clinical data such as Jak2 mutation status, myeloproliferation, and Dupriez score.

This predictive model confirms the implication of Flt3/MAPK axis activation in PMF megakaryopoiesis and establishes a link with patient clinicobiological parameters.

#### Flt3/MAPK axis is involved in PMF dysmegakaryopoiesis

Our results showing that Flt3/MAPK axis was altered in PMF megakaryopoiesis raise the question of whether it is involved in this pathologic process (30). Therefore, we assessed the effect of p38, p42/p44, Jnk, and Flt3 inhibitors (refs. 32, 33; Supplementary Table S6) or of anti-Flt3 mAb (10 µg/mL) on PMF MK-derived CD34<sup>+</sup> cultures. Inhibition of either MAPK or Flt3 significantly reduced the proliferation of MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 6A), without affecting their viability (Fig. 6B). Figure 6C showed that such treatment increased the percentage of polyploid MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> cells, especially of cells with a ploidy more than 64N (Supplementary Table S6) and induced a nuclear localization of cyclin D3, known to promote endomitosis. It also stimulated MK differentiation as shown by an increased expression of the CD41 MK differentiation marker (Fig. 6D). A similar effect on CD41 expression was observed after p38 or Flt3 silencing, confirming their participation in the differentiation process (Fig. 6D and Supplementary Fig. S1). Furthermore, Flt3 inhibitors restored the formation of proplatelets (Fig. 6D). Participation of the Flt3/p38-mediated pathway in the control of PMF megakaryopoiesis was further confirmed by results showing an upregulation of GATA-1, FOG-1, FLI-1, NFE2 MK transcriptional factors, of Aurora B endomitotic regulator and of TGFB1, PF4, and CD9 MK marker gene expression after Flt3 or p38 silencing (Fig. 6E).

FL has been reported to be a mobilization factor (27). Therefore, we analyzed whether Flt3/p38 axis participates in PMF MK migration in response to FL. We first determined FL doses that induced a maximal MK migration (data not shown). In contrast to HD, in PMF patients, addition of 10 ng/mL FL induced a significant MK precursor migration as compared with untreated cells (46.85% ± 10.09% vs. 25.88% ± 5.29%; *n* = 3, *P* = 0.03; Fig. 6F). FL-mediated migration was inhibited by addition of Flt3 inhibitor (Fig. 6F), confirming the role of Flt3 in the PMF FL-induced migration. Addition of p38 inhibitors also totally inhibited the FL-mediated migration (Fig. 6F) showing that it was dependent on p38 activation. As expected, addition of SDF-1 alone used as control, stimulated the migration of MK precursors from either PMF patients or HD (Fig. 6F). However, when added to FL, SDF-1 did not increase the PMF FL-induced migration (Fig. 6F), suggesting that both processes are differentially regulated in patients.

Altogether, our data support the notion for a role for the Flt3/p38-MAPK axis in PMF dysmegakaryopoiesis.

#### Discussion

PMF is characterized by a clonal amplification of HSC, an increased circulating CD34<sup>+</sup> cell number, and a prominent MK proliferation with altered maturation and dysplastic features in the bone marrow. This myeloproliferation is associated with marked changes in the BM stroma characterized by myelofibrosis, osteosclerosis, and neoangiogenesis consequent to an overproduction of fibrogenic and inflammatory cytokines by hematopoietic cells and especially by MKs (34). Reciprocally, studies from our group have shown the role of stromal cells from PMF patients in the myeloproliferation and especially in

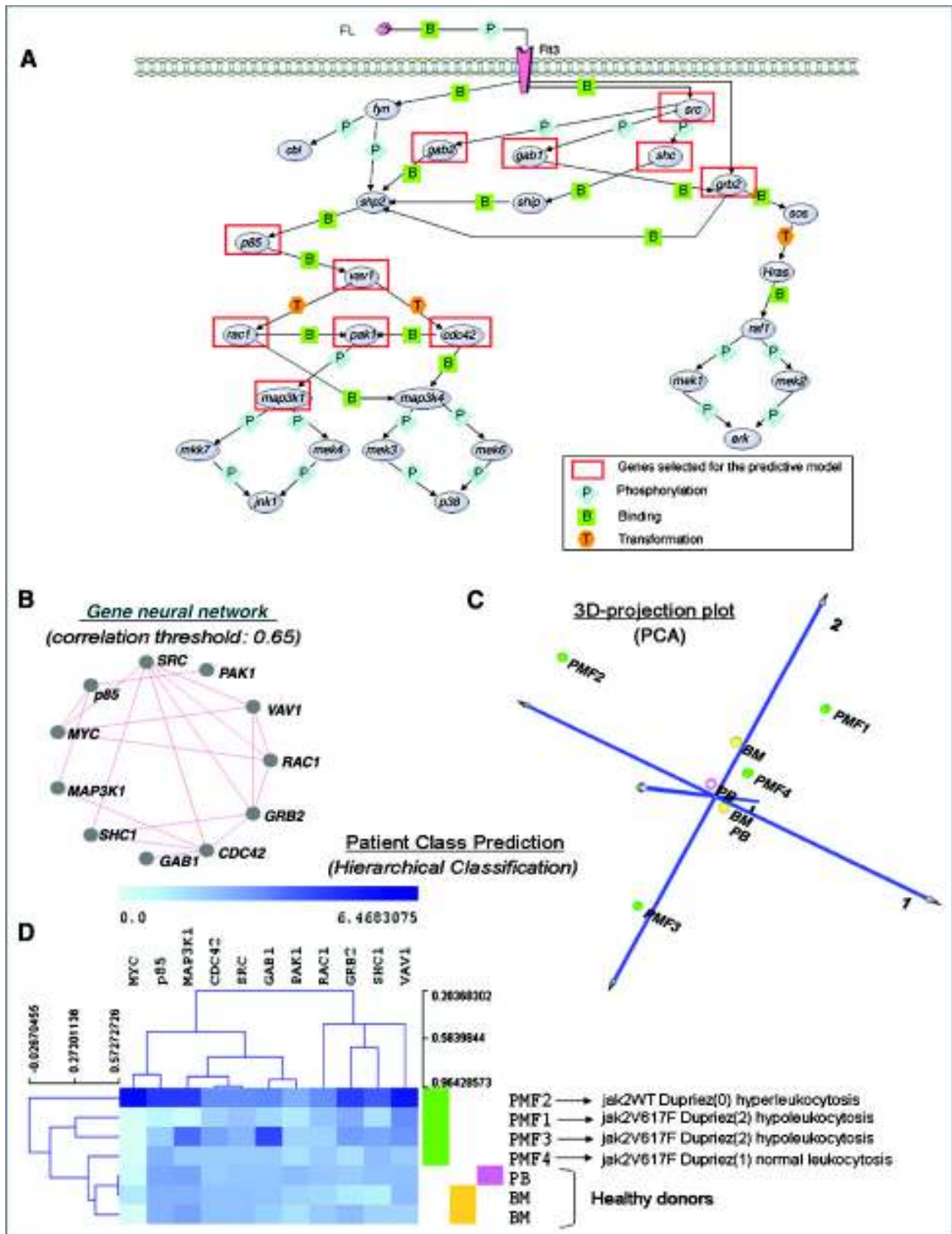


Figure 5. PMF patient group prediction model according to modulation of upstream MAPK linker and effector expression in response to FL stimulation. A, scheme of genes involved in FcγR3/MAPK axis drawn from www.genego.com. Red frame genes were selected for conducting a predictive model of PMF patient groups according to FL-dependent MAPK response (B–D). Predictive model: (B) neural network with selected genes, (C) principal component analysis, (D) hierarchical clustering with correlation of clinicobiological data.

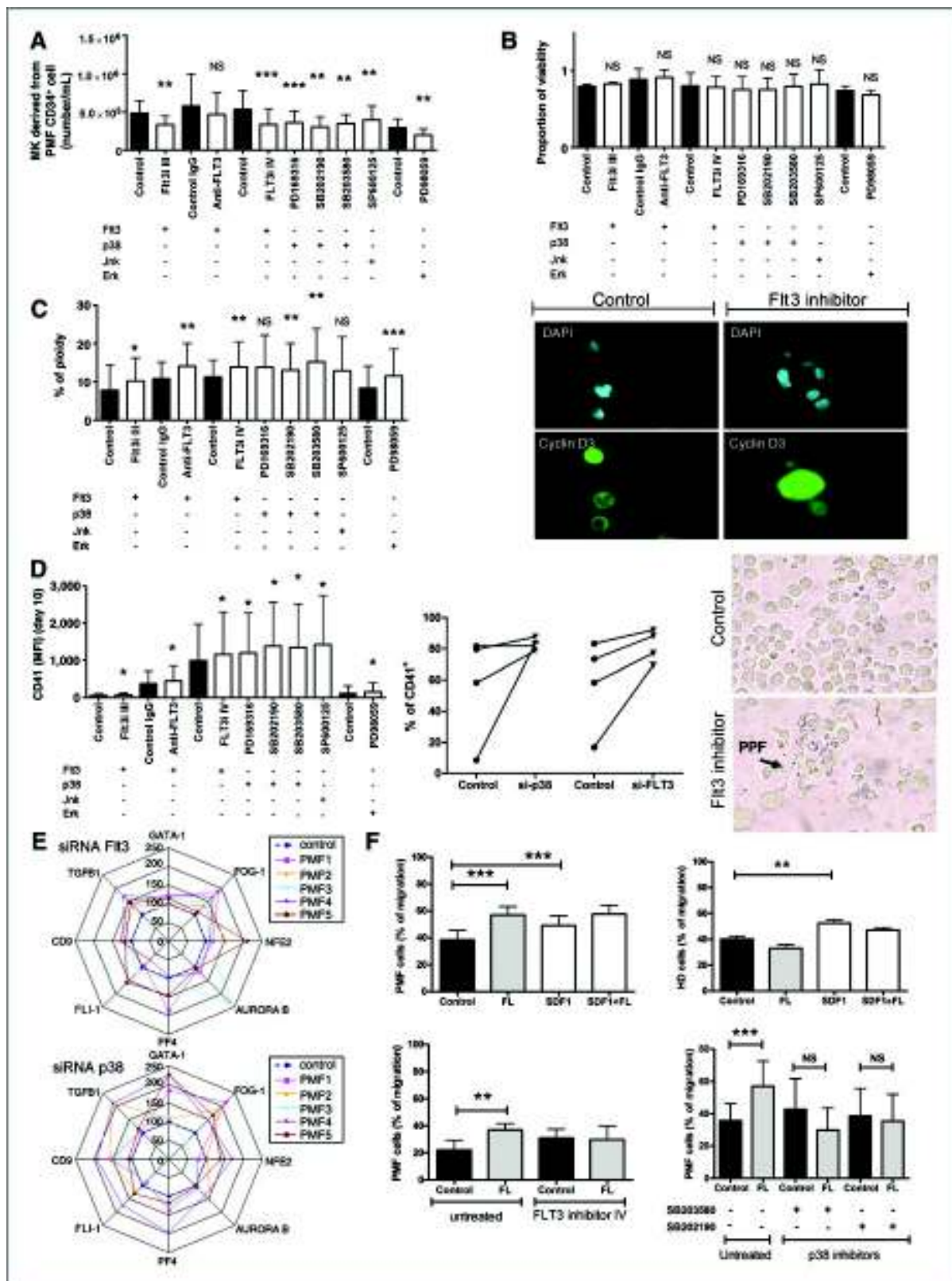


Figure 6. Fit3/MAPK axis is involved in PMF dysmegakaryopoiesis. Effect of Fit3 or MAPK inhibitors on proliferation (A) and viability (B) of PMF MK derived from CD34<sup>+</sup> culture (D10), polyloidy cell percentage, cyclin D3 expression and cytologic maturation (400 $\times$ ; C). D, effect of inhibitors and siRNA on CD41 expression and proplatelet formation. E, effect of Fit3 and p38 silencing on gene expression involved in MK regulation quantified by QRT-PCR. F, percentage of migration of MK derived from CD34<sup>+</sup> cells purified from HD or PMF patients in response to FL (10 ng/mL) in the presence or absence of SDF-1 $\alpha$  (100 ng/mL) and effect of Fit3 and p38 inhibitors on PMF MK derived from CD34<sup>+</sup> cell migration in response to FL (10 ng/mL). \*,  $P = 0.01$  to  $0.05$ ; \*\*,  $P = 0.001$  to  $0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, not significant.

the dysmegakaryopoiesis that characterizes the disease (35). Among cytokines secreted by stromal cells, FL (36) has been reported to play a role in HSC proliferation and survival (37). Its receptor, Flt3, is frequently altered in leukemia through gene rearrangements such as ITD that induces a myeloproliferative syndrome in knockin mice model (23). Evidence for such a myeloproliferative phenotype incited us to study the potential involvement of the FL/Flt3 couple in PMF pathogenesis.

Our present data show that the FL plasma level is specifically increased in PMF patients, in whom it is produced by stromal and hematopoietic cells. Furthermore, in contrast to HD in whom Flt3 expression is restricted to HSC/HP and granulomacrophagic progenitors (22), in PMF patients, Flt3 expression and phosphorylation are associated with MK differentiation, as shown by an increased percentage of circulating CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup> cells expressing the CD41 MK antigen as well as by the increased Flt3 expression on CD41<sup>+</sup>MK cells. Flt3 overexpression is maintained during CD41<sup>+</sup>MK derived from PMF CD34<sup>+</sup> cell culture, consistent with sustained Flt3 expression along the MK lineage in patients.

Whereas we have shown that Flt3 overexpression is Jak2<sup>V617F</sup> independent, its mechanism is still unknown. Actually, we did not find any mutations of the *Flt3* gene sequence that could lead to the receptor activation, being compatible with a recent study in PMF patients (38). Among other hypotheses, mutations in the *c-Cbl* gene, an adapter protein that regulates the ubiquitination of receptor protein tyrosine kinases, recently reported in PMF (39), could participate in maintaining Flt3 membrane expression. Flt3 deregulation could be also secondary to other signals including epigenetic modifications, as already shown for CXCR4 in PMF CD34<sup>+</sup> cells (40).

Evidence for specific alterations of the FL/Flt3 couple in PMF patients encouraged us to study its potential role in the dysmegakaryopoiesis that characterizes the disease. Among the different mechanisms proposed to be involved, NF- $\kappa$ B (41) activation and IL-8 (30) overexpression are reported to participate in this dystrophic process. Jak2<sup>V617F</sup> and MPL<sup>W515L/K</sup> mutations that induce enhanced STAT signaling (42), are suggested to indirectly activate MAPK pathways, known to be important in MK differentiation and especially in endomitosis (24). Our present data, showing in PMF MK cells (i) an increased expression of Flt3 and its phosphorylation, (ii) a modulation of gene profiling involved in MAPK signaling, (iii) an increased phosphorylation of p38, p42/44, and JNK MAPKs, (iv) an increased phosphorylation of p38 pathway effectors, and (v) an activation of Flt3/p38-MAPK axis and an increase of p38 target genes in response to FL, establish a link between Flt3 and MAPK activation, and especially p38, in PMF MKs.

Participation of Flt3 signaling in the PMF dysmegakaryopoiesis through MAPK pathways is suggested by our results showing that treatment with MAPK inhibitors or p38 RNA silencing reverses MAPK phosphorylation and restores MK differentiation. Our hypothesis that a sustained MAPK pathway activation participates in MK maturation block observed in PMF is also supported by our data showing that FL stimulation of PMF MK precursors provokes an increase of p38, recently reported to play a role in PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)-induced MK differentiation of K562

cells (43). The presence of phospho-p38 in the cytoplasm of polyploid MKs (Fig. 3B) strongly suggests its activation in those cells (44). It is also consistent with the stabilization of transcripts with 3'UTR (untranslated regions) AU-rich element-motif (ARE-motif; ref. 31) like IL-8, shown to be upregulated in response to FL (Fig. 4D) and to participate in PMF dysmegakaryopoiesis (30). The p38 phosphorylation recently reported in BM sections from MPN patients (45) confirms our data obtained in culture and supports our hypothesis on p38 activation in PMF.

As expected, FL-induced MAPK phosphorylation is not observed in HD MK precursors which no longer express membrane Flt3. In contrast, in PMF patients, we suggest that an elevated FL level maintains MAPK activation in MK precursors which abnormally expressed Flt3. Our data, showing that Flt3 inhibition by either antibodies or gene silencing improves the megakaryopoiesis in PMF CD34<sup>+</sup> cultures and reduces the p38-MAPK effector phosphorylation, reinforce the role of Flt3/p38 axis in PMF dysmegakaryopoiesis. As IL-8 transcripts are suggested to be upregulated by FL stimulation via p38 activation, it can be speculated that phospho-p38 may participate in inflammation observed in PMF by stabilizing transcripts for cytokines/chemokines participating in this process (31). AP-1 and NFATc4 that are upregulated during megakaryopoiesis (46), are overexpressed in response to FL in MK-derived PMF CD34<sup>+</sup> cells. Being partners in transcription, they likely cooperate to induce transcription of genes involved in such inflammatory process (47).

In PMF, CD34<sup>+</sup> cells egress from the bone marrow to circulate and invade spleen and liver where an extramedullary hematopoiesis is developing. Several mechanisms, including disturbance of SDF-1 $\alpha$ -CXCR4 axis (48) and increased extracellular matrix proteolytic activity reducing HP adhesion to BM stroma (49), can explain this migration. Besides its role in primitive hematopoiesis, the FL/Flt3 couple has been reported to regulate cell migration (27). Our data showing that FL stimulates the *in vitro* migration of PMF MK precursors support the hypothesis that the FL/Flt3 couple also participates in the abnormal migration of MKs. In our experimental conditions, the FL-dependent migration PMF MKs is not modified by addition of SDF-1 $\alpha$ , suggesting that both processes are differentially regulated in those cells. This FL-dependent migration process is p38 dependent, leading to the assumption that targeting p38 could reduce Flt3-expressing cell mobilization in patients.

Up to now, the general concept in PMF is that stromal changes are secondary to the proliferation of hematopoietic cells and especially of MKs. Recently, we have proposed that an abnormal dialogue between hematopoietic and stromal cells, resulting from microenvironmental niche alterations, participates in the hematopoietic deregulation that characterizes PMF (13). Our present demonstration that FL, overproduced by stromal cells, participates in the altered megakaryopoiesis, supports this hypothesis (35).

In conclusion, our results suggest that activation of the Flt3/MAPK pathway and especially of p38-MAPK participate in PMF dysmegakaryopoiesis, including alterations of proliferation/differentiation and migration processes within an inflammatory context (Fig. 7).

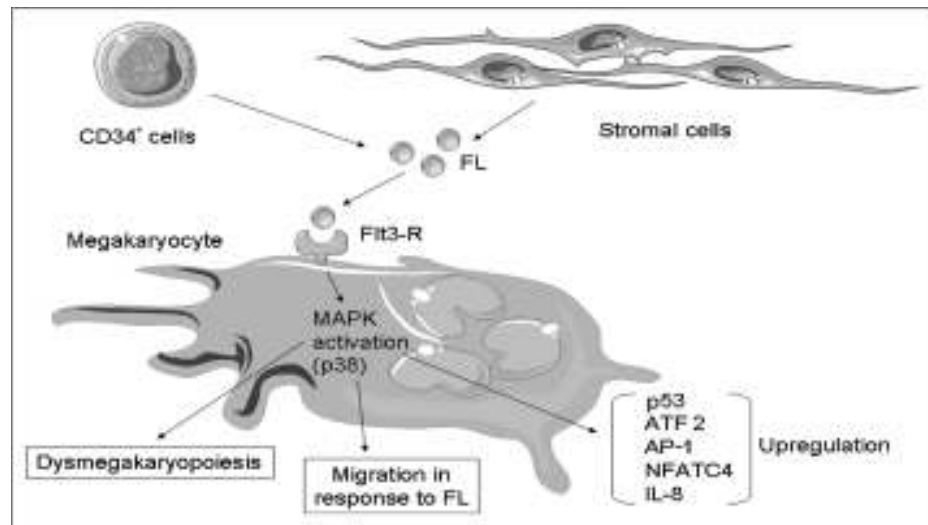


Figure 7. Potential role of Flt3/MAPK axis deregulation in PMF pathogenesis. Pathophysiologic model integrating the "FL/Flt3" couple in PMF MK deregulation through persistent p38-MAPK activation.

The recent therapeutic strategies for PMF mainly target the Jak2 kinase and some of the Jak2 inhibitors also inhibit the Flt3 kinase (50). The clinical efficacy of these inhibitors has been ascribed to a general downregulation of inflammatory cytokine production and signaling (29). Our data suggest that this anti-inflammatory effect could be mediated, at least partially, by the FL/Flt3/p38 axis. In this context, our patient group predictive model, based on FL/MAPK response in MKs and including clinicobiological data, could be powerful in the therapeutic decision to use inhibitors also targeting the Flt3 kinase.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

The authors declare no competing financial interest.

#### Acknowledgments

The authors thank Prof. Y. Masse, Drs. C. Blondeau and A. Touma (Hôpital Intercommunal, Aulnay-Sous-Bois, France), and Général M. Joussemet (Jean Julliard Army Blood Transfusion Center, Clamart, France) for supplying human bone marrow and blood samples. They also thank Ms. Chantal Tisseuil, IDE Recherche Clinique (CHU Dupuytren, Limoges, France), and Ms. Corinne Graff from the Department of Internal Medicine I, Division of Haematology and Haemostaseology (Medical University of Vienna, Austria), for their tremendous help in supplying blood patient samples.

#### Grant Support

This work was supported by grants from the Association "Nouvelles Recherches Biomédicales" (ANRB), Convention de Recherche INCa no. PL054 and no. R06031LP; the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, 9806), "Laurette Fugain" association (ALF/no. 06-06, project no. R06067LL), the "Contrat d'Interface" with Paul Brousse Hospital, the "Groupement d'Intérêt

Scientifique (GIS)-Institut des Maladies Rares 03/GIS/PB/SJ/no. 35, the European Union-EUMNET Project (QLRT-2001-01123), INCa (PL054 and 2007-1-PL5-INSERM 11-1), and the "Ligue Contre le Cancer" (Equipe labellisée "LA LIGUE 2010").

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

**Members of the French INSERM Network on Myelofibrosis:** Jean-François Abgrall, CHU de Brest, Brest, France; Chrystele Bilhou-Nabéra, CHU Kremlin-Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, France; Dominique Bordessoule, CHR Dupuytren, Limoges, France; Jean-Henri Bourhis and Stéphane de Botton, IGR, Villejuif, France; Jean Brière, CHU Beaujon, Clichy, France; Jean-Loup Demory, Hôpital Catholique de Lille, Lille, France; Brigitte Dupriez, CH Dr. Schaffner, Lens, France; Pierre Fenaux, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; Stéphane Giraudier, Hôpital H. Mondor, Créteil and INSERM U790, Villejuif, France; Jean-Jacques Kiladjian, Hôpital Avicenne, Bobigny, France; Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, INSERM U972, Villejuif, France; Jean-Max Pasquet, UMR 5533, Univ. Bordeaux 2, Bordeaux, France; Eric Lippert and Vincent Praloran, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France; Pierre Morel, CH Dr. Schaffner, Lens, France; Jérôme Rey, Institut Paoli-Calmette, Marseille, France; Lydia Roy, CHU Poitiers, Poitiers, France; Jean-François Viillard, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

**Members of the European EUMNET Network on Myelofibrosis:** Giovanni Barosi, IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy; Francisco Cervantes, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain; Heinz Gisslinger, Department of Hematology and Blood Coagulation, University of Vienna, Austria; Martin Griesshammer, Department of Medicine III, University of Ulm, Ulm, Germany; Hans Hasselbalch, Department of Oncology-Hematology, Roskilde Hospital, University of Copenhagen, Denmark; Hans Kreipe, Hannover, Germany; Hans M. Kvasnicka, University of Cologne, Germany; Rajko Kusec, University Hospital Merkur, Zagreb, Croatia; Monia Marchetti, IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy; Mats Merup, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; Heike Pahl, University of Freiburg, Freiburg, Germany; Jan Palmblad, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden; John T. Reilly, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, UK; Radek Skoda, University of Basel, Basel, Switzerland; Alessandro M. Vannucchi, University of Florence, Florence, Italy; Jurgen Thiele, Institute of Pathology, University of Cologne, Germany and the French INSERM Network members.

Received May 17, 2010; revised February 1, 2011; accepted February 15, 2011; published online April 12, 2011.

#### References

- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472-76.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-61.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive



- signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144–48.
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387–97.
  6. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–90.
  7. Hibbin JA, Njoku OS, Matutes E, Lewis SM, Goldman JM. Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 1984;57:495–503.
  8. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978;51:189–94.
  9. Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Bann P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 1992;80:184–88.
  10. Bilhou-Nabera C, Brigaudeau C, Clay D, Andrieux J, Lai JL, Brouty-Boye D, et al. Does cytogenetic mosaicism in CD34+CD38low cells reflect the persistence of normal primitive hematopoietic progenitors in myeloid metaplasia with myelofibrosis? *Blood* 2003;102:1551–52.
  11. Castro-Malaspina H, Jhanwar SC. Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts. *Prog Clin Biol Res* 1984;154:307–22.
  12. Martyre MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Benyahia B, Dupriez B, et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1994;88:9–16.
  13. Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyre MC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood* 2008;112:3026–35.
  14. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ, Marchetto S, Tonnelle C, Toiron Y, et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993;82:1110–19.
  15. Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Ruggieri L, Li ZH, Lyman SD. Flt3 ligand stimulates/costimulates the growth of myeloid stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 1995;23:1121–29.
  16. Zhang S, Broxmeyer HE. Flt3 ligand induces tyrosine phosphorylation of gab1 and gab2 and their association with shp-2, grb2, and PI3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:195–99.
  17. Hannum C, Culppepper J, Campbell D, McClanahan T, Zurawski S, Bazan JF, et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of hematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 1994;368:643–48.
  18. Mackarehshchian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 1995;3:147–61.
  19. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Marsaskovsky E, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000;95:3489–97.
  20. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Ford J, Kregenow R, Marlicz W, Gewirtz AM. FLT3/FLK-2 (STK-1) ligand does not stimulate human megakaryopoiesis *in vitro*. *Stem Cells* 1996;14:146–50.
  21. Piacibello W, Garetto L, Sanavio F, Severino A, Fubini L, Stacchini A, et al. The effects of human FLT3 ligand on *in vitro* human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol* 1996;24:340–46.
  22. Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, et al. Human flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol* 2008;180:7358–67.
  23. Li L, Piloto O, Nguyen HB, Greenberg K, Takamiya K, Racke F, et al. Knock-in of an internal tandem duplication mutation into murine FLT3 confers myeloproliferative disease in a mouse model. *Blood* 2008;111:3849–58.
  24. Guerriero R, Parolini I, Testa U, Samoggia P, Petrucci E, Sargiacomo M, et al. Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *J Cell Sci* 2006;119:744–52.
  25. Chabanon A, Desterke C, Rodenburger E, Clay D, Guerton B, Boutin L, et al. A cross-talk between stromal cell-derived factor-1 and transforming growth factor-beta controls the quiescence/cycling switch of CD34(+) progenitors through FoxO3 and mammalian target of rapamycin. *Stem Cells* 2008;26:3150–61.
  26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
  27. Fukuda S, Broxmeyer HE, Pelus LM. Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha (CXCL12)/CXCR4 axis. *Blood* 2005;105:3117–26.
  28. Abecassis L, Rogier E, Vazquez A, Atfi A, Bourgeade MF. Evidence for a role of MSK1 in transforming growth factor-beta-mediated responses through p38alpha and Smad signaling pathways. *J Biol Chem* 2004;279:30474–79.
  29. Vannucchi AM. How do JAK2-inhibitors work in myelofibrosis: an alternative hypothesis. *Leukemia Res* 2009;33:1581–83.
  30. Emadi S, Clay D, Desterke C, Guerton B, Maquarrie E, Charpentier A, et al. IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Blood* 2005;105:464–73.
  31. Clark AR, Dean JL, Saklatvala J. Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett* 2003;546:37–44.
  32. Patch RJ, Baumann CA, Liu J, Gibbs AC, Ott H, Lattanze J, et al. Identification of 2-acylaminothiophene-3-carboxamides as potent inhibitors of FLT3. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16:3282–86.
  33. Dai Y, Hartandi K, Ji Z, Ahmed AA, Albert DH, Bauch JL, et al. Discovery of N-(4-(3-amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea (ABT-869), a 3-aminoindazole-based orally active multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *J Med Chem* 2007;50:1584–97.
  34. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98:3249–55.
  35. Brouty-Boye D, Briard D, Azzarone B, Le Bousse-Kerdiles MC, Clay D, Pottin-Clemenceau C, et al. Effects of human fibroblasts from myelometaplastic and non-myelometaplastic hematopoietic tissues on CD34+ stem cells. *Int J Cancer* 2001;92:484–88.
  36. Lisovsky M, Braun SE, Ge Y, Takahira H, Lu L, Savchenko VG, et al. Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia* 1996;10:1012–8.
  37. Lyman SD, Williams DE. Biology and potential clinical applications of flt3 ligand. *Curr Opin Hematol* 1995;2:177–81.
  38. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Care RS, Gari M, Wilson GA, Peake IR, et al. Mutational analysis of class III receptor tyrosine kinases (C-KIT, C-FMS, FLT3) in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 2003;120:464–70.
  39. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009;113:6182–92.
  40. Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, Desterke C, Rosti V, Bosi A, et al. Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34+ cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells* 2008;26:1920–30.
  41. Komura E, Tonetti C, Penard-Lacronique V, Chagraoui H, Lacout C, Lecouedic JP, et al. Role for the nuclear factor kappaB pathway in transforming growth factor-beta1 production in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FK506 binding protein 51 overexpression. *Cancer Res* 2005;65:3281–89.
  42. Komura E, Chagraoui H, Mansat de Mas V, Blanchet B, de Sepulveda P, Larbret F, et al. Spontaneous STAT5 activation induces growth factor independence in idiopathic myelofibrosis: possible relationship with FKBP51 overexpression. *Exp Hematol* 2003;31:622–30.
  43. Chang YI, Hua WK, Yao CL, Hwang SM, Hung YC, Kuan CJ, et al. Protein-arginine methyltransferase 1 suppresses megakaryocytic differentiation via modulation of the p38 MAPK pathway in K562 cells. *J Biol Chem* 2010;285:20595–606.
  44. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol* 1998;8:1049–57.

45. Shahjahan M, Dunphy CH, Ewton A, Zu Y, Monzon FA, Rice L, et al. p38 mitogen-activated protein kinase has different degrees of activation in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol* 2008;130:635-41.
46. Kiani A, Kuithan H, Kuithan F, Kytala S, Habermann I, Temme A, et al. Expression analysis of nuclear factor of activated T cells (NFAT) during myeloid differentiation of CD34+ cells: regulation of Fas ligand gene expression in megakaryocytes. *Exp Hematol* 2007;35:757-70.
47. Macian F, Lopez-Rodríguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 2001;20:2476-89.
48. Guglielmelli P, Zini R, Bogani C, Salati S, Pancrazzi A, Bianchi E, et al. Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). *Stem Cells* 2007;25:165-73.
49. Xu M, Bruno E, Chao J, Huang S, Finazzi G, Fruchtman SM, et al. Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood* 2005;105:4508-15.
50. Barosi G, Rosti V. Novel strategies for patients with chronic myeloproliferative disorders. *Curr Opin Hematol* 2009;16:129-34.

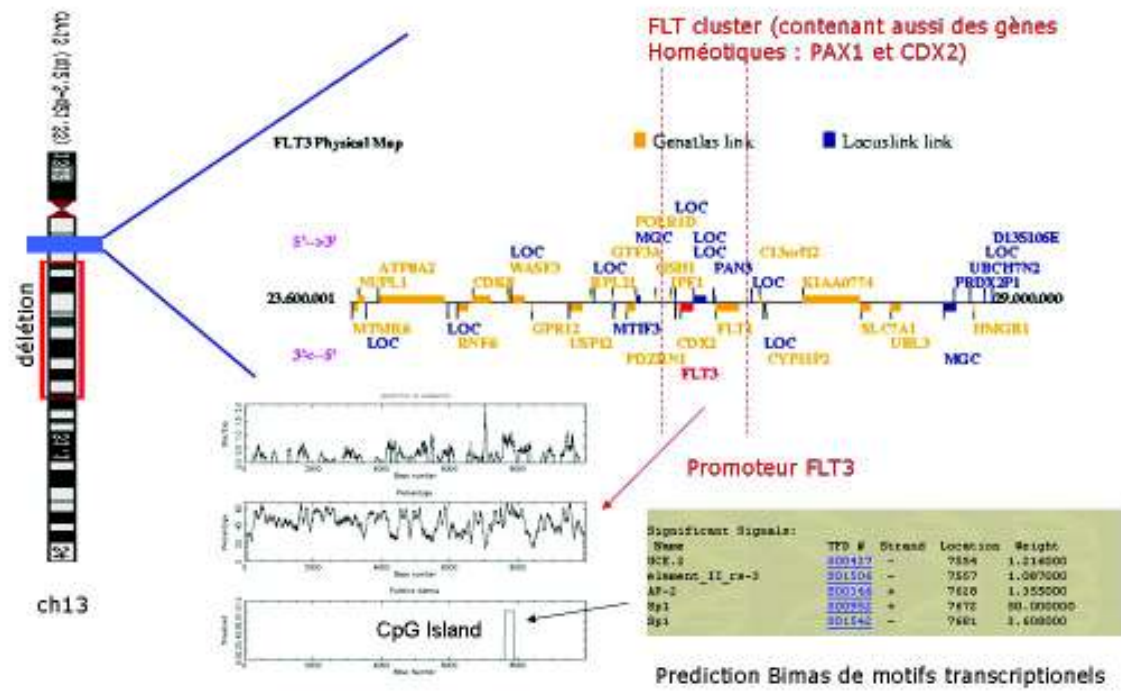


## **4/ Rôle de la régulation épigénétique dans les anomalies d'expression de Flt3 et la migration des précurseurs mégacaryocytaires; Résultats préliminaires**

Nos résultats précédents montrent que chez les patients, le gène *FLT3* est situé 2 mégabases en amont de la borne de délétion 13q14. Ceci suggère que la dérégulation de l'expression de Flt3 dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les mégacaryocytes n'est vraisemblablement pas la conséquence directe d'une anomalie génétique quantitative. De plus, la diminution de son expression dans les progéniteurs hématopoïétiques et son augmentation au cours de la différenciation mégacaryocytaire nous oriente vers une dérégulation épigénétique de cette modulation. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé le rôle potentiel d'une méthylation et/ou acétylation du promoteur de Flt3 sur son expression membranaire. L'implication fonctionnelle d'une telle régulation a été également évaluée sur la migration des mégacaryocytes en réponse au Flt3-ligand.

### **4.1/ Prédiction bioinformatique de la présence d'îlots CpG, cibles de la méthylation, dans la région promotrice de Flt3**

On peut prédire par bioinformatique la susceptibilité de méthylation de l'ADN d'un promoteur en recherchant les îlots CpG en amont du codon d'initiation de la transcription. Les algorithmes bioinformatiques (dont l'algorithme Bimas) que nous avons utilisés prédisent un îlot CpG localisé 2000 pb en amont du codon d'initiation du gène *FLT3* et des sites de fixation de facteurs de transcription (UCE-2, element II rs-3, AP-2, sp1) (Figure 44). La méthylation du promoteur *FLT3* pourrait donc entraîner une inhibition de l'accès de la région promotrice à ces facteurs de transcription et en conséquence, une diminution de son expression.



**Figure 44 : Organisation du promoteur du gène FLT3 sur le chromosome 13 et prédiction bioinformatique d'îlots CpG et des sites de fixation de facteurs de transcription**

## **4.2/ Une déméthylation par la 5-azacytidine (AZA) entraîne une augmentation de l'expression membranaire du récepteur Flt3 sur des lignées hématopoïétiques**

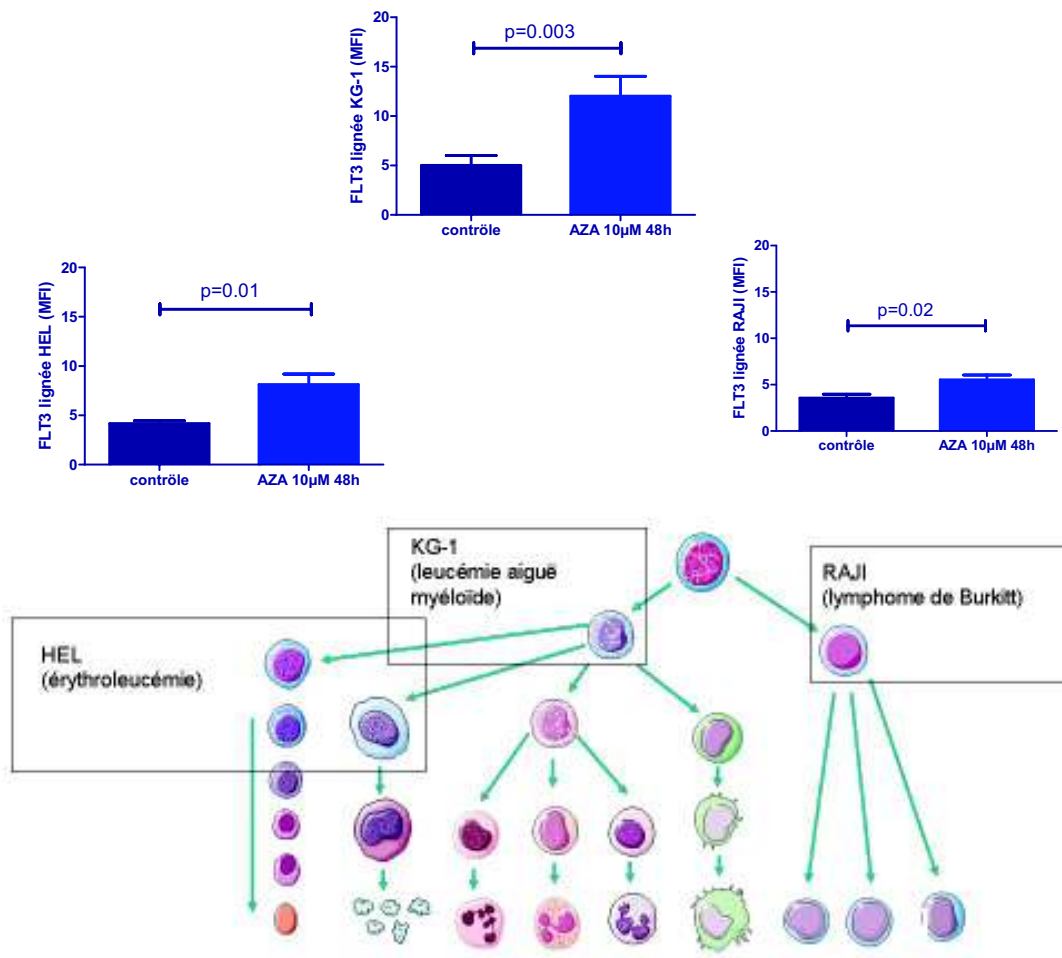
J'ai étudié l'effet d'un traitement de 48 heures avec la 5-Azacytidine (5AZA ; 10  $\mu\text{mol/l}$ ), un agent déméthylant, sur l'expression du récepteur Flt3 à la surface des cellules de différentes lignées hématopoïétiques.

Les résultats obtenus montrent que la 5-AZA entraîne une augmentation significative de l'expression du récepteur Flt3 à la surface des cellules de lignées myéloïdes et lymphoïdes telles que: HEL (érythroleucémie) (contrôle :  $4.16 \pm 0.29$  versus AZA :  $8.13 \pm 1.06$ ,  $n=3$ ,  $p=0.01$ ), KG-1 (leucémie aiguë myéloïde) (contrôle :  $5 \pm 1$  versus AZA :  $12 \pm 2$ ,  $n=3$ ,  $p=0.0034$ ) et RAJI (lymphome de Burkitt) (contrôle :  $3.56 \pm 0.4$  versus AZA :  $5.53 \pm 0.5$ ,  $n=3$ ,  $p=0.03$ ) (Figure 45). Ce résultat montre que le promoteur de Flt3 est sensible à la méthylation dans les cellules hématopoïétiques et que sa déméthylation induit l'augmentation de son expression protéique. Cette étude, qui devra être effectuée sur des cellules primaires de sujets sains et de patients, suggère que la présence d'ilôts CpG dans le promoteur *FLT3* et leur méthylation participe à la modulation de l'expression du gène.

## **4.3/ Approche fonctionnelle de la méthylation du promoteur Flt3**

Nous avons ensuite étudié l'influence de la méthylation du promoteur de *FLT3*, sous l'action de la 5AZA (10  $\mu\text{mol/l}$ ), sur la mobilisation des précurseurs mégacaryocytaires des patients MFP en réponse à la cytokine Flt3-ligand ; ceci a été réalisé en chambre de Boyden.

Comme nous l'avons précédemment montré dans l'article de « Cancer Research », les précurseurs mégacaryocytaires de patients migrent en réponse au Flt3-ligand (contrôle :  $46.08 \pm 16.70$  versus Flt3-ligand :  $60.17 \pm 19.34$ ,  $n=7$ ,  $p=0.001$ ), contrairement à leurs homologues normaux (contrôle :  $44.16 \pm 9.98$  versus Flt3-ligand :  $37.58 \pm 11.80$ ,  $n=8$ ) (Figure 46). De façon intéressante, le traitement par la 5AZA induit la migration des précurseurs mégacaryocytaires des sujets sains (contrôle :  $44.16 \pm 9.98$  versus AZA :  $55.96 \pm 8.67$ ,  $n=7$ ,  $p=0.005$ ), sans modifier celle des patients (Flt3-ligand :  $60.17 \pm 19.34$  versus AZA :  $63.12 \pm 16.72$ ,  $n=6$ ).



**Figure 45 : Effet de la 5-azacytidine sur l'expression membranaire de *Flt3* sur les cellules de lignées hématopoïétiques**

Ces résultats montrent que, chez les sujets sains, la déméthylation de l'ADN favorise la migration des précurseurs mégacaryocytaires en réponse au Flt3-ligand alors qu'elle est sans influence chez les patients. Cette absence d'effet de la 5AZA sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires des patients pourrait être expliquée par une déméthylation déjà existante au stade progéniteur et persistant au cours de la différenciation mégacaryocytaire.

#### **4.4/ Approche fonctionnelle de l'acétylation des histones**

Nous avons également testé l'influence de la trichostatine A (TSA ; un inhibiteur des histones déacétylases) sur la migration (Flt3-ligand)-dépendante des précurseurs mégacaryocytaires. La TSA, un inhibiteur des HDAC, induit une hyperacétylation de l'ADN et l'expression des gènes par décondensation de l'ADN.

De la même façon que pour l'effet de la 5AZA, l'addition de trichostatine A stimule la migration des précurseurs mégacaryocytaires de sujets sains en présence de Flt3-ligand (contrôle : 44.16+/-9.98 v.s. Trichostatine A : 61.33+/-10.32, n=8, p<0.0001). Au contraire, chez les patients, l'addition de trichostatine A annule leur migration en réponse au Flt3-ligand (contrôle : 46.08+/-16.70 v.s. Trichostatine A : 42.20+/-16.12, n=7, p=0.0001) (figure 47).

L'effet différentiel de la trichostatine A sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires chez les sujets sains et les patients suggère qu'une modification de l'acétylation des histones intervient dans la régulation de la migration (Flt3-ligand)-dépendante des précurseurs mégacaryocytaires de sujets sains.

#### **4.3.1/ Le Flt3-ligand induit une modification de l'acétylation des histones et plus particulièrement de l'histone H4 en Lysine 8**

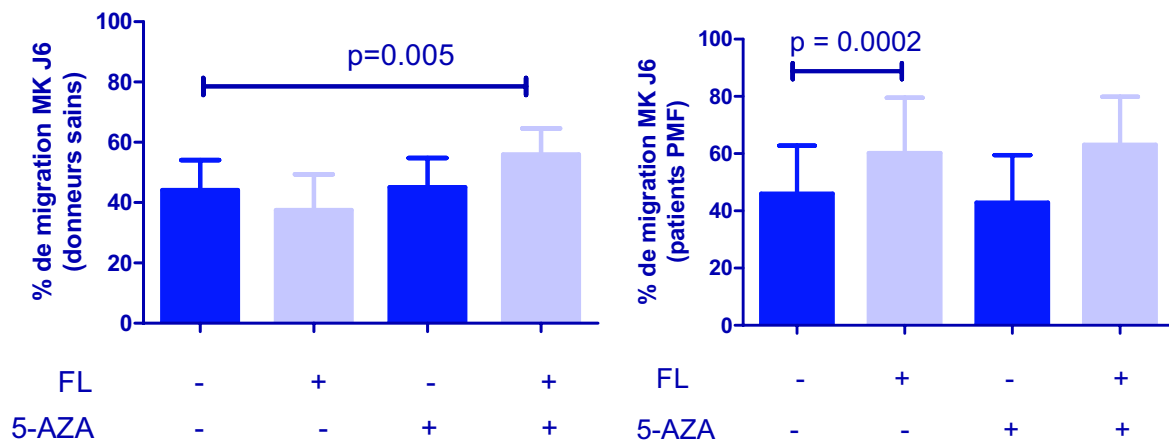
L'hyperacétylation des histones observée chez les patients en réponse au Flt3-ligand nous a incité à rechercher l'histone et la lysine cibles de cette acétylation. Dans ce but, nous avons quantifié le pourcentage de précurseurs mégacaryocytaires présentant un résidu lysine d'histone acétylé déterminé (H2aK5, H2bK5, H3K27 et H4K8) par cytométrie en flux, après stimulation par le Flt3-ligand (50 ng/ml pendant 48 heures).

La Figure 48 montre que, chez les patients, la stimulation par le Flt3-ligand ne modifie pas le pourcentage de cellules présentant une acétylation des 1) lysine 5 de l'histone H2a (contrôle : 20.28+/-5.68 versus Flt3-ligand : 15.34+/-8.32, n=6), 2) lysine 5 de l'histone H2b (contrôle : 18.63+/-10.68 versus Flt3-ligand : 20.53+/-11.86, n=6) et 3) lysine 27 de l'histone

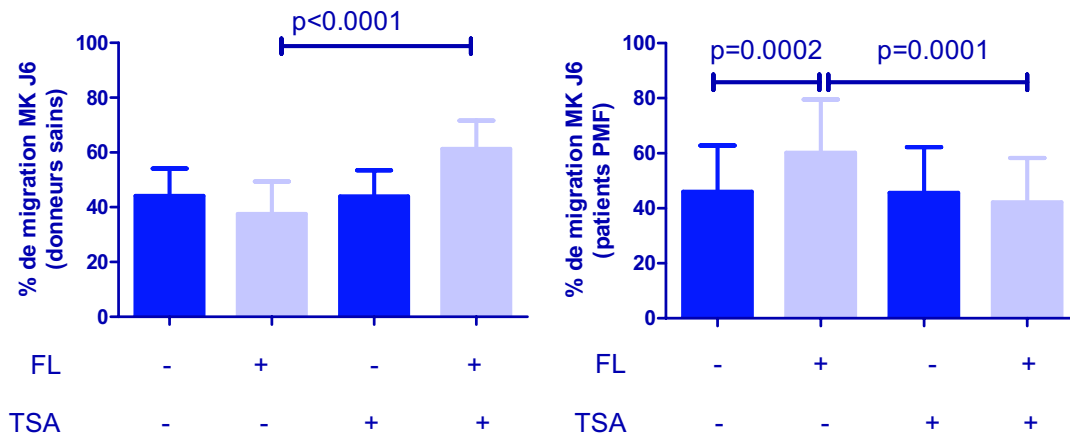


H3 (contrôle : 6.69+/-9.83 versus Flt3-ligand : 4.23+/-4.07, n=6). Par contre, cette stimulation entraîne une augmentation du pourcentage de cellules présentant une l'acétylation de la lysine 8 de l'histone H4 (contrôle : 27.95+/-18.82 versus Flt3-ligand : 54.52+/-29.31, n=6, p=0.04). Ceci suggère que, chez les patients, l'influence de l'acétylation sur la migration Flt3-ligand dépendante pourrait être liée une acétylation de la lysine 8 de l'histone H4.

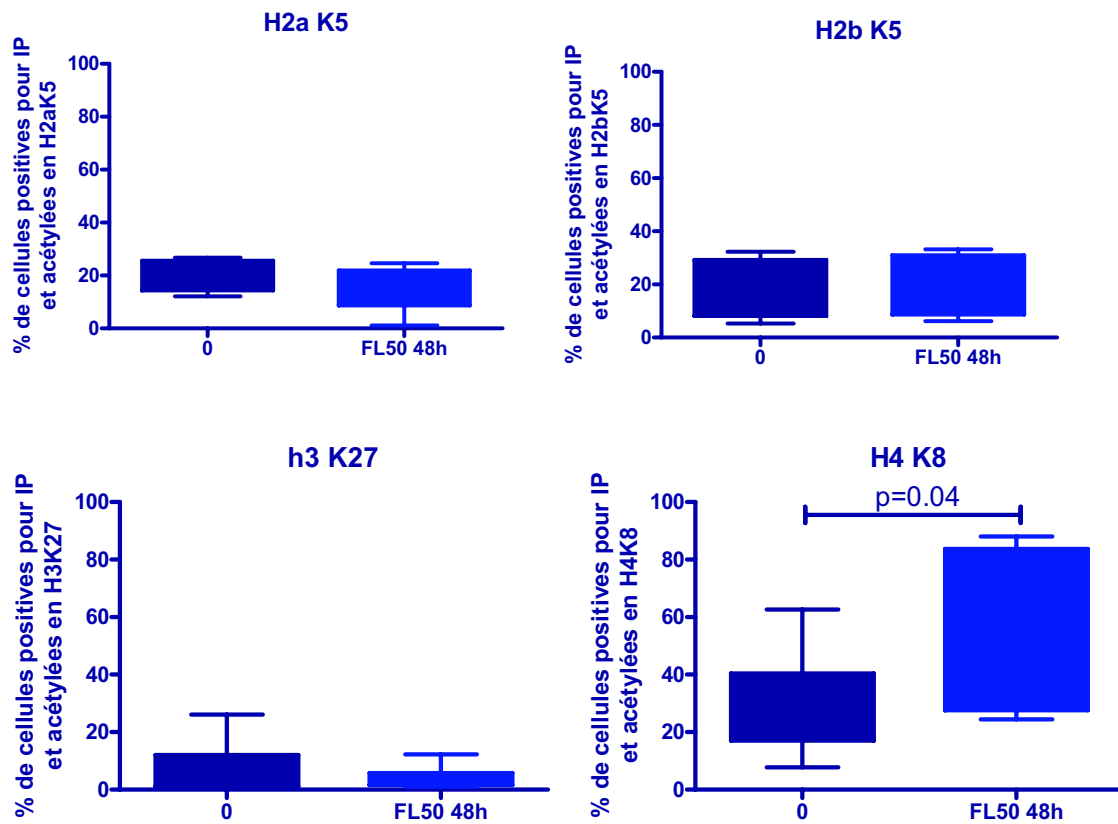
Bien que ces résultats soient très préliminaires, nous avons choisi de les présenter pour étayer l'hypothèse d'une possible régulation épigénétique de l'expression de Flt 3 chez les patients et de son rôle potentiel dans la réponse migratoire des précurseurs mégacaryocytaires au Flt3-ligand.



**Figure 46 : Effet du 5-AZA sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires en réponse au Flt3-ligand (FL)**



**Figure 47 : Effet de la trichostatine A (TSA) sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires en réponse au Flt3-ligand (FL)**



*Figure 48 : Etude de la modification du pourcentage de précurseurs mégacaryocytaires de patients présentant différents résidus lysine acétylés d'histones en réponse à une stimulation par le Flt3-ligand (FL)*

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



La myélofibrose primitive est un néoplasme myéloprolifératif chronique *BCR-ABL1*-négatif associant une dérégulation de l'hématopoïèse (myéloprolifération, dysmégacaryopoïèse et migration des CSH/PH) à une altération du stroma médullaire et splénique (ostéomyélofibrose, néoangiogenèse). Le mégacaryocyte est un acteur majeur de sa pathogenèse, *via* la production exacerbée de cytokines et facteurs fibrosants, dans un contexte inflammatoire.

De nombreux arguments suggèrent que les mutations *JAK2V617F* et *MPL515L/K* qui caractérisent les NMP ne sont vraisemblablement pas les événements initiaux de la myélofibrose primitive car elles ne sont retrouvées que chez la moitié des patients (§Introduction). L'objectif du travail qui a fait l'objet de ma thèse a été de rechercher si d'autres anomalies, géniques ou non, pourraient expliquer la pathogenèse de la MFP. Pour cela, parallèlement à une démarche génomique (transcriptome et CGH array), nous avons développé une approche de biologie cellulaire ciblée sur le microenvironnement.

## **1/ De la recherche d'anomalies génomiques à l'identification du cluster « FLT » à proximité de la délétion 13q14-13q21 et d'une dérégulation du gène FLT3**

**L'approche génomique** que nous avons tout d'abord choisie visait à identifier de nouvelles régions génomiques pouvant être responsables de l'anomalie clonale initiale. Cette approche ne nous a hélas pas permis de mettre en évidence de nouveaux gènes cibles et en particulier, de gènes tels que *JAK2*. En effet, alors que ce travail venait de commencer, la découverte de la mutation *Jak2* n'était pas encore publiée. Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer nos résultats. Bien que l'on ne puisse écarter la présence d'un mosaïcisme au sein des populations cellulaires étudiées (PH CD34<sup>+</sup> et polynucléaires purifiés), ces cellules appartiennent au clone pathologique et portent donc très vraisemblablement les anomalies géniques recherchées. Il est donc possible que les techniques que nous avons utilisées manquaient de sensibilité. En effet, les puces BAC (CIT Curie) utilisées au début de notre étude (début 2005) et qui privilégiaient des régions impliquées dans les tumeurs solides, ne recouvraient peut-être pas, ou peu, de régions impliquées dans l'hématopoïèse. Les puces que nous avons utilisées ultérieurement sur une dizaine de patients étaient de type 44K, c'est-à-dire avec un seuil de sensibilité de l'ordre de 0.5 Mb et seules les cellules de deux patients ont été hybridées sur des puces 244K, plus sensibles. Ce manque de sensibilité technique peut donc expliquer l'absence de détection d'un

remaniement (délétion, amplification) « sentinelle » qui aurait pu attirer notre attention sur la cible *JAK2* par exemple. De plus, compte tenu de la fréquence de la mutation touchant environ 50% des patients atteints de MFP, le nombre limité de patients étudiés, de l'ordre d'une dizaine, ne nous plaçait pas dans des conditions optimales pour la pressentir. Seule une approche de type « microsattellites » (SNP) ciblées sur le 9p aurait pu nous permettre de l'identifier. Une telle étude a été également entreprise mais n'a pas abouti en raison de notre difficulté à obtenir, rétrospectivement, l'ADN constitutionnel des patients étudiés dont le recrutement était très dispersé à l'échelle Européenne. En effet, en 2004-2005, on commençait à peine à prendre conscience de l'importance de l'ADN constitutionnel comme référence pour distinguer les anomalies délétères observées, des polymorphismes.

N'ayant pas identifié d'autres anomalies génomiques que celles décrites dans la littérature (délétions 12q, 13q, 20q et trisomie 1q), cette approche génomique aurait donc pu paraître décevante. Cependant, elle s'est avérée très utile car elle nous a permis de préciser les bornes de la région 13q délétée dans les PH CD34<sup>+</sup> et les polynucléaires des patients. En effet, parmi les anomalies génomiques que nous avons identifiées par CGH array, celle qui paraissait la plus en concordance avec l'hypothèse d'une altération du dialogue CSH/PH-stroma (Lataillade et al., 2008) était la délétion de la région chromosomique minimale 13q14-13q21, située à 2 mégabases (télomérique) du cluster *FLT* dans lequel est localisé le gène *FLT3*.

Plusieurs arguments expérimentaux étayaient notre choix : i) la comparaison des données de CGH array et du transcriptome (réalisé sur les cellules CD34<sup>+</sup> et mégacaryocytaires des patients) ciblées sur cette région 13q, montrait l'existence d'une modulation d'expression de gènes inclus dans la zone de délétion 13q et dans le cluster *FLT*, dont le gène *FLT3*, ii) Flt3 est un récepteur clé de la régulation de l'hématopoïèse primitive et est souvent impliqué dans la pathogenèse d'hémopathies malignes et iii) son ligand, Flt3-ligand, est majoritairement produit par le stroma hématopoïétique.

Ces différents résultats nous ont alors conduits à rechercher si le couple Flt3-ligand/Flt3 était impliqué dans la dérégulation de l'hématopoïèse et plus particulièrement dans la dysmégacaryopoïèse observée chez les patients atteints de MFP.

## **2/ D'une dérégulation du gène FLT3 à une activation de la voie des MAPKs p38 ; de nouveaux acteurs de la pathogenèse de la myélofibrose primitive ?**

Notre étude met en évidence **une dérégulation de Flt3 et des MAPKs p38** dans les PH CD34<sup>+</sup> et les MK des patients atteints de MFP et ceci, quelque soit leur statut mutationnel Jak2. Elle démontre également que la persistance de la stimulation de l'axe Flt3/p38 en réponse à une production accrue de Flt3-ligand, participe à la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la maladie. Les résultats énoncés ci-après viennent étayer cette hypothèse, à savoir : 1) une augmentation du taux sérique de Flt3-ligand et de son expression par les cellules du stroma médullaire et splénique ainsi que par les PH des patients atteints de MFP, 2) une surexpression spécifique de son récepteur Flt3 et de sa phosphorylation dans les cellules CD34<sup>+</sup> et les progéniteurs mégacaryocytaires (MK), qui persistent au cours de la différenciation MK, quelque soit le statut mutationnel de Jak2 des patients, 3) une activation de Flt3 dans les progéniteurs MK en réponse au Flt3-ligand conduisant à la phosphorylation en cascade de la voie de signalisation des MAPKs p38 et à l'expression de ses gènes cibles, 4) une restauration de la mégacaryopoïèse et une inhibition de la migration (Flt3-ligand)-dépendante des progéniteurs MK des patients après inhibition d'Flt3 ou de p38.

Nos résultats suscitent de nombreuses interrogations. Dans cette discussion, nous avons privilégié une réflexion sur les points suivants: 1) quelles sont les causes de la surexpression spécifique du Flt3-ligand et de son récepteur Flt3 chez les patients atteints de MFP, quelque soit leur statut mutationnel Jak2? 2) en quoi les conséquences de l'activation de l'axe Flt3/p38 participent-elles à la dérégulation de la mégacaryopoïèse et au processus inflammatoire qui caractérise la MFP ? 3) quel rôle peut-on attribuer à l'axe Flt3-ligand/Flt3/p38 dans l'altération du dialogue cellules hématopoïétiques-stroma et en quoi étaye-t-il notre hypothèse physiopathologique du « Bad seed in Bad soil » ? 4) sur la base de nos résultats, peut-on proposer des approches ciblées en particulier sur l'axe Flt3-ligand/Flt3/p38 comme thérapies adjuvantes, en raison de leur action potentielle sur l'inflammation ? 5) comment peut-on intégrer nos résultats dans la hiérarchie des événements moléculaires agrégeant les syndromes myéloprolifératifs ?



## **2.1/ Une augmentation de l'expression de Flt3 et de son ligand Flt3-ligand : une « spécificité » de la MFP, quelque soit le statut mutationnel Jak2 des patients**

Le couple Flt3-ligand/Flt3 joue un rôle important dans la survie et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Il a été proposé que l'autocrinie de production de Flt3-ligand par les cellules leucémiques exprimant Flt3 contribuait au processus leucémogène (Drexler, 1996). Dans notre travail, nous avons observé une augmentation de la concentration plasmatique de Flt3-ligand chez les patients atteints de myélofibrose primitive ; celle-ci semble spécifique de cette maladie puisqu'elle n'est pas observée chez les patients atteints d'autres néoplasmes myéloprolifératifs *BCR-ABL1* négatifs tels que la PV et la TE. De façon intéressante, cette augmentation n'est pas liée à la présence de la mutation Jak2V617F puisqu'elle est observée chez les patients quelque soit leur statut mutationnel.

**Le Flt3-ligand** est un régulateur majeur de l'homéostasie hématopoïétique en particulier dans les situations d'aplasie médullaire. En effet, une augmentation du taux sérique et plasmatique de Flt3-ligand est fréquemment observée lors d'un défaut de production médullaire comme par exemple dans l'anémie de Fanconi, l'aplasie médullaire idiopathique et les insuffisances médullaires radio- et chimio-induites (Lyman et al., 1995) (Prat et al., 2006).

Chez les patients atteints de MFP, on observe également une aplasie médullaire progressive. N'ayant pas eu accès au chiffre de CD34<sup>+</sup> circulantes chez les patients pour lesquels nous avons dosé le taux de Flt3-ligand, nous n'avons pas pu établir de corrélation entre le taux sérique de Flt3-ligand et le nombre de cellules CD34<sup>+</sup>. Une telle étude serait intéressante pour rechercher si le Flt3-ligand pourrait être un bio indicateur de l'insuffisance médullaire dans la MFP.

Le Flt3-ligand est produit par différents types cellulaires et principalement par les cellules stromales endothéliales et mésenchymateuses. Dans les cellules endothéliales, cette production peut être constitutive ou induite par différents facteurs tels que le TGF- $\beta$ , l'INF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  ou le ligand du CD40, une molécule de la superfamille du TNF (Solanilla, Grosset et al., 2000) (Solanilla, Dechanet et al., 2000). Dans les cellules souches mésenchymateuses, Flt3-ligand est produit après induction par le TNF- $\alpha$  (Dormady, Bashayan, Dougherty, Zhang, & Basch, 2001), l'IL-1 (Lisovsky et al., 1996) et l'IL-6 (Peters, Solem, Goldschmidt, Schirmacher, & Rose-John, 2001). Il peut être également exprimé, comme son récepteur Flt3, par les progéniteurs hématopoïétiques et agir alors de façon autocrine/paracrine sur leur prolifération (Weisel, Yildirim, Schweikle, Kanz, & Mohle, 2009). Chez les patients atteints de MFP, l'expression moléculaire et protéique de Flt3-ligand est significativement augmentée

dans les cellules CD34<sup>+</sup> de sang périphérique ainsi que dans les CSM médullaires et spléniques. Il est vraisemblable que les cellules endothéliales des patients soient également une source de Flt3-ligand mais nous n'avons pu l'étudier par manque de cellules endothéliales purifiées. Une étude sur coupe histologique de moelle ou de rate nous permettra d'aborder plus facilement ce point. L'expression du ligand Flt3-ligand est augmentée en réponse à de nombreuses cytokines inflammatoires. La myélofibrose primitive est une pathologie dans laquelle le contexte inflammatoire est particulièrement développé (Vannucchi, 2009). Il est donc très vraisemblable que l'orage cytokinique qui la caractérise participe à cette augmentation.

Dans notre étude, l'expression protéique du **récepteur Flt3** est augmentée chez les patients dans les progéniteurs hématopoïétiques pluripotents CD34<sup>+</sup> mais également mégacaryocytaires. Ce profil d'expression est maintenu au cours de la différenciation MK chez les patients alors qu'elle disparaît rapidement chez les sujets sains. De façon surprenante, contrairement aux progéniteurs MK, l'expression moléculaire de Flt3 est « downrégulée » dans les cellules CD34<sup>+</sup>. Différents mécanismes peuvent contribuer à la modulation d'expression de Flt3 dans les CD34<sup>+</sup> et au cours de la mégacaryopoïèse. Parmi ceux-ci, citons, des mutations du gène *FLT3*, des mutations de Cbl, une dérégulation épigénétique...

Nous n'avons pas trouvé de **mutations dans le gène *FLT3***, et en particulier pas de duplications internes en tandem (*FLT3-ITD*), confirmant les données d'Abu-Duhier et al (Abu-Duhier et al., 2003). De plus, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de S. Giraudier (Inserm U1009, Villejuif), nous n'avons pas identifié d'autres mutations de *FLT3*, suggérant que la modulation de son expression ne résulte pas de modification de la séquence du gène. Des **mutations de Cbl** ont été décrites chez environ 6% des patients atteints de MFP ; cette protéine contrôle, par ubiquitinylation, la dégradation de récepteurs tels que c-Kit, Tpo et Flt3... Il a été montré qu'après fixation du ligand Flt3-ligand, Flt3 est ubiquitinylé par Cbl sauvage mais non par la forme mutante R420Q, principalement retrouvée chez les patients (Sargin et al., 2007). Ainsi, l'absence de dégradation de Flt3 secondaire à l'altération de l'activité ubiquitine ligase de Cbl pourrait expliquer la dérégulation de l'expression de Flt3 observée dans les cellules hématopoïétiques des patients. Chez les patients porteurs de la mutation Jak2, ce processus serait Jak2 indépendant et conférerait un avantage prolifératif des cellules Cbl mutées sur le clone Jak2V617F (Grand et al., 2009). Il serait donc intéressant de rechercher la présence de telles mutations chez les patients que nous avons étudiés. Les données de la littérature montrent que seuls 6% des patients présente une mutation Cbl (Grand

et al., 2009), ce qui suggère que d'autres événements participent très vraisemblablement à la dérégulation de l'expression de Flt3.

Comme cela a été proposé pour CXCR4 (Bogani et al., 2008) pour lequel une hyperméthylation du promoteur participe à la sous-expression chez les patients, une **régulation épigénétique** du gène *FLT3* pourrait également être envisagée. Le cluster *FLT*, comprenant le gène *FLT3*, est localisé en amont de région de délétion 13q14 et les gènes qui le composent sont sous-exprimés (cartographie chromosomique du transcriptome). L'hypothèse d'une régulation épigénétique du gène *FLT3* est renforcée par la présence d'un îlot CpG en amont du codon start (analyse bioinformatique de la séquence promotrice *FLT3*). Nos résultats préliminaires, montrant que la 5AZA (agent déméthylant) et la TSA (agent acétylant) modulent l'expression de Flt3 et la migration (Flt3-ligand)-dépendante des précurseurs MK des patients, confortent également cette hypothèse. En effet, contrairement aux sujets sains, le gène *FLT3* est déméthylé chez les patients et cette déméthylation persiste au cours de la différenciation mégacaryocytaire. Bien que l'effet de la méthylation du promoteur *FLT3* sur l'expression protéique du gène doive être confirmé sur les cellules primaires des patients, l'effet de la 5AZA sur la migration (Flt3-ligand)-dépendante des progéniteurs MK suggère l'implication du statut de méthylation de promoteur *FLT3* sur la fonction du gène et l'activité biologique de la protéine. Cette hypothèse sera confirmée par l'étude du statut de méthylation du promoteur en utilisant des techniques spécifiques telles que le pyroséquencage après traitement au bisulfite par exemple.

L'effet différentiel observé sur la migration des précurseurs mégacaryocytaires entre les sujets sains et les patients après action de la trichostatine A (agent acétylant) laisse supposer une possible différence d'acétylation du promoteur de *FLT3* et son hyper-acétylation chez les patients. Chez ces derniers, nos résultats suggèrent que l'influence de l'acétylation sur la migration (Flt3-ligand)-dépendante pourrait être liée à une acétylation de la lysine 8 de l'histone H4. Il est intéressant de noter l'implication de celle-ci dans les mécanismes liés au stress oxydatif et dans la libération d'IL-8 participant à la réponse inflammatoire (Tomita, Barnes, & Adcock, 2003).

## **2.2/ Comment l'activation de la voie Flt3/p38 participe-t-elle à la dérégulation de la mégacaryopoïèse?**

La fixation du ligand Flt3-ligand sur son récepteur spécifique Flt3 entraîne la dimérisation du récepteur et l'activation de son domaine tyrosine kinase qui est stabilisé par auto-phosphorylation. Flt3 phosphorylé transduit des signaux d'activation mitogénique grâce à différentes voies de signalisation comme la voie Ras/MAPK, la voie PI3K...

Chez les patients, **la surexpression du Flt3 est associée à une augmentation de son niveau de phosphorylation dans les cellules CD34<sup>+</sup> et au maintien de cette phosphorylation au cours de la différenciation MK.** L'augmentation de la production du Flt3-ligand chez les patients participe très vraisemblablement au maintien de son activation. Les résultats de notre étude transcriptomique ayant mis en évidence une dérégulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la signalisation des MAPK dans les cellules CD34<sup>+</sup> et dans les MK des patients, quelque soit leur statut mutationnel Jak2, nous avons recherché des altérations de cette voie de signalisation. Nous avons ainsi mis en évidence que la phosphorylation de Flt3 induit une cascade d'activation des molécules de la voie de signalisation des MAP kinases, telles qu'ERK1/2, JNK et plus particulièrement de p38 et de ses effecteurs. Le rôle du couple Flt3-ligand/Flt3 dans cette activation est renforcé par nos résultats montrant que la stimulation *in vitro* des progéniteurs MK de patients par le Flt3-ligand provoque également une augmentation de la phosphorylation de p38. Cette phosphorylation est associée à celle de plusieurs effecteurs en aval de p38 tels que ATF2, une molécule clé de l'activité transcriptionnelle de p38 et a une augmentation d'expression de nombreux facteurs de transcription cibles de p38 tels que le complexe AP1, NFATC4, p53... La phosphorylation de p38 ainsi que celle de ses effecteurs est diminuée après inhibition de Flt3 par des approches de type siRNA, inhibiteurs pharmacologiques ou anticorps neutralisants, confirmant le rôle de Flt3 dans cette activation.

Des résultats récents obtenus sur des coupes histologiques de moelle osseuse mettent en évidence une modification de la phosphorylation de p38 chez les patients atteints de NMP et de syndromes myélodysplasiques (SMD), avec un niveau de phosphorylation plus élevé chez les patients atteints de SMD (Shahjahan et al., 2008). Nos résultats, confirment donc ces données et suggèrent que si l'activation de p38 n'est pas spécifique de la MFP, son niveau de

phosphorylation et son maintien élevé via l'activation persistante de Flt3 contribue très vraisemblablement à cette spécificité.

La persistance de **l'activation des MAPK** et plus particulièrement de la voie p38, au cours de la différenciation des progéniteurs MK chez les patients, nous a incité à étudier son **rôle dans la dysmégacaryopoïèse** qui définit la MFP. Cette dysmégacaryopoïèse est caractérisée par une augmentation du nombre de mégacaryocytes immatures et dystrophiques dans la moelle osseuse et la présence de micromégacaryocytes dans la circulation. Par la production de nombreuses cytokines fibrosantes, angiogéniques et inflammatoires, le mégacaryocyte est un élément clé de la pathogenèse de la MFP et plus particulièrement de la réaction stromale. Nos résultats montrent que l'inhibition d'ERK-1/2, de JNK mais surtout de p38 dans les mégacaryocytes des patients, restaure leur différenciation/maturation comme le montre : i) une réduction de prolifération des MK, ii) une augmentation de la ploïdie, iii) une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation MK tels que le CD41 et CD42a à leur surface et iv) la formation de pro-plaquettes en culture. Comme nous le verrons ci-dessous, cet effet sur la différenciation MK est associé à une réduction de leur migration en réponse au Flt3-ligand. Le rôle de l'axe Flt3/p38 dans cette dysmégacaryopoïèse a été ensuite confirmé après inhibition de Flt3 et de p38 par des siRNA, des inhibiteurs chimiques ou des anticorps spécifiques.

La MFP est caractérisée par un nombre élevé de cellules CD34<sup>+</sup> et de micromégacaryocytes circulants. En collaboration avec notre groupe, l'équipe d'A. Vannuchi (Florence, Italie) a mis en évidence le rôle de CXCL12(SDF-1) dans les mécanismes de mobilisation des cellules CD34<sup>+</sup> via une sous-expression de son récepteur CXCR4, liée à une hyperméthylation de son promoteur, dans les progéniteurs hématopoïétiques des patients (Bogani et al., 2008). D'autres molécules telles que le G-CSF, le SCF, le LF et l'IL-8 sont également capables d'induire la mobilisation des PH mais avec un timing différent. Chez l'animal, l'IL-8 induit une mobilisation très rapide des PH (Laterveer et al., 1996) contrairement au Flt3-ligand dont l'action mobilisatrice est plus lente (Brasel et al., 1996). L'intervention de ces deux cytokines dans la mobilisation de cellules hématopoïétiques observée chez les patients atteints de MFP n'a pas été étudiée jusqu'à présent. Nos résultats montrent que **le Flt3-ligand pourrait participer à la mobilisation des précurseurs MK**. Dans ce processus, le Flt3-ligand pourrait agir seul ou en synergie avec l'IL-8 (de Kruijf, Hagoort, Velders, Fibbe, & van Pel, 2010) en stabilisant les transcrits de l'IL-8 via l'activation de p38 (nos résultats) (Clark et al., 2003). De façon surprenante, contrairement à

ce qui a été décrit par l'équipe de Broxmeyer et Pelus sur des cellules CD34<sup>+</sup> de sujets sains (Fukuda et al., 2005), la migration (Flt3-ligand)-dépendante des précurseurs MK de patients n'est pas modifiée par l'adjonction de CXCL12 (SDF-1). Ceci suggère que, dans la MFP, ces deux processus coexistent mais qu'il est possible qu'ils agissent sur des cellules à des stades de différenciation différents.

### **2.3/ Quelle est la place du processus inflammatoire dans la pathogenèse de la MFP ?**

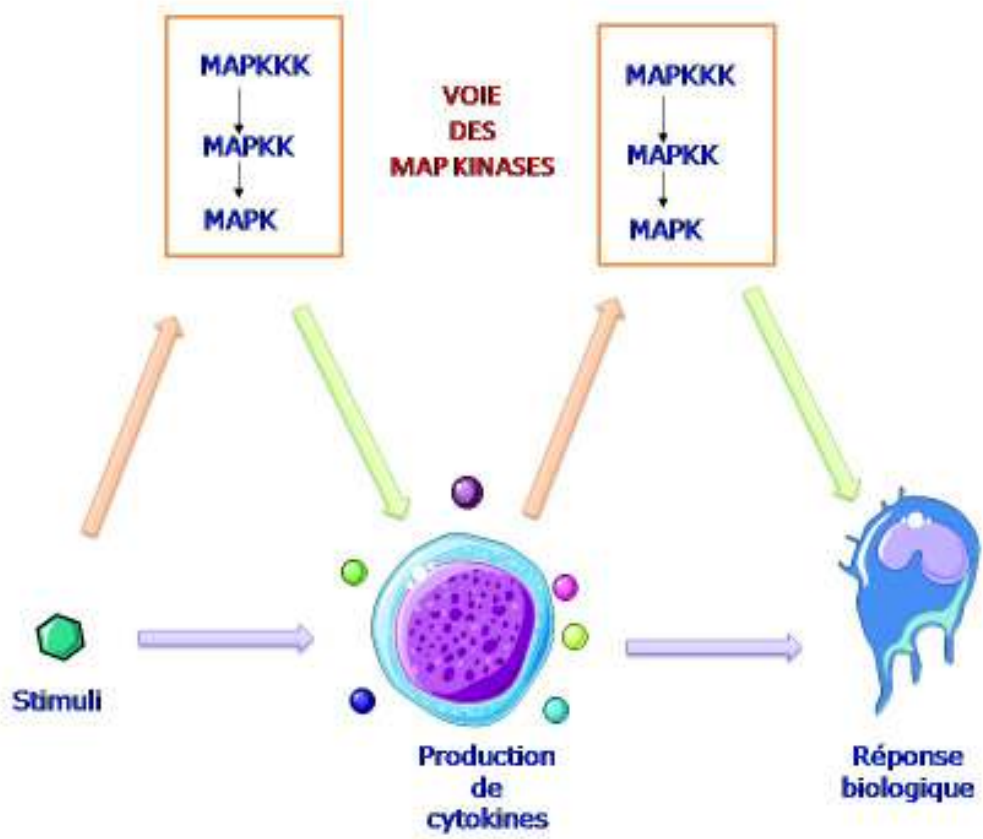
La voie p38 est principalement activée en réponse à un stress environnemental, aux **cytokines inflammatoires** et aux facteurs de croissance. En fonction des stimuli (facteurs de croissance hématopoïétique ou cytokines inflammatoires), l'activation de p38 et de ses isoformes peut conduire à un effet inverse sur l'hématopoïèse : les cytokines inflammatoires de type TGF- $\beta$ , IL-6, INF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ... médient les effets inhibiteurs de p38 alors que les facteurs de croissance hématopoïétique médient ses effets promoteurs sur l'hématopoïèse (Feng et al., 2009). Ainsi, les effets de p38 sur l'hématopoïèse résultent d'un subtil équilibre entre le stimulus, l'intensité de la stimulation, les isoformes présents et la lignée cellulaire... Chez les souris invalidées pour le gène *ATM*, une élévation des ROS provoque l'activation spécifique de p38 dans les CSH. L'inactivation de cette voie protège les CSH contre une réduction de leur capacité d'autorenouvellement (Ito et al., 2006). Chez les patients atteints de MFP, l'activation de p38 pourrait conduire à une réduction de la capacité d'autorenouvellement des CSH de patients et contribuer, par une prolifération accrue des CSH, à l'aplasie médullaire observée au stade terminal de la maladie. Nos résultats suggèrent donc qu'une activation persistante de p38 via la stimulation de l'axe Flt3-ligand/Flt3 participe très vraisemblablement au déséquilibre entre prolifération et différenciation/maturation des progéniteurs MK conduisant à la dysmégacaryopoïèse observée chez les patients.

Au cours de la myélofibrose primitive, une importante libération de cytokines inflammatoires est observée (Vannucchi, 2009). De nombreuses cytokines telles que IL-1, IL-6, IL-8, TNF, G-CSF, MIP-1, VEGF.... participent à cet orage cytokinique. Nous avons montré que le **taux d'Il-8** était fortement augmenté chez les patients et qu'elle jouait un rôle important dans la dysmégacaryopoïèse (Emadi et al., 2005). Il a été récemment proposé que le taux élevé d'Il-8 a une valeur pronostique chez les patients atteints de MFP (Tefferi et al., 2011), soulignant son importance dans le processus pathogénique. Dans le travail qui fait

l'objet de ma thèse, nous montrons également que la transcription de son gène est régulée via l'activation de la voie p38 (Clark et al., 2003), en réponse au Flt3-ligand. Chez les patients, l'activation de p38 participe au processus inflammatoire en stabilisant les transcrits de l'IL-8 mais également, très vraisemblablement, ceux d'autres cytokines et chimiokines inflammatoires. Les facteurs de transcription AP-1 et NFATc4, activés au cours de la mégacaryopoïèse, sont surexprimés en réponse à Flt3-ligand dans les MK des patients. Agissant de concert au niveau transcriptionnel (Macian, Lopez-Rodriguez, & Rao, 2001), ils pourraient coopérer pour induire la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation. Ainsi, dans la MFP, la tempête cytokinique émanant du stroma inflammatoire activerait la signalisation p38 qui, à son tour, entretiendrait la production de cytokines inflammatoires ou non via une activation transcriptionnelle de leurs gènes, faisant de **p38, un des messagers secondaires clés de ce processus** (Platanias, 2003) (figure 49).

L'inflammation est un processus adaptatif développé à la suite d'une rupture de l'homéostasie cellulaire ou tissulaire. Au cours de l'inflammation, de nombreux processus tels qu'une modification de la composition cellulaire, de la capacité de réponse aux stimuli inflammatoires, de la régulation des voies de signalisation et de la régulation des gènes au niveau transcriptionnel sont observés (Figure 51) (Medzhitov & Horng, 2009). Les processus inflammatoires peuvent également jouer un rôle dans la structure chromatinienne. Pourraient-ils alors avoir un rôle dans une possible **régulation épigénétique** de la mégacaryopoïèse au cours de la MFP ?

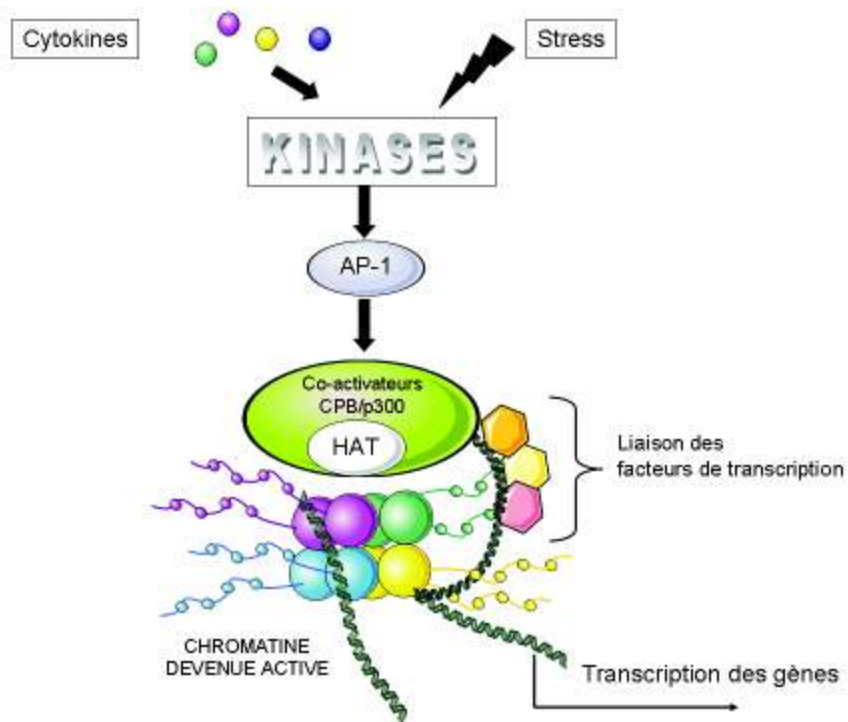
Nous avons observé que la trichostatine A pouvait influencer la migration (Flt3-ligand)-dépendante des précurseurs MK des patients en modifiant l'acétylation des histones et en particulier, en modulant l'acétylation de la lysine 8 de l'histone H4. Le Flt3-ligand induit la sur-expression du transcript AP-1 qui peut être à l'origine d'une modification chromatinienne dont la signature est fréquemment retrouvée dans un contexte inflammatoire ; en effet, le remodelage de la chromatine par l'acétylation des histones joue un rôle dans les réponses pro-inflammatoires (Tomita et al., 2003). Ainsi, des cytokines inflammatoires tels que le TNF-alpha ou des dérivés oxydatifs tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peuvent modifier l'acétylation des histones/la déacétylation et l'activation de NF-kappaB et AP-1, menant à la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Rahman, 2002). Dans notre étude, la stimulation des mégacaryocytes par le Flt3-ligand entraîne une sur-expression de l'interleukine 8, elle-même impliquée dans l'inflammation et dans la dysmégacaryopoïèse des patients MFP (Emadi et al., 2005).



*Figure 49 : Rôle de l'activation des MAPK dans la réponse aux cytokines et le contrôle de la prolifération cellulaire*

D'après (Platanias, 2003)





**Figure 50 : La réponse cellulaire aux cytokines et au stress peut induire une régulation transcriptionnelle conduisant à une modification de l'acétylation des histones par l'intermédiaire du complexe AP-1**

D'après (Rahman, 2002) abréviations : HAT « histone acetyl transférase ».



**Figure 51: Conséquences du processus inflammatoire au sein d'un tissu**

D'après (Medzhitov & Horng, 2009)

Compte tenu du rôle de la réaction inflammatoire chronique dans la cancérogenèse, il est possible que les mécanismes épigénétiques sous-jacents participent à ce processus en régulant l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Villagra, Sotomayor, & Seto, 2010). (Figure 48). Les protéines HMG (*high mobility group*) ont été caractérisées il y a près de 30 ans comme jouant un rôle essentiel dans le contrôle conformationnel de la chromatine, en participant à la régulation de la transcription, de la recombinaison, et à certains processus de réplication. L'une de ces protéines, HMGB1, a été récemment identifiée comme agissant en tant que cytokine pro-inflammatoire (Murakami et al., 2011). La mise en évidence d'une altération d'expression de la protéine HMGA2 dans les progéniteurs hématopoïétiques des patients (ref Andrieux et article en Annexe) conforte l'hypothèse d'un lien possible entre une altération de molécules participant au remodelage chromatinien et le processus inflammatoire qui caractérise la MFP. Nous avons observé des modifications épigénétiques de type acétylation des histones au cours de la différenciation mégacaryocytaire *in vitro* chez patients MFP. L'acétylation des histones est notamment régulée par des familles d'enzymes les histones déacétylases (HDAC) qui peuvent être inhibées par la trichostatine A ou le SAHA. En dehors des histones, les HDACs peuvent également désacétyler d'autres protéines telles que p53, E2F1 (Glozak, Sengupta, Zhang, & Seto, 2005) et réguler l'expression de gènes tels que GATA-1 (Watanabe et al., 2003). Compte tenu des conséquences d'une modification épigénétique de GATA-1 sur la différenciation mégacaryocytaire et de son rôle potentiel dans la pathogenèse de la MFP (Vannucchi et al., 2002), il serait intéressant d'étudier l'implication des HDACs et notamment celle de HDAC5, au cours de la différenciation mégacaryocytaire chez les patients atteints de MFP ainsi que son interaction avec le facteur de transcription GATA-1.

#### **2.4/ Le couple *Flt3-ligand/Flt3* est-il un médiateur du dialogue entre les progéniteurs hématopoïétiques et leur niches régulatrices et en quoi étaye-t-il l'hypothèse du « *Bad seed in Bad soil* »?**

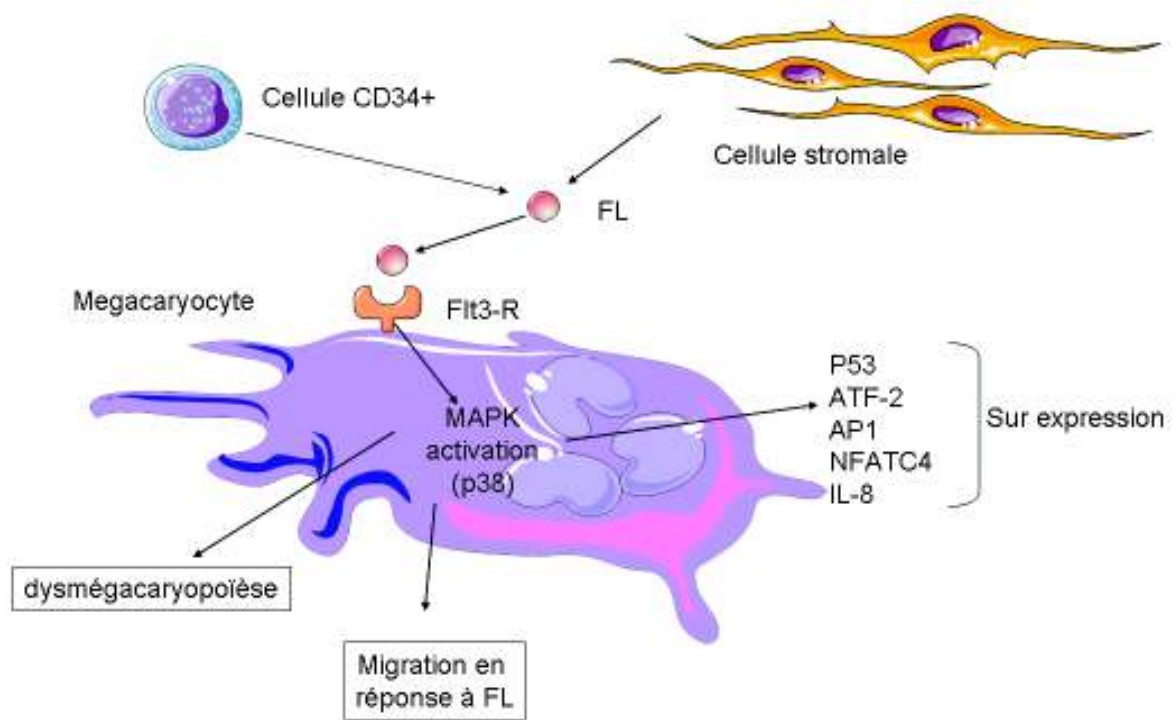
En cancérologie, le **concept de « seed and soil »** illustre la notion selon laquelle l'implantation et le développement d'une tumeur (ou d'une métastase) nécessitent qu'un environnement adapté fasse le lit de la tumeur. S'il est actuellement avéré que le stroma joue un rôle important dans l'évolution des tumeurs solides, son rôle dans les hémopathies malignes est également très probable. Dans la myélofibrose primitive, une importante mobilisation des cellules souches, quelles soient hématopoïétiques, mésenchymateuses ou

endothéliales, de la moelle osseuse vers la rate et le foie *via* le sang périphérique est observée, expliquant l'augmentation très importante du volume et du poids de ces organes chez les patients. Si la dérégulation du couple CXCL12/CXCR4 et en particulier la sous-expression de CXCR4, permet d'expliquer en partie la mobilisation des PH de la moelle osseuse vers le sang, elle n'explique pas pour autant pourquoi ces cellules migrent vers ces organes secondaires et s'y nichent. La rate est par excellence un lieu de production de la cytokine Flt3-ligand (Lyman et al., 1994) vers laquelle les progéniteurs hématopoïétiques et plus particulièrement les mégacaryocytaires des patients, migrent de façon anormale *in vitro*. Il serait donc intéressant de rechercher si la production de Flt3-ligand au niveau de la rate des patients participe à l'adressage splénique des PH au cours de cette maladie. Il serait également intéressant de chercher si, comme cela a été proposé dans le cas de patients porteurs de leucémies aigües myéloïdes, le Flt3-ligand contribue à leur survie en régulant la molécule anti-apoptotique Mcl-1 (Yoshimoto et al., 2009) (Opferman et al., 2005). Nos résultats préliminaires suggèrent une augmentation du nombre de cellules dendritiques dans le sang et la rate des patients atteints de MFP. Compte tenu du rôle du Flt3-ligand dans la différenciation des cellules dendritiques en synergie avec d'autres cytokines telles que SCF, GM-CSF et TNF- $\alpha$ , il serait également intéressant d'étudier si l'augmentation du taux sérique de Flt3-ligand favorise le recrutement des lymphocytes et/ou des cellules dendritiques dans cet organe. Une telle hypothèse est compatible avec le fait qu'une réduction très significative du poids de la rate est observée chez les patients traités avec des « anti-jak2 » tels que le CEP-701, initialement développé pour cibler FLT3-ITD dans les LAM (Santos et al., 2010).

Un nombre croissant d'arguments suggère que le **stroma hématopoïétique** médullaire et splénique, participe au développement de la MFP. Nous avons mis en évidence l'existence de modulations sélectives d'expression de protéines structurales ( $\alpha$ -sm-actine) et matricielles, de molécules de surface et de production de cytokines et chimiokines dans les cellules souches mésenchymateuses (CSM) de la rate des patients. Nous avons également montré l'interdépendance du couple CD34<sup>+</sup>/CSM chez les patients ainsi que le rôle déterminant du stroma splénique dans la dérégulation de l'hématopoïèse et plus particulièrement dans la dysmégacaryopoïèse (Brouty-Boye et al., 2001). La mise en évidence d'une production accrue de Flt3-ligand par les CSM médullaires et spléniques renforce le lien étroit existant, chez les patients, entre la dérégulation du stroma et la dysmégacaryopoïèse (Figure 52).

Par la production de nombreux facteurs fibrosants, angiogéniques et ostéogéniques, les mégacaryocytes exercent un rôle direct ou indirect sur la niche hématopoïétique et jouent un

rôle crucial dans la pathogenèse de la MFP (Breton-Gorius et al., 1992) (Lataillade et al., 2008) (Wickenhauser et al., 1995). La fibrose, indispensable au diagnostic, participe de façon importante à la détérioration de l'hématopoïèse médullaire. Bien que supposée d'origine réactionnelle, peu de données permettaient d'en comprendre la pathogenèse. C'est H. Castro-Malaspina qui, le premier, avait apporté des preuves tangibles du rôle du mégacaryocyte (MK), *via* le relargage du PDGF (Platelet Derived Growth Factor) stocké dans les plaquettes, dans ce processus (Castro-Malaspina, 1984). Au laboratoire, nous avons montré que deux autres cytokines, le Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et le Fibroblast-Growth-Factor basique (bFGF), dont les taux étaient fortement augmentés dans les MK et plaquettes des patients, jouaient également un rôle clé dans la synthèse du collagène. Ces résultats nous ont permis de proposer l'hypothèse selon laquelle le relargage local de ces facteurs fibrosants, stockés dans les MK dystrophiques et les granules alpha des plaquettes, participait à la pathogenèse de la myélofibrose (Martyre et al., 1994) (Martyre et al., 1997) (Le Bousse-Kerdiles & Martyre, 2001). En dehors de leurs rôles dans la fibrose médullaire, les mégacaryocytes participent également, en association avec d'autres types cellulaires comme les cellules ostéocompétentes, à l'homéostasie du tissu osseux. En effet, les souris déficientes pour *GATA-1* présentent une dérégulation mégacaryocytaire associée à une augmentation de la masse osseuse. L'augmentation des mégacaryocytes immatures observée chez ces souris est corrélée à une prolifération accrue des ostéoblastes et à une réduction de la différenciation ostéoclastique (Breton-Gorius et al., 1992). Les souris exprimant faiblement GATA développent un néoplasme myéloprolifératif proche de la pathologie humaine avec une augmentation importante des MK (Vannucchi et al., 2002). Ces souris présentent une ostéomyélosclérose résultant d'une stimulation de l'activité ostéoblastique et d'un taux élevé de facteurs tels que les BMP. De façon intéressante, un lien entre la prolifération MK, la production de BMP, la formation osseuse et la voie des MAPK a été également très récemment démontré chez des souris déficientes pour *Erk1* (Guihard et al., 2010).



**Figure 52 : Rôle d'une altération de l'axe « Flt3-ligand/Flt3/p38 » dans la dysmégacaryopoïèse des patients atteints de MFP**

## **2.5/ Peut-on proposer des approches ciblées sur l'axe Flt3-ligand/Flt3/p38 comme thérapies adjuvantes dans la MFP?**

Hormis le traitement curatif par greffe allogénique de cellules souches proposé à certains patients dans un cadre d'éligibilité stricte, les axes actuels de développement thérapeutique dans la myélofibrose incluent : les traitements cytoréducteurs, l'immuno-modulation, les modulateurs de l'épigénétique et les inhibiteurs de Jak2 (Mesa, 2010). Plusieurs essais thérapeutiques anti-Jak2 dans la myélofibrose ont été recensés au cours de ces dernières années (Abdel-Wahab & Levine, 2009). Parmi ceux-ci, deux classes d'inhibiteurs ont été testés ou sont en cours d'essai : 1) les inhibiteurs sélectifs de Jak2 tels que TG101209, TG101348, INCB018424, SB1518, XL019 et CYT387, le premier des inhibiteurs expérimentaux démontrant un effet sur l'anémie et 2) des inhibiteurs non sélectifs intégrant des inhibiteurs de la kinase Aurora (MK0407 et AT9283), un inhibiteur d'histone déacétylase (ITF2357) et des inhibiteurs de Flt3 (CEP-701 et SB1518) (Lasho et al., 2008; Santos et al., 2010). Ces différentes molécules induisent une réduction importante de la splénomégalie, une amélioration des « symptômes constitutionnels » et une réduction de la production de cytokines inflammatoires (Vannucchi, 2009). Nos résultats permettent d'expliquer l'efficacité des inhibiteurs non spécifiques de Jak2, ciblant la kinase Flt3, et de proposer un modèle de prédiction de réponse à ces inhibiteurs. Cependant, de tels traitements ne réduisent ni l'anémie (sauf dans le cas de CYT387), ni la charge allélique de la mutation Jak2V617F et encore moins l'intensité de la fibrose, un élément pathogénique central de la MFP.

Ces résultats partiellement décevants orientent actuellement le clinicien vers l'utilisation des **combinaisons thérapeutiques** associant, à ces inhibiteurs, des molécules issues des nouvelles connaissances physiopathologiques. Ces nouvelles approches devront améliorer le dialogue entre les cellules hématopoïétiques, en particulier mégacaryocytaires, et leurs niches régulatrices. Ainsi, la restauration d'une mégacaryopoïèse « normale » par l'inhibition de l'activation de la voie p38 devrait réguler la production de cytokines impliquées dans la réaction stromale, telles que TGF- $\beta$ , bFGF, PDGF, TNF- $\alpha$  etc... et donc la limiter. Compte tenu de la modulation d'expression des isoformes de p38 en fonction de la lignée et du stade de différenciation des cellules hématopoïétiques (Feng et al., 2009), des inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre ces isoformes pourraient apporter une spécificité thérapeutique. De tels inhibiteurs de p38 ont été utilisés dans la LMC, les syndromes myélodysplasiques et le myélome pour inhiber de façon spécifique (VX-745) ou non

(SB203580, SB202190), la production de cytokines agissant sur le clone leucémique (Feng et al., 2009)

Par son action anti-apoptotique mais également pro-apoptotique en fonction de son stimulus et de son niveau d'activation, p38 est considérée comme une kinase « dualiste ». Ainsi, pour obtenir une efficacité thérapeutique, le clinicien devra prendre en compte la subtilité qui régit l'activation de cette voie de signalisation. L'efficacité de l'interféron sous forme pégylée a été démontrée dans les néoplasmes myéloprolifératifs. En raison de son rôle sur la signalisation p38, il est possible que l'interféron interfère dans cette dualité, modulant ainsi les effets de p38. Il serait donc intéressant d'étudier l'action combinée de l'interféron et d'inhibiteurs de p38 sur la différenciation *in vitro* des progéniteurs CD34<sup>+</sup> des patients ainsi que dans des modèles expérimentaux de myélofibrose chez la souris (Chagraoui et al., 2002) (Chagraoui et al., 2003).

### **3/ Comment intégrer nos résultats dans la hiérarchie des événements moléculaires agrégeant les néoplasmes myéloprolifératifs?**

Les arguments avancés par Damesheck selon lesquels les quatre entités représentées par la LMC, la PV, la TE, la MFP devaient être regroupées sous le terme de syndromes myéloprolifératifs en raison d'une présentation clinique proche, de caractéristiques histologiques (myéloprolifération non régulée des trois lignées myéloïdes) et d'un mécanisme physiopathologique similaire restent valables, plus de 60 ans après la publication princeps. En effet, à l'éclairage des connaissances actuelles dont nous disposons, ces quatre pathologies semblent être issues d'une population ancestrale de cellules souches polyclonales ou oligoclonales « présentant des caractères de prédisposition » à partir desquelles émergerait le clone pathologique.

Récemment, la mise en évidence d'un spectre mutationnel somatique Jak2V617F, hétérogène en fonction du NMP concerné, de nouvelles mutations (*MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *IKZF1*, *IZH2*, *CBL*, *LNK*...) et d'un haplotype de prédisposition *JAK2* 46/1 sont autant d'éléments accumulés qu'il va falloir hiérarchiser dans les années à venir pour tenter d'expliquer l'émergence d'un NMP (Tefferi & Vainchenker, 2011). Ainsi, dans l'état actuel des connaissances, on ne peut encore affirmer quels facteurs génétiques modulent l'évolution vers un phénotype NMP donné et l'évolution de celui-ci dans le temps. Actuellement, la MFP

n'est pas caractérisée par un profil mutationnel particulier. Placer dans cet ordre hiérarchique, l'anomalie 13q identifiée chez les patients que nous avons étudiés, est difficile. De plus, en dehors de la mutation *JAK2*, nous n'avons pas recherché, chez les patients étudiés, la présence ou non des mutations *MPL*, *TET2*, *ASLX1*, *IDH1* ou *LNK*, récemment décrites.

Pour comprendre l'ordre de survenue des différentes mutations décrites dans le contexte des NMP, on ne peut actuellement qu'avoir recours à l'analyse du profil mutationnel et cytogénétique des patients lors des deux phases de leur maladie : en phase chronique puis après évolution vers une leucémie aiguë. Ainsi, le statut mutationnel de plusieurs gènes a été étudié : *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *ASLX1*, *IDH1*, *LNK*. Ces mutations, présentes de façon hétérogène en fonction d'un NMP donné, ne sont pas mutuellement exclusives. Certains patients présentant une mutation *JAK2* en phase chronique développent une leucémie aiguë sur un clone dépourvu de la mutation Jak2V617F. Ainsi, l'anomalie génétique à l'origine de la transformation serait survenue plus précocement que la mutation *JAK2*.

L'observation selon laquelle une anomalie *TET2* n'est présente que lorsque *JAK2* est muté et qu'une mutation *JAK2* n'est jamais retrouvée chez des patients non mutés pour *TET2* laisserait également supposer que la survenue de la mutation *TET2* est antérieure à celle de *JAK2*. Cependant, cette donnée vient d'être très récemment controversée (Abdel-Wahab & Levine, 2009). Lors d'une transformation aiguë myéloïde, la mutation *ASLX1*, identifiée quelque soit le stade de la pathologie, précéderait la survenue d'une anomalie *TET2* et d'une mutation *JAK2*. Les mutations de *LNK*, acquises précocement ou tardivement au cours de l'évolution de la maladie, peuvent concerner les deux allèles (survenue indépendante et séquentielle), et sont préférentiellement retrouvées dans les MFP. Une observation récente (Lasho, Tefferi, Finke, & Pardanani, 2011) montre que les mutations de *LNK* et *JAK2* ne sont pas mutuellement exclusives. Il est intéressant de noter que la fréquence des anomalies génotypiques *JAK2*, *TET2*, *ASLX1*, *IDH1* retrouvées dans les NMP en transformation est très proche de celle existant dans les leucémies aiguës myéloïdes *de novo*.

Récemment, l'analyse de polymorphismes par la technologie de type SNP, a mis en évidence des régions de perte d'hétérozygotie (appelées « copy-neutral-loss of heterozygoty » (CN-LOH), équivalent somatique de la disomie uniparentale (UPD)). L'identification de ces régions chromosomiques a permis d'identifier des gènes candidats mutés, impliqués dans de nombreuses pathologies myéloïdes (O'Keefe, McDevitt, & Maciejewski, 2010). Le tableau (9) suivant fait état des anomalies de type UPD trouvées dans les pathologies myéloïdes, les gènes candidats mutés dans les régions d'intérêts sont également mentionnés.



région d'UPD	gène	pathologie de description
UPD 1p	MPL	SMP, SMD
UPD 1p	NRAS	LMMJ, LMMC
UPD 4q	TET2	LAM, SMP, SMD
UPD 9p	JAK2	SMP, SMD
UPD 11p	WT1	LAM
UPD 11q	c-CBL	LMMC, LMMJ, PMF
UPD 13	FLT3ITD	LAM
UPD 17p	TP53	SMD, LAM
UPD 17q	NF1	LMMJ
UPD 19q	CEBPa	LAM
UPD 21q	RUNX1	LAM

**Tableau 9: Description des UPD découverts dans les pathologies myéloïdes**

D'après (O'Keefe et al., 2010)

De façon intéressante, l'analyse des CN-LOH a permis d'identifier les loci *JAK2*, *MPL*, *CBL* et *TET2* mais aussi, celui de *FLT3*. L'identification de cet UPD par une approche SNP est en cohérence avec la délétion 13q14 identifiée en CGH array. Dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence ou non d'un CN-LOH *FLT3* en raison du nombre faible de patients analysés.

Comme nous l'avons mentionné, **la délétion 13q**, bien que non spécifique est fréquemment retrouvée dans les SMD et les NMP dont la myélofibrose primitive. Il en est de même pour les délétions 5q et 20q. La survenue de la délétion 20q (Delhommeau, données personnelles) survient plus précocement que la mutation *JAK*. Les données du laboratoire (Bilhou-Nabera et al., 2003) montraient, en 2003, que la del13q était présente dans des précurseurs très immatures CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> et coexistait avec des précurseurs dépourvus de l'anomalie clonale, ce qui supposait l'existence d'un mosaïcisme ou d'une anomalie cytogénétique d'apparition relativement tardive conférant, au clone pathologique, un avantage prolifératif.

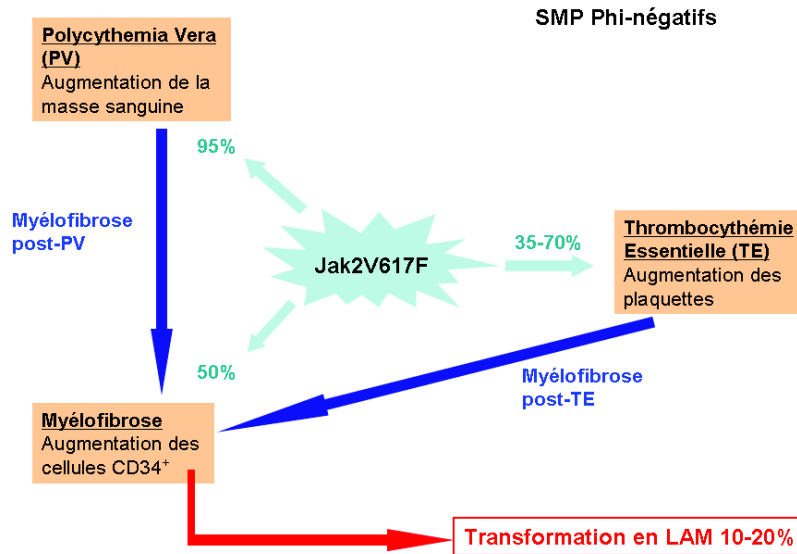


Figure 53: Evolution clinique possible des NMP BCR-ABL-1 négatifs

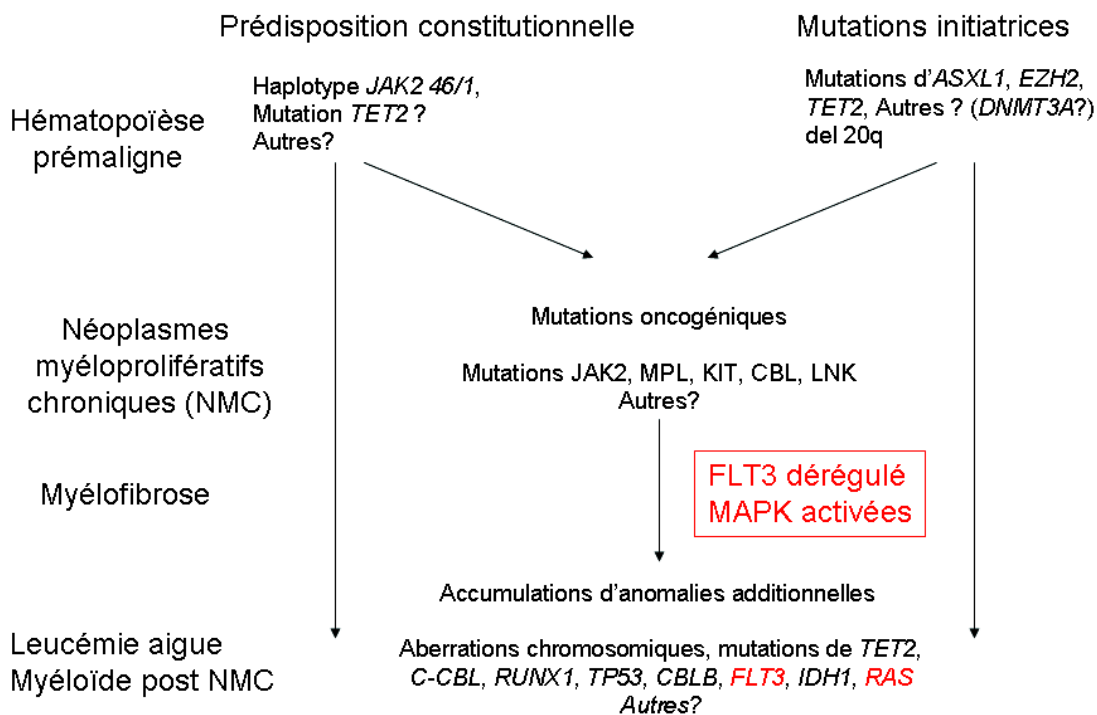


Figure 54: Hypothèse d'acquisition des événements génétiques et cytogénétiques dans la progression des pathologies myéloïdes

Sur le plan clinique, la PV et de la TE peuvent évoluer vers une myélofibrose (Figure 53). Sur le plan génétique, cette évolution est peu documentée. S'agit-il d'une évolution phénotypique secondaire à d'autres événements génétiques ou épigénétiques ? Comment alors expliquer la diversité phénotypique des NMP agrégés autour de la mutation JakV617F ? Les anomalies génétiques identifiées sont-elles associées ou alternatives ? Sont-elles primaires ou secondaires, concernent-elles des voies de signalisation similaires ou différentes ? Sont-elles spécifiques des cellules hématopoïétiques ou intéressent-elles également les cellules stromales, ce qui remettrait en question le schéma physiopathologique actuellement admis de la MFP? Les cellules stromales (dépourvues d'anomalies géniques ?) exerceraient-elles une pression de sélection sur les CSH/PH en favorisant l'émergence ou le développement d'un ou plusieurs clones adaptés à cet environnement? De telles hypothèses sont actuellement en cours d'étude sans que l'on ne puisse, aujourd'hui, répondre à ces questions.

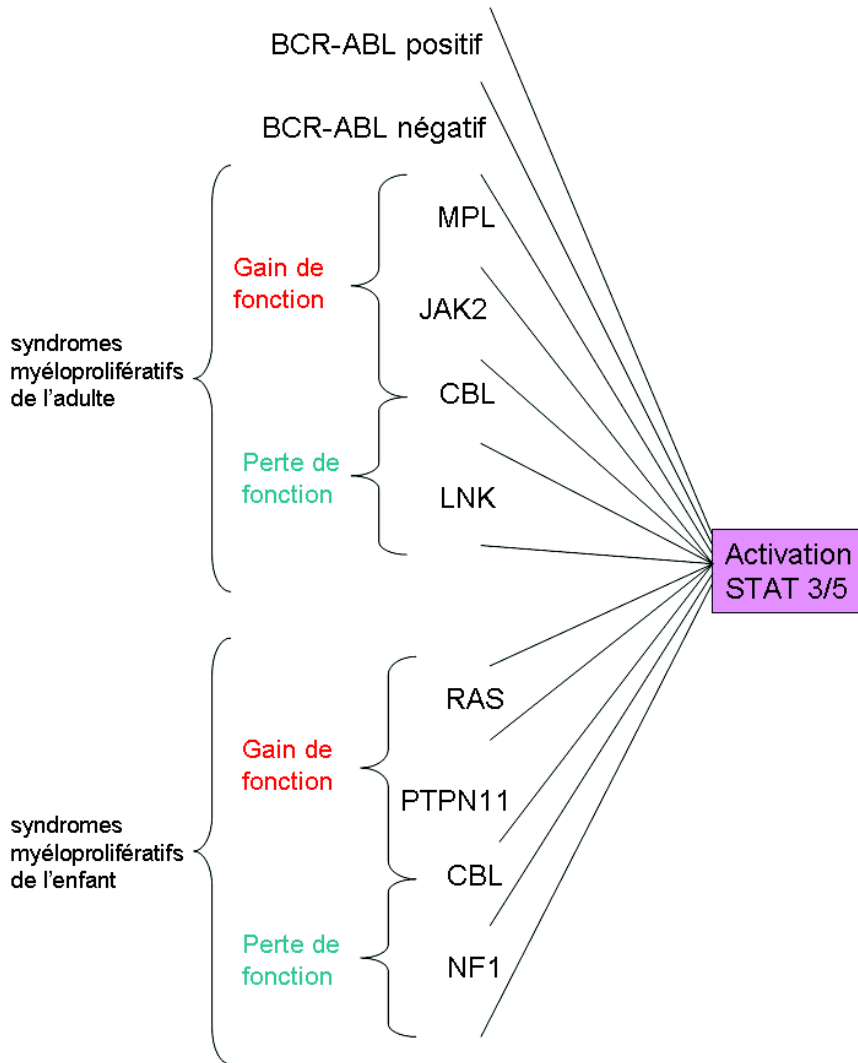
Ainsi, il est actuellement proposé que des anomalies épigénétiques (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*...) non spécifiques aux NMP (méthylation de l'ADN, remodelage chromatinien), des mutations initiatrices (*ASXL-1*, *EZH2*, *TET2*, del 20q...) et une prédisposition constitutionnelle (*JAK2* 46/1...) joueraient un rôle initiateur dans l'émergence d'un clone pré-malin. Des mutations oncogéniques (*JAK2*, *MPL*, *KIT*, *CBL*, *LNK*...) conduiraient alors au développement des NMP de phénotypes différents, dont l'évolution vers une phase de transformation aiguë serait liée à une accumulation d'anomalies additionnelles (aberrations chromosomiques, *C-CBL*, *RUNX1*, *TP53*, *CBLB*, *FLT3*, *IDH1*...) (Figure 54).

Quelque soit l'anomalie initiale à l'origine du développement du clone pathologique et quelle que soit la séquence d'apparition des anomalies géniques dont le nombre va croissant au cours de ces dernières années, elles concourent directement ou indirectement à une **dérégulation de tyrosine kinases**. Il est actuellement admis que des altérations de la signalisation Jak/STAT jouent très vraisemblablement un rôle central dans la pathogenèse des NMP et sont la cible privilégiée des thérapies actuelles (Figure 55). Cependant, d'autres voies de signalisation telles que la voie PI3K/AKT et la voie des MAPK participent également à la pathogénie de ces néoplasmes, comme cela a été en particulier montré dans la PV (Cleyrat et al.) et la mastocytose (Patrice Dubreuil).

Les résultats de mon travail confirment l'**importance des MAPK** et souligne le rôle d'une activation persistante de la voie **p38**, via le couple Flt3-ligand/Flt3, dans la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la myélofibrose primitive. Ils suggèrent également que cette dérégulation participe au processus inflammatoire à l'origine de la réaction stromale et « lit » d'une transformation leucémique potentielle.

## **Conclusion générale**

L'ensemble de nos résultats a permis de proposer un modèle physiopathologique dans lequel une augmentation de production de la cytokine Flt3-ligand par le stroma médullaire et les cellules CD34<sup>+</sup> participe à la dysmégacaryopoïèse via une activation persistante de son récepteur Flt3 et de la voie de signalisation p38. Ce dialogue altéré entre les cellules hématopoïétiques pathologiques (Bad seeds), en particulier mégacaryocytaires et les cellules stromales (Bad soil), conforte notre concept « Bad seeds in Bad soil ». Ce travail pourrait contribuer à l'amélioration de ce dialogue par des approches thérapeutiques ciblées sur l'axe Flt3-ligand/Flt3 médié par l'activation de p38 qui, en réduisant le processus inflammatoire, rétablirait un lien entre le « Seed » et le « Soil ».



**Figure 55: Gain et perte de fonctions associées à une activation STAT**

Les néoplasmes myéloprolifératifs de l'adulte et de l'enfant sont caractérisés par une dérégulation de la balance activation/inactivation de la voie Jak-STAT impliquant différentes mutations de type gain ou perte de fonction. D'après (Bunting, 2010)

# REFERENCES



- Abdel-Wahab, O. I., & Levine, R. L. (2009). Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment. *Annu Rev Med*, 60, 233-245.
- Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Care, R. S., Gari, M., Wilson, G. A., Peake, I. R., et al. (2003). Mutational analysis of class III receptor tyrosine kinases (C-KIT, C-FMS, FLT3) in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*, 120(3), 464-470.
- Adachi, M., Fukuda, M., & Nishida, E. (2000). Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol*, 148(5), 849-856.
- Adams, G. B., Chabner, K. T., Alley, I. R., Olson, D. P., Szczepiorkowski, Z. M., Poznansky, M. C., et al. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, 439(7076), 599-603.
- Adams, R. H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., et al. (2000). Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*, 6(1), 109-116.
- Al-Assar, O., Ul-Hassan, A., Brown, R., Wilson, G. A., Hammond, D. W., & Reilly, J. T. (2005). Gains on 9p are common genomic aberrations in idiopathic myelofibrosis: a comparative genomic hybridization study. *Br J Haematol*, 129(1), 66-71.
- Alexander, W. S. (1999). Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(10), 1027-1035.
- Allen, M., Svensson, L., Roach, M., Hambor, J., McNeish, J., & Gabel, C. A. (2000). Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med*, 191(5), 859-870.
- Allen, T. D., & Dexter, T. M. (1983). Long term bone marrow cultures: an ultrastructural review. *Scan Electron Microsc (Pt 4)*, 1851-1866.
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 786-794.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., et al. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, 117(6), 699-711.
- Anderson, R. E., Hoshino, T., & Yamamoto, T. (1964). Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia in Survivors of the Atomic Bomb in Hiroshima. *Ann Intern Med*, 60, 1-18.
- Andrieux, J., Bilhou-Nabera, C., Lippert, E., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Dupriez, B., Grardel, N., et al. (2006). Expression of HMGA2 in PB leukocytes and purified CD34+ cells from controls and patients with Myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Leuk Lymphoma*, 47(9), 1956-1959.
- Andrieux, J., Roche-Lestienne, C., Geffroy, S., Desterke, C., Grardel, N., Plantier, I., et al. (2007). Bone morphogenetic protein antagonist gene NOG is involved in myeloproliferative disease associated with myelofibrosis. *Cancer Genet Cytogenet*, 178(1), 11-16.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., et al. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, 49(6), 729-739.
- Antonchuk, J., Sauvageau, G., & Humphries, R. K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell*, 109(1), 39-45.
- Aouadi, M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y., & Bost, F. (2006). Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*, 88(9), 1091-1098.



- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., et al. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, *118*(2), 149-161.
- Arai, F., Hirao, A., & Suda, T. (2005). Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. *Int J Hematol*, *82*(5), 371-376.
- Arai, F., & Suda, T. (2007). Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann N Y Acad Sci*, *1106*, 41-53.
- Arai, F., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., et al. (2009). Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann N Y Acad Sci*, *1176*, 36-46.
- Avecilla, S. T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, *10*(1), 64-71.
- Baena, E., Ortiz, M., Martinez, A. C., & de Alboran, I. M. (2007). c-Myc is essential for hematopoietic stem cell differentiation and regulates Lin(-)Sca-1(+)-c-Kit(-) cell generation through p21. *Exp Hematol*, *35*(9), 1333-1343.
- Baker, S. J., Rane, S. G., & Reddy, E. P. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene*, *26*(47), 6724-6737.
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E., & Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J*, *19*(9), 2056-2068.
- Baran-Marszak, F., Magdoud, H., Desterke, C., Alvarado, A., Roger, C., Harel, S., et al. (2010). Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, *116*(26), 5961-5971.
- Barbui, T., Barosi, G., Birgegard, G., Cervantes, F., Finazzi, G., Griesshammer, M., et al. (2011). Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*, *29*(6), 761-770.
- Barosi, G., Viarengo, G., Pecci, A., Rosti, V., Piaggio, G., Marchetti, M., et al. (2001). Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, *98*(12), 3249-3255.
- Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M., & Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(7), 2804-2808.
- Beardmore, V. A., Hinton, H. J., Eftychi, C., Apostolaki, M., Armaka, M., Darragh, J., et al. (2005). Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol Cell Biol*, *25*(23), 10454-10464.
- Belaid-Choucair, Z., Lepelletier, Y., Poncin, G., Thiry, A., Humblet, C., Maachi, M., et al. (2008). Human bone marrow adipocytes block granulopoiesis through neuropilin-1-induced granulocyte colony-stimulating factor inhibition. *Stem Cells*, *26*(6), 1556-1564.
- Bench, A. J., Nacheva, E. P., Champion, K. M., & Green, A. R. (1998). Molecular genetics and cytogenetics of myeloproliferative disorders. *Baillieres Clin Haematol*, *11*(4), 819-848.
- Bertho, J. M., Chapel, A., Loilleux, S., Frick, J., Aigueperse, J., Gorin, N. C., et al. (2000). CD135 (Flk2/Flt3) expression by human thymocytes delineates a possible role of FLT3-ligand in T-cell precursor proliferation and differentiation. *Scand J Immunol*, *52*(1), 53-61.

- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., et al. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*, 2(2), 172-180.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O. I., & Dick, J. E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*, 4(9), 1038-1045.
- Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5320-5325.
- Bhoulmick, A., Lopez-Bergami, P., & Ronai, Z. (2007). ATF2 on the double - activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Res*, 20(6), 498-506.
- Bilhou-Nabera, C., Brigaudeau, C., Clay, D., Andrieux, J., Lai, J. L., Brouty-Boye, D., et al. (2003). Does cytogenetic mosaicism in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>low</sup> cells reflect the persistence of normal primitive hematopoietic progenitors in myeloid metaplasia with myelofibrosis? *Blood*, 102(4), 1551-1552.
- Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 321(6067), 209-213.
- Bluteau, D., Lordier, L., Di Stefano, A., Chang, Y., Raslova, H., Debili, N., et al. (2009). Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 227-234.
- Bock, O., Hoftmann, J., Theophile, K., Hussein, K., Wiese, B., Schlue, J., et al. (2008). Bone morphogenetic proteins are overexpressed in the bone marrow of primary myelofibrosis and are apparently induced by fibrogenic cytokines. *Am J Pathol*, 172(4), 951-960.
- Bock, O., Neuse, J., Hussein, K., Brakensiek, K., Buesche, G., Buhr, T., et al. (2006). Aberrant collagenase expression in chronic idiopathic myelofibrosis is related to the stage of disease but not to the JAK2 mutation status. *Am J Pathol*, 169(2), 471-481.
- Bogani, C., Ponziani, V., Guglielmelli, P., Desterke, C., Rosti, V., Bosi, A., et al. (2008). Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34<sup>+</sup> cells from patients with primary myelofibrosis. *Stem Cells*, 26(8), 1920-1930.
- Bottardi, S., Ghiam, A. F., Bergeron, F., & Milot, E. (2007). Lineage-specific transcription factors in multipotent hematopoietic progenitors: a little bit goes a long way. *Cell Cycle*, 6(9), 1035-1039.
- Boveri, E., Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Arcaini, L., et al. (2008). Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol*, 140(2), 162-168.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., et al. (2003). Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev*, 17(16), 1969-1978.
- Brandt, J., Srour, E. F., van Besien, K., Briddell, R. A., & Hoffman, R. (1990). Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow. *J Clin Invest*, 86(3), 932-941.
- Brasel, K., McKenna, H. J., Charrier, K., Morrissey, P. J., Williams, D. E., & Lyman, S. D. (1997). Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood*, 90(9), 3781-3788.
- Brasel, K., McKenna, H. J., Morrissey, P. J., Charrier, K., Morris, A. E., Lee, C. C., et al. (1996). Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood*, 88(6), 2004-2012.

- Breton-Gorius, J., Clezardin, P., Guichard, J., Debili, N., Malaval, L., Vainchenker, W., et al. (1992). Localization of platelet osteonectin at the internal face of the alpha-granule membranes in platelets and megakaryocytes. *Blood*, 79(4), 936-941.
- Briard, D., Brouty-Boye, D., Giron-Michel, J., Azzarone, B., Jasmin, C., & Le Bousse-Kerdiles, C. (2003). Impaired NK cell differentiation of blood-derived CD34+ progenitors from patients with myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Clin Immunol*, 106(3), 201-212.
- Broske, A. M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M. R., Mancini, E., Scheller, M., et al. (2009). DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet*, 41(11), 1207-1215.
- Brouty-Boye, D., Briard, D., Azzarone, B., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Clay, D., Pottin-Clemenceau, C., et al. (2001). Effects of human fibroblasts from myelometaplastic and non-myelometaplastic hematopoietic tissues on CD34+ stem cells. *Int J Cancer*, 92(4), 484-488.
- Broxmeyer, H. E. (1996). Primitive hematopoietic stem and progenitor cells in human umbilical cord blood: an alternative source of transplantable cells. *Cancer Treat Res*, 84, 139-148.
- Bruhat, A., Cherasse, Y., Maurin, A. C., Breitwieser, W., Parry, L., Deval, C., et al. (2007). ATF2 is required for amino acid-regulated transcription by orchestrating specific histone acetylation. *Nucleic Acids Res*, 35(4), 1312-1321.
- Bryon, P. A., Gentilhomme, O., & Fiere, D. (1979). [Histomorphometric analysis of bone-marrow adipose density and heterogeneity in myeloid aplasia and dysplasia (author's transl)]. *Pathol Biol (Paris)*, 27(4), 209-213.
- Buchsbaum, R. J., Connolly, B. A., & Feig, L. A. (2002). Interaction of Rac exchange factors Tiam1 and Ras-GRF1 with a scaffold for the p38 mitogen-activated protein kinase cascade. *Mol Cell Biol*, 22(12), 4073-4085.
- Bunting, K. D. (2010). Another Lnk to STAT activation. *Blood*, 116(6), 862-864.
- Buschle, M., Janssen, J. W., Drexler, H., Lyons, J., Anger, B., & Bartram, C. R. (1988). Evidence for pluripotent stem cell origin of idiopathic myelofibrosis: clonal analysis of a case characterized by a N-ras gene mutation. *Leukemia*, 2(10), 658-660.
- Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960), 841-846.
- Campbell, P. J., Griesshammer, M., Dohner, K., Dohner, H., Kusec, R., Hasselbalch, H. C., et al. (2006). V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood*, 107(5), 2098-2100.
- Caramazza, D., Begna, K. H., Gangat, N., Vaidya, R., Siragusa, S., Van Dyke, D. L., et al. (2011). Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*, 25(1), 82-88.
- Carow, C. E., Kim, E., Hawkins, A. L., Webb, H. D., Griffin, C. A., Jabs, E. W., et al. (1995). Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12-->q13. *Cytogenet Cell Genet*, 70(3-4), 255-257.
- Carow, C. E., Levenstein, M., Kaufmann, S. H., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P., et al. (1996). Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*, 87(3), 1089-1096.
- Carver-Moore, K., Broxmeyer, H. E., Luoh, S. M., Cooper, S., Peng, J., Burstein, S. A., et al. (1996). Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood*, 88(3), 803-808.

- Castro-Malaspina, H. (1984). Pathogenesis of myelofibrosis: role of ineffective megakaryopoiesis and megakaryocyte components. *Prog Clin Biol Res*, 154, 427-454.
- Chagraoui, H., Komura, E., Tulliez, M., Giraudier, S., Vainchenker, W., & Wendling, F. (2002). Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*, 100(10), 3495-3503.
- Chagraoui, H., Tulliez, M., Smayra, T., Komura, E., Giraudier, S., Yun, T., et al. (2003). Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO. *Blood*, 101(8), 2983-2989.
- Chaligne, R., Tonetti, C., Besancenot, R., Marty, C., Kiladjian, J. J., Socie, G., et al. (2009). SOCS3 inhibits TPO-stimulated, but not spontaneous, megakaryocytic growth in primary myelofibrosis. *Leukemia*, 23(6), 1186-1190.
- Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., et al. (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNFalpha-induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell*, 124(3), 601-613.
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40.
- Charbord, P., Tavian, M., Humeau, L., & Peault, B. (1996). Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. *Blood*, 87(10), 4109-4119.
- Chen, X. D., Dusevich, V., Feng, J. Q., Manolagas, S. C., & Jilka, R. L. (2007). Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 22(12), 1943-1956.
- Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., et al. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21<sup>cip1</sup>/waf1. *Science*, 287(5459), 1804-1808.
- Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X., & Weissman, I. L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(6), 3120-3125.
- Chi, H., Barry, S. P., Roth, R. J., Wu, J. J., Jones, E. A., Bennett, A. M., et al. (2006). Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), 2274-2279.
- Chute, J. P., Muramoto, G. G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N. J., et al. (2006). Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(31), 11707-11712.
- Claesson-Welsh, L., Eriksson, A., Westermarck, B., & Heldin, C. H. (1989). cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(13), 4917-4921.
- Clark, A. R., Dean, J. L., & Saklatvala, J. (2003). Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett*, 546(1), 37-44.
- Clay, D., Rubinstein, E., Mishal, Z., Anjo, A., Prenant, M., Jasmin, C., et al. (2001). CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood*, 97(7), 1982-1989.
- Cleyrat, C., Jelinek, J., Girodon, F., Boissinot, M., Ponge, T., Harousseau, J. L., 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*, 24(5), 1069-1073.
- Cohen-Solal, K., Debili, N., Vainchenker, W., & Wendling, F. (1997). Thrombopoietin (Mpl ligand) and the regulation of platelet production. *Eur Cytokine Netw*, 8(3), 311-314.

- Conrad, P. W., Millhorn, D. E., & Beitner-Johnson, D. (2000). Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of Ca<sup>2+</sup>/CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. *Adv Exp Med Biol*, 475, 293-302.
- Corre, S., Primot, A., Baron, Y., Le Seyec, J., Goding, C., & Galibert, M. D. (2009). Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *J Biol Chem*, 284(28), 18851-18862.
- Correa, P. N., Eskinazi, D., & Axelrad, A. A. (1994). Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood*, 83(1), 99-112.
- Coulombel, L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene*, 23(43), 7210-7222.
- Coussens, L., Van Beveren, C., Smith, D., Chen, E., Mitchell, R. L., Isacke, C. M., et al. (1986). Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene fms at carboxyl terminus. *Nature*, 320(6059), 277-280.
- Cuadrado, A., & Nebreda, A. R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*, 429(3), 403-417.
- Dalley, A., Smith, J. M., Reilly, J. T., & Neil, S. M. (1996). Investigation of calmodulin and basic fibroblast growth factor (bFGF) in idiopathic myelofibrosis: evidence for a role of extracellular calmodulin in fibroblast proliferation. *Br J Haematol*, 93(4), 856-862.
- Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6(4), 372-375.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264(5164), 1415-1421.
- Dawson, M. A., Bannister, A. J., Gottgens, B., Foster, S. D., Bartke, T., Green, A. R., et al. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*, 461(7265), 819-822.
- de Kruijf, E. J., Hagoort, H., Velders, G. A., Fibbe, W. E., & van Pel, M. (2010). Hematopoietic stem and progenitor cells are differentially mobilized depending on the duration of Flt3-ligand administration. *Haematologica*, 95(7), 1061-1067.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*, 360(22), 2289-2301.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Tonetti, C., Masse, A., Godin, I., Le Couedic, J. P., et al. (2007). Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*, 109(1), 71-77.
- Demange, C., Ferrand, N., Prunier, C., Bourgeade, M. F., & Atfi, A. (2009). A model of partnership co-opted by the homeodomain protein TGIF and the Itch/AIP4 ubiquitin ligase for effective execution of TNF-alpha cytotoxicity. *Mol Cell*, 36(6), 1073-1085.
- Demory, J. L., Dupriez, B., Fenaux, P., Lai, J. L., Beuscart, R., Jouet, J. P., et al. (1988). Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 47 cases. *Blood*, 72(3), 855-859.
- Dexter, T. M., Allen, T. D., & Lajtha, L. G. (1977). Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol*, 91(3), 335-344.
- Dhanasekaran, D. N., & Johnson, G. L. (2007). MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene*, 26(22), 3097-3099.
- Dick, J. E., Bhatia, M., Gan, O., Kapp, U., & Wang, J. C. (1997). Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells*, 15 Suppl 1, 199-203; discussion 204-197.

- Diwan, A., Koesters, A. G., Odley, A. M., Pushkaran, S., Baines, C. P., Spike, B. T., et al. (2007). Unrestrained erythroblast development in Nix<sup>-/-</sup> mice reveals a mechanism for apoptotic modulation of erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(16), 6794-6799.
- Domen, J., Gandy, K. L., & Weissman, I. L. (1998). Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood*, *91*(7), 2272-2282.
- Dong, C., Yang, D. D., Wusk, M., Whitmarsh, A. J., Davis, R. J., & Flavell, R. A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science*, *282*(5396), 2092-2095.
- Dormady, S. P., Bashayan, O., Dougherty, R., Zhang, X. M., & Basch, R. S. (2001). Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res*, *10*(1), 125-140.
- Dosil, M., Wang, S., & Lemischka, I. R. (1993). Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, *13*(10), 6572-6585.
- Drachman, J. G., Rojnuckarin, P., & Kaushansky, K. (1999). Thrombopoietin signal transduction: studies from cell lines and primary cells. *Methods*, *17*(3), 238-249.
- Drexler, H. G. (1996). Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells. *Leukemia*, *10*(4), 588-599.
- Dupriez, B., Demory, J. L., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Giraudier, S., Bilhou-Nabera, C., Abgrall, J. F., et al. (2008). Myélofibrose primitive. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie*.
- Dupriez, B., Morel, P., Demory, J. L., Lai, J. L., Simon, M., Plantier, I., et al. (1996). Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*, *88*(3), 1013-1018.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, *3*(11), 859-868.
- Emadi, S., Clay, D., Desterke, C., Guerton, B., Maquarre, E., Charpentier, A., et al. (2005). IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Blood*, *105*(2), 464-473.
- Enslin, H., Raingeaud, J., & Davis, R. J. (1998). Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem*, *273*(3), 1741-1748.
- Epstein, E., & Goedel, A. (1934). Hemorrhagic thrombocytopenia with a cascular, sclerotic spleen. *Virchows Arch*, *293*, 233-248.
- Erlacher, M., Labi, V., Manzl, C., Bock, G., Tzankov, A., Hacker, G., et al. (2006). Puma cooperates with Bim, the rate-limiting BH3-only protein in cell death during lymphocyte development, in apoptosis induction. *J Exp Med*, *203*(13), 2939-2951.
- Farina, S. F., Girard, L. J., Vanin, E. F., Nienhuis, A. W., & Bodine, D. M. (1995). Dysregulated expression of GATA-1 following retrovirus-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells increases erythropoiesis. *Blood*, *86*(11), 4124-4133.
- Feng, Y., Wen, J., & Chang, C. C. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase and hematologic malignancies. *Arch Pathol Lab Med*, *133*(11), 1850-1856.
- Fichelson, S., Freyssonier, J. M., Picard, F., Fontenay-Roupie, M., Guesnu, M., Cherai, M., et al. (1999). Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. *Blood*, *94*(5), 1601-1613.

- Filippi, M. D., Porteu, F., Le Pesteur, F., Schiavon, V., Millot, G. A., Vainchenker, W., et al. (2002). Requirement for mitogen-activated protein kinase activation in the response of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells to thrombopoietin in vitro. *Blood*, *99*(4), 1174-1182.
- Fleming, H. E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K. M., Kronenberg, H. M., et al. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*, *2*(3), 274-283.
- Fourouclas, N., Li, J., Gilby, D. C., Campbell, P. J., Beer, P. A., Boyd, E. M., et al. (2008). Methylation of the suppressor of cytokine signaling 3 gene (SOCS3) in myeloproliferative disorders. *Haematologica*, *93*(11), 1635-1644.
- Fu, S., & Liesveld, J. (2000). Mobilization of hematopoietic stem cells. *Blood Rev*, *14*(4), 205-218.
- Fukuda, S., Broxmeyer, H. E., & Pelus, L. M. (2005). Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha(CXCL12)/CXCR4 axis. *Blood*, *105*(8), 3117-3126.
- Gainsford, T., Nandurkar, H., Metcalf, D., Robb, L., Begley, C. G., & Alexander, W. S. (2000). The residual megakaryocyte and platelet production in c-mpl-deficient mice is not dependent on the actions of interleukin-6, interleukin-11, or leukemia inhibitory factor. *Blood*, *95*(2), 528-534.
- Ganiatsas, S., Kwee, L., Fujiwara, Y., Perkins, A., Ikeda, T., Labow, M. A., et al. (1998). SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(12), 6881-6886.
- Garcia, J., de Gunzburg, J., Eychene, A., Gisselbrecht, S., & Porteu, F. (2001). Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol Cell Biol*, *21*(8), 2659-2670.
- Garrett, R. W., & Emerson, S. G. (2009). Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell*, *4*(6), 503-506.
- Gaundar, S. S., Bradstock, K. F., & Bendall, L. J. (2009). p38MAPK inhibitors attenuate cytokine production by bone marrow stromal cells and reduce stroma-mediated proliferation of acute lymphoblastic leukemia cells. *Cell Cycle*, *8*(18), 2975-2983.
- Geddis, A. E. (2009). The regulation of proplatelet production. *Haematologica*, *94*(6), 756-759.
- Geddis, A. E. (2010). Megakaryopoiesis. *Semin Hematol*, *47*(3), 212-219.
- Geddis, A. E., & Kaushansky, K. (2006). Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation. *Cell Cycle*, *5*(5), 538-545.
- Ghobrial, I. M., Witzig, T. E., & Adjei, A. A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, *55*(3), 178-194.
- Giraudier, S., Chagraoui, H., Komura, E., Barnache, S., Blanchet, B., LeCouedic, J. P., et al. (2002). Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood*, *100*(8), 2932-2940.
- Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X., & Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, *363*, 15-23.
- Goldfarb, A. N. (2007). Transcriptional control of megakaryocyte development. *Oncogene*, *26*(47), 6795-6802.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., & Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, *183*(4), 1797-1806.

- Goodsell, D. S. (2002). The molecular perspective: Bcl-2 and apoptosis. *Stem Cells*, 20(4), 355-356.
- Goralczyk, R., Closs, E. I., Ruther, U., Wagner, E. F., Strauss, P. G., Erfle, V., et al. (1990). Characterization of fos-induced osteogenic tumours and tumour-derived murine cell lines. *Differentiation*, 44(2), 122-131.
- Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., & Neufeld, G. (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev*, 8(2), 95-114.
- Gotherstrom, C. (2007). Immunomodulation by multipotent mesenchymal stromal cells. *Transplantation*, 84(1 Suppl), S35-37.
- Grand, F. H., Hidalgo-Curtis, C. E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., et al. (2009). Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 113(24), 6182-6192.
- Gregoret, I. V., Lee, Y. M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, 338(1), 17-31.
- Grimwade, L. F., Happerfield, L., Tristram, C., McIntosh, G., Rees, M., Bench, A. J., et al. (2009). Phospho-STAT5 and phospho-Akt expression in chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*, 147(4), 495-506.
- Groom, L. A., Sneddon, A. A., Alessi, D. R., Dowd, S., & Keyse, S. M. (1996). Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *Embo J*, 15(14), 3621-3632.
- Guihard, S., Clay, D., Cocault, L., Saulnier, N., Opolon, P., Souyri, M., et al. (2010). The MAPK ERK1 is a negative regulator of the adult steady-state splenic erythropoiesis. *Blood*, 115(18), 3686-3694.
- Gupta, R., Knight, C. L., & Bain, B. J. (2002). Receptor tyrosine kinase mutations in myeloid neoplasms. *Br J Haematol*, 117(3), 489-508.
- Hausgen, W., Herdegen, T., & Waetzig, V. (2011). The bottleneck of JNK signaling: Molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol*.
- Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Bazan, J. F., et al. (1994). Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature*, 368(6472), 643-648.
- Hayashi, M., & Lee, J. D. (2004). Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med*, 82(12), 800-808.
- Hemavathy, K. C., Chang, T. H., Zhang, H., Charles, W., Goldberg, A., Aithal, S., et al. (2006). Reduced expression of TGF beta1RII in agnogenic myeloid metaplasia is not due to mutation or methylation. *Leuk Res*, 30(1), 47-53.
- Heuck, G. (1879). Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively. *Arch Pathol Anat*, 78, 475-496.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., et al. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420(6913), 333-336.
- Hogan, C. J., Shpall, E. J., & Keller, G. (2002). Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34+ cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 413-418.
- Horiuchi, K., Morioka, H., Takaishi, H., Akiyama, H., Blobel, C. P., & Toyama, Y. (2009). Ectodomain shedding of FLT3 ligand is mediated by TNF-alpha converting enzyme. *J Immunol*, 182(12), 7408-7414.



- Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Nakamura, Y., Gomei, Y., et al. (2010). Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood*, *116*(4), 554-563.
- Hsu, C. L., Kikuchi, K., & Kondo, M. (2007). Activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathway is involved in myeloid lineage commitment. *Blood*, *110*(5), 1420-1428.
- Hu, H. (1987). Benzene-associated myelofibrosis. *Ann Intern Med*, *106*(1), 171-172.
- Hunte, B. E., Hudak, S., Campbell, D., Xu, Y., & Rennick, D. (1996). flk2/flt3 ligand is a potent cofactor for the growth of primitive B cell progenitors. *J Immunol*, *156*(2), 489-496.
- Ihalainen, J., Juvonen, E., Savolainen, E. R., Ruutu, T., & Palotie, A. (1994). Calcitonin gene methylation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*, *8*(2), 230-235.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Takimoto, M., Irei, M., Yoshioka, S., Shibuya, Y., et al. (2005). Treatment with valproic acid for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Ann Hematol*, *84*(12), 833-834.
- Italiano, J. E., Jr., Richardson, J. L., Patel-Hett, S., Battinelli, E., Zaslavsky, A., Short, S., et al. (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*, *111*(3), 1227-1233.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, *431*(7011), 997-1002.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, *12*(4), 446-451.
- Jacobson, R. J., Salo, A., & Fialkow, P. J. (1978). Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*, *51*(2), 189-194.
- James, C., Ugo, V., Le Couedic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., et al. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, *434*(7037), 1144-1148.
- Jochum, W., David, J. P., Elliott, C., Wutz, A., Plenk, H., Jr., Matsuo, K., et al. (2000). Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med*, *6*(9), 980-984.
- John, A. M., Thomas, N. S., Mufti, G. J., & Padua, R. A. (2004). Targeted therapies in myeloid leukemia. *Semin Cancer Biol*, *14*(1), 41-62.
- Jones, A. V., Campbell, P. J., Beer, P. A., Schnittger, S., Vannucchi, A. M., Zoi, K., et al. (2010). The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*, *115*(22), 4517-4523.
- Jones, L. C., Tefferi, A., Idos, G. E., Kumagai, T., Hofmann, W. K., & Koeffler, H. P. (2004). RARbeta2 is a candidate tumor suppressor gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Oncogene*, *23*(47), 7846-7853.
- Jung, Y., Wang, J., Song, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Havens, A., et al. (2007). Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. *Blood*, *110*(1), 82-90.
- Junt, T., Schulze, H., Chen, Z., Massberg, S., Goerge, T., Krueger, A., et al. (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, *317*(5845), 1767-1770.
- Kahn, A., Bernard, J. F., Cottreau, D., Marie, J., & Boivin, P. (1975). Gd(-) Abrami: a deficient G-6PD variant with hemizygous expression in blood cells of a woman with primary myelofibrosis. *Humangenetik*, *30*(1), 41-46.

- Kaluzhny, Y., Yu, G., Sun, S., Toselli, P. A., Nieswandt, B., Jackson, C. W., et al. (2002). BclxL overexpression in megakaryocytes leads to impaired platelet fragmentation. *Blood*, *100*(5), 1670-1678.
- Kastan, M. B., Schlaffer, E., Russo, J. E., Colvin, O. M., Civin, C. I., & Hilton, J. (1990). Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*, *75*(10), 1947-1950.
- Katsoulidis, E., Li, Y., Yoon, P., Sassano, A., Altman, J., Kannan-Thulasiraman, P., et al. (2005). Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cytokine-mediated hematopoietic suppression in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res*, *65*(19), 9029-9037.
- Kelkar, N., Standen, C. L., & Davis, R. J. (2005). Role of the JIP4 scaffold protein in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Mol Cell Biol*, *25*(7), 2733-2743.
- Kelly, L. M., Liu, Q., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., & Gilliland, D. G. (2002). FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*, *99*(1), 310-318.
- Keyse, S. M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, *12*(2), 186-192.
- Khurana, A., Nakayama, K., Williams, S., Davis, R. J., Mustelin, T., & Ronai, Z. (2006). Regulation of the ring finger E3 ligase Siah2 by p38 MAPK. *J Biol Chem*, *281*(46), 35316-35326.
- Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., & Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, *121*(7), 1109-1121.
- Kim, H. S., Choi, E. S., Shin, J. A., Jang, Y. K., & Park, S. D. (2004). Regulation of Swi6/HP1-dependent heterochromatin assembly by cooperation of components of the mitogen-activated protein kinase pathway and a histone deacetylase Ctr6. *J Biol Chem*, *279*(41), 42850-42859.
- Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D., & Alexander, W. S. (1998). Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(3), 1195-1200.
- Kirito, K., Fox, N., & Kaushansky, K. (2003). Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. *Blood*, *102*(9), 3172-3178.
- Kishimoto, T., Taga, T., & Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*, *76*(2), 253-262.
- Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J., Bielawski, J., Taha, T. A., Jenkins, R. W., Senkal, C. E., et al. (2006). Protein kinase C-induced activation of a ceramide/protein phosphatase 1 pathway leading to dephosphorylation of p38 MAPK. *J Biol Chem*, *281*(48), 36793-36802.
- Kobayashi, H., Butler, J. M., O'Donnell, R., Kobayashi, M., Ding, B. S., Bonner, B., et al. (2010). Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*, *12*(11), 1046-1056.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S. S., Tiedt, R., Passweg, J. R., et al. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, *352*(17), 1779-1790.
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., & May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, *87*(1), 1-13.

- Kuribara, R., Honda, H., Matsui, H., Shinjyo, T., Inukai, T., Sugita, K., et al. (2004). Roles of Bim in apoptosis of normal and Bcr-Abl-expressing hematopoietic progenitors. *Mol Cell Biol*, 24(14), 6172-6183.
- Kuter, D. J., Bain, B., Mufti, G., Bagg, A., & Hasserjian, R. P. (2007). Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol*, 139(3), 351-362.
- Kyriakis, J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2), 807-869.
- Labouyrie, E., Dubus, P., Groppi, A., Mahon, F. X., Ferrer, J., Parrens, M., et al. (1999). Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol*, 154(2), 405-415.
- Lacout, C., Pisani, D. F., Tulliez, M., Gachelin, F. M., Vainchenker, W., & Villeval, J. L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*, 108(5), 1652-1660.
- Laird, D. J., von Andrian, U. H., & Wagers, A. J. (2008). Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*, 132(4), 612-630.
- Lapidot, T., Dar, A., & Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood*, 106(6), 1901-1910.
- Lapidot, T., & Kollet, O. (2010). The brain-bone-blood triad: traffic lights for stem-cell homing and mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010, 1-6.
- Lapidot, T., & Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*, 30(9), 973-981.
- Lasho, T. L., Tefferi, A., Finke, C., & Pardanani, A. (2011). Clonal hierarchy and allelic mutation segregation in a myelofibrosis patient with two distinct LNK mutations. *Leukemia*.
- Lasho, T. L., Tefferi, A., Hood, J. D., Verstovsek, S., Gilliland, D. G., & Pardanani, A. (2008). TG101348, a JAK2-selective antagonist, inhibits primary hematopoietic cells derived from myeloproliferative disorder patients with JAK2V617F, MPLW515K or JAK2 exon 12 mutations as well as mutation negative patients. *Leukemia*, 22(9), 1790-1792.
- Laszlo, J. (1975). Myeloproliferative disorders (MPD): myelofibrosis, myelosclerosis, extramedullary hematopoiesis, undifferentiated MPD, and hemorrhagic thrombocythemia. *Semin Hematol*, 12(4), 409-432.
- Lataillade, J. J., Clay, D., Bourin, P., Herodin, F., Dupuy, C., Jasmin, C., et al. (2002). Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood*, 99(4), 1117-1129.
- Lataillade, J. J., Clay, D., Dupuy, C., Rigal, S., Jasmin, C., Bourin, P., et al. (2000). Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood*, 95(3), 756-768.
- Lataillade, J. J., Pierre-Louis, O., Hasselbalch, H. C., Uzan, G., Jasmin, C., Martyre, M. C., et al. (2008). Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*, 112(8), 3026-3035.
- Laterveer, L., Lindley, I. J., Heemskerk, D. P., Camps, J. A., Pauwels, E. K., Willemze, R., et al. (1996). Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. *Blood*, 87(2), 781-788.

- Lavagna-Sevenier, C., Marchetto, S., Birnbaum, D., & Rosnet, O. (1998). FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates. *Leukemia*, *12*(3), 301-310.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., Chevillard, S., Charpentier, A., Romquin, N., Clay, D., Smadja-Joffe, F., et al. (1996). Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood*, *88*(12), 4534-4546.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., & Martyre, M. C. (2001). Involvement of the fibrogenic cytokines, TGF-beta and bFGF, in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol (Paris)*, *49*(2), 153-157.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., Praloran, V., Martyré, M. C., & Membres du réseau de recherche clinique Inserm sur la myélofibrose. (2002). La splénomégalie myéloïde. De données récentes à un modèle physiopathologique. *Hématologie*, *8*(3), 187-196.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C., Souyri, M., Smadja-Joffe, F., Praloran, V., Jasmin, C., & Ziltener, H. J. (1992). Enhanced hematopoietic growth factor production in an experimental myeloproliferative syndrome. *Blood*, *79*(12), 3179-3187.
- Lepage, A., Leboeuf, M., Cazenave, J. P., de la Salle, C., Lanza, F., & Uzan, G. (2000). The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood*, *96*(13), 4169-4177.
- Letourneux, C., Rocher, G., & Porteu, F. (2006). B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *Embo J*, *25*(4), 727-738.
- Leuenroth, S. J., Grutkoski, P. S., Ayala, A., & Simms, H. H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol*, *68*(1), 158-166.
- Levenson, J. M., & Sweatt, J. D. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci*, *6*(2), 108-118.
- Levesque, J. P., Helwani, F. M., & Winkler, I. G. (2010). The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*, *24*(12), 1979-1992.
- Levine, R. L., Belisle, C., Wadleigh, M., Zahrieh, D., Lee, S., Chagnon, P., et al. (2006). X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*, *107*(10), 4139-4141.
- Levine, R. L., Pardnani, A., Tefferi, A., & Gilliland, G. (2007). Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature Reviews Cancer*, *7*, 673-683.
- Li, W., Johnson, S. A., Shelley, W. C., & Yoder, M. C. (2004). Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. *Exp Hematol*, *32*(12), 1226-1237.
- Lisovsky, M., Braun, S. E., Ge, Y., Takahira, H., Lu, L., Savchenko, V. G., et al. (1996). Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia*, *10*(6), 1012-1018.
- Lopez-Bergami, P., Lau, E., & Ronai, Z. (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer*, *10*(1), 65-76.
- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., et al. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood*, *112*(8), 3164-3174.

- Lortat-Jacob, H., Grosdidier, A., & Imberty, A. (2002). Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(3), 1229-1234.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, *389*(6648), 251-260.
- Lyman, S. D., & Jacobsen, S. E. (1998). c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood*, *91*(4), 1101-1134.
- Lyman, S. D., James, L., Johnson, L., Brasel, K., de Vries, P., Escobar, S. S., et al. (1994). Cloning of the human homologue of the murine flt3 ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood*, *83*(10), 2795-2801.
- Lyman, S. D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., et al. (1993). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell*, *75*(6), 1157-1167.
- Lyman, S. D., Seaberg, M., Hanna, R., Zappone, J., Brasel, K., Abkowitz, J. L., et al. (1995). Plasma/serum levels of flt3 ligand are low in normal individuals and highly elevated in patients with Fanconi anemia and acquired aplastic anemia. *Blood*, *86*(11), 4091-4096.
- Macdonald, D., Aguiar, R. C., Mason, P. J., Goldman, J. M., & Cross, N. C. (1995). A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review. *Leukemia*, *9*(10), 1628-1630.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., & Rao, A. (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, *20*(19), 2476-2489.
- Mackarechtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., & Lemischka, I. R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*, *3*(1), 147-161.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, *298*(5600), 1912-1934.
- Martin, F., Prandini, M. H., Thevenon, D., Marguerie, G., & Uzan, G. (1993). The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J Biol Chem*, *268*(29), 21606-21612.
- Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M. C., et al. (2010). Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood*, *116*(5), 783-787.
- Martyre, M. C., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Romquin, N., Chevillard, S., Praloran, V., Demory, J. L., et al. (1997). Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*, *97*(2), 441-448.
- Martyre, M. C., Magdelenat, H., Bryckaert, M. C., Laine-Bidron, C., & Calvo, F. (1991). Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*, *77*(1), 80-86.
- Martyre, M. C., Romquin, N., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Chevillard, S., Benyahia, B., Dupriez, B., et al. (1994). Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*, *88*(1), 9-16.
- Martyre, M. C., Steunou, V., LeBousse-Kerdiles, M. C., & Wietzerbin, J. (2003). Lack of alteration in GATA-1 expression in CD34+ hematopoietic progenitors from patients with idiopathic myelofibrosis. *Blood*, *101*(12), 5087-5088; author reply 5088-5089.
- Massa, M., Rosti, V., Ramajoli, I., Campanelli, R., Pecci, A., Viarengo, G., et al. (2005). Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol*, *23*(24), 5688-5695.

- Masson, K., & Ronnstrand, L. (2009). Oncogenic signaling from the hematopoietic growth factor receptors c-Kit and Flt3. *Cell Signal*, *21*(12), 1717-1726.
- Mateescu, B., England, P., Halgand, F., Yaniv, M., & Muchardt, C. (2004). Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3. *EMBO Rep*, *5*(5), 490-496.
- Matsumura, I., Nakajima, K., Wakao, H., Hattori, S., Hashimoto, K., Sugahara, H., et al. (1998). Involvement of prolonged ras activation in thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation of a human factor-dependent hematopoietic cell line. *Mol Cell Biol*, *18*(7), 4282-4290.
- Matsuoka, H., Unami, A., Fujimura, T., Noto, T., Takata, Y., Yoshizawa, K., et al. (2007). Mechanisms of HDAC inhibitor-induced thrombocytopenia. *Eur J Pharmacol*, *571*(2-3), 88-96.
- Matthews, W., Jordan, C. T., Wiegand, G. W., Pardoll, D., & Lemischka, I. R. (1991). A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell*, *65*(7), 1143-1152.
- Mazzucchelli, C., Vantaggiato, C., Ciamei, A., Fasano, S., Pakhotin, P., Krezel, W., et al. (2002). Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*, *34*(5), 807-820.
- Medvinsky, A., & Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, *86*(6), 897-906.
- Medzhitov, R., & Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*, *9*(10), 692-703.
- Mendes, S. C., Robin, C., & Dzierzak, E. (2005). Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, *132*(5), 1127-1136.
- Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., et al. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, *466*(7308), 829-834.
- Mesa, R. A. (2010). New drugs for the treatment of myelofibrosis. *Curr Hematol Malig Rep*, *5*(1), 15-21.
- Mesa, R. A., Hanson, C. A., Rajkumar, S. V., Schroeder, G., & Tefferi, A. (2000). Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, *96*(10), 3374-3380.
- Mesa, R. A., Verstovsek, S., Cervantes, F., Barosi, G., Reilly, J. T., Dupriez, B., et al. (2007). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res*, *31*(6), 737-740.
- Mesa, R. A., Verstovsek, S., Rivera, C., Pardanani, A., Hussein, K., Lasho, T., et al. (2009). 5-Azacitidine has limited therapeutic activity in myelofibrosis. *Leukemia*, *23*(1), 180-182.
- Miharada, K., Hiroyama, T., Sudo, K., Danjo, I., Nagasawa, T., & Nakamura, Y. (2008). Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. *J Cell Physiol*, *215*(2), 526-537.
- Miller, J. S., Verfaillie, C., & McGlave, P. (1992). The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture. *Blood*, *80*(9), 2182-2187.
- Moliterno, A. R., Hankins, W. D., & Spivak, J. L. (1998). Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*, *338*(9), 572-580.

- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, *132*(4), 598-611.
- Morrison, S. J., Uchida, N., & Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *11*, 35-71.
- Morrison, S. J., & Weissman, I. L. (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, *1*(8), 661-673.
- Muda, M., Theodosiou, A., Rodrigues, N., Boschert, U., Camps, M., Gillieron, C., et al. (1996). The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, *271*(44), 27205-27208.
- Mudgett, J. S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N. A., Yang, L., Gopal, S., et al. (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(19), 10454-10459.
- Murakami, K., Koide, M., Dumont, T. M., Russell, S. R., Tranmer, B. I., & Wellman, G. C. (2011). Subarachnoid Hemorrhage Induces Gliosis and Increased Expression of the Pro-inflammatory Cytokine High Mobility Group Box 1 Protein. *Transl Stroke Res*, *2*(1), 72-79.
- Nagata, Y., Muro, Y., & Todokoro, K. (1997). Thrombopoietin-induced polyploidization of bone marrow megakaryocytes is due to a unique regulatory mechanism in late mitosis. *J Cell Biol*, *139*(2), 449-457.
- Nakamura, Y., Arai, F., Iwasaki, H., Hosokawa, K., Kobayashi, I., Gomei, Y., et al. (2010). Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood*, *116*(9), 1422-1432.
- Naresh, K. N. (2010). Bone marrow trephine biopsy findings in primary myelofibrosis. *Am J Hematol*, *85*(12), 954-955.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P. L., Hauschka, P. V., Fahey, F., & Daley, G. Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, *460*(7252), 259-263.
- Nie, Y., Han, Y. C., & Zou, Y. R. (2008). CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *J Exp Med*, *205*(4), 777-783.
- Noort, W. A., Kruisselbrink, A. B., in't Anker, P. S., Kruger, M., van Bezooijen, R. L., de Paus, R. A., et al. (2002). Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, *30*(8), 870-878.
- Novack, D. V., & Teitelbaum, S. L. (2008). The osteoclast: friend or foe? *Annu Rev Pathol*, *3*, 457-484.
- O'Brien, H. A., & Horton, M. A. (1984). A short-term assay of myeloid precursor cells in man. *Exp Hematol*, *12*(7), 575-580.
- O'Farrell, A. M., Abrams, T. J., Yuen, H. A., Ngai, T. J., Louie, S. G., Yee, K. W., et al. (2003). SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*, *101*(9), 3597-3605.
- O'Keefe, C., McDevitt, M. A., & Maciejewski, J. P. (2010). Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood*, *115*(14), 2731-2739.
- Opferman, J. T. (2007). Life and death during hematopoietic differentiation. *Curr Opin Immunol*, *19*(5), 497-502.
- Opferman, J. T., Iwasaki, H., Ong, C. C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., et al. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science*, *307*(5712), 1101-1104.

- Oppliger Leibundgut, E., Horn, M. P., Brunold, C., Pfanner-Meyer, B., Marti, D., Hirsiger, H., et al. (2006). Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. *Haematologica*, *91*(11), 1465-1472.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., & Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, *273*(5272), 242-245.
- Osler, W. (1903). Chronic cyanosis, with polycythaemia and enlarged spleen: a new clinical entity. *American journal of the medical sciences*, *126*, 187-201.
- Ouwens, D. M., de Ruiter, N. D., van der Zon, G. C., Carter, A. P., Schouten, J., van der Burgt, C., et al. (2002). Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *Embo J*, *21*(14), 3782-3793.
- Pages, G., Guerin, S., Grall, D., Bonino, F., Smith, A., Anjuere, F., et al. (1999). Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*, *286*(5443), 1374-1377.
- Papayannopoulou, T., Nakamoto, B., Andrews, R. G., Lyman, S. D., & Lee, M. Y. (1997). In vivo effects of Flt3/Flk2 ligand on mobilization of hematopoietic progenitors in primates and potent synergistic enhancement with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, *90*(2), 620-629.
- Pardanani, A. D., Levine, R. L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R. A., Wadleigh, M., et al. (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*, *108*(10), 3472-3476.
- Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Della Porta, M. G., Boveri, E., Pascutto, C., et al. (2006). Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood*, *107*(9), 3676-3682.
- Patel, S. R., Hartwig, J. H., & Italiano, J. E., Jr. (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, *115*(12), 3348-3354.
- Pelus, L. M., Horowitz, D., Cooper, S. C., & King, A. G. (2002). Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines. *Crit Rev Oncol Hematol*, *43*(3), 257-275.
- Peters, M., Solem, F., Goldschmidt, J., Schirmacher, P., & Rose-John, S. (2001). Interleukin-6 and the soluble interleukin-6 receptor induce stem cell factor and Flt-3L expression in vivo and in vitro. *Exp Hematol*, *29*(2), 146-155.
- Pevny, L., Simon, M. C., Robertson, E., Klein, W. H., Tsai, S. F., D'Agati, V., et al. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature*, *349*(6306), 257-260.
- Piaggio, G., Rosti, V., Corselli, M., Bertolotti, F., Bergamaschi, G., Pozzi, S., et al. (2009). Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. *Blood*, *114*(14), 3127-3130.
- Pierelli, L., Bonanno, G., Rutella, S., Marone, M., Scambia, G., & Leone, G. (2001). CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma*, *42*(6), 1195-1206.
- Pikman, Y., Lee, B. H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B. L., Gozo, M., et al. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, *3*(7), e270.
- Pittenger, M. F. (2008). Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol*, *449*, 27-44.
- Platanias, L. C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood*, *101*(12), 4667-4679.



- Ploemacher, R. E., van der Sluijs, J. P., van Beurden, C. A., Baert, M. R., & Chan, P. L. (1991). Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*, *78*(10), 2527-2533.
- Prat, M., Demarquay, C., Frick, J., Dudoignon, N., Thierry, D., & Bertho, J. M. (2006). Use of flt3 ligand to evaluate residual hematopoiesis after heterogeneous irradiation in mice. *Radiat Res*, *166*(3), 504-511.
- Pruijt, J. F., Willemze, R., & Fibbe, W. E. (1999). Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8. *Curr Opin Hematol*, *6*(3), 152-158.
- Quintas-Cardama, A., Tong, W., Kantarjian, H., Thomas, D., Ravandi, F., Kornblau, S., et al. (2008). A phase II study of 5-azacitidine for patients with primary and post-essential thrombocythemia/polycythemia vera myelofibrosis. *Leukemia*, *22*(5), 965-970.
- Raaijmakers, M. H., & Scadden, D. T. (2008). Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*, *15*(4), 301-306.
- Rahman, I. (2002). Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharmacol*, *64*(5-6), 935-942.
- Raman, M., Chen, W., & Cobb, M. H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, *26*(22), 3100-3112.
- Rameshwar, P., Chang, V. T., & Gascon, P. (1996). Implication of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF-beta and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis. *Br J Haematol*, *93*(1), 22-29.
- Rameshwar, P., Denny, T. N., Stein, D., & Gascon, P. (1994). Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines. Potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *J Immunol*, *153*(6), 2819-2830.
- Rappold, I., Ziegler, B. L., Kohler, I., Marchetto, S., Rosnet, O., Birnbaum, D., et al. (1997). Functional and phenotypic characterization of cord blood and bone marrow subsets expressing FLT3 (CD135) receptor tyrosine kinase. *Blood*, *90*(1), 111-125.
- Ratajczak, M. Z. (2008). Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*, *15*(4), 293-300.
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Machalinski, B., Majka, M., Marlicz, W., Carter, A., et al. (1998). Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta-derived growth factor (PlGF) in regulating human haemopoietic cell growth. *Br J Haematol*, *103*(4), 969-979.
- Ravid, K., Beeler, D. L., Rabin, M. S., Ruley, H. E., & Rosenberg, R. D. (1991). Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(4), 1521-1525.
- Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J. M., & Jones, M. R. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol*, *190*(1), 7-20.
- Ray, R. J., Paige, C. J., Furlonger, C., Lyman, S. D., & Rottapel, R. (1996). Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *Eur J Immunol*, *26*(7), 1504-1510.
- Regan, C. P., Li, W., Boucher, D. M., Spatz, S., Su, M. S., & Kuida, K. (2002). Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(14), 9248-9253.
- Reilly, J. T. (2003). Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev*, *17*(4), 241-248.
- Reilly, J. T., Snowden, J. A., Spearing, R. L., Fitzgerald, P. M., Jones, N., Watmore, A., et al. (1997). Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol*, *98*(1), 96-102.

- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105-111.
- Rhodes, M. M., Kopsombut, P., Bondurant, M. C., Price, J. O., & Koury, M. J. (2005). Bcl-x(L) prevents apoptosis of late-stage erythroblasts but does not mediate the antiapoptotic effect of erythropoietin. *Blood*, *106*(5), 1857-1863.
- Ribeil, J. A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., et al. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*, *445*(7123), 102-105.
- Richmond, T. J., & Davey, C. A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*, *423*(6936), 145-150.
- Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene*, *26*(47), 6715-6723.
- Rojnuckarin, P., Drachman, J. G., & Kaushansky, K. (1999). Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood*, *94*(4), 1273-1282.
- Rollins, B. J. (1997). Chemokines. *Blood*, *90*(3), 909-928.
- Romanov, Y. A., Darevskaya, A. N., Merzlikina, N. V., & Buravkova, L. B. (2005). Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*, *140*(1), 138-143.
- Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A. J., et al. (2011). Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(6), 2378-2383.
- Rosenbauer, F., & Tenen, D. G. (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, *7*(2), 105-117.
- Rosnet, O., Buhring, H. J., deLapeyriere, O., Beslu, N., Lavagna, C., Marchetto, S., et al. (1996). Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol*, *95*(3-4), 218-223.
- Rosnet, O., Mattei, M. G., Marchetto, S., & Birnbaum, D. (1991). Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics*, *9*(2), 380-385.
- Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M. J., Marchetto, S., Tonnelle, C., Toiron, Y., et al. (1993). Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood*, *82*(4), 1110-1119.
- Rosti, V., Massa, M., Vannucchi, A. M., Bergamaschi, G., Campanelli, R., Pecci, A., et al. (2007). The expression of CXCR4 is down-regulated on the CD34+ cells of patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood Cells Mol Dis*, *38*(3), 280-286.
- Rotman, G., & Shiloh, Y. (1997). Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays*, *19*(10), 911-917.
- Rouyez, M. C., 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.
- Saba-El-Leil, M. K., Vella, F. D., Vernay, B., Voisin, L., Chen, L., Labrecque, N., et al. (2003). An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development. *EMBO Rep*, *4*(10), 964-968.
- Sabapathy, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M., & Wagner, E. F. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev*, *89*(1-2), 115-124.
- Sabio, G., Arthur, J. S., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., et al. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *Embo J*, *24*(6), 1134-1145.

- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, *131*(2), 324-336.
- Sachs, L. (1996). The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(10), 4742-4749.
- Salati, S., Zini, R., Bianchi, E., Testa, A., Mavilio, F., Manfredini, R., et al. (2008). Role of CD34 antigen in myeloid differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, *26*(4), 950-959.
- Santos, F. P., Kantarjian, H. M., Jain, N., Manshouri, T., Thomas, D. A., Garcia-Manero, G., et al. (2010). Phase 2 study of CEP-701, an orally available JAK2 inhibitor, in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Blood*, *115*(6), 1131-1136.
- Sargin, B., Choudhary, C., Crosetto, N., Schmidt, M. H., Grundler, R., Rensinghoff, M., et al. (2007). Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood*, *110*(3), 1004-1012.
- Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C. J., Lawrence, H. J., Largman, C., Lansdorp, P. M., et al. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev*, *9*(14), 1753-1765.
- Savona, M., & Talpaz, M. (2008). Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*, *8*(5), 341-350.
- Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, *19*(4), 2435-2444.
- Schelling, M. E. (1991). FGF mediation of coronary angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, *638*, 467-469.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., et al. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, *13*(5), 607-619.
- Schulze, H., Korpil, M., Hurov, J., Kim, S. W., Zhang, J., Cantley, L. C., et al. (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, *107*(10), 3868-3875.
- Seita, J., Ema, H., Oechara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., et al. (2007). Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(7), 2349-2354.
- Shahjahan, M., Dunphy, C. H., Ewton, A., Zu, Y., Monzon, F. A., Rice, L., et al. (2008). p38 mitogen-activated protein kinase has different degrees of activation in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol*, *130*(4), 635-641.
- Shen, L., Kondo, Y., Guo, Y., Zhang, J., Zhang, L., Ahmed, S., et al. (2007). Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet*, *3*(10), 2023-2036.
- Shi, J., Zhao, Y., Ishii, T., Hu, W., Sozer, S., Zhang, W., et al. (2007). Effects of chromatin-modifying agents on CD34+ cells from patients with idiopathic myelofibrosis. *Cancer Res*, *67*(13), 6417-6424.
- Sidorenko, S. P., & Clark, E. A. (2003). The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol*, *4*(1), 19-24.
- Sigurjonsson, O. E., Gudmundsson, K. O., Haraldsdottir, V., Rafnar, T., & Gudmundsson, S. (2002). Flt3/Flk-2-ligand in synergy with thrombopoietin delays megakaryocyte

- development and increases the numbers of megakaryocyte progenitor cells in serum-free cultures initiated with CD34+ cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(2), 389-400.
- Siminovitch, L., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Physiol*, 62, 327-336.
- Sintes, J., Romero, X., Marin, P., Terhorst, C., & Engel, P. (2008). Differential expression of CD150 (SLAM) family receptors by human hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp Hematol*, 36(9), 1199-1204.
- Small, D. (2006). FLT3 mutations: biology and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 178-184.
- Sohn, S. J., Sarvis, B. K., Cado, D., & Winoto, A. (2002). ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem*, 277(45), 43344-43351.
- Solanilla, A., Dechanet, J., El Andaloussi, A., Dupouy, M., Godard, F., Chabrol, J., et al. (2000). CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood*, 95(12), 3758-3764.
- Solanilla, A., Grosset, C., Duchez, P., Legembre, P., Pitard, V., Dupouy, M., et al. (2003). Flt3-ligand induces adhesion of haematopoietic progenitor cells via a very late antigen (VLA)-4- and VLA-5-dependent mechanism. *Br J Haematol*, 120(5), 782-786.
- Solanilla, A., Grosset, C., Lemercier, C., Dupouy, M., Mahon, F. X., Schweitzer, K., et al. (2000). Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell. *Leukemia*, 14(1), 153-162.
- Solar, G. P., Kerr, W. G., Zeigler, F. C., Hess, D., Donahue, C., de Sauvage, F. J., et al. (1998). Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood*, 92(1), 4-10.
- Srinivasa, S. P., & Doshi, P. D. (2002). Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways cooperate in mediating cytokine-induced proliferation of a leukemic cell line. *Leukemia*, 16(2), 244-253.
- Srour, E. F., Zanjani, E. D., Cornetta, K., Traycoff, C. M., Flake, A. W., Hedrick, M., et al. (1993). Persistence of human multilineage, self-renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood*, 82(11), 3333-3342.
- Stahl, N., & Yancopoulos, G. D. (1993). The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell*, 74(4), 587-590.
- Steunou, V., Le Bousse-Kerdiles, M. C., Colin-Micouin, A., Clay, D., Chevillard, S., & Martyre, M. C. (2003). Altered transcription of the stem cell leukemia gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia*, 17(10), 1998-2006.
- Stier, S., Cheng, T., Dombkowski, D., Carlesso, N., & Scadden, D. T. (2002). Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, 99(7), 2369-2378.
- Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grunewald, E., et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*, 201(11), 1781-1791.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977-988.
- Sunters, A., McCluskey, J., & Grigoriadis, A. E. (1998). Control of cell cycle gene expression in bone development and during c-Fos-induced osteosarcoma formation. *Dev Genet*, 22(4), 386-397.
- Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Eaves, A. C., Dragowska, W., & Lansdorp, P. M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*, 74(5), 1563-1570.
- Taksin, A. L., Couedic, J. P., Dusanter-Fourt, I., Masse, A., Giraudier, S., Katz, A., et al. (1999). Autonomous megakaryocyte growth in essential thrombocythemia and

- idiopathic myelofibrosis is not related to a c-mpl mutation or to an autocrine stimulation by Mpl-L. *Blood*, 93(1), 125-139.
- Tamura, K., Sudo, T., Senftleben, U., Dadak, A. M., Johnson, R., & Karin, M. (2000). Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, 102(2), 221-231.
- Tanaka, S., Nakamura, K., Takahashi, N., & Suda, T. (2005). Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev*, 208, 30-49.
- Tanoue, T., Moriguchi, T., & Nishida, E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *J Biol Chem*, 274(28), 19949-19956.
- Tanoue, T., Yamamoto, T., Maeda, R., & Nishida, E. (2001). A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J Biol Chem*, 276(28), 26629-26639.
- Taylor, S. M., & Jones, P. A. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 17(4), 771-779.
- Tefferi, A. (2008a). The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*, 22(1), 3-13.
- Tefferi, A. (2008b). JAK and MPL mutations in myeloid malignancies. *Leuk Lymphoma*, 49(3), 388-397.
- Tefferi, A. (2010). Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*, 24(6), 1128-1138.
- Tefferi, A., Mesa, R. A., Nagorney, D. M., Schroeder, G., & Silverstein, M. N. (2000). Splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 223 patients. *Blood*, 95(7), 2226-2233.
- Tefferi, A., Mesa, R. A., Schroeder, G., Hanson, C. A., Li, C. Y., & Dewald, G. W. (2001). Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*, 113(3), 763-771.
- Tefferi, A., Thiele, J., Orazi, A., Kvasnicka, H. M., Barbui, T., Hanson, C. A., et al. (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*, 110(4), 1092-1097.
- 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), 1356-1363.
- Tefferi, A., & Vainchenker, W. (2011). Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*, 29(5), 573-582.
- Teofili, L., Martini, M., Iachininoto, M. G., Capodimonti, S., Nuzzolo, E. R., Torti, L., et al. (2011). Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2V617F mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 117(9), 2700-2707.
- Thiele, J., & Kvasnicka, H. M. (2003). Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol*, 82(3), 148-152.
- Thiele, J., & Kvasnicka, H. M. (2005). Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. *Semin Oncol*, 32(4), 380-394.

- Thiele, J., & Kvasnicka, H. M. (2006). Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings—a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol*, *85*(4), 226-232.
- Thiele, J., Kvasnicka, H. M., & Czeslick, C. (2002). CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification between spleen and bone marrow tissue. *Ann Hematol*, *81*(2), 86-89.
- Thiele, J., Kvasnicka, H. M., Zankovich, R., & Diehl, V. (2001). Clinical and morphological criteria for the diagnosis of prefibrotic idiopathic (primary) myelofibrosis. *Ann Hematol*, *80*(3), 160-165.
- Thoren, L. A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J. M., Jensen, C. T., Qian, H., et al. (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J Immunol*, *180*(4), 2045-2053.
- Till, J. E., & McCulloch, E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, *14*, 213-222.
- Tipping, A. J., Pina, C., Castor, A., Hong, D., Rodrigues, N. P., Lazzari, L., et al. (2009). High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. *Blood*, *113*(12), 2661-2672.
- To, L. B., Haylock, D. N., Simmons, P. J., & Juttner, C. A. (1997). The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood*, *89*(7), 2233-2258.
- Tomita, K., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2003). The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release. *Biochem Biophys Res Commun*, *301*(2), 572-577.
- Tripodo, C., Di Bernardo, A., Ternullo, M. P., Guarnotta, C., Porcasi, R., Ingraio, S., et al. (2009). CD146(+) bone marrow osteoprogenitors increase in the advanced stages of primary myelofibrosis. *Haematologica*, *94*(1), 127-130.
- Trumpp, A., Essers, M., & Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, *10*(3), 201-209.
- Tsang, A. P., Visvader, J. E., Turner, C. A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M. J., et al. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, *90*(1), 109-119.
- Turner, A. M., Lin, N. L., Issarachai, S., Lyman, S. D., & Broudy, V. C. (1996). FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood*, *88*(9), 3383-3390.
- Turner, B. M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol*, *9*(1), 2-6.
- Uddin, S., Lekmine, F., Sharma, N., Majchrzak, B., Mayer, I., Young, P. R., et al. (2000). The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem*, *275*(36), 27634-27640.
- Uddin, S., Majchrzak, B., Woodson, J., Arunkumar, P., Alsayed, Y., Pine, R., et al. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons. *J Biol Chem*, *274*(42), 30127-30131.
- van Dam, H., & Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*, *20*(19), 2453-2464.
- Vannucchi, A. M. (2009). How do JAK2-inhibitors work in myelofibrosis: an alternative hypothesis. *Leuk Res*, *33*(12), 1581-1583.
- Vannucchi, A. M., Bianchi, L., Cellai, C., Paoletti, F., Rana, R. A., Lorenzini, R., et al. (2002). Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). *Blood*, *100*(4), 1123-1132.
- Vaquez, H. (1892). On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocythosis. *Comp Rend Soc Biol*, *12*.

- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, *114*(5), 937-951.
- Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., et al. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*, *6*(11), 1278-1281.
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., & Alitalo, K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*, *60*(2), 203-212.
- Vener, C., Fracchiolla, N. S., Gianelli, U., Calori, R., Radaelli, F., Iurlo, A., et al. (2008). Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood*, *111*(4), 1862-1865.
- Verfaillie, C., Blakolmer, K., & McGlave, P. (1990). Purified primitive human hematopoietic progenitor cells with long-term in vitro repopulating capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J Exp Med*, *172*(2), 509-502.
- Verfaillie, C. M. (1992). Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood*, *79*(11), 2821-2826.
- Verma, A., Deb, D. K., Sassano, A., Kambhampati, S., Wickrema, A., Uddin, S., et al. (2002). Cutting edge: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway mediates cytokine-induced hemopoietic suppression in aplastic anemia. *J Immunol*, *168*(12), 5984-5988.
- Verstovsek, S., Estey, E., Manshour, T., Keating, M., Kantarjian, H., Giles, F. J., et al. (2001). High expression of the receptor tyrosine kinase Tie-1 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*, *42*(3), 511-516.
- Villagra, A., Sotomayor, E. M., & Seto, E. (2010). Histone deacetylases and the immunological network: implications in cancer and inflammation. *Oncogene*, *29*(2), 157-173.
- Villevall, J. L., Cohen-Solal, K., Tulliez, M., Giraudier, S., Guichard, J., Burstein, S. A., et al. (1997). High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*, *90*(11), 4369-4383.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D. W., Katavic, V., Lorenzo, J., & Aguila, H. L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*, *103*(9), 3258-3264.
- Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Norol, F., Guichard, J., Cramer, E., Vainchenker, W., et al. (1998). Compared effects of Mpl ligand and other cytokines on human MK differentiation. *Stem Cells*, *16 Suppl 2*, 37-51.
- Vitrat, N., Cohen-Solal, K., Pique, C., Le Couedic, J. P., Norol, F., Larsen, A. K., et al. (1998). Endomitosis of human megakaryocytes are due to abortive mitosis. *Blood*, *91*(10), 3711-3723.
- Vogt, P. K. (2001). Jun, the oncoprotein. *Oncogene*, *20*(19), 2365-2377.
- Voisin, L., Saba-El-Leil, M. K., Julien, C., Fremin, C., & Meloche, S. (2010). Genetic demonstration of a redundant role of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 mitogen-activated protein kinases in promoting fibroblast proliferation. *Mol Cell Biol*, *30*(12), 2918-2932.
- Wagner-Ballon, O., Chagraoui, H., Prina, E., Tulliez, M., Milon, G., Raslova, H., et al. (2006). Monocyte/macrophage dysfunctions do not impair the promotion of myelofibrosis by high levels of thrombopoietin. *J Immunol*, *176*(11), 6425-6433.

- Wang, J., Fernald, A. A., Anastasi, J., Le Beau, M. M., & Qian, Z. (2010). Haploinsufficiency of *Apc* leads to ineffective hematopoiesis. *Blood*, *115*(17), 3481-3488.
- Wang, J. C., Chen, C., Dumlao, T., Naik, S., Chang, T., Xiao, Y. Y., et al. (2008). Enhanced histone deacetylase enzyme activity in primary myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*, *49*(12), 2321-2327.
- Wang, J. C., Chen, W., Nallusamy, S., Chen, C., & Novetsky, A. D. (2002). Hypermethylation of the P15INK4b and P16INK4a in agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and AMM in leukaemic transformation. *Br J Haematol*, *116*(3), 582-586.
- Wang, J. C., Hemavathy, K., Charles, W., Zhang, H., Dua, P. K., Novetsky, A. D., et al. (2004). Osteosclerosis in idiopathic myelofibrosis is related to the overproduction of osteoprotegerin (OPG). *Exp Hematol*, *32*(10), 905-910.
- Wang, J. C., Lang, H. D., Lichter, S., Weinstein, M., & Benn, P. (1992). Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol*, *80*(2), 184-188.
- Wang, N., Satoskar, A., Faubion, W., Howie, D., Okamoto, S., Feske, S., et al. (2004). The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med*, *199*(9), 1255-1264.
- Wang, X., Zhang, W., Ishii, T., Sozer, S., Wang, J., Xu, M., et al. (2009). Correction of the abnormal trafficking of primary myelofibrosis CD34+ cells by treatment with chromatin-modifying agents. *Cancer Res*, *69*(19), 7612-7618.
- Watanoto, K., Towatari, M., Ozawa, Y., Miyata, Y., Okamoto, M., Abe, A., et al. (2003). Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*, *22*(57), 9176-9184.
- Watowich, S. S., Wu, H., Socolovsky, M., Klingmuller, U., Constantinescu, S. N., & Lodish, H. F. (1996). Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *12*, 91-128.
- Weisel, K. C., Yildirim, S., Schweikle, E., Kanz, L., & Mohle, R. (2009). Regulation of FLT3 and its ligand in normal hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol*, *88*(3), 203-211.
- Wickenhauser, C., Hillienhof, A., Jungheim, K., Lorenzen, J., Ruskowski, H., Hansmann, M. L., et al. (1995). Detection and quantification of transforming growth factor beta (TGF-beta) and platelet-derived growth factor (PDGF) release by normal human megakaryocytes. *Leukemia*, *9*(2), 310-315.
- Wickrema, A., & Crispino, J. D. (2007). Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene*, *26*(47), 6803-6815.
- Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., et al. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, *18*(22), 2747-2763.
- Wilson, A., & Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, *6*(2), 93-106.
- Winkler, I. G., & Levesque, J. P. (2006). Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol*, *34*(8), 996-1009.
- Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., et al. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, *116*(23), 4815-4828.
- Wisdom, R. (1999). AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res*, *253*(1), 180-185.
- Witowsky, J. A., & Johnson, G. L. (2003). Ubiquitylation of MEKK1 inhibits its phosphorylation of MKK1 and MKK4 and activation of the ERK1/2 and JNK pathways. *J Biol Chem*, *278*(3), 1403-1406.



- Wodnar-Filipowicz, A., Lyman, S. D., Gratwohl, A., Tichelli, A., Speck, B., & Nissen, C. (1996). Flt3 ligand level reflects hematopoietic progenitor cell function in aplastic anemia and chemotherapy-induced bone marrow aplasia. *Blood*, *88*(12), 4493-4499.
- Wolf, N. S., Kone, A., Priestley, G. V., & Bartelmez, S. H. (1993). In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol*, *21*(5), 614-622.
- Xu, M., Bruno, E., Chao, J., Huang, S., Finazzi, G., Fruchtman, S. M., et al. (2005). Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood*, *105*(11), 4508-4515.
- Yang, D. D., Conze, D., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Davis, R. J., Rincon, M., et al. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity*, *9*(4), 575-585.
- Yang, D. D., Kuan, C. Y., Whitmarsh, A. J., Rincon, M., Zheng, T. S., Davis, R. J., et al. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, *389*(6653), 865-870.
- Yang, M., Khachigian, L. M., Hicks, C., Chesterman, C. N., & Chong, B. H. (1997). Identification of PDGF receptors on human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines. *Thromb Haemost*, *78*(2), 892-896.
- Yao, Y., Li, W., Wu, J., Germann, U. A., Su, M. S., Kuida, K., et al. (2003). Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(22), 12759-12764.
- Yarden, Y., Escobedo, J. A., Kuang, W. J., Yang-Feng, T. L., Daniel, T. O., Tremble, P. M., et al. (1986). Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, *323*(6085), 226-232.
- Yarden, Y., Kuang, W. J., Yang-Feng, T., Coussens, L., Munemitsu, S., Dull, T. J., et al. (1987). Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*, *6*(11), 3341-3351.
- Yin, T., & Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*, *116*(5), 1195-1201.
- Yokota, S., Kiyoi, H., Nakao, M., Iwai, T., Misawa, S., Okuda, T., et al. (1997). Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*, *11*(10), 1605-1609.
- Yong, H. Y., Koh, M. S., & Moon, A. (2009). The p38 MAPK inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, *18*(12), 1893-1905.
- Yoon, S., & Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, *24*(1), 21-44.
- Yoshida, M., Tsuji, K., Ebihara, Y., Muraoka, K., Tanaka, R., Miyazaki, H., et al. (1997). Thrombopoietin alone stimulates the early proliferation and survival of human erythroid, myeloid and multipotential progenitors in serum-free culture. *Br J Haematol*, *98*(2), 254-264.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*, *1*(6), 685-697.
- Yoshimoto, G., Miyamoto, T., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Iino, T., Rocnik, J. L., Kikushige, Y., et al. (2009). FLT3-ITD up-regulates MCL-1 to promote survival of stem cells in acute myeloid leukemia via FLT3-ITD-specific STAT5 activation. *Blood*, *114*(24), 5034-5043.

- Youssefian, T., & Cramer, E. M. (2000). Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*, 95(12), 4004-4007.
- Zauli, G., Visani, G., Catani, L., Vianelli, N., Gugliotta, L., & Capitani, S. (1993). Reduced responsiveness of bone marrow megakaryocyte progenitors to platelet-derived transforming growth factor beta 1, produced in normal amount, in patients with essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*, 83(1), 14-20.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W. G., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960), 836-841.
- Zhang, Y., Sun, S., Wang, Z., Thompson, A., Kaluzhny, Y., Zimmet, J., et al. (2002). Signaling by the Mpl receptor involves IKK and NF-kappaB. *J Cell Biochem*, 85(3), 523-535.
- Zheng, R., Levis, M., Piloto, O., Brown, P., Baldwin, B. R., Gorin, N. C., et al. (2004). FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 103(1), 267-274.
- Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S., et al. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), 335-343.
- Zhou, S., Schuetz, J. D., Bunting, K. D., Colapietro, A. M., Sampath, J., Morris, J. J., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*, 7(9), 1028-1034.
- Zuluaga, S., Alvarez-Barrientos, A., Gutierrez-Uzquiza, A., Benito, M., Nebreda, A. R., & Porras, A. (2007). Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell Signal*, 19(1), 62-74.
- Zumkeller, W. (2002). The insulin-like growth factor system in hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma*, 43(3), 487-491.



# **ANNEXES**



## ***1/ Implication de l'interleukine 8 et de ses récepteurs dans la dysmégacaryopoïèse des patients atteints de myélofibrose primitive***

**« IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis ».**

**Emadi S, Clay D, Desterke C, Guerton B, Maquarre E, Charpentier A, Jasmin C, Le Bousse-Kerdilès MC.**

**Blood. 2005 Jan 15;105(2):464-73.**

L'Il-8 est une cytokine inflammatoire principalement sécrétée par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales et participe au processus de mobilisation cellulaire. Le taux d'interleukine 8 circulant est fortement augmenté chez les patients atteints de myélofibrose primitive. De plus, les mégacaryocytes des patients sur-expriment les récepteurs CXCR1 et CXCR2 de l'Il-8. Au cours de ce travail, nous avons montré que le couple Il-8/récepteurs participent à la dysmégacaryopoïèse des patients atteints de Myélofibrose Primitive. Son rôle dans notre travail a été détaillé dans la discussion de ma thèse.



## IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis

Sharareh Emadi, Denis Clay, Christophe Desterke, Bernadette Guerton, Eliane Maquarre, Agnès Charpentier, Claude Jasmin, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, for the French INSERM Research Network on MMM

**Myeloproliferation, myelofibrosis, and neoangiogenesis are the 3 major intrinsic pathophysiologic features of myeloid metaplasia with myelofibrosis (MMM). The myeloproliferation is characterized by an increased number of circulating CD34<sup>+</sup> progenitors with the prominent amplification of dystrophic megakaryocytic (MK) cells and myeloid metaplasia in the spleen and liver. The various biologic activities of interleukin 8 (IL-8) in hematopoietic progenitor proliferation and mobilization as well as in neoangiogenesis**

**prompted us to analyze its potential role in MMM. We showed that the level of IL-8 chemokine is significantly increased in the serum of patients and that various hematopoietic cells, including platelets, participate in its production. In vitro inhibition of auto-crine IL-8 expressed by CD34<sup>+</sup> cells with either a neutralizing or an antisense anti-IL-8 treatment increases the proliferation of MMM CD34<sup>+</sup>-derived cells and stimulates their MK differentiation. Moreover, addition of neutralizing anti-IL-8 receptor (CXC che-**

**mokine receptor 1 [CXCR1] or 2 [CXCR2]) antibodies to MMM CD34<sup>+</sup> cells cultured under MK liquid culture conditions increases the proliferation and differentiation of MMM CD41<sup>+</sup> MK cells and restores their polyploidization. Our results suggest that IL-8 and its receptors participate in the altered MK growth that features MMM and open new therapeutic prospects for this still incurable disease. (Blood. 2005;105:464-473)**

© 2005 by The American Society of Hematology

### Introduction

Myeloid metaplasia with myelofibrosis (MMM), a chronic myeloproliferative disorder also called idiopathic myelofibrosis or agnogenic myeloid metaplasia, is a clonal process with a hematopoietic stem cell/progenitor origin. Myeloproliferation with inefficient hematopoiesis and bone marrow fibrosis are the main biologic hallmarks of this rare disease.<sup>1,2</sup> Neoangiogenesis is also frequently observed. Cytogenetic and enzymatic studies have demonstrated the clonal nature of the hematopoietic progenitor (HP) expansion and the polyclonality of the neighboring proliferating fibroblasts.<sup>3-5</sup> Bone marrow fibrosis is considered a reactive process resulting from the stimulation of nonclonal fibroblasts by growth factors derived from necrotic and dysplastic megakaryocytes.<sup>6-8</sup>

The myeloproliferative process is characterized by an increased number of HPs<sup>9</sup> with a prominent proliferation of the megakaryocytic (MK) cells that exhibited a dysplastic appearance created by their plump lobulation of nuclei and the disturbance of nuclear/cytoplasmic maturation.<sup>10</sup> This process is associated with a tremendous CD34<sup>+</sup> HP mobilization from the bone marrow (BM) to spleen and liver through to the peripheral blood (PB).<sup>11,12</sup> While the underlying molecular genetic alterations remain unknown, recent data led us to propose a model integrating alterations in the expression and function of MK nuclear regulatory factors and in the complex network of humoral and cellular interactions between

hematopoietic cells and stroma in the pathogenetic mechanisms of the disease.<sup>13,14</sup>

Interleukin 8 (IL-8) is a member of the family of chemokines related by a CXC motif. It binds to two 7-transmembrane-domain CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) and 2 (CXCR2) receptors that belong to the superfamily of G protein-coupled receptors with high affinity.<sup>15-17</sup> CXCR1 also binds to granulocyte chemotactic protein 2 (GCP-2), neutrophil-activating peptide 2 (NAP2), and epithelial neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78) with low affinity,<sup>18,19</sup> while CXCR2 responds to additional chemokines such as those of the growth-related oncogene (GRO) family.<sup>20,21</sup> IL-8 is produced in vitro by many cell types, including fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, neutrophils, mast cells, monocytes, macrophages, and megakaryocytes,<sup>22-25</sup> and exhibits several biologic activities. IL-8 is a major factor in acute inflammation, acting as a potent chemoattractant and activator of neutrophils by activation of CXCR1 and CXCR2.<sup>26-28</sup> IL-8 administration in mice induces a rapid neutrophilia and a concurrent HP mobilization.<sup>29-31</sup> Similarly, IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) can modulate the homing of HPs by affecting the secretion of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) proteases by BM and PB CD34<sup>+</sup> cells.<sup>32</sup> IL-8 also modulates myelopoiesis by suppressing the myeloid progenitor

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unit 602, André Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France; Department of Chemical and Material Engineering (CME), Arizona State University, Tempe AZ; and the Laboratory of Hematology, Saint-Vincent Hospital, Groupe Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Lille Cedex, France.

Submitted December 29, 2003; accepted September 7, 2004. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, September 28, 2004; DOI 10.1182/blood-2003-12-4415.

A complete list of the members of the French INSERM Research Network on MMM appears in the "Appendix."

Supported by grants from the Association Nouvelles Recherches Biomédicales (ANRB), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) no. 9806, and from Groupement d'Interet Scientifique (GIS)-Institut des Maladies Rares no. 03/GIS/PB/SJ/n°35. S.E. was awarded a fellowship from the Fondation de France.

**Reprints:** M. C. Le Bousse-Kerdilès, INSERM U602, André Lwoff Institute, Paul Brousse Hospital, 14, Avenue Paul Vaillant Couturier, 94800 Villejuif, France; e-mail: lebousse@vjf.inserm.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2005 by The American Society of Hematology



proliferation.<sup>33,34</sup> It is suggested that this suppressive activity is mediated via the expression of CXCR2 receptor on BM-derived HPs.<sup>20,35</sup> In contrast to platelet factor 4 (PF4), IL-8 that contains the ELR-CXC chemokine motif induces endothelial chemotaxis and proliferation in vitro and angiogenesis in vivo.<sup>36,37</sup>

The various biologic activities of IL-8 prompted us to analyze its role in the pathogenesis of MMM, a disease in which myeloproliferation, myelofibrosis, and neoangiogenesis are the major intrinsic pathophysiologic characteristics. In the present study, we showed that the IL-8 level is strongly increased in the serum of patients with MMM and that its expression is partly related to hematopoietic cells including platelets. By using antisense and antibodies against IL-8, we showed its involvement in the myeloproliferative process observed in patients with MMM. Using a similar strategy, we also demonstrated the participation of CXCR1 and CXCR2 receptors in the altered MMM MK proliferation, differentiation, and ploidyization.

## Materials and methods

### Monoclonal antibodies (mAbs)

The mAbs directed against CD14 (RM052-phycoerythrin/RM052-fluorescein isothiocyanate [RM052-PE/RM052-FITC]), CD38 (T16-FITC), CD41/glycoprotein IIb (CD41/GPIIb) (P2-FITC), CD42a/GPIX (SZ1-FITC), CD42b/GPIb (SZ2-FITC), CD117/c-kit (95C3-PE), glycoporphin A (GPA) (11E4B-7-6-FITC) were obtained from Beckman Coulter-Immunotech (Marseille, France). Mouse antihuman CD15 (Leu-M1-FITC), CD34 8G12-peridinin chlorophyll-alpha protein (8G12-PerCP), CD62P (AK-4-PE), IL-8RA/CXCR1 (5A12-PE), IL-8RB/CXCR2 (6C6-PE), and CD90/thymus cell antigen-1 (Thy1) (5E10-PE) were from Becton Dickinson/Pharmingen (Le Pont de Claix, France); CD41 (5B12 unconjugated or PE) and CD61 (Y2/51-FITC) were from DakoCytomation (Trappes, France). Murine immunoglobulin Gs (IgGs) of the same isotype were used as negative controls. The unconjugated CD41 was revealed with the use of goat anti-mouse-FITC (GAM-FITC) as the secondary antibody (Beckman Coulter-Immunotech). Mouse antihuman CD9 (SYB-1) was a gift from C. Boucheix (Paul Brousse Hospital, Villejuif, France).

### Sample collections

Since fibrosis precludes marrow aspiration, samples were obtained from the PB of 37 patients with MMM (age,  $65 \pm 9$  years) not receiving chemotherapy at the time of the study. Diagnosis was established according to the Polycythemia Vera Study Group (PVSG) clinical and hematologic criteria.<sup>38</sup> Normal bone marrow (NBM) and peripheral blood (NPB) samples were obtained from 8 healthy individuals undergoing hip prosthesis surgery and from 32 healthy unmobilized subjects, respectively, with their informed consent.

### Cell preparations

Mononuclear cells were isolated either from NBM or NPB or from the PB of patients with MMM through Ficoll centrifugation, and CD34<sup>+</sup> cells were recovered by the immunomagnetic magnetic-activated cell sorting (MACS) system (Miltenyi Biotec, Paris, France) as previously described.<sup>39</sup> This procedure gave rise to more than 98% pure viable CD34<sup>+</sup> cells. Washed platelets were obtained as previously described.<sup>40</sup>

### Flow cytometry analysis

Purified CD34<sup>+</sup> cells were costained with fluorochrome-conjugated mAbs directed against the CD34 antigen (8G12-PerCP) and against other antigens to allow flow cytometric analysis using a 4-color FACScalibur (Becton Dickinson) as already described.<sup>41</sup> When used, the biotin-labeled mAb was revealed by allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin. For IL-8 intracellular detection, whole blood cells and freshly purified CD34<sup>+</sup> were

incubated for 5 hours with brefeldin A (Golgistop; Becton Dickinson/Pharmingen) (10  $\mu$ g/mL, 4°C). After being washed in phosphate-buffered saline (PBS) 1  $\times$  containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), cells were surface stained with CD14-, CD15-, CD41-, CD42b-, GPA-, CD42a-FITC or their isotype controls and subjected to intracellular IL-8 labeling by means of Cytofix/Cytoperm kit and a PE-mouse antihuman IL-8 antibody (Becton Dickinson/Pharmingen). For each sample,  $5 \times 10^4$  events were acquired, stored in list mode data files, and analyzed with Cellquest (Becton Dickinson) or WinMDI (Joe Trotter; The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) softwares.

### IL-8 immunostaining

PB mononuclear cells (PBMcs) ( $8 \times 10^4$ ) were smeared onto glass slides by cytospin centrifugation and permeabilized with 100% methanol for 20 minutes at 4°C. After being washed, cells were coincubated with anti-CD41-FITC (P2; Beckman Coulter-Immunotech) and anti-IL-8-PE antibodies (G265-8; Pharmingen) for 45 minutes in the dark at room temperature. After being washed, cells were incubated for 30 minutes with a 1:200 dilution of goat anti-IgG2b mouse antibody (Alexa fluor 595; BD Biosciences, le Pont de Claix, France), washed again 3 times in PBS/0.5% BSA for 5 minutes, mounted on a slide with Moviol, and photographed under a fluorescence microscope (Leica DMR with 200  $\times$ /0.30 objective lens; Leica, Heidelberg, Germany) (magnification  $\times$  200). Images were captured with an LEI-750 CE camera and LIDA vol. 54 software (Leica). Images were further processed with Adobe Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA).

### IL-8 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Detection of IL-8 in sera and in culture media was assessed by means of an IL-8 ELISA kit according to the manufacturer's description (Beckman Coulter-Immunotech).

### CD34<sup>+</sup> and MK liquid cultures

Purified CD34<sup>+</sup> cells were cultured in a serum-free medium either containing IL-1, IL-3, IL-6, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), Flt3, stem cell factor (SCF), erythropoietin (Epo), thrombopoietin (Tpo) (RM-BO2; Mabio-International, Tourcoing, France) for their granulo-macrophagic, erythroid, and MK differentiation (9-factor [9F] medium) or containing IL-3, IL-6, IL-11, Tpo (RM-BO3; RTM/Mabio-International) for specific MK differentiation (MK medium). Cells were incubated in the presence or absence of 10  $\mu$ g/mL antihuman IL-8-neutralizing polyclonal goat antibody (AF-208-NA; R&D Systems, Abingdon, United Kingdom), antihuman IL-8RA/CXCR1 (5A12-PE), or IL-8RB/CXCR2 (6C6-PE). Isotypic immunoglobulins were used as controls. On days 7 to 14 of the culture, cells were harvested, counted, and labeled with mAbs directed against surface differentiation markers or were prepared for cell cycle analysis. Supernatants, smears, and pellets were prepared for ELISA, cytologic, and molecular analysis.

### Clonogenic MK colony-forming unit (CFU-MK) progenitors

MK progenitors were assessed in collagen matrix by means of the DM-CB00 $\Omega$  kit (Mabio-International). CD34<sup>+</sup> cells ( $5 \times 10^3$ ) were incubated in 1 mL serum-free collagen medium supplemented by IL-3 (2.5 ng) (Mabio-International), IL-6 (10 ng), and Tpo (50 ng) (Pepro-tech, Tebu International, Le Perray en Yvelines, France) with or without anti-CXCR1<sup>-</sup> or anti-CXCR2<sup>-</sup> neutralizing antibodies (10  $\mu$ g/mL). IgG isotype was used as control (Pharmingen). Duplicate cultures were incubated for 10 to 12 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Standard May-Grünwald-Giemsa staining and immunocytochemistry using a CD41 mAb-FITC were performed for reliable and accurate identification of MK colonies.

### MK ploidy quantification

DNA content of MK CD41<sup>+</sup> cells (controlled by flow cytometry greater than 95% to 97% pure) was measured by propidium iodide (PI) staining on

day 12 of the MK liquid culture. Cells ( $5 \times 10^4$ ) were fixed in 70% ice-cold ethanol overnight at  $-20^\circ\text{C}$  and incubated for 30 minutes in the dark at  $4^\circ\text{C}$  in PBS containing PI ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Molecular Probes Europe, Breda, The Netherlands) and RNase A ( $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Cells were gated and analyzed for ploidy and S phase percentages with WinMDI and Cylchred freewares (Nigel Garrahan; [www.uwcm.ac.uk/uwcm/hg/hoy](http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/hg/hoy)).

### Antisense (AS) oligonucleotide treatment

To verify the oligonucleotide nontoxicity,  $\text{CD}34^+$  cells were incubated for 7 days in liquid medium containing cytokines and IL-8 antisense or control CG-matched randomized-sequence phosphorothioate oligonucleotides (Biognostik, Göttingen, Germany) at 2, 5, and  $10 \mu\text{M}$  concentrations, and viability was assessed with trypan blue exclusion. The  $5\text{-}\mu\text{M}$  concentration was thus determined to be efficient and nontoxic. Oligonucleotide sequence specificity was addressed by quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR), and specific inhibition due to the AS was also verified on the protein level by ELISA, according to the manufacturer's recommendation for highly expressed genes. To assess the IL-8 AS effect, purified  $\text{CD}34^+$  cells from patients or healthy donors were set up in double wells (at a cell density of  $5 \times 10^3/\text{mL}$ ) and cultured for 14 days, with or without  $5 \mu\text{M}$  IL-8 antisense or control oligonucleotides. Cultures were renewed every 3 days with  $3 \mu\text{M}$  IL-8 antisense or control oligonucleotides. After 7 and 14 days of culture, cells were harvested, counted, and labeled with anti- $\text{CD}41$ mAbs. Supernatants were stocked at  $-20^\circ\text{C}$ ; smears and pellets were prepared for cytological and molecular studies.

### Primers and probes

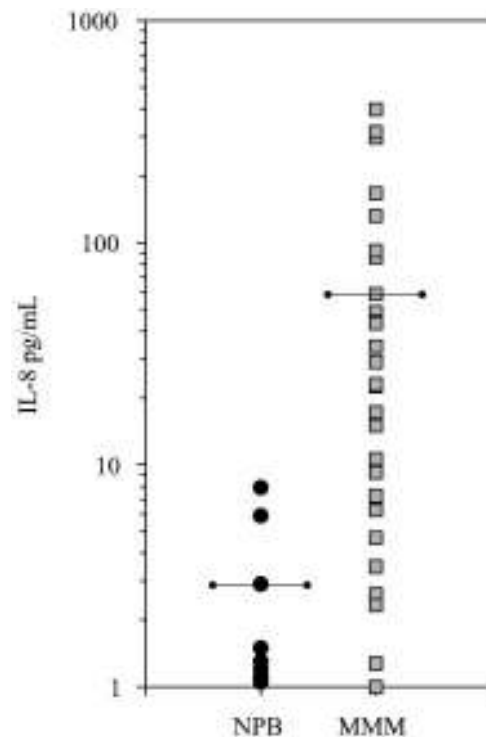
Primers and probes were designed by means of primer Express software (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Courtaboeuf, France) and synthesized by PE Biosystems (Courtaboeuf, France). For human IL-8, the forward and reverse primers were  $5'\text{-CAC CGG AAG GAA CCA TTC TC-}3'$  and  $5'\text{-AAT CAG GAA GGC TGC CAA GA-}3'$ , respectively, and the TaqMan probe was 6-carboxyfluorescein (FAM)-TGA CTT CCA AGC TGG CCG TGG C-6-carboxy-tetramethyl-rhodamine (TAMRA). For human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), the forward and reverse primers were  $5'\text{-GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA-}3'$  and  $5'\text{-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-}3'$ , respectively, and the TaqMan probe was 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein (JOE)-CCG ACT CTT GCC CTT CGA AC-TAMRA.

### RNA isolation and QRT-PCR assay

Total RNA from  $\text{CD}34^+$  cells ( $1 \times 10^6$ ; purity exceeding 98%) prepared according to Chomczynski and Sacchi<sup>42</sup> was applied for reverse transcription and amplification by means of the TaqMan RT-PCR kit (PE Biosystems).<sup>43</sup> Briefly, cDNA corresponding to reverse-transcribed total RNA was amplified in a  $30\text{-}\mu\text{L}$  vol reaction in triplicate assays. IL-8 and GAPDH were amplified in the presence of  $400 \text{ nM}$  IL-8 primers or  $200 \text{ nM}$  GAPDH primers,  $200 \text{ nM}$  IL-8 probe, and  $100 \text{ nM}$  GAPDH probe. A no-template control and the unknown samples were also amplified in triplicate in a final volume of  $30 \mu\text{L}$ . Thermal cycling conditions were performed as described previously.<sup>43</sup> Amplifications were performed on an ABI PRISM 7700 Sequence detector (PE Biosystems). During the assay, the linear increase in fluorescence signals ( $\Delta\text{Rn}$ ) from the reporter dye was collected by a Prism 7700 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), and raw data were calculated by means of Sequence Detector Software 1.6.3 (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocol. For each sample, data were normalized to the GAPDH housekeeping gene level.

### Statistical analysis

Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). *P* values of less than .05 were considered statistically significant (Student *t* test).



**Figure 1. Elevated IL-8 serum level in patients with MMM.** Sera from 32 patients with MMM and from 10 healthy controls (NPB) were assayed for IL-8 by ELISA. Mean levels are indicated by the horizontal bars. The difference between patients with MMM and healthy subjects was significant ( $P = .003$ ).

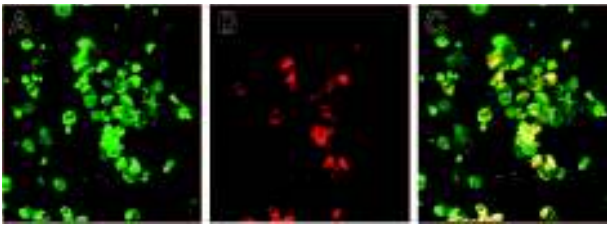
## Results

### Serum IL-8 level is increased in patients with MMM

IL-8 was quantified in the serum of 32 patients with MMM and 10 healthy subjects by ELISA. As shown in Figure 1, the IL-8 level was heterogeneous but highly elevated in most analyzed patients, with a mean serum IL-8 value in patients with MMM 30-fold increased as compared with healthy subjects ( $60.20 \pm 100 \text{ pg}/\text{mL}$  versus  $2.7 \pm 2.5 \text{ pg}/\text{mL}$ , respectively;  $P = .003$ ).

### Hematopoietic cells, including megakaryocytic cells and platelets, participate in IL-8 production in patients with MMM

The nature of the IL-8-producing cells was analyzed by intracellular flow cytometry, immunocytochemistry, and ELISA. Flow cytometry analysis, performed on total blood cells excluding the platelet gate, shows that in healthy donors IL-8 was expressed in  $\text{CD}15^+$  granulocytic ( $50\% \pm 26\%$ ;  $14 \pm 1.4$  mean fluorescence intensity [MFI];  $n = 3$ ) and  $\text{CD}14^+$  monocytic ( $10\% \pm 6\%$ ;  $47 \pm 27$  MFI;  $n = 3$ ) cells. In patients with MMM, circulating  $\text{CD}41^+$  MK cells ( $30\% \pm 15\%$ ;  $85 \pm 54$  MFI;  $n = 4$ ) also participated with  $\text{CD}15^+$  ( $32\% \pm 3.7\%$ ;  $73 \pm 19$  MFI;  $n = 4$ ) and  $\text{CD}14^+$  cells ( $11\% \pm 3.6\%$ ;  $117 \pm 18$  MFI;  $n = 4$ ) in the IL-8 production. Absence of  $\text{CD}42\text{b}$  labeling on these cells eliminated a possible contamination by sticky platelets (data not shown). IL-8 detection in MMM MK cells was confirmed by double IL-8/ $\text{CD}41$  labeling performed on blood mononuclear cells (Figure 2) as well as by ELISA performed on supernatants of  $\text{CD}41^+$  cells generated from  $\text{CD}34^+$  cell culture in MK conditions ( $651 \pm 185 \text{ pg}/\text{mL}$  in MMM MK cells versus  $299 \pm 59 \text{ pg}/\text{mL}$  in NPB MK cells;  $n = 3$ ,



**Figure 2. Circulating MMM CD41<sup>+</sup> megakaryocytic cells expressed IL-8 protein.** Smears of blood mononuclear cells from patients with MMM were subjected to double labeling with anti-CD41 and anti-IL-8. The 3 panels show the same field of cells (magnification  $\times 200$ ). (A) Green fluorescent staining of anti-CD41-FITC. (B) Red-orange fluorescence staining of anti-IL-8-PE. (C) Double labeling of IL-8 and CD41 antigens. Slides were observed with a fluorescence microscope (Leica DMR, 200  $\times$  aperture .30, 400  $\times$  aperture .50; Leica, Heidelberg, Germany).

$P < .05$ ). Participation of MMM platelets in the IL-8 overproduction was supported by results showing that platelet-rich plasma (PRP) contains significantly higher levels of IL-8 than platelet-poor plasma (PPP) in patients or in PRP or PPP from healthy subjects (Table 1). This result was confirmed by a 5- to 70-fold higher IL-8 production per platelet in MMM as compared with healthy subjects and by an elevated IL-8 level in purified, washed MMM platelets ( $54 \pm 4$  pg/mL;  $n = 2$ ) versus normal platelets ( $10 \pm 2$  pg/mL;  $n = 2$ ).

**IL-8 is expressed in CD34<sup>+</sup> cells from healthy subjects and patients with MMM**

The high number of circulating CD34<sup>+</sup> cells in patients' blood led us to analyze possible participation of these cells in IL-8 production. QRT-PCR showed that normal PB CD34<sup>+</sup> expressed a higher relative IL-8 transcript level than their medullar counterparts ( $2.25 \pm 0.5$  versus  $0.25 \pm 0.25$ , respectively;  $P = .05$ ;  $n = 3$  pools of 6 to 7 healthy donors for NPB and  $n = 3$  individual NBM) (Figure 3). In patients with MMM, IL-8 expression by PB CD34<sup>+</sup> cells was heterogeneous and displayed intermediate or similar relative transcript levels for normal PB and BM expression, respectively (Figure 3). Intracellular IL-8 protein was detected by flow cytometry in CD34<sup>+</sup> cells purified from either normal BM ( $36.6\% \pm 17\%$ ,  $18 \pm 0.5$  MFI) or MMM PB ( $24.5\% \pm 16\%$ ,  $30 \pm 10$  MFI). Evaluation of intracellular IL-8 protein expression in NPB CD34<sup>+</sup> cells was not possible owing to the low number of recovered cells.

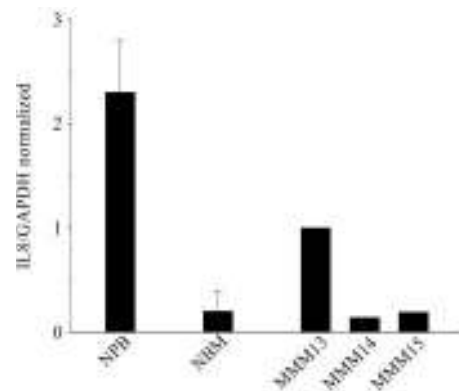
**Table 1. IL-8 levels in PRP and PPP of patients with MMM or healthy subjects**

Sample	IL-8, pg/mL	
	PRP*	PPP
H1	46	< 8
H2	< 8	< 8
H3	< 8	< 8
MMM1	252	72
MMM2	249	54
MMM4	324	77
MMM11	64	< 8
MMM12	96	< 8

H indicates healthy donor; MMM, patients with MMM.

IL-8 concentrations were assessed by means of an IL-8 ELISA kit. The threshold sensitivity for the IL-8 ELISA was  $\geq 8$  pg/mL.

\*Indicates significant difference between PRP and PPP values for H and MMM subjects;  $P < .05$ .



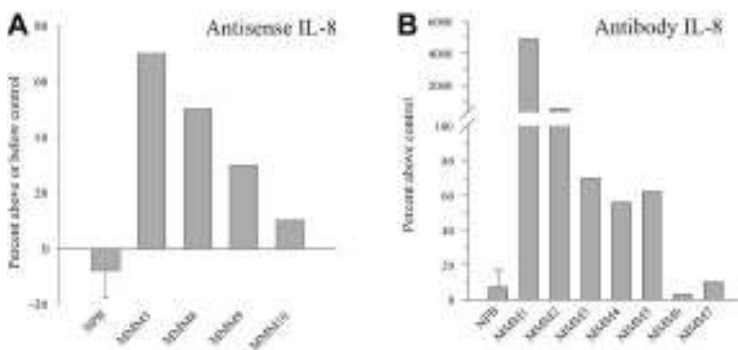
**Figure 3. IL-8 gene expression in CD34<sup>+</sup> cells from patients with MMM and healthy subjects.** Real-time quantitative PCR was performed with appropriate primers for IL-8 and GAPDH as described in "Materials and methods." Amplification results were calculated by means of Sequence Detector Software 1.6.3. Mean IL-8/GAPDH normalized values with standard deviations are plotted for NPB ( $n = 3$  pools of 6 to 7 blood samples) and NBM ( $n = 3$ ). The IL-8/GAPDH ratio was individually calculated for the 3 patients with MMM.

**Inhibition of IL-8 expression/production increases the proliferation of MMM CD34<sup>+</sup>-derived cells and stimulates their megakaryocytic differentiation**

The potential role of autocrine IL-8 on CD34<sup>+</sup>-derived cell proliferation was analyzed by adding either IL-8 AS oligonucleotides or neutralizing antibodies to purified CD34<sup>+</sup> cells in 9F culture condition. Figure 4A shows that addition of 5  $\mu$ M AS, which was previously demonstrated to be the most effective nontoxic concentration, increased the number of CD34<sup>+</sup>-derived cells by 30% to 70% after 10 to 14 days of culture in 3 of the 4 tested patients whereas it did not alter the growth of normal CD34<sup>+</sup>-derived cells. Reduction of the IL-8 transcript level ( $R = 0.695$ , when normalized on GAPDH expression) and of the IL-8 protein level (30% to 77%, when quantified by ELISA) (Table 2) was detected in the AS-treated cells as compared with matched random control cells.

To further substantiate the role of secreted IL-8 on CD34<sup>+</sup> growth, we assessed the effect of an anti-IL-8-neutralizing antibody (10  $\mu$ g/mL) in such cultures. In contrast to NPB CD34<sup>+</sup> cells, such treatment also significantly increased the number of CD34<sup>+</sup>-derived cells by 50% to 5000% in 5 of the 7 tested patients with MMM (Figure 4B). This effect, which was not observed in control isotype-treated cells, was maximal on day 14 of the culture. Increased cell proliferation in anti-IL-8 MMM treated cultures was correlated with a reduction in the IL-8 supernatant level (Table 2). Interestingly, the 2 unresponsive patients (MMM6 and MMM7) (Figure 4) exhibited a low IL-8 level reduction (Table 2). Even if these values may be biased by a possible competition between the antibodies added in the culture and those used in the ELISA, they are correlated with the biologic response of patients.

Flow cytometry analysis demonstrated that a 14-day anti-IL-8 antibody treatment significantly reduced, by  $82\% \pm 30\%$  and  $50\% \pm 4\%$ , the number of MMM cells expressing the primitive multilineage Thy1 and CD34 antigens, respectively, as compared with IgG-treated control ( $P = .005$ ). Such a reduction was not observed in normal PB CD34<sup>+</sup> anti-IL-8-treated cultures. There was no modification in the percentage of cells expressing CD15, CD14, CD71, GPA, or CD41 (Figure 5) after anti-IL-8 antibody treatment in either MMM or normal cultures. In contrast, the expression level of the CD41/GpIIB megakaryocytic membrane glycoprotein was significantly increased after either an anti-IL-8



**Figure 4. Effect of endogenous IL-8 inhibition by antisense oligonucleotides or neutralizing antibody on CD34<sup>+</sup>-derived cell proliferation.** CD34<sup>+</sup> cells purified from patients with MMM or NPB were cultured for 14 days in serum-free medium containing a cytokine cocktail (as described in "Materials and methods") with or without IL-8 antisense (5 μM, panel A) or antihuman IL-8 antibody (10 μg/mL, panel B). Cells were harvested after 14 days of culture and counted. Bar graphs display mean ± standard error of the mean (SEM) from 3 independent experiments for normal PB. Patients with MMM were individually analyzed.

antibody or an AS oligonucleotide treatment in most of the analyzed patients with MMM (Figure 5). The CD41 expression increase was maximal on day 14 of the culture and was correlated with the presence of multinucleated differentiated megakaryocytes in anti-IL-8-treated MMM cultures (Figure 6A).

**CXCR2 receptor is overexpressed in PB MMM CD34<sup>+</sup> cells**

To analyze why CD34<sup>+</sup> cells from healthy donors did not response to anti-IL-8 treatment in contrast to MMM CD34<sup>+</sup> cells, we compared the expression of CXCR1 and CXCR2 IL-8 receptors on CD34<sup>+</sup> cells from MMM and healthy subjects. Table 3 shows that most of NPB CD34<sup>+</sup> cells expressed low levels of CXCR1 and that a low percentage of cells weakly expressed CXCR2. In contrast, CXCR2 was overexpressed in a high percentage of CD34<sup>+</sup> cells from the majority of tested patients with MMM (*P* = .05). Interestingly, patient MMM1 shows 2 distinct populations; 1 of them, corresponding to 8% of CD34<sup>+</sup> cells, expressed a 30-fold higher CXCR2 expression level than NPB CD34<sup>+</sup> cells (Table 3).

**CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of MMM MK cell proliferation and differentiation**

To address the potential involvement of IL-8 receptors in the control of MMM MK proliferation/differentiation, we analyzed the effect of specific neutralizing antibodies for CXCR1 and CXCR2 on clonal CFU-MKs and on megakaryocytes derived from CD34<sup>+</sup> cell growth in specific MK medium. Figure 7A shows that both antibodies similarly stimulated the growth of colonies that were identified as CFU-MK by CD41 immunolabeling from NPB or MMM CD34<sup>+</sup> cells. Neutralization of both receptors also stimulated the proliferation of CD41<sup>+</sup> megakaryocytes derived from CD34<sup>+</sup> cells; this increase, although low in healthy subjects, is greatly elevated in 2 of the 3 patients with MMM. In fact, in MMM17, cell proliferation exceeded that of untreated control cells by up to 2300% on day 14 of the culture when neutralizing antibodies for CXCR1 were added to the culture (Figure 7B). This increased proliferation is associated with a significantly higher expression level of CD41 and CD9 MK antigens (Figure 7C).<sup>44</sup>

**Neutralization of CXCR1 and CXCR2 receptors restores altered MMM MK ploidy**

To further analyze the role of CXCR1 and CXCR2 receptors on MMM MK cell differentiation/maturation, we studied the effect of both antibodies on the ploidy level of CD41<sup>+</sup> megakaryocytes derived from NPB or MMM CD34<sup>+</sup> cell culture in MK conditions. Our results show that after 14 days of culture, MMM CD41<sup>+</sup> MK cells (greater than 95% pure) exhibited a lower ploidy level than their normal counterparts, especially for 2 (MMM16 and MMM17) of the 3 analyzed patients (Figure 8). This low ploidy level was

associated with a high percentage of 2n cells in S phase in all studied patients as compared with NPB (Table 4). Surprisingly, a 14-day treatment with either CXCR1 or CXCR2 antibodies restored the ploidy of MMM MK cells since it increased by 2 to 4 the percentage of higher-than-8n CD41<sup>+</sup> MK cells with the existence of 16n and 32n cells in treated cultures versus isotypic control cultures (Figure 8B; Table 4). This increase in ploidy level was associated with the presence of mature multinucleated MK cells in MMM cultures treated with either the anti-CXCR1 or the anti-CXCR2 antibody as compared with untreated cells, which exhibited an abnormal nuclear lobulation (Figure 6B). It is noteworthy that such treatment also induced a reduction of the sub-G<sub>1</sub> peak that defined the proportion of apoptotic/dead cells and of the percentage of 2n MK cells in S phase, especially in patients

**Table 2. Inhibition of IL-8 production, in CD34<sup>+</sup>-derived cell culture, by either IL-8 antisense or anti-IL-8 antibody**

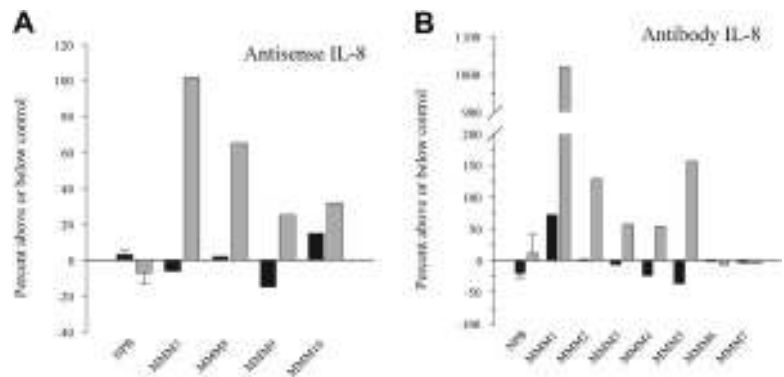
	IL-8 production		
	Controls, pg/mL*	With IL-8 antisense or antibody, pg/mL	Inhibition, %
<b>Cultured with or without 5 μM IL-8 antisense</b>			
H1	11 460	3270	71
H2	1 800	1120	40
H3	2 475	1284	50
MMM3	4 652	1260	73
MMM8	9 760	2280	77
MMM9	3 176	2140	33
MMM10	3 850	2850	25
<b>Cultured with or without 10 μg/mL anti-IL-8 antibody</b>			
H1	11 680	592	94
H2	12 786	4944	61
H3	2 880	60	97
H4	4 060	< 8	100
MMM1	2 995	< 8	100
MMM2	2 600	< 8	100
MMM3	4 020	120	97
MMM4	10 080	180	98
MMM5	5 740	930	83
MMM6	3 950	3500	11
MMM7	2 478	2000	19

See Table 1 footnote for abbreviations.

CD34<sup>+</sup> cells purified from the peripheral blood of either patients with MMM or healthy subjects were cultured in serum-free medium containing cytokines in the presence and absence of IL-8 antisense or antihuman IL-8 antibody. After 14 days of culture, supernatants were harvested, and the IL-8 level was measured by ELISA. The threshold sensitivity for the IL-8 ELISA was ≥ 8 pg/mL.

\*Matched random controls for IL-8 antisense; isotypic controls for anti-IL-8 antibody.

**Figure 5. Effect of endogenous IL-8 inhibition by antisense oligonucleotides or neutralizing antibody on CD41 antigen expression levels.** CD34<sup>+</sup> cells purified from either MMM or NPB were cultured in serum-free medium containing a cytokine cocktail in the presence and absence of 5  $\mu$ M IL-8 antisense (panel A) or 10  $\mu$ g/mL antihuman IL-8 antibody (panel B). Cells were harvested after 14 days of culture and labeled with monoclonal antibody against CD41. The percentage (■) and MFI (▨) of CD41<sup>+</sup> cells were analyzed with Cellquest software by means of a FACScalibur flow cytometer. Bar graphs display mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. patients with MMM were individually analyzed.



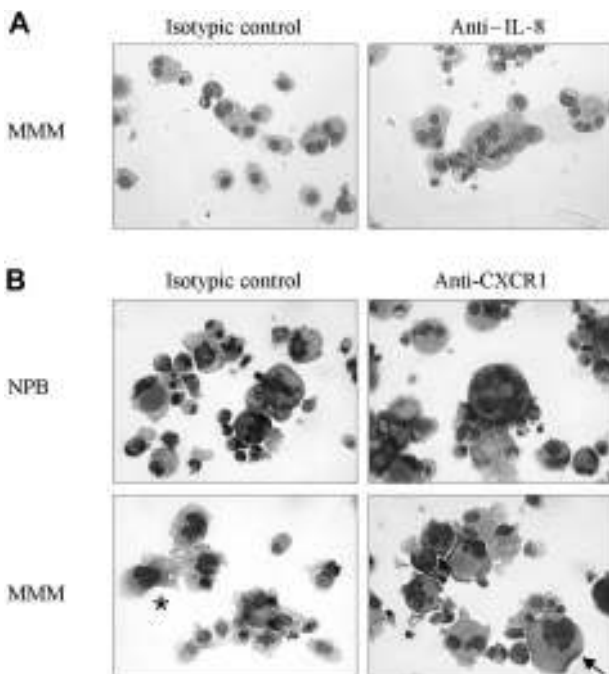
MMM16 and MMM17 in whom ploidy was the most altered (Table 4).

## Discussion

The numerous biologic activities of IL-8 on HP mobilization, regulation, and angiogenesis prompted us to analyze its potential role in MMM, a myeloproliferative syndrome characterized by severe alteration of these processes. In the present study, we showed that IL-8 level is highly increased in the serum of patients with MMM and that hematopoietic cells participated in its production. MMM platelets that express higher level of IL-8 than their normal counterparts are likely to participate in such an overproduc-

tion. However, the fact that there is no clear correlation ( $r = -0.203$ ;  $n = 19$ ) between the average platelet count (9000 to 524 000/mm<sup>3</sup>) and the IL-8 serum level in patients with MMM suggests that other cells also participate in such an increased production. Actually, whereas circulating MMM granulocytes/monocytes, MK cells, and CD34<sup>+</sup> cells expressed IL-8 protein level similar to that of their normal counterparts, their elevated numbers in patients' PB<sup>11</sup> suggest that they take part in the IL-8 overproduction. Our results showing that CD34<sup>+</sup> and megakaryocytically derived CD34<sup>+</sup> cells from unmobilized normal blood or from patients with MMM expressed IL-8 protein, reinforce recent data reporting IL-8 production by CD34<sup>+</sup> cells and MK cells derived from cord blood or BM.<sup>45,46</sup> IL-8 is known to also be produced by BM stromal and endothelial cells. Since myeloproliferation is associated with myelofibrosis and neoangiogenesis, the participation of stromal and endothelial cells in the elevated serum IL-8 level observed in MMM cannot be excluded.

IL-8 is reported to exert an inhibitory effect on hematopoiesis and specially on MK proliferation.<sup>47,48</sup> However, in synergy with M-CSF, it could also act on promotion of monocyte/macrophage growth and differentiation.<sup>49</sup> As for other chemokines, it has been



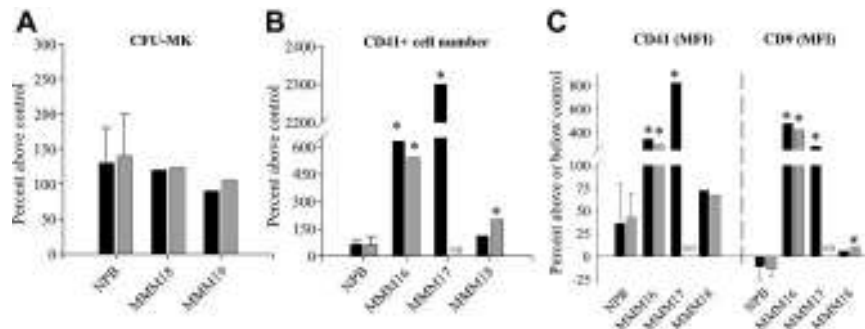
**Figure 6. Effect of neutralizing anti-IL-8 or anti-CXCR1/anti-CXCR2 antibodies on the maturation of megakaryocytic cells derived from MMM CD34<sup>+</sup> cells.** Purified CD34<sup>+</sup> cells from MMM and healthy subjects (NPB) were cultured for 14 days in serum-free medium containing a cytokine cocktail (9F or MK medium) in the absence or presence of neutralizing anti-IL-8 (panel A) or anti-CXCR1 or anti-CXCR2 (panel B) antibodies. The cells were cytocentrifuged and stained with May-Grünwald-Giemsa (magnification  $\times 400$ ). In panel B, the asterisk indicates the presence of MK cells with plump lobulated nucleus in MMM untreated cells, and the black arrow designates MK cells with polylobulated nucleus in the anti-IL-8- or anti-CXCR1 antibody-treated cultures in patients with MMM. Similar polylobulated nuclei were also obtained in anti-CXCR2 antibody-treated MMM cultures.

**Table 3. Expression of CXCR1 and CXCR2 IL-8 receptors on CD34<sup>+</sup> cells**

	CXCR1		CXCR2	
	%	MFI	%	MFI
NPB1	97	18	30	8
NPB2	70	8	18	7
NPB3	60	10	Ud	Ud
NPB4	89	11	Ud	Ud
NPB5	94	13	25	6
<b>MMM1</b>				
Population 1	39	10	71	10
Population 2	Ud	Ud	8	183
MMM2	ND	ND	ND	ND
MMM3	90	32	96	39
MMM4	ND	ND	73	19
MMM5	97	14	95	10
MMM6	ND	ND	ND	ND
MMM7	90	21	4	14
MMM8	99	20	77	7
MMM9	7	18	20	41
MMM10	88	15	97	16

CD34<sup>+</sup> cells purified from either MMM or NPB were labeled with PE-conjugated anti-CXCR1 and anti-CXCR2 or isotype control. The percentage and MFI of positive cells were analyzed on  $5 \times 10^4$  cells with FACScalibur flow cytometer. Note that patient MMM1 exhibited 2 distinct CXCR2-expressing populations.

Ud indicates undetectable; ND, not determined.



**Figure 7. Effect of neutralizing anti-CXCR1 and anti-CXCR2 antibodies on CFU-MK growth and MK cell proliferation and differentiation in samples from healthy and MMM subjects.** (A) CFU-MK colony formation from peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells of patients with MMM and healthy subjects. Purified CD34<sup>+</sup> cells ( $5 \times 10^3$ ) were cultured in serum-free collagen medium with or without anti-CXCR1-neutralizing (black bar) or anti-CXCR2-neutralizing (gray bar) antibodies as described in "Materials and methods." Colonies were scored at day 12 after staining with an anti-CD41 mAb-FITC and May-Grünwald-Giemsa. (B) (C) MK cell proliferation (panel B) and differentiation (panel C) from peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells of MMM and healthy subjects. Purified CD34<sup>+</sup> cells were cultured for 12 days under megakaryocytic liquid culture conditions in the presence or absence of anti-CXCR1-neutralizing (black bar) or anti-CXCR2-neutralizing (gray bar) antibodies as described in "Materials and methods." Cells were harvested after 14 days of culture, and cell numbers were determined by counting viable cells by trypan blue exclusion. After cells were labeled with monoclonal antibody against CD41, the percentage and MFI of CD41<sup>+</sup> cells were analyzed with Cellquest software by means of a FASCalibur flow cytometer. The expression level of CD41 and CD9 antigens on days 12 to 14 of culture compared with isotype control is expressed as MFI. In all experiments, results were expressed as the percentage above or below untreated control cells. Bar graphs display mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments for normal blood cells. patients with MMM were individually analyzed. \* $P < .05$ . ND indicates not done.

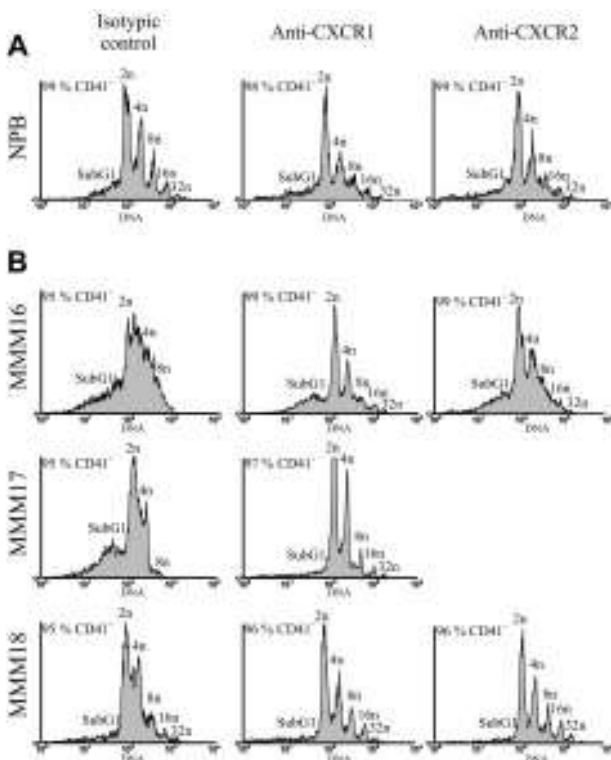
suggested that such a controversial stimulatory or inhibitory effect of IL-8 on hematopoiesis is concentration dependent.<sup>49</sup>

In the present study, we used antisense and antibodies against IL-8 to analyze its potential role in the myeloproliferative process that characterizes MMM. We show that both treatments strongly increase the proliferation of MMM PB CD34<sup>+</sup>-derived cells in 9F liquid culture medium, whereas they do not alter the proliferation

of their normal counterparts. The stimulating effect of anti-IL-8-neutralizing antibody was higher than that of specific AS. This could be explained by the QRT-PCR and ELISA data showing that the highest nontoxic AS concentration (5  $\mu$ M) used in this experiment was not adequately effective on IL-8 expression inhibition, which is frequently observed in active protein synthesis. Anti-IL-8 treatments also increased the expression level of CD41 and CD9,<sup>44</sup> 2 MK differentiation/maturation markers, and the number of multinucleated MK cells, suggesting that IL-8 participates in the altered MK maturation observed in patients with MMM.

The stimulating effect of anti-IL-8 treatment is observed late in liquid culture and is barely evident on myeloid clonogenic progenitors in semisolid medium (data not shown). This observation suggests that endogenous IL-8 negatively regulates the proliferation of hematopoietic cells, which are more mature than clonogenic progenitors. Furthermore, our unpublished data (S.E., 2000) indicate that the addition of human recombinant monocytic IL-8 (up to 20 ng/mL) does not affect the CFU-GM and erythroid burst-forming unit (BFU-E) growth in semisolid medium. These observations are in agreement with the previously stated assumption and confirm earlier observations from Ratajczak and Ratajczak.<sup>50</sup>

Of the 10 tested patients, 2 (MMM6 and MMM7) showed no response to anti-IL-8 antibody treatment while 2 others (MMM9 and MMM10) responded weakly to IL-8 AS. It is interesting to note that IL-8 production was weakly inhibited in these patients, in contrast to the responsive ones in whom IL-8 production was highly inhibited (Table 2). The healthy subjects did not respond to anti-IL-8 treatment even though the IL-8 secretion was inhibited in NPB CD34<sup>+</sup>-derived cultures. We therefore investigated whether an altered expression of IL-8 receptors could account for such a different response to anti-IL-8 treatment. We showed that while CXCR2 IL-8 receptor expression was weakly detectable on NPB CD34<sup>+</sup> cells, it was overexpressed on most MMM CD34<sup>+</sup> cells (Table 3) and its expression was maintained during the culture since  $86\% \pm 12\%$  of MMM cells still expressed CXCR2 on day 12 as compared with  $13\% \pm 2\%$  in their normal counterparts. Interestingly, MMM7 and MMM9 patients who did not respond or responded weakly to anti-IL-8 treatment demonstrated a low CXCR2 expression, as in normal CD34<sup>+</sup> cells. These results are in agreement with Sanchez et al's<sup>20</sup> and Broxmeyer et al's<sup>35</sup> studies



**Figure 8. Effect of anti-CXCR1 and anti-CXCR2 antibodies on the ploidy distribution of CD41<sup>+</sup> MK cells derived from normal or MMM CD34<sup>+</sup> cell culture.** Polyploidy was evaluated by flow cytometry analysis, at days 12 to 14 of culture, on CD41<sup>+</sup> MK cells grown in either the absence or the presence of anti-CXCR1 and anti-CXCR2 antibodies (10  $\mu$ g/mL). CD41<sup>+</sup> MK cells were stained with PI as described in "Materials and methods." Histograms show the DNA content of CD41<sup>+</sup> MK cells derived from normal (panel A) and MMM CD34<sup>+</sup> (panel B) cells. One representative experiment from 3 separate experiments is shown for NPB. patients with MMM were individually analyzed.

**Table 4. Ploidy distribution of CD41<sup>+</sup> MK cells derived from healthy subjects and patients with MMM with and without anti-CXCR1 and anti-CXCR2 antibodies**

	Lower than 2n ploidy, sub-G <sub>1</sub> phase, %	2n ploidy		4n ploidy		Greater than 8n ploidy, %
		%	S phase %	%	S phase %	
<b>NPB</b>						
Control	28±3	61±2	36±1	25±0	43 ± 3	14 ± 2
Anti-CXCR1	22±5	58±3	25±5	27±0	39 ± 10	15 ± 2
Anti-CXCR2	21±6	61±5	26±6	26±1	41 ± 4	14 ± 2
<b>MMM16</b>						
Control	43	69	80	26	60	5
Anti-CXCR1	33	63	31	24	40	13
Anti-CXCR2	24	53	40	32	45	15
<b>MMM17</b>						
Control	40	83	57	15	18	2
Anti-CXCR1	3	69	31	23	26	8
Anti-CXCR2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>MMM18</b>						
Control	29	64	55	27	45	9
Anti-CXCR1	19	62	38	22	28	16
Anti-CXCR2	19	57	33	26	35	17

Data for healthy subjects are the mean of 3 distinct experiments; data for MMM subjects are presented individually. See Table 3 for abbreviations.

showing that the inhibitory effect of CXC chemokines on myelopoiesis is mediated by CXCR2.

Involvement of IL-8 receptors in this process, especially in the altered MMM MK proliferation/differentiation, was further addressed by using neutralizing antibodies against CXCR1 or CXCR2 receptors on megakaryocyte-derived CD34<sup>+</sup> cells. While anti-CXCR1 or anti-CXCR2 treatments similarly affect the clonal growth of NPB and MMM CFU-MKs, neutralization of both receptors greatly stimulated the proliferation of CD41<sup>+</sup> megakaryocytically derived CD34<sup>+</sup> cells from patients with MMM as compared with healthy subjects. The significantly higher expression levels of CD41 and CD9 MK differentiation marker in MMM-treated cultures confirmed the involvement of both receptors in stimulating the MK differentiation/maturation. Interestingly, both antibodies also restored the altered polyploidization of MMM CD41<sup>+</sup> MK cells. Such an effect was observed particularly in MMM16 and MMM17 patients, who exhibited the lowest ploidy as compared with MMM18, or in NPB MK cells, which exhibit a higher or "normal" endomitotic process with the presence of 32n cells. The reduction in the percentage of cells in sub-G<sub>1</sub> phase and of 2n cells in S phase in MMM-treated culture suggested that neutralization of IL-8 receptors reduced the apoptosis of dysmatured MK cells and favored their maturation by stimulating the endomitosis versus the proliferation process. The presence of multinucleated mature MK cells in treated cultures reinforces such an assumption.

Neutralization of either CXCR1 or CXCR2 stimulated the maturation of MMM megakaryocytes, restored their ploidy, and reduced their percentage in sub-G<sub>1</sub> phase, which strongly suggests that their ligands, including IL-8, participate in the altered MK growth. In contrast to cytokines, the relation between chemokines and their receptors is of a "polygamous" type since chemokine receptors bind several different chemokines and chemokines bind several different receptors.<sup>51</sup> Therefore, it could be hypothesized that other CXC chemokines participate in the MMM MK dysregulation. The serum levels of NAP2, quantified by densitometry on protein array (data not shown) and of ENA-78 (1354 ± 1021 pg/mL and 1393 ± 843 pg/mL, respectively) were similar in MMM and healthy subjects. In contrast, those of GRO alpha and granulocyte chemotactic protein 2, which are higher potent agonists for CXCR2 than for CXCR1,<sup>52</sup> are increased in patients

(645 ± 320 pg/mL and 590 ± 180 pg/mL, respectively) as compared with healthy subjects (120 ± 40 pg/mL and 164 ± 130 pg/mL, respectively). Although the implication of these chemokines in MMM pathogenesis cannot be excluded, our results showing that inhibition of either IL-8 or its receptors resulted in similar biologic effects supports a major role for IL-8 in the process described.

MMM is a heterogeneous and puzzling disease in which myeloproliferation is associated with an alteration of MK maturation and with the extramedullary migration of HP to the spleen and liver. Considering the inhibitory role of IL-8 in hematopoiesis, the presence of myeloproliferation associated with a high level of IL-8 in MMM could appear paradoxical. Interestingly, abnormal production of IL-8 has also been reported in a number of proliferative hematologic disorders such as polycythemia vera, where its action is still not well understood.<sup>53</sup> The most significant biologic effect of IL-8 and its receptors suggested by our results is that they participate in the altered MK cell proliferation and differentiation in MMM. Therefore, it can be suggested that IL-8, most likely in synergy with other cytokines/chemokines overproduced in this disease, contributed to maintaining the CD34<sup>+</sup> progenitor compartment in a proliferative immature state by a feedback mechanism. Our results showing that the anti-IL-8 treatment significantly reduced the number of MMM cells expressing the primitive multilineage Thy1 and CD34 antigens are in agreement with such a hypothesis. It has been recently reported that the binding of PF4 to IL-8 could impair IL-8-dependent signaling in CD34<sup>+</sup> progenitors through the formation of IL-8/PF4 heterodimers or heterotetramers.<sup>54</sup> A similar process could be evoked in MMM, in which PF4 is highly increased in the BM microenvironment.<sup>55,56</sup> Interestingly, intramedullary accumulation of PF4 is suggested to promote the displacement of hematopoiesis to other organs such as liver and spleen.<sup>54</sup> Such a hypothesis is of pathophysiologic relevance with regard to MMM, in which medullary aplasia is associated with myeloid metaplasia in spleen and liver.<sup>12</sup>

Our results showed that the altered MK maturation observed in patients with MMM could be reproduced in vitro in CD34<sup>+</sup> cell-derived cultures, corroborating the intrinsic alteration of MMM HPs. To our knowledge, this is the first time that IL-8 and its receptors are reported to be involved in MMM-altered MK growth. This observation, which is relevant to a significant subpopulation

of patients exhibiting striking MK abnormalities, probably reflects the heterogeneous character of the disease. Even though the primary molecular defect is still unknown in MMM, it is suggested that the clonal expansion of HP and their deregulated differentiation are favored by the overproduction and release of hematopoietic, fibrogenic, and angiogenic cytokines/chemokines by hematopoietic cells, including CD34<sup>+</sup> cells, monocytes, and megakaryocytes.<sup>7,8,57-59</sup> Excessive release/leakage of these growth factors within the bone marrow, especially by dysplastic and necrotic MK cells, would lead to the uncontrolled stromal activation resulting in generation of secondary myelofibrosis. In that respect, our results showing that IL-8 and its receptors play a role in the deregulated MK differentiation process in a significant number of patients with MMM are important for a better understanding of the pathogenesis of the disease. Furthermore, they open new targeted therapeutic prospects for this rare and still incurable hemopathy.

## Acknowledgments

We thank the members of the French INSERM Research Network on MMM and of European Myelofibrosis Network (EUMNET) for providing blood samples from patients with MMM. We express

gratitude to Dr J. J. Lataillade (Centre de Transfusion Sanguine des Armées Jean-Juillard [CTSA Jean-Juillard], Clamart, France) for continuously supplying buffy coats from the peripheral blood of healthy adults. We are greatly indebted to Dr Y. Masse (Service de Chirurgie Orthopédique du CHR d'Aulnay-Sous-Bois, France), for regularly providing normal bone marrow surgical materials. We thank Dr J. Chagraoui for her helpful advice with the fluorescence microscopy and Dr C. Boucheix for his critical reading of the manuscript.

## Appendix

Members of the French INSERM Network on Myeloid Metaplasia with Myelofibrosis: Dr Jean-Loup Demory, St Vincent Hospital, Lille, France; Dr Brigitte Dupriez, Dr Schaffner Hospital, Lens, France; Dr Vincent Praloran, Dr Chrystèle Bilhou-Nabéra, and Dr Eric Lippert, Hematology Laboratory, and Dr Jean-François Viillard, Victor Segalen University, Bordeaux, France; Dr Dominique Bordessoule, Dupuytren Hospital, Limoges, France; Dr Jean Brière, Beaujon Hospital, Clichy, France; Dr Jean-François Emile, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France; Dr Marie-Claire Martyré, Institut Curie, Paris, France.

## References

- Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol*. 1999;17:2954-2970.
- Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*. 2000;342:1255-1265.
- Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978;51:189-194.
- Wang JC, Lang HD, Lichter S, Weinstein M, Benn P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 1992;80:184-188.
- Bilhou-Nabera C, Brigaudeau C, Clay D, et al. Does cytogenetic mosaicism in CD34+CD38low cells reflect the persistence of normal primitive hematopoietic progenitors in myeloid metaplasia with myelofibrosis? *Blood*. 2003;102:1551-1552.
- Castro-Malaspina H, Jhanwar SC. Properties of myelofibrosis-derived fibroblasts. *Prog Clin Biol Res*. 1984;154:307-322.
- Martyré MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdilès MC, et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1994;88:9-16.
- Martyré MC, Le Bousse-Kerdilès MC, Romquin N, et al. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1997;97:441-448.
- Hibbin JA, Njoku OS, Matutes E, Lewis SM, Goldman JM. Myeloid progenitor cells in the circulation of patients with myelofibrosis and other myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 1984;57:495-503.
- Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Idiopathic primary osteomyelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. *Leuk Lymphoma*. 1996;22:303-317.
- Barosi G, Viarengo G, Pecci A, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2001;98:3249-3255.
- Le Bousse-Kerdilès MC, Martyré MC. Myelofibrosis: pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. French INSERM Research Network on Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Springer Semin Immunopathol*. 2000:491-508.
- Martyré MC, Le Bousse-Kerdilès MC. Stem cell dysregulation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: current data on growth factor and transcription factor involvement. *Semin Oncol Rev*. In press.
- Steunou V, Le Bousse-Kerdilès MC, Colin-Micouin A, Clay D, Chevillard S, Martyré MC. Altered transcription of the stem cell leukemia gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leukemia*. 2003;17:1998-2006.
- Baggiolini M, Loetscher P, Moser B. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17:103-108.
- Murphy PM. Molecular piracy of chemokine receptors by herpesviruses. *Infect Agents Dis*. 1994;3:137-154.
- Murphy PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. *Semin Hematol*. 1997;34:311-318.
- Wuyts A, D'Haese A, Cremers V, et al. NH2- and COOH-terminal truncations of murine granulocyte chemotactic protein-2 augment the in vitro and in vivo neutrophil chemotactic potency. *J Immunol*. 1999;163:6155-6163.
- Wuyts A, Proost P, Lenaerts JP, Ben-Baruch A, Van Damme J, Wang JM. Differential usage of the CXC chemokine receptors 1 and 2 by interleukin-8, granulocyte chemotactic protein-2 and epithelial-cell-derived neutrophil attractant-78. *Eur J Biochem*. 1998;255:67-73.
- Sanchez X, Suetomi K, Cousins-Hodges B, Horton JK, Navarro J. CXC chemokines suppress proliferation of myeloid progenitor cells by activation of the CXC chemokine receptor 2. *J Immunol*. 1998;160:906-910.
- Schraufstatter IU, Chung J, Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280:L1094-L1103.
- Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. 1994;84:4242-4248.
- Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*. 1989;1:2-13.
- Hashimoto S, Yoda M, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Motoyoshi K. Macrophage colony-stimulating factor induces interleukin-8 production in human monocytes. *Exp Hematol*. 1996;24:123-128.
- Takeuchi K, Higuchi T, Yamashita T, Koike K. Chemokine production by human megakaryocytes derived from CD34-positive cord blood cells. *Cytokine*. 1999;11:424-434.
- Thomas KM, Taylor L, Prado G, et al. Functional and ligand binding specificity of the rabbit neutrophil IL-8 receptor. *J Immunol*. 1994;152:2496-2500.
- Murphy PM, Tiffany HL. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253:1280-1283.
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991;253:1278-1280.
- Pruijt JF, Fibbe WE, Laterveer L, et al. Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10863-10868.
- Pruijt JF, Willemze R, Fibbe WE. Mechanisms underlying hematopoietic stem cell mobilization induced by the CXC chemokine interleukin-8. *Curr Opin Hematol*. 1999;6:152-158.
- Fibbe WE, Pruijt JF, Velders GA, et al. Biology of IL-8-induced stem cell mobilization. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;872:71-82.
- Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Dobrowsky A, Ratajczak PZ, Cabuhat ML. Differential MMP and TIMP production by human marrow and peripheral blood CD34(+) cells in response to chemokines. *Exp Hematol*. 2000;28:1274-1285.
- Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, et al. Comparative analysis of the human macrophage



- inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells: interacting effects involving suppression, synergistic suppression, and blocking of suppression. *J Immunol.* 1993;150:3448-3458.
34. Lu CY, Tang ZS. Interleukin-8 and inflammation [in Chinese]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* 1993;24:351-353.
  35. Broxmeyer HE, Cooper S, Cacalano G, Hague NL, Bailish E, Moore MW. Involvement of interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J Exp Med.* 1996;184:1825-1832.
  36. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science.* 1992;258:1798-1801.
  37. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995;270:27348-27357.
  38. Berlin N. Diagnosis and classification of the polycythemia. *Semin Hematol.* 1975;12:339-351.
  39. de Wynter EA, Coutinho LH, Pei X, et al. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells.* 1995;13:524-532.
  40. Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG, Packham MA. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br J Haematol.* 1972;22:193-204.
  41. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods.* 2000;243:77-97.
  42. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
  43. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-994.
  44. Clay D, Rubinstein E, Mishal Z, et al. CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood.* 2001;97:1982-1989.
  45. Higuchi T, Koike K, Sawai N, et al. Megakaryocytes derived from CD34-positive cord blood cells produce interleukin-8. *Br J Haematol.* 1997;99:509-516.
  46. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood.* 2001;97:3075-3085.
  47. Gewirtz AM, Zhang J, Ratajczak J, et al. Chemokine regulation of human megakaryocytopoiesis. *Blood.* 1995;86:2559-2567.
  48. Daly TJ, LaRosa GJ, Dolich S, Maione TE, Cooper S, Broxmeyer HE. High activity suppression of myeloid progenitor proliferation by chimeric mutants of interleukin 8 and platelet factor 4. *J Biol Chem.* 1995;270:23282-23292.
  49. 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;27:28-36.
  50. Ratajczak J, Ratajczak MZ. In vitro study about the influence of recombinant interleukin-8 on human hematopoiesis [in Polish]. *Acta Haematol Pol.* 1994;25:269-275.
  51. Devalaraja MN, Richmond A. Multiple chemotactic factors: fine control or redundancy? *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20:151-156.
  52. Feniger-Barish R, Belkin D, Zaslaver A, et al. GCP-2-induced internalization of IL-8 receptors: hierarchical relationships between GCP-2 and other ELR(+)-CXC chemokines and mechanisms regulating CXCR2 internalization and recycling. *Blood.* 2000;95:1551-1559.
  53. Hermouet S, Godard A, Pineau D, et al. Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythemia vera. *Cytokine.* 2002;20:178-183.
  54. Dudek AZ, Nesmelova I, Mayo K, Verfaillie CM, Pitchford S, Slungaard A. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood.* 2003;101:4687-4694.
  55. Rosenstingl S, Brouland JP, Zini JM, Tobelem G, Dupuy E. Mixed myelodysplastic syndrome and myeloproliferative disorder with bone marrow and pulmonary fibrosis: the role of megakaryocytes. *Acta Haematol.* 2003;109:145-149.
  56. Rueda F, Pinol G, Marti F, Pujol-Moix N. Abnormal levels of platelet-specific proteins and mitogenic activity in myeloproliferative disease. *Acta Haematol.* 1991;85:12-15.
  57. Gilbert HS, Praloran V, Stanley ER. Increased circulating CSF-1 (M-CSF) in myeloproliferative disease: association with myeloid metaplasia and peripheral bone marrow extension. *Blood.* 1989;74:1231-1234.
  58. Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Charpentier A, et al. 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.* 1996;88:4534-4546.
  59. Rameshwar P, Denny TN, Stein D, Gascon P. Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines: potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *J Immunol.* 1994;153:2819-2830.

## Erratum

In the response letter by Arbab et al entitled "Feride-protamine sulfate labeling does not alter differentiation of mesenchymal stem cells," which appeared in the November 15, 2004, issue of *Blood* (Volume 104:3412-3413), the title's first word was incorrect. The title should read "Ferumoxide-protamine sulfate labeling does not alter differentiation of mesenchymal stem cells."

## **2/ Augmentation d'expression du gène *HMGA2* dans les leucocytes et les progéniteurs hématopoïétiques *CD34<sup>+</sup>* de patients atteints de myélofibrose primitive**

**« Expression of *HMGA2* in PB leukocytes and purified *CD34<sup>+</sup>* cells from controls and patients with Myelofibrosis and myeloid metaplasia ».**

**Andrieux J, Bilhou-Nabera C, Lippert E, Le Bousse-Kerdiles MC, Dupriez B, Grardel N, Pierre-Louis O, Desterke C, Praloran V, Lai JL, Demory JL.**

**Leuk Lymphoma. 2006 Sep;47(9):1956-9.**

*HMGA2* (High-mobility group AT-hook 2) est un facteur architectural appartenant au complexe protéique « enhancesome » qui se fixe sur la région « enhancer » du promoteur d'un gène. Cette fixation a pour conséquence d'accélérer la transcription du gène concerné. Des réarrangements du gène *HMGA2* sont associés aux lipomes.

Au cours de ce travail, réalisé en collaboration avec Joris Andrieux et Jean-Loup Demory, des réarrangements en région chromosomique 12q comprenant le locus du gène *HMGA2* ont été détectés chez les patients atteints de MFP. Des modifications quantitatives en 12q ont été également retrouvées par CGH-array BAC. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression de *HMGA2* dans les progéniteurs hématopoïétiques et les granulocytes de patients atteints de MFP. L'ensemble de ces résultats suggère une possible implication de *HMGA2* dans la pathogenèse de la maladie.



LETTER TO THE EDITOR

**Expression of *HMG A2* in PB leukocytes and purified CD34<sup>+</sup> cells from controls and patients with Myelofibrosis and myeloid metaplasia**

JORIS ANDRIEUX<sup>1,2</sup>, CHRYSTELE BILHOU-NABERA<sup>3,2</sup>, ERIC LIPPERT<sup>3</sup>,  
MARIE-CAROLINE LE BOUSSE-KERDILES<sup>4</sup>, BRIGITTE DUPRIEZ<sup>5</sup>,  
NATHALIE GRARDEL<sup>6</sup>, OLIVIER PIERRE-LOUIS<sup>3</sup>, CHRISTOPHE DESTERKE<sup>4</sup>,  
VINCENT PRALORAN<sup>3</sup>, JEAN LUC LAÏ<sup>1,2</sup>, & JEAN-LOUP DEMORY<sup>7</sup>

<sup>1</sup>INSERM Unité 524, Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, Lille, France, <sup>2</sup>Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU de Lille, France, <sup>3</sup>Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux, France, <sup>4</sup>INSERM U602, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France, <sup>5</sup>Service des Maladies du Sang, CHRU de Lille, France, <sup>6</sup>Service d'Hématologie, Hôpital Calmette, CHRU de Lille, France, and <sup>7</sup>Département d'Hématologie, Université Catholique de Lille, France

(Received 10 November 2005; accepted 6 March 2006)

**Introduction**

Myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM) is a rare myeloproliferative disorder which associates clonal proliferation of multi-potent hematologic progenitors and reactive fibrosis [1]. The karyotype performed on bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) progenitors is abnormal in 40% of the cases [2,3]. Some patients exhibit 12q rearrangements [4]: a previous analysis of two such patients using BAC-FISH and RT-PCR lead to demonstrate an expression of the embryonic gene *HMG A2*. Transcripts of *HMG A2* were also found in purified mononuclear blood cells from 10 additional MMM patients bearing no visible 12q alteration [5]. The next step was, thus, to quantify the expression of the gene and look for correlation with the other biological features of the disease and to test selected cellular populations with a special interest to CD34<sup>+</sup> progenitors, high blood concentrations of those cells being a hallmark of MMM [6].

**Material and methods**

We studied 24 patients diagnosed as primary MMM according to the set of criteria recently updated through an Italian Consensus Conference

[7]. Besides, we required a blood monocytosis < 1.10<sup>9</sup> l<sup>-1</sup> to avoid possible confusion with Chronic myelomonocytic leukemia. Patients were orally informed of the research purpose and agreed for the test to be performed on the blood drawn for routine monitoring of their disease. Six volunteers free from hematologic malignancy were used as controls.

We also studied purified sub-sets of CD34<sup>+</sup> cells: eight samples were isolated from the PB of MMM patients, seven CD34<sup>+</sup> cell samples were purified from the BM of consenting subjects undergoing surgery for hip replacement.

Total RNA was isolated from the leukocytes separated on Ficoll gradients. The RNA was extracted using High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Germany) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was done using Oligo(dT)<sub>12-18</sub> primer (Invitrogen, USA) and SuperScript<sup>TM</sup> II Rnase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA).

CD34<sup>+</sup> cells were isolated by MACS immunomagnetic method; granulocytic cells were recovered from Ficoll separation tubes after lysis of the erythrocyte pellets and controlled by CD15 labelling > 90–95%. Real-time quantitative RT-PCR was performed using the Taq-Man core reagents (Applied biosystems) according to the manufacturer's

Correspondence: Dr J. Andrieux, Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital Jeanne de Flandre, Barre Nord CHRU, 2 Avenue Oscar Lambret, 59037 Lille Cedex, France. E-mail: j-andrieux@chru-lille.fr

recommendations. Specific primers and probe were determined using Primer Express software (Applied biosystem). Results were expressed in  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ( $2^{-(C_t \text{ HMGA2} - C_t \text{ TBP}) \text{ patient} - (C_t \text{ HMGA2} - C_t \text{ TBP}) \text{ HL60}}$ ) values according to the manufacturer's instructions. These values were calculated by reference to a series of HL 60 cells dilution (calibrator), ranging from  $10^5 - 10^1$ . The internal control (endogenous reference) used was *TBP* (TATA box binding factor).

cDNAs were amplified in a 25  $\mu$ l total volume reaction containing: 600 nmol  $l^{-1}$  of each *HMGA2* primer (*HMGA2*-F: 5'-GCA GCA AGA ACC AAC CGG-3', *HMGA2*-R: 5'-CTT TCT TTT GAG CTG CTT TAG AGG G-3'), 300 nmol  $l^{-1}$  of each *TBP* primer (*TBP*-F: 5'-CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT-3', *TBP*-R: 5'-TTT TCT TGC TGC CAG TCT GGA C-3'), 200 nmol  $l^{-1}$  *HMGA2* probe (5' FAM-AAG ACC CAA AGG CAG CA-TAMRA-3') and 200 nmol  $l^{-1}$  *TBP* probe (5'-FAM-TGT GCA CAG GAG CCA AGA GTG AAG A-TAMRA-3').

Amplification was performed using a 2 min step at 50°C then a 10 min denaturation step at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95°C, 1 mn primer annealing polymerization step at 60°C. Thermal cycling and detection of the real-time amplification plot was performed using the Model 7700 Sequence detection System and analysed with

Sequence Detector V1.6.3 software. All samples were run in triplicate.

## Results and discussion

In MMM patients we evidenced *HMGA2* transcripts in PB mononuclear cells with levels of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ranging from 0.25–52 136 as compared to *TBP* (mean 2710) while in the eight mononuclear cells controls the levels of expression ranged between 0.07–0.12 (mean 0.11). Patients mononuclear cells  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values were significantly 10-fold higher than controls ( $P < 10^{-6}$ , Student test). The expression of the gene in patients appeared highly variable, which could depend from the quality of the mononuclear cells gathered in the Ficoll ring as MMM is characterized by circulating immature granulocytes (IG) and  $CD34^+$  progenitors in concentrations varying from a patient to another and also during the course of the disease in a single patient. The leukocyte count (WBC) and percentages of IG and blasts were available for every patient and the  $CD34^+$  absolute cell count for 14/27 (Table I). Poor correlations were noticed between the number of *HMGA2* copies and the respective concentrations of WBC, IG, blasts and  $CD34^+$  cells (data not shown). Figure 1 indicates that *HMGA2* is expressed in both normal and patients  $CD34^+$  cells but approximately

Table I. Blood cell count, karyotype and *HMGA2*/*TBP* values for 27 MMM patients.

	WBC ( $\times 10^9 L^{-1}$ )	IG (%)	Blasts (%)	Karyotype	$CD34^+$ ( $mm^{-3}$ )
#13	18	2	27	45, XY, t(6;14)(p11;q32), der(20;21)(p10;q10), -20 <10>	ND
#41	16	2	0	ND	ND
#21	4.8	0	0	ND	ND
#19	13.6	24	1	ND	100
#11	2.6	12	0	46, XY <22>	29
#17	12.2	29	3	45, XY, add(2)(p22), t(4;15)(q12;p11), -5, del(13)(q14q22), der(17)t(17;18)(q25;q11) <6>	574
#31	25	0		ND	ND
#3	64	6	6	46, XY, del(4)(q12q31), (0-1)add(7)(p15) <10>/46, XY <4>	ND
#29	6.7	0	0	46, XY <2>	ND
#4	2.4	10	1	46, XY <5>	ND
#16	3.4	5	1	46, XY <2>	ND
#33	16.4	7	2	46, XX, del(13)(q14q22) <11>	ND
#28	11.3	14	0	46, XY <7>	187
#40	6.4	1	1	46, XY <15>	ND
#30	11.4	7	3	ND	270
#7	5.5	10	2	46, XX, dup(1)(q21q42) <6> 46, XX <16>	37
#45	23.8	24	4	46, XY <15>	172
MER	53.4	11	0	46, XY, t(4;12)(q33;q15), del(13)(q13q31) <12>	7696
#35	6.5	8	0	ND	22
#42	6.3	0	0	47, XY, del(6)(p21p22), +9 <4>	ND
#44	8.6	2	0	46, XY <7>	47
#37	11.4	7	0	ND	104
#39	4.7	4	0	ND	13
#2	4.5	9	0	46, XY <6>	ND
#52	4.9	21	1	46, XY, del(13)(q13q31) <5>	75
#32	41.1	11	1	46, XY <19>	ND
#50	16.9	14	1	ND	435

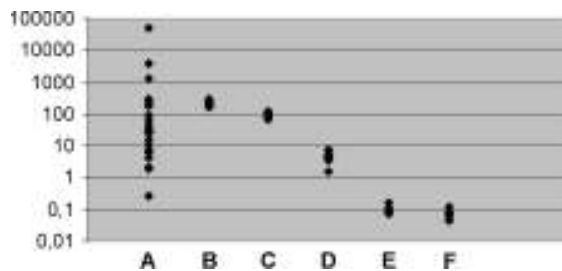


Figure 1. Range of  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ( $2^{-(C_t \text{ HMGGA2} - C_t \text{ TBP})_{\text{patient}} - (C_t \text{ HMGGA2} - C_t \text{ TBP})_{\text{HL60}}}$ ) values in cell sub-populations from patients and controls: the more  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  is, the more *HMGGA2* is expressed. (a) MMM PB mononuclear cells ( $n=27$ ); (b) MMM PB  $CD34^+$  cells ( $n=8$ ); (c) Normal BM  $CD34^+$  cells ( $n=7$ ); (d) MMM PB granulocytes ( $n=10$ ); (e) Normal PB mononuclear cells ( $n=8$ ); (f) Normal granulocytes ( $n=7$ ).

twice more in the latter than in normal BM  $CD34^+$  cells ( $P < 10^{-5}$ , Student test). PB  $CD15^+$  granulocytic cells, contained *HMGGA2* transcripts in 10/10 patients ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values: 1.55–5.22, mean 4.67) while they were always absent in their normal counterparts ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$  values: 0.04–0.12, mean 0.08) ( $P < 10^{-5}$ , Student test), thus demonstrating an abnormal sustained expression of the gene all along the granulocytic lineage. The mean level of expression of *HMGGA2* is about ten fold higher in MMM patients PB mononuclear cells (including IG and  $CD34^+$ ) than in their mature granulocytes, which can be explained by the low genetic activity of these mature cells and suggests that *HMGGA2* expression in MMM is rather related to the excessive proliferative capacity of myeloid cells.

Our results confirm that *HMGGA2* is not expressed in the mature blood cells of healthy adults but is expressed in  $CD34^+$  progenitors [8]. In MMM, not only *HMGGA2* is highly expressed in  $CD34^+$  cells but transcripts are found in mature granulocytic cells. Further studies of more accurately defined cell subsets are necessary to understand this sustained expression.

The high mobility group protein A2 (*HMGGA2*, formerly *HMGI-C*) belongs to the *HMGI* family of phosphoproteins carrying three AT hooks, each encoded by a single exon, that bind to the minor groove of AT-rich DNA sequences. These proteins enhance promoter binding of transcription factors [9] and are regulated by cell-cycle dependent phosphorylation altering their DNA binding affinity [10].

*HMGGA2* plays an important role in embryonic and fetal growth and development. In mice, it is mainly active during embryogenesis in the tissues of mesenchymal origin, and alterations in the *HMG* genes are known to induce dwarfism or conversely gigantism with lipomatosis [11]. In a variety of

mesenchymal benign tumors, rearrangements and transcriptional activation of *HMGGA2*, generally occurring through balanced translocations with a break within the third intron and chimeric transcripts containing exons 1–3, are reported. Occasional translocations of 12q13–q15 produce fusion proteins containing the AT hooks and novel carboxy terminals [12].

Experimental data suggest a role for *HMGGA2* in malignant transformation [13]. In human hematological malignancies, *HMGGA2* is expressed in  $CD34^+$  cells from patients with CGL [8] and leukemic cells from AML and ALL [8,14]. The derepression of *HMGGA2* seems also associated in myelodysplasia [15]. MMM appears as another example of proliferation associating with an enhanced expression of *HMGGA2* in  $CD34^+$  cells abnormally sustained in the entire granulocytic lineage. We, thus, assume a role for *HMGGA2* as part of the pathogenesis of MMM as well as its involvement in leukemogenesis.

#### Acknowledgement

This work was supported by a grant from ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer).

#### References

1. Van Slyck EJ, Weiss L, Dully M. Chromosomal evidence for the secondary role of fibroblastic proliferation in acute myelofibrosis. *Blood* 1970;36:729–735.
2. Demory JL, Dupriez B, Fenaux P, Lai JL, Beuscart R, Jouet JP, et al. Cytogenetic studies and their prognostic significance in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 47 cases. *Blood* 1988;72:855–859.
3. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, Fitzgerald PM, Jones N, Watmore A, Potter A. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol* 1997;98:96–102.
4. Andrieux J, Demory JL, Morel P, Plantier I, Dupriez B, Caulier MT, et al. Frequency of structural abnormalities of the long arm of chromosome 12 in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:68–71.
5. Andrieux J, Demory JL, Dupriez B, Quief S, Plantier I, Roumier C, et al. Dysregulation and overexpression of *HMGGA2* in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Genes, Chromosomes Cancer* 2004;39:82–87.
6. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frasson F. Diagnostic and clinical relevance of circulating  $CD34(+)$  cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98:3249–3255.
7. Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, Grossi A, Leoni P, Liberato NL, et al. The Italian consensus conference on diagnostic criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 1999;104:730–737.
8. Rommel B, Rogalla P, Jox A, Kalle CV, Kazmierczak B, Wolf J, Bullerdiek J. *HMGI-C*, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 1997;26:603–607.

9. Mantovani F, Covaceuszach S, Rustighi A, Sgarra R, Heath C, Goodwin GH, Manfioletti G. NF-kappaB mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C. *Nucleic Acids Res* 1998;26:1433–1439.
10. Diana F, Sgarra R, Manfioletti G, Rustighi A, Poletto D, Sciortino MT, et al. A link between apoptosis and degree of phosphorylation of high mobility group A1a protein in leukemic cells. *J Biol Chem* 2001;276:11354–11361.
11. Battista S, Fidanza V, Fedele M, Klein-Szanto AJ, Outwater E, Brunner H, et al. The expression of a truncated HMGI-C gene induces gigantism associated with lipomatosis. *Cancer Res* 1999;59:4793–4797.
12. Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, et al. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82:57–65.
13. Baldassarre G, Fedele M, Battista S, Vecchione A, Klein-Szanto AJ, Santoro M, et al. Onset of natural killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of the IL-2 and IL-15 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7970–7975.
14. Pierantoni GM, Santulli B, Caliendo I, Pentimalli F, Chiappetta G, Zanesi N, et al. HMGA2 locus rearrangement in a case of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol* 2003;23:363–367.
15. Otero MD, Grand FH, Iqbal S, Ross F, Roman JP, Vizmanos JL, et al. Disruption and aberrant expression of HMGA2 as a consequence of diverse chromosomal translocations in myeloid malignancies. *Leukemia* 2005;19:245–252.

### **3/ Corrélation entre la présence de la mutation JAK2V617F et le taux de survie chez les patients atteints de MFP**

« V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis ».

**Campbell PJ, Griesshammer M, Döhner K, Döhner H, Kusec R, Hasselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC, Desterke C, Guerton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjian JJ, Viillard JF, Brière J, Harrison CN, Green AR, Reilly JT.**

**Blood. 2006 Mar 1;107(5):2098-100. Epub 2005 Nov 17**

La découverte de la mutation activatrice Jak2V617F a révolutionné le diagnostic et a favorisé une meilleure compréhension des néoplasmes myéloprolifératifs chroniques *BCR-ABL* négatif.

Au cours d'une étude internationale réalisée sur une large cohorte de patients atteints de myélofibrose primitive, il a été établi que la mutation Jak2V617F était associée à un taux de survie plus faible.





## Brief report

# V617F mutation in *JAK2* is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis

Peter J. Campbell, Martin Griesshammer, Konstanze Döhner, Hartmut Döhner, Rajko Kusec, Hans C. Hasselbalch, Thomas Stauffer Larsen, Niels Pallisgaard, Stéphane Giraudier, Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès, Christophe Desterke, Bernadette Guerton, Brigitte Dupriez, Dominique Bordessoule, Pierre Fenaux, Jean-Jacques Kiladjian, Jean-François Viallard, Jean Brière, Claire N. Harrison, Anthony R. Green, and John T. Reilly

**Most patients with polycythemia vera and half with idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia have an acquired V617F mutation in *JAK2*. Using sensitive polymerase chain reaction (PCR)-based methods, we genotyped 152 patients with idiopathic myelofibrosis to establish whether there were differences in**

**presentation and outcome between those with and those without the mutation. Patients positive for V617F had higher neutrophil and white cell counts ( $P = .02$ ) than did patients negative for V617F, but other diagnostic features were comparable between the 2 groups. Patients positive for V617F were less likely to require**

**blood transfusion during follow-up ( $P = .03$ ). Despite this, patients positive for V617F had poorer overall survival, even after correction for confounding factors ( $P = .01$ ). (Blood. 2006;107:2098-2100)**

© 2006 by The American Society of Hematology

## Introduction

An acquired mutation in the *JAK2* gene has recently been described in a large proportion of patients with myeloproliferative disorders.<sup>1-4</sup> Most patients with polycythemia vera and about half those with idiopathic myelofibrosis (IMF) and essential thrombocythemia have the mutation. For patients with IMF, it is unknown whether there are differences between patients who are V617F-positive and -negative in their presenting features or survival. We therefore genotyped 152 patients with IMF for the V617F mutation and correlated their *JAK2* status with diagnostic features and outcome.

United Kingdom. All patients provided informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki. Information was collected on clinical and laboratory parameters at diagnosis, together with transfusion requirements and survival during follow-up. The Lille prognostic score was calculated as described.<sup>6</sup> Allele-specific polymerase chain reaction (PCR) or sequencing was used to screen genomic DNA (136 patients) or cDNA (16 patients) from peripheral blood or marrow, using previously published protocols.<sup>1,7</sup> Diagnostic variables were compared between patients who were V617F-positive and V617F-negative using the Wilcoxon rank-sum test for continuous variables and Pearson chi-squared test for categorical variables. Multivariate survival analysis was performed using Cox proportional hazards techniques.<sup>8</sup> The same Cox model resulted from both forward stepwise and backward elimination approaches.

## Study design

The study patients were treated in 14 centers in Europe and satisfied standard diagnostic criteria for idiopathic myelofibrosis.<sup>5</sup> We specifically excluded patients with secondary myelofibrosis, preceding polycythemia vera, or essential thrombocythemia and transitional myeloproliferative disorder. Sixteen patients were included in one of the original descriptions of the *JAK2* V617F mutation.<sup>1</sup> All centers had local ethics committee approval for the research, with overall approval from the Eastern Region Multicentre Research Ethics Committee,

## Results and discussion

We screened 152 samples from patients with IMF for *JAK2* V617F using allele-specific PCR<sup>1</sup> or sequencing. In total, 83 patients were positive for the mutation, giving an overall frequency of the mutation of 54.6% (95% confidence interval, 50.7%-58.5%).

From the Department of Haematology, University of Cambridge, United Kingdom; the Department of Internal Medicine III, University of Ulm, Germany; the Department of Haematology and Clinical Chemistry, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia; the Department of Haematology and Pathology, Odense University Hospital, Denmark; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U362, Villejuif, and Laboratoire d'Hématologie, Henri Mondor Hospital, Créteil; INSERM U602, Villejuif, France; the Hématologie Clinique, Centre Hospitalier de Lens; the Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU) Limoges; the Hématologie Clinique, Hôpital Avicenne, Bobigny; the Hôpital du Haut-Lévêque, Pessac; the Department of Hematology, Hôpital Beaujon, Clichy, France; the Department of Haematology, St Thomas's Hospital, London, United Kingdom; and the Department of Haematology, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, United Kingdom.

Kingdom (P.J.C., A.R.G., and J.T.R.).

P.J.C. contributed patient samples, clinical data, and genotype analyses, as well as performing the statistical analyses and drafting the manuscript. M.G., K.D., H.D., S.G., M.-C.L.B.-K., C.D., B.G., C.N.H., and A.R.G. contributed patient samples, clinical data, and genotype analyses. B.D., D.B., P.F., J.-J.K., J.-F.V., J.B., R.K., H.C.H., T.S.L., and N.P. contributed patient samples and clinical data. J.T.R. contributed patient samples, clinical data, and genotype analyses, as well as directing and coordinating the research. All authors have reviewed and contributed to the manuscript.

**Reprints:** John T. Reilly, Department of Haematology, Royal Hallamshire Hospital, Glossop Rd, Sheffield S10 2JF, United Kingdom; e-mail: [j.t.reilly@sheffield.ac.uk](mailto:j.t.reilly@sheffield.ac.uk).

Submitted August 22, 2005; accepted October 19, 2005. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, November 17, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-08-3395.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

Supported by research grants from the Leukaemia Research Fund, United

© 2006 by The American Society of Hematology

**Table 1. Laboratory and clinical features at diagnosis of idiopathic myelofibrosis analyzed by presence or absence of the JAK2 V617F mutation**

	JAK2 V617F	JAK2 wild-type	P
Total, no.	83	69	
Percentage (95% CI)	54.6 (50.7-58.5)	45.4 (41.5-49.3)	
<b>Demographics</b>			
Male, no. (%)	44 (53)	42 (61)	.3
Female, no. (%)	39 (47)	27 (39)	
Median age, y (10th-90th centile)	64 (48-77)	62 (43-77)	.3
<b>Laboratory and clinical features at diagnosis</b>			
LDH, U/L			.9
Mean $\pm$ SD	546 $\pm$ 374	501 $\pm$ 358	
Median (10th-90th centile)	440 (182-939)	451 (214-764)	
CD34, $\times 10^6/L$			.9
Mean $\pm$ SD	568 $\pm$ 724	620 $\pm$ 840	
Median (10th-90th centile)	292 (67-1332)	222 (22-1345)	
Blast cell count, $\times 10^9/L$			.5
Mean $\pm$ SD	0.25 $\pm$ 0.85	0.29 $\pm$ 0.71	
Median (10th-90th centile)	0.02 (0-0.56)	0.06 (0-0.67)	
Hemoglobin level, g/L			.1
Mean $\pm$ SD	110 $\pm$ 24	104 $\pm$ 22	
Median (10th-90th centile)	109 (73-139)	100 (81-132)	
White cell count, $\times 10^9/L$			.02
Mean $\pm$ SD	15.3 $\pm$ 15.4	10.1 $\pm$ 7.9	
Median (10th-90th centile)	10.0 (4.0-32.9)	7.2 (2.5-21.1)	
Neutrophil count, $\times 10^9/L$			.02
Mean $\pm$ SD	13.1 $\pm$ 15.7	8.1 $\pm$ 12.1	
Median (10th-90th centile)	7.7 (2.9-23.7)	4.7 (1.8-16.1)	
Platelet count, $\times 10^9/L$			.3
Mean $\pm$ SD	312 $\pm$ 252	254 $\pm$ 203	
Median (10th-90th centile)	227 (51-723)	232 (48-494)	
Spleen size, cm			.7
Mean $\pm$ SD	6.7 $\pm$ 5.2	7.4 $\pm$ 6.0	
Median (10th-90th centile)	7.0 (0-14.0)	5.0 (0-15.0)	
Cytogenetics, no.			.8
Normal	18	22	
Abnormal	16	15	
Lille score, no.			.06
0	36	17	
1	23	28	
2	6	5	
Transfusion required during follow-up, no.			.03
None	47	25	
Intermittent or regular	31	35	

Diagnostic clinical and laboratory features were compared between patients who were V617F-positive and -negative (Table 1). There were no significant differences in age, sex, hemoglobin levels, platelet count, peripheral blood blast counts, and spleen size. Similarly, there were no differences in lactate dehydrogenase (LDH) levels, CD34 counts, or frequency of abnormal karyotype, although data were only available on these variables for 48, 43, and 71 patients, respectively. In contrast, patients positive for V617F had significantly higher white cell counts than patients negative for V617F (median, 10.0 versus 7.2  $\times 10^9/L$ ;  $P = .02$ ) and significantly higher neutrophil counts (median, 7.7 versus 4.7  $\times 10^9/L$ ;  $P = .02$ ). This fact meant that the Lille prognostic scores tended to be lower (indicating better prognostic group) for patients positive for V617F ( $P = .06$ ).

Patients positive for V617F were significantly less likely to require blood transfusions during follow-up than patients negative for V617F (Table 1). Of 78 patients positive for V617F in whom data were available, 47 (60%) did not require transfusions, compared with 25 (42%) of 60 patients negative for V617F ( $P = .03$ ).

Patients positive for V617F had worse survival. With a median 38 months of follow-up, 17 patients positive for V617F and

12 patients negative for V617F died. To explore whether this apparent difference was due to the V617F mutation or explained by other potential confounding factors, we fitted multivariate Cox proportional hazards models for 110 patients from whom full clinical data were available (Table 2). When the effects of age and hemoglobin level were controlled for, patients positive for V617F had significantly poorer survival than patients negative for V617F (adjusted hazard ratio, 3.30; 95% confidence interval, 1.26-8.68;  $P = .01$ ). Sex, Lille prognostic score, spleen

**Table 2. Cox proportional hazards model of factors independently predictive of overall survival in myelofibrosis cohort**

Variable	Adjusted hazard ratio	95% confidence interval	P
Hemoglobin level*	0.74	0.60-0.91	.004
Age†	1.61	1.10-2.36	.01
V617F	3.30	1.26-8.68	.01

Variables not independently associated with survival were sex, Lille prognostic score, white cell count, platelet count, and spleen size.

\*Hazard ratio refers to proportional decrease in hazard ratio per 10 g/L (1 g/dL) increase in hemoglobin level at diagnosis.

†Hazard ratio refers to proportional increase in hazard ratio per 10-year increase in age.

size, platelet count, and white cell count were not independently predictive of survival. Some of the differences in survival may be explained by the fact that of the 6 patients with documented leukemic transformation, 5 were V617F-positive. None of the 6 patients had received busulphan, <sup>32</sup>P, or chlorambucil, and only one had received hydroxyurea before leukemic transformation, excluding therapy as an explanation for the differences in leukemia rates between patients who were V617F-positive or V617F-negative.

We found the *JAK2* V617F mutation present in just more than half of cases of idiopathic myelofibrosis, which accords well with previous estimates of its frequency in this disorder.<sup>1-4</sup> Patients positive for V617F had a significantly higher white cell count and neutrophil count than patients negative for V617F, suggesting that the mutation is associated with expansion of the myeloid lineage. In contrast, spleen size, platelet count, CD34<sup>+</sup> counts, and hemoglobin levels showed no significant differences between the V617F-positive and V617F-negative groups as a whole, but there was substantial interindividual variation in all of these parameters. This suggests that many of the clinical manifestations of IMF are caused by factors unrelated to the V617F mutation, and the high frequency of abnormal cytogenetics in both groups implies that other acquired abnormalities contribute substantially to the phenotype.

Interestingly, patients positive for V617F with IMF had less requirement for transfusion than patients negative for V617F. Given that the V617F mutation is common in polycythemia vera

and that the mutation gives erythrocytosis in a murine model,<sup>2</sup> the V617F mutation may be able to partially protect patients with IMF against severe anemia.

In view of the lesser transfusion requirement for patients positive for V617F and the trend for better Lille prognostic score, it was interesting to find that patients positive for V617F had worse overall survival, particularly after correction for potential confounding factors. Not all the cases here were collected prospectively; therefore, survival analyses will be subject to length bias,<sup>9</sup> in which patients with more indolent disease are more likely to survive long enough to be registered in the cohort. However, unless there is a group of patients negative for V617F who do extremely poorly, length bias would, if anything, cause the differences in survival between patients who are V617F-positive and -negative to be underestimated. This emphasizes the need for a careful prospective study of the effects of the V617F mutation in IMF and suggests that the V617F mutation may be an important molecular prognostic marker for this disease.

Because most patients with IMF die of complications related to their disease, especially leukemic transformation and bone marrow failure,<sup>6</sup> the finding of poorer survival in patients positive for V617F suggests they have more aggressive disease. If confirmed in other studies, this would support the use of transplantation or experimental treatments in patients positive for V617F and underscore the role of *JAK2* as a potential therapeutic target in IMF.

## References

- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
- 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;7:387-397.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
- Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol*. 1999;104:730-737.
- Dupriez B, Morel P, Demory JL, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*. 1996;88:1013-1018.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythaemia vera based on *JAK2* V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945-1953.
- Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J Royal Stat Soc Series B*. 1972;34:187-220.
- Brawley OW, Kramer BS. Cancer screening in theory and in practice. *J Clin Oncol*. 2005;23:293-300.



#### **4/ le gène *NOG*, un inhibiteur des *BMP*, est impliqué dans un réarrangement chromosomique chez un patient atteint de myélofibrose**

**« Bone morphogenetic protein antagonist gene *NOG* is involved in myeloproliferative disease associated with myelofibrosis. »**

**Andrieux J, Roche-Lestienne C, Geffroy S, Desterke C, Grardel N, Plantier I, Selleslag D, Demory JL, Laï JL, Leleu X, Le Bousse-Kerdiles C, Vandenberghe P.**

**Cancer Genet Cytogenet. 2007 Oct 1;178(1):11-6**

Au cours de la myélofibrose primitive, les patients développent une réaction stromale caractérisée par une ostéosclérose, une myélofibrose et une néoangiogenèse. Les « Bone morphogenetic proteins » (BMPs) appartiennent à un groupe de facteurs de croissance impliqué dans l'ostéogenèse et la néoangiogenèse. Le gène *NOG* est un inhibiteur de ce groupe de protéines.

Au cours de ce travail réalisé en collaboration avec Joris Andrieux et Jean-Loup Demory, nous avons étudié l'expression des BMP et de *NOG* dans les cellules CD34<sup>+</sup> de patients atteints de MFP. Les résultats de ce travail suggèrent que, chez les patients, une altération du gène *NOG* pourrait participer à la modulation d'expression des BMP et donc contribuer au processus conduisant à la réaction stromale.





ELSEVIER

## Bone morphogenetic protein antagonist gene *NOG* is involved in myeloproliferative disease associated with myelofibrosis

Joris Andrieux<sup>a,\*</sup>, Catherine Roche-Lestienne<sup>a,b</sup>, Sandrine Geffroy<sup>a</sup>, Christophe Desterke<sup>c</sup>, Nathalie Gardel<sup>d</sup>, Isabelle Plantier<sup>e</sup>, Dominik Selleslag<sup>f</sup>, Jean-Loup Demory<sup>g</sup>, Jean-Luc Lai<sup>a,b</sup>, Xavier Leleu<sup>h</sup>, Caroline Le Bousse-Kerdiles<sup>c</sup>, Peter Vandenberghe<sup>i</sup>

<sup>a</sup>Medical Genetics Laboratory, Jeanne de Flandre Hospital, CHRU, 2 Avenue Oscar Lambret, 59037 Lille, France

<sup>b</sup>Cancer Research Institute of Lille, INSERM U817, 59000 Lille, France

<sup>c</sup>INSERM U602, Paul-Brousse Hospital, 94807 Villejuif Cedex, France

<sup>d</sup>Hematology Laboratory, Calmette Hospital, CHRU, 59000 Lille, France

<sup>e</sup>Clinical Hematology Service, Hospital Center of Roubaix, Roubaix, France

<sup>f</sup>Hematology Department, AZ Sint-Jan, Brugge, Belgium

<sup>g</sup>Hematology Department, Catholic University of Lille, Lille, France

<sup>h</sup>Blood Disorders Service, Huriez Hospital, CHRU, 59000 Lille, France

<sup>i</sup>CME-UZ, University Hospital Leuven, Leuven, Belgium

Received 30 April 2007; received in revised form 24 May 2007; accepted 1 June 2007

### Abstract

In a case with secondary myelofibrosis occurring after essential thrombocythemia, cytogenetic analysis revealed an isolated translocation t(X;17)(q27;q22) in all cells. We found that a bacterial artificial chromosome (BAC) encompassing the breakpoint on chromosome 17 long arm contained only one gene, *NOG*. We therefore investigated the occurrence of this rare breakpoint in myeloproliferative disorders (MPDs). We identified three more patients with a 17q abnormality in MPDs: myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM); chronic myeloid leukemia positive for t(9;22)(q34;q11) with additional t(4;17)(p15;q22) at diagnosis; and myelofibrosis complicating polycythemia vera. All three cases exhibited a split of BACs containing *NOG*. The protein encoded by *NOG*, noggin, acts as an antagonist to bone morphogenetic secreted protein 2 and 4 (BMP2 and BMP4). A comparative analysis of gene expression on Agilent 22K oligonucleotide microarrays in purified CD34+ cells from the blood of MMM patients showed significant downregulation of *BMPR2*, *BMPR1B*, *BMP2*, and *BMP8*; upregulation of *BMP3* and *BMP10*; and a trend to lower expression of *NOG*. Thus, given that expression and release of BMPs are important in the induction of osteosclerosis and angiogenic activity, the observed BMP deregulations could be triggered by potential *NOG* genetic alterations in the four cases here described, and may contribute to the myelofibrotic process characterized by bone marrow stromal reaction including collagen fibrosis, osteosclerosis, and angiogenesis. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Myelofibrosis with myeloid metaplasia (MMM) is a rare myeloproliferative disorder (MPD) that associates clonal proliferation of multipotent hematologic progenitors and reactive fibrosis. The karyotype performed on bone marrow or peripheral blood progenitors is abnormal in less than half the cases of MMM, with some patients exhibiting apparently balanced translocations. Distinguishing the power of

analysis of cytogenetic abnormalities in the comprehension and the identification of genetic mechanisms of the disease, we previously documented 12q rearrangements in several myelodysplastic syndromes patients leading to the identification of aberrant overexpression of the embryonic gene *HMG2* [1,2].

We first performed fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in one patient who had developed myelofibrosis after essential thrombocythemia. This analysis revealed an isolated rare balanced t(X;17)(q27;q22) that could interact with the normal expression of the sole identified gene in this region, *NOG*. We documented the

\* Corresponding author. Tel.: +33-3-2044-4018; fax: +33-3-2044-6804.

E-mail address: j-andrieux@chru-lille.fr (J. Andrieux).



recurrence of this breakpoint in three more MPD patients with a breakpoint on 17q. Further analyses of microarray gene expression in MMM CD34<sup>+</sup> cells support the potential implication of the *NOG/BMP* signaling in the etiology of myelodysplastic syndromes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Conventional cytogenetic studies and fluorescence in situ hybridization

Analyses were performed on four cytogenetic samples with chromosome 17q22 abnormalities from patients with MPD, myelofibrosis, or both and without myelodysplasia. Metaphases were obtained from peripheral blood or bone marrow, after short-term (24 or 48 hours) culture without stimulation. Chromosomes were analyzed with conventional Wright stain with G-banding or Giemsa stain with acridine orange and R-banding. Karyotypes are described according to ISCN 2005 [3].

FISH was performed on cytogenetic spreads. Bacterial artificial chromosomes (BAC) RP11-112J9 (chr17:51,993,134-52,172,785) and RP11-890A14 (chr17:51,945,360-52,151,405) (Sanger Institute, Cambridge, UK; <http://www.sanger.ac.uk/>) located on 17q23.2 were used (Fig. 1). Probe DNA (2 µg) was labeled by nick translation with SpectrumRed dUTP (Abbott Molecular–Vysis, Des Plaines, IL). Hybridization was performed at 37°C in 2× saline sodium citrate, 50% (vol/vol) formamide, 10% dextran sulfate, 60 µg Cot-1 DNA (Roche, Indianapolis, IN) in a volume of 10 µL. Posthybridization washing was performed at 72°C in 4× SSC, 1 mL Nonidet P40 (Roche) followed by 1 wash in 1× PBS at room temperature. Chromosomes were counterstained using 4',6-diamidino-2-phenylindole.

### 2.2. Microarray gene expression analysis

Microarray data were provided by the research group of one of us (C. Desterke et al., unpublished data). Total RNA

was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and cleaned up with an RNeasy microkit (Qiagen, Valencia, CA). Total RNA extracted from CD34<sup>+</sup> cells purified from the blood of seven MMM patients (12 slides) different from patients with 17q anomaly was compared with a pool of total RNA from 42 unmobilized healthy donor blood (1 slide) and with a pool of total RNA extracted from CD34<sup>+</sup> cells purified from the blood marrow of six healthy donor (3 slides) on Agilent human 22K (version A) oligomicroarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Total RNA (500 ng) was used to synthesize the microarray cRNA probe with the use of a linear amplification kit (Agilent Technologies). After extraction, microarray data were normalized by application of the local LOWESS algorithm with Agilent feature extraction software (Agilent Technologies). To assume statistical significance, unpaired Student *t*-test was realized between the following two groups: MMM (12 slides) versus healthy donor blood and bone marrow (4 slides). Microarray gene expression data were graphically represented with TMEV 2.0 software using a hierarchical clustering algorithm [4].

## 3. Results

### 3.1. Cytogenetic analyses

Step-by-step FISH analysis performed on metaphase spreads of patient 1 revealed an isolated translocation t(X;17)(q27;q22). In 20 metaphases analyzed, the BAC encompassing the breakpoint on 17q22 contained only one gene, *NOG*. We further documented the recurrence of this rare breakpoint with a split of the BAC containing *NOG* in three other patients with MPD showing a chromosome 17q abnormality (cases 2–4).

#### 3.1.1. Case 1

An 82-year-old woman, diagnosed with essential thrombocythemia 12 years earlier, developed myelofibrosis with anemia and splenomegaly despite an adequate treatment

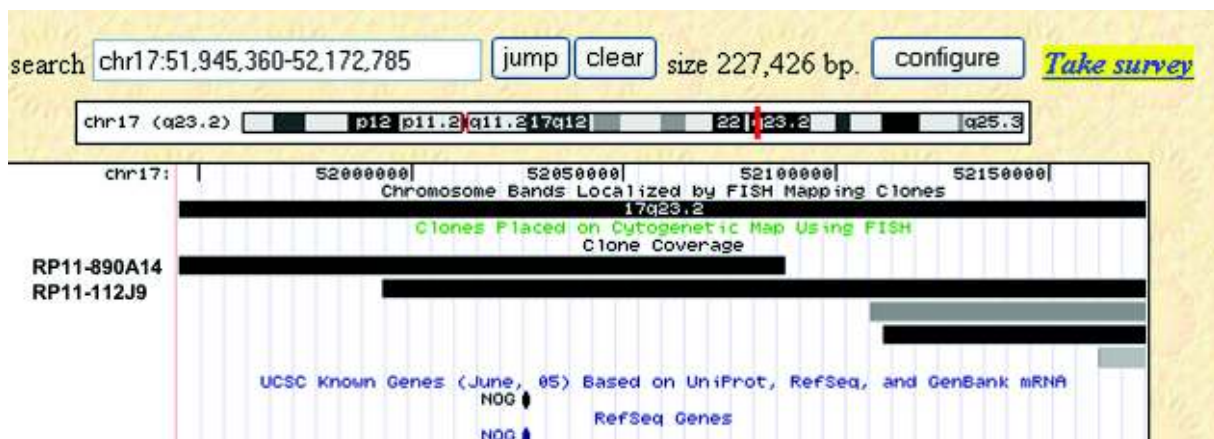


Fig. 1. Localization of *NOG* (17q23.2) and BACs RP11-112J9 and RP11-890 A14 (from the UCSC Human Genome Browser Gateway database, available at <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?org=human>).

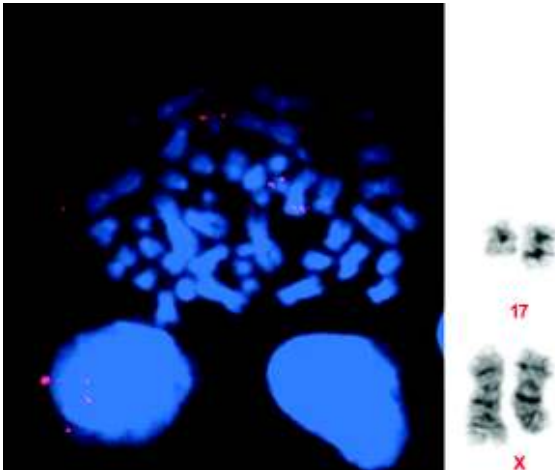


Fig. 2. FISH study (BAC RP11-112J9) of case 1 with 3 red spots showing split FISH signals. Partial G-banding karyogram of chromosomes 17 and X.

with oral hydroxyurea from the year 2000 onwards. At this stage, karyotyping performed on circulating myeloid cells showed 46,XX,t(X;17)(q27;q22)[20]. Administration of erythropoietin induced improvement of anemia, but the subsequent evolution was marked by progressive appearance of thrombopenia and leucopenia. In August 2004, the differential count was suggestive of an acute transformation, with 4% circulating micromegakaryocytes and 13% undifferentiated blasts. Bone marrow analysis confirmed this hypothesis. FISH analysis with BAC RP11-112J9 probe exhibited a split signal on all metaphases analyzed (Fig. 2).

### 3.1.2. Case 2

A 79-year-old woman was diagnosed with chronic myeloid leukemia in 2004. In addition to the classical t(9;22)(q34;q11), her karyotype showed another translocation, t(4;17)(p15;q22), in 26 cells. The patient was first treated for 3 months with oral hydroxyurea and then switched to imatinib mesylate, which soon had to be

interrupted because of acute renal failure, possibly drug-related. Imatinib was finally resumed without further adverse effect, and after 6 months the patient achieved a complete hematological and cytogenetic responses and a satisfying molecular response. FISH analysis with BAC RP11-112J9 probe on diagnostic metaphases exhibited a split signal on all metaphases analyzed (Fig. 3).

### 3.1.3. Case 3

A 55-year-old woman with liver cirrhosis presented in January 2002 with anemia, a leukoerythroblastic blood picture, thrombocytosis, and splenomegaly. The suspected diagnosis of chronic idiopathic myelofibrosis was confirmed by the absence of the *BCR/ABL* fusion gene and by bone marrow histology showing a dense marrow with distorted megakaryocytes, myelofibrosis, and a slight increase of blast cells. The complex karyotype showed various numerous structural anomalies: 45,X,del(7)(p12),add(11)(q21),t(12;13)(p11;p13),der(16)t(16;17)(q24;q11),-17,add(20)(p13)[2]/46,XX[4]. In August 2002, blood count showed 37% blasts, and the acute megakaryocytic transformation was demonstrated by electron microscopic analysis of new bone marrow biopsy. The patient died less than 1 month later. FISH analysis with BAC RP11-112J9 probe on diagnostic sample exhibited a split signal in 5 of the 12 cells analyzed (Fig. 4).

### 3.1.4. Case 4

Case 4 was diagnosed with polycythemia vera in 1989 at age 37. He was treated with phlebotomy, radiation therapy (6 mCi of  $^{32}\text{P}$ ), and intermittent courses of busulfan. After developing a t(3;8)(q26;q12) in 1995, with clinical signs of acceleration, he underwent a conventional sibling HLA-matched bone marrow transplantation in 1996, followed by cytogenetic relapse in 1997 with 46,XY,t(3;8)(q26;q12) in one cell and an unrelated clone with 46,XY,del(20)(q12) in two cells. He underwent a second allogeneic stem cell transplantation following reduced-intensity conditioning

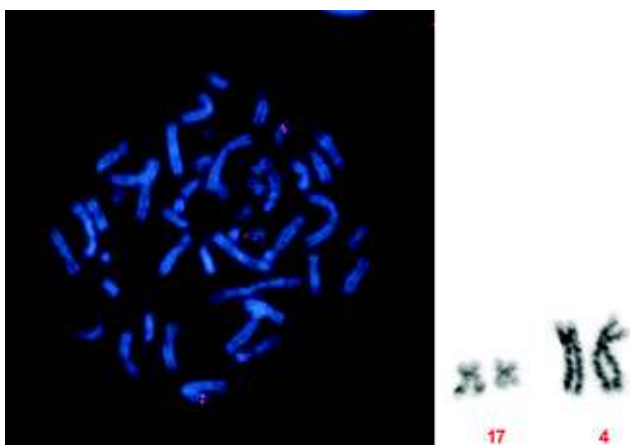


Fig. 3. FISH study (BAC RP11-112J9) of case 2 with 3 red spots showing split FISH signals. Partial G-banding karyogram of chromosomes.

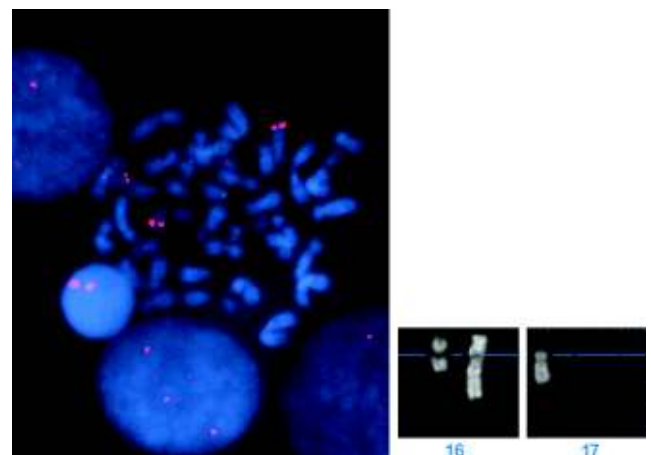


Fig. 4. FISH study (BAC RP11-112J9) of case 3 with 3 red spots showing split FISH signals. Partial R-banding karyogram of chromosomes.

in 2000, followed by graft failure despite three donor lymphocyte infusions. In 2001, he again developed increasing erythrocytosis, leukocytosis and thrombocytosis. Examination of bone marrow aspirate and biopsy revealed a picture of myeloproliferative disease, with increase of reticulin fibers. Bone marrow karyotyping indicated 46,XY,t(3;11)(q27;q14),t(13;17)(q14;q21) in two cells, nonclonal abnormalities in four cells, and a normal karyotype in four cells, without the original t(3;8). Following administration of hydroxyurea, his disease remained rather well controlled from 2001 onward.

FISH analysis with BAC RP11-112J9 probe exhibited (Fig. 5) a split signal on 2 of 12 metaphases (17%) and three spots on 18 of 150 nuclei (12%).

### 3.2. Gene expression analysis

Comparative analysis of gene expression profiles array revealed 213 genes with a twofold change in CD34+ cells. Among them, the 149 genes that are underexpressed are implicated in lymphocytes differentiation, apoptosis, and response to interferon.

The pattern of *NOG* expression revealed no statistical difference ( $P = 0.07$ ), but we distinguished a trend to a lower expression profile in MMM CD34+ cells (Fig. 6). Notably, genes from the bone morphogenetic protein (BMP) pathway were differentially expressed ( $P \leq 0.05$ ). We observed lower expression of BMP Receptor 2 (BMPR2) ( $P < 0.006$ ), BMPR1B ( $P < 0.036$ ), BMP2 ( $P < 0.005$ ) and BMP8 ( $P < 0.028$ ) and an increased expression of BMP3 ( $P < 0.019$ ) and BMP10 ( $P < 0.041$ ). In contrast, we observed no statistical variation of expression of the BMP1, -4, -5, -6, -7, -15, and BMPR1A expression in MMM CD34+ cells.

## 4. Discussion

Myelofibrosis is a clonal stem cell disorder characterized by a bone marrow stromal reaction with collagen fibrosis,

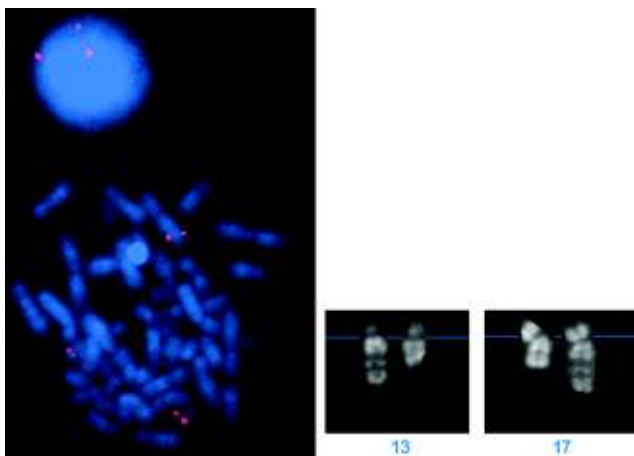


Fig. 5. FISH study (BAC RP11-112J9) of case 4 with 3 red spots showing split FISH signals. Partial R-banding karyogram of chromosomes.

osteosclerosis, and angiogenesis. The characteristic stromal proliferation is secondary to aberrant release of a variety of growth factors from megakaryocytes and monocytes, such as basic fibroblast growth factor, platelet-derived growth factor, and vascular endothelial growth factors [5–7].

BMPs significantly increase the mRNA expression of type I collagen, alkaline phosphatase, osteonectin, osteocalcin, osteopontin, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor A, and parathyroid hormone receptor time dependently during the osteoblastic differentiation [8].

Apparently balanced translocations are useful in identifying gene involvement in oncohematological diseases. FISH analyses of four patients with MPDs with or without myelofibrosis and with a 17q anomaly show a recurrent breakpoint in the *NOG* gene. In a physiological context, secreted *NOG* protein binds and inactivates members of the TGF- $\beta$  superfamily of signaling proteins, molecules that mediate many key events in normal growth and development, including cellular differentiation, proliferation, motility, organization, and death. *NOG* acts as a BMP2 and BMP4 antagonist [9,10]. It also synergizes with basic fibroblast growth factor to repress BMP signaling [11].

Several dominant human *NOG* mutations in families with proximal symphalangism and multiple synostoses syndrome were identified [12,13]. Mutations of *NOG* have also been found in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva, a very rare disease characterized by congenital malformation of the great toes and progressive heterotopic ossification of the muscles [14,15]. Transgenic mice overexpressing *NOG* in the bone microenvironment have decreased trabecular bone volume and impaired osteoblastic function, leading to osteopenia and fractures [16].

In the cases reported here (patients 1 and 2) and in 28 other patients with myelofibrosis, we could not document any mutation found by direct DNA sequencing of *NOG* (data not shown). However, we could argue that, in the present four cases, the breakpoint in 17q potentially deregulates directly *NOG* expression or a regulating sequence around this gene. Likewise, the gene expression profiles analyzed by microarray in CD34+ cells from MMM patients revealed a trend to lower expression of *NOG*.

The correlation between BMPs and *NOG* expression (Fig. 6) leads us to speculate about connection between *NOG* involvement and BMP-pathway genes in either primary or secondary myelofibrosis. Further investigations are needed to improve these preliminary observations.

Several models have shown that *NOGGIN* can antagonize BMP signaling. BMP4-induced heterotopic ossification can be prevented in vivo by local delivery of wild-type *NOGGIN* or after somatic cell of an engineered *Noggin* mutein transfer [17]. Likewise, the BMP2-induced enhancement of tumor neovascularization, could be inhibited by soluble BMP receptor 1A or by *noggin* [18–20].

The expression and release of BMPs by megakaryocytes, within platelets and perhaps by secretion, may help

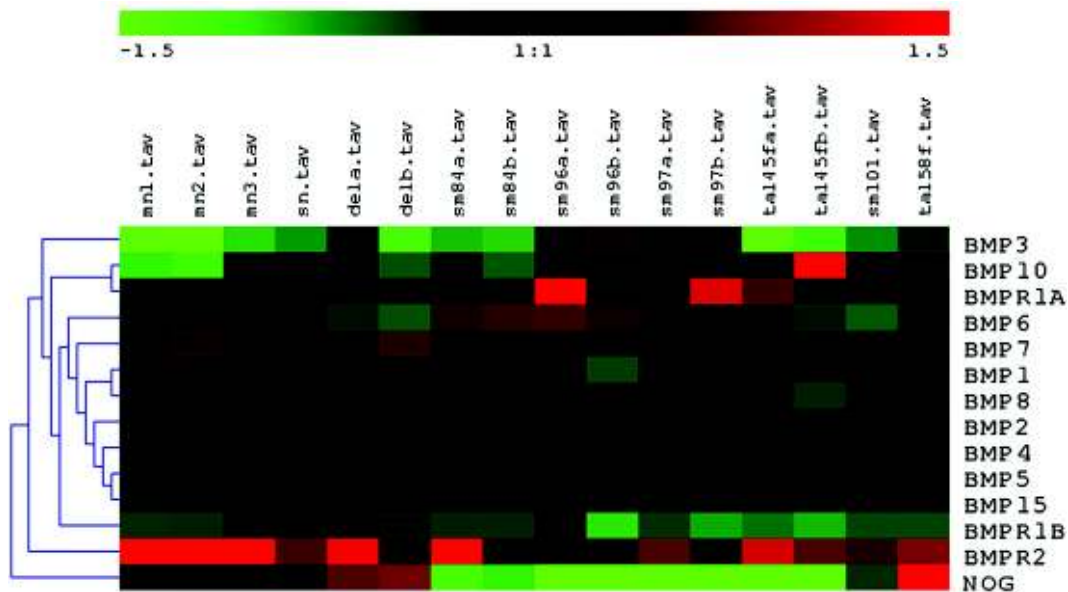


Fig. 6. Unsupervised clustering microarray for BMP, BMPR, and *NOG* gene expression of CD34+ cells of MMM patients and healthy donors. CD34+ cells from 7 patients with single or double experiment (number 1 to 7) and healthy donors: CD34+ CD42b- cells of peripheral blood, CD34+ cells of bone marrow were graphically represented with TMEV 2.0 free software [4] using hierarchical clustering algorithm. Legend: Colors are keyed to the bar across the top, from -1.5 (green, downregulation) to 1.5 (red, upregulation).

to explain recent reports of excessive bone formation associated with increased numbers of marrow megakaryocytes in GATA-1 or NF-E2 gene-deficient mice [21]. BMP involvement has also been suggested in megakaryocytic leukemia [22].

The expression and release of BMPs by malignant and hyperplastic megakaryocytes may also be an important factor in the induction of osteosclerosis, as seen in megakaryocytic leukemia (M7) [23]. Acute leukemia M7, the most frequent subtype of leukemic transformation of myelofibrosis [22], is characterized by hyperplasia of immature megakaryocytes in the marrow, followed by osteosclerosis and myelofibrosis [23,24]. Marked variations in the levels of BMP4 and BMP7 protein expression were also reported in human hematopoietic cell lines, suggesting that disorders in BMP signaling pathways may play a role in the development of hematopoietic neoplasia [25].

Based on our results and on these various observations, we hypothesize that deregulation of *NOG* or related pathways such as the *BMP* genes may contribute to the myelofibrotic process in some myeloproliferative diseases, a hypothesis that is strengthened by the observation from the present study of a deregulated expression of the *BMP* pathway in CD34+ cells of MMM patients.

## Acknowledgments

We are grateful to Evelyne Belot and Anne Delcroix for technical assistance. P.V. is a senior clinical investigator of FWO-Vlaanderen.

## References

- [1] Andrieux J, Demory JL, Morel P, Plantier I, Dupriez B, Caulier MT, Bauters F, Lai JL. Frequency of structural abnormalities of the long arm of chromosome 12 in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;137:68–71.
- [2] Andrieux J, Demory JL, Dupriez B, Queif S, Plantier I, Roumier C, Bauters F, Lai JL, Kerckaert JP. Dysregulation and overexpression of *HMG2* in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:82–7.
- [3] ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005). In: Shaffer LG, Tommerup N, editors. Basel: S. Karger, 2005.
- [4] Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 2003;34:374–8.
- [5] Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles MC, Romquin N, Chevillard S, Praloran V, Demory JL, Dupriez B. Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1997;97:441–8.
- [6] Martyre MC, Le Bousse-Kerdiles MC. French INSERM Research Network on Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. Stem cell dysregulation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: current data on growth factor and transcription factor involvement. *Semin Oncol* 2005;32:373–9.
- [7] Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23:8520–30.
- [8] Hu Z, Peel SA, Ho SK, Sandor GK, Clokie CM. Role of bovine bone morphogenetic proteins in bone matrix protein and osteoblast-related gene expression during rat bone marrow stromal cell differentiation. *J Craniofac Surg* 2005;16:1006–14.
- [9] Cohen MM Jr. TGF $\beta$ /Smad signaling system and its pathologic correlates. *Am J Med Genet A* 2003;116:1–10.
- [10] Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Ward-van Oostwaard D, Mummery C. Regulation of

- human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci* 2004;117:1269–80.
- [11] Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005;2:185–90.
- [12] Marcelino J, Sciortino CM, Romero MF, Ulatowski LM, Ballock RT, Economides AN, Eimon PM, Harland RM, Warman ML. Human disease-causing *NOG* missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11353–8.
- [13] Brown DJ, Kim TB, Petty EM, Downs CA, Martin DM, Strouse PJ, Moroi SE, Gebarski SS, Lesperance MM. Characterization of a stapes ankylosis family with a *NOG* mutation. *Otol Neurotol* 2003;24:210–5.
- [14] Semonin O, Fontaine K, Daviaud C, Ayuso C, Lucotte G. Identification of three novel mutations of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Am J Med Genet* 2001;102:314–7.
- [15] Fontaine K, Semonin O, Legarde JP, Lenoir G, Lucotte G. A new mutation of the noggin gene in a French fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) family. *Genet Couns* 2005;16:149–54.
- [16] Devlin RD, Du Z, Pereira RC, Kimble RB, Economides AN, Jorgetti V, Canalis E. Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation. *Endocrinology* 2003;144:1972–8.
- [17] Glaser DL, Economides AN, Wang L, Liu X, Kimble RD, Fandl JP, Wilson JM, Stahl N, Kaplan FS, Shore EM. In vivo somatic cell gene transfer of an engineered Noggin mutein prevents BMP4-induced heterotopic ossification. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:2332–42.
- [18] Raida M, Clement JH, Leek RD, Ameri K, Bicknell R, Niederwieser D, Harris AL. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and induction of tumor angiogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005;131:741–50.
- [19] Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Lowik CW. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002;143:1545–53.
- [20] Langenfeld EM, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein-2 stimulates angiogenesis in developing tumors. *Mol Cancer Res* 2004;2:141–9.
- [21] Sipe JB, Zhang J, Waits C, Skikne B, Garimella R, Anderson HC. Localization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-2, -4, and -6 within megakaryocytes and platelets. *Bone* 2004;35:1316–22.
- [22] Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005;105:973–7.
- [23] Reilly J. Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: role of growth factors. *J Clin Pathol* 1992;45:461–4.
- [24] Bergstrom K, Van Slyke E. Acute myelofibrosis: an accelerated variant of agnogenic myeloid metaplasia. *Ann Int Med* 1971;74:232–5.
- [25] Detmer K, Steele TA, Shoop MA, Dannawi H. Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 1999;25:310–23.

## **5/ Le promoteur de CXCR4 est hyperméthylé dans les cellules CD34<sup>+</sup> des patients atteints de MFP**

« Hypermethylation of CXCR4 promoter in CD34<sup>+</sup> cells from patients with primary myelofibrosis ».

**Bogani C, Ponziani V, Guglielmelli P, Desterke C, Rosti V, Bosi A, Le Bousse-Kerdilès MC, Barosi G, Vannucchi AM.**

**Stem Cells. 2008 Aug;26(8):1920-30. Epub 2008 May 29**

Le CXCR4, un des récepteurs de la chimiokine CXCL12/SDF-1, est fortement impliqué dans la migration des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques.

Les patients atteints de MFP présentent un taux élevé de cellules CD34<sup>+</sup> circulantes et cette augmentation est associée à l'aplasie médullaire qui survient chez les patients en phase terminale de la maladie. Ce récepteur est sous exprimé à la membrane des cellules CD34<sup>+</sup> de patients atteints de MFP et sa sous-expression participe au processus de migration de ces CSH/PH hors de la moelle osseuse.

Au cours d'un échange universitaire Franco-Italien avec le laboratoire du Pr. Alessandro Vannucchi de l'Université de Florence, nous avons montré que la sous expression de CXCR4 dans les CD34<sup>+</sup> était associée à l'hyperméthylation de son promoteur.



## Hypermethylation of *CXCR4* Promoter in CD34<sup>+</sup> Cells from Patients with Primary Myelofibrosis

COSTANZA BOGANI,<sup>a,b</sup> VANESSA PONZIANI,<sup>a,b</sup> PAOLA GUGLIELMELLI,<sup>a,b</sup> CRISTOPHE DESTERKE,<sup>c</sup> VITTORIO ROSTI,<sup>d</sup> ALBERTO BOSI,<sup>a,b</sup> MARIE-CAROLINE LE BOUSSE-KERDILÈS,<sup>c</sup> GIOVANNI BAROSI,<sup>d</sup> ALESSANDRO M. VANNUCCHI,<sup>a,b</sup> FOR THE MYELOPROLIFERATIVE DISORDERS RESEARCH CONSORTIUM

<sup>a</sup>Unità Funzionale di Ematologia, Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica, Università degli Studi, Firenze, Italy; <sup>b</sup>Istituto Toscano Tumori, Firenze, Italy, on behalf of the MPD-RC, Mount Sinai Hospital, New York, New York, USA; <sup>c</sup>Inserm U602, University Paris-Sud, Villejuif, France; <sup>d</sup>Laboratorio di Epidemiologia Clinica, Fondazione Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy

**Key Words.** CXCR4 • Methylation • Myelofibrosis • CD34<sup>+</sup> cell • Epigenetic

### ABSTRACT

Constitutive mobilization of CD34<sup>+</sup> cells in patients with primary myelofibrosis (PMF) has been attributed to proteolytic disruption of the CXCR4/SDF-1 axis and reduced CXCR4 expression. We document here that the number of circulating CD34<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> cells in PMF patients, as well as the cellular CXCR4 expression, was directly related to CXCR4 mRNA level and that reduced CXCR4 mRNA level was not due to SDF-1-induced downregulation. To address whether epigenetic regulation contributes to defective CXCR4 expression, we studied the methylation status of the CXCR4 promoter using methylation-specific polymerase chain reaction and methylation-specific sequencing in the JAK2V617F-positive HEL cell line and in CD34<sup>+</sup> cells. We

found that CD34<sup>+</sup> cells from PMF patients, unlike those from normal subjects, presented hypermethylation of CXCR4 promoter CpG island 1. Following incubation with the demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AzaD), the percentage of PMF CD34<sup>+</sup> cells expressing CXCR4 increased 3–10 times, whereas CXCR4 mRNA level increased approximately 4 times. 5-AzaD-treated PMF CD34<sup>+</sup> cells displayed almost complete reversal of CpG1 island 1 hypermethylation and showed enhanced migration in vitro in response to SDF-1. These data point to abnormal methylation of the CXCR4 promoter as a mechanism contributing to constitutive migration of CD34<sup>+</sup> cells in PMF. STEM CELLS 2008;26:1920–1930

Disclosure of potential conflicts of interest is found at the end of this article.

### INTRODUCTION

Stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12 (SDF-1/CXCL12) is a major chemoattractant for normal hematopoietic stem and progenitor cells (HSCs/HPCs). SDF-1 is produced by endothelial cells, immature osteoblasts, and stromal cells within the bone marrow (BM) microenvironment, as well as by other cell types, including CD34<sup>+</sup> cells themselves [1]. The canonical receptor for SDF-1 is chemokine receptor 4 (CXCR4), a member of a family of seven trans-membrane domain receptors coupled to heterotrimeric G1 proteins. Experimental deficiency in *SDF-1* or *CXCR4* in the embryo resulted in a lethal phenotype characterized by defective development of cardiac, gastrointestinal, blood vessel, and central nervous system and in the lack of BM seeding by HSCs/HPCs and maturing myeloid or lymphoid cells [2–5]. A role for the SDF-1/CXCR4 axis in human cancer cell metastatic spread has also been inferred [6–9].

Firm adhesion of HSCs/HPCs to BM endothelium in a murine transplantation model was mediated by locally produced SDF-1 [10], whereas, conversely, SDF-1 administration induced recruitment of HSCs/HPCs and maturing leukocytes to the circulation and the spleen [11]. Thus, a positive SDF-1 gradient is the mechanism (or one of the mechanisms) by which HSCs/HPCs are normally retained in the BM. The increased mobilization of HSCs/HPCs that occurs following administration of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) or chemotherapeutic agents [12, 13] has been associated with the release of proteolytic enzymes, such as cathepsin G, neutrophil elastase, and matrix metalloprotease-9 (MMP-9), which cause SDF-1 degradation and cleavage of the CXCR4 N terminus [12]. However, a negative correlation was found between the degree of HSCs/HPCs mobilized to peripheral blood (PB) and CXCR4 expression level in patients receiving chemotherapy plus G-CSF [14] or G-CSF alone [15]; furthermore, CD34<sup>+</sup> cells in the BM of patients on G-CSF displayed lower CXCR4 membrane density than naïve cells, and the yield of mobilized CD34<sup>+</sup> cells

Author contributions: C.B.: conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation; V.P.: conception and design, collection and/or assembly of data; P.G.: conception and design, provision of study material or patients, data analysis and interpretation, manuscript writing; C.D. and V.R.: collection and/or assembly of data; A.B.: provision of study material or patients; M.-C.L.B.-K. and G.B.: data analysis and interpretation, manuscript writing; A.M.V.: conception and design, financial support, provision of study material or patients, data analysis and interpretation, manuscript writing. All authors gave final approval of the manuscript.

Correspondence: Alessandro M. Vannucchi, M.D., Department of Hematology, University of Florence, 50134 Florence, Italy. Telephone: 39-055-7947-688; Fax: 39-055-7947-688; e-mail: amvannucchi@unifi.it Received April 15, 2008; accepted for publication May 15, 2008; first published online in STEM CELLS EXPRESS May 29, 2008. ©AlphaMed Press 1066-5099/2008/\$30.00/0 doi: 10.1634/stemcells.2008-0377



correlated with the proportion of BM CD34<sup>+</sup>/CXCR4<sup>-</sup> cells [15]. These data support the contention that mobilization of CD34<sup>+</sup> cells is also dependent on the density of CXCR4 on the cell membrane; accordingly, antagonist-induced desensitization of CXCR4 caused the egress of HSCs/HPCs from BM to PB [16]. The mechanisms by which G-CSF affects the expression of CXCR4 have not been completely elucidated, but at least in part they depend on proteolytic modifications with functional inactivation of the receptor [13]. However, it has been shown that G-CSF downregulates CXCR4 in myeloid cells [17] through the transcriptional repressor growth factor independence-1 (Gfi-1) [18], whereas modulation of CXCR4 expression at the post-translational level has been described in both hematopoietic [19] and nonhematopoietic [7, 20] cells. CXCR4 on the cell surface of migrating cells is physiologically downregulated upon SDF-1 binding through rapid phosphorylation and internalization of the receptor [21]. Therefore, mobilization of HSCs/HPCs may be the consequence of changes in the expression of either SDF-1 or CXCR4 or both.

Primary myelofibrosis (PMF) is a chronic myeloproliferative disorder (MPD) characterized by variable changes in blood cell count, leukoerythroblastosis, splenomegaly, extramedullary hematopoiesis, and bone marrow fibrosis with extensive angiogenesis [22]. Constitutive mobilization of CD34<sup>+</sup> cells in the PB is one striking characteristic of PMF; the number of these cells is more than 300 times greater than in healthy subjects and 20–30 times greater than in other MPDs, such as polycythemia vera and essential thrombocythemia [23]. Abnormal cell mobilization in PMF is not limited to HSCs/HPCs, since more cells with a CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/vascular endothelial growth factor receptor 2<sup>+</sup> phenotype have been reported to circulate, preferentially at early phases of the disease [24]; although these cells do not function as true endothelial progenitor cells and their function in vessel formation and/or homeostasis is still unknown [25], they might be involved in the same mechanisms leading to enhanced mobilization as for the HSCs/HPCs. Mechanisms underlying the abnormal mobilization of CD34<sup>+</sup> cells in PMF probably involve the establishment of a proteolytic environment causing SDF-1 degradation within the BM [26, 27]. However, it is likely that abnormalities of CXCR4 also play some role, as suggested by findings of reduced CXCR4 expression and an abnormally low CXCR4 mRNA level in PMF CD34<sup>+</sup> cells [28, 29]. The aim of this study was to address potential mechanisms for the reduced CXCR4 expression in PMF CD34<sup>+</sup> cells and its contribution to the phenomenon of constitutive migration in the circulation.

## SUBJECTS, MATERIALS, AND METHODS

### Subjects

This study included a total of 40 PMF patients, 11 normal blood donors, and 31 volunteer donors of hematopoietic stem cells, of whom 20 donated BM cells and 11 were mobilized with G-CSF. Diagnosis of PMF was made according to the criteria identified by the Italian Consensus Conference [30]; all patients were primary forms in a typical fibrotic stage of the disease [31], who were studied at diagnosis or during follow-up, but were cytotoxic agent-free from at least 1 month. Twenty-four patients were *JAK2V617F* mutant (60%) [32], whereas none harbored *MPL* mutation [33]. Seventy-five percent of the patients were in the low-risk category, 20% in the intermediate category, and 5% in the high-risk category, according to Lille score [34]. The CD34<sup>+</sup> cell count in the PB of PMF patients was  $186 \pm 179 \times 10^6$  cells per liter (range,  $10\text{--}379 \times 10^6$  cells per liter). Informed consent from patients and controls was obtained under an IRB approval study protocol.

www.StemCells.com

### Flow Cytometry Analysis of Circulating CD34<sup>+</sup> Cells

CD34<sup>+</sup> cells in the PB of PMF patients were enumerated using 50  $\mu$ l of EDTA-anticoagulated blood, after staining with CD45-fluorescein isothiocyanate (FITC)-/CD34-phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies (both from Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, <http://www.bd.com>) and 7-aminoactinomycin D (BD Pharmingen, San Diego, [http://www.bdbiosciences.com/index\\_us.shtml](http://www.bdbiosciences.com/index_us.shtml)) for excluding dead cells in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson), according to guidelines from the International Society of Hematology and Graft Engineering [35]. Cell surface expression of CXCR4 (CD184) was determined using anti-human CD184(CXCR4)-PE antibody (BD Pharmingen) and the appropriate isotype control. Results were expressed both as the percentage of CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4 and as the ratio of geometric mean fluorescence intensity (MFI) by dividing the value of specific antibodies with the corresponding isotype control antibody. Intracellular CXCR4 staining in cells migrating in Transwell cells (Corning Costar, Boston, <http://www.corning.com/lifesciences>) (described below) was performed after blocking cell surface CXCR4 with nonconjugated antihuman CXCR4 antibody (clone 12G5, 10  $\mu$ g/ml, for 1 hour at 4°C). Cells were fixed with paraformaldehyde and permeabilized with 1% Triton X-100 before fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Data analysis was performed using WinMDI software (version 2.9; <http://facs.scripps.edu/software.html>).

### CD34<sup>+</sup> Cell Purification

BM or PB mononuclear cells were separated over a Ficoll-Hypaque gradient (Lymphoprep; Nycomed Pharma, Oslo, Norway, <http://www.nycomed.at>), and CD34<sup>+</sup> cells were immunomagnetically selected (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany, <http://www.miltenyibiotec.com>) [36]. Purity of the isolated CD34<sup>+</sup> cell population was evaluated by flow cytometry after labeling with PE-HPCA2 anti-CD34 monoclonal antibody (Becton Dickinson). Aliquots of CD34<sup>+</sup> cells were immediately resuspended in lysis buffer for RNA and DNA purification or used in culture.

### Ex Vivo Short-Term Incubation of CD34<sup>+</sup> Cells

Purified CD34<sup>+</sup> cells were cultured at  $10^5$  cells per milliliter in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; Bio Whittaker) containing 10% fetal calf serum (FCS; HyClone, Logan, UT, <http://www.hyclone.com>) and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere for 4 hours. Cells were then exposed for variable times up to 48 hours to different agents, including cytokines (SDF-1, transforming growth factor- $\beta$  [TGF- $\beta$ ], and interferon- $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ]; all from Peprotech, Rocky Hill, NJ, <http://www.peprotech.com>) and the hypomethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-AzaD; Sigma-Aldrich, Milano, Italy, <http://www.sigmaaldrich.com>). Parallel cultures without added cytokines or 5-AzaD were prepared in each experiment as control. At the end of incubation, cells were collected and either processed directly for FACS analysis or nucleic acid extraction, or washed in fresh medium for use in migration experiments.

### Cell Lines

The human erythroleukemia HEL and K562 cell lines and the myeloid HL60 cell line were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, <http://www.atcc.org>). The cells were maintained in IMDM supplemented with 10% FCS.

### Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Determination of CXCR4 mRNA Level

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Paisley, U.K., <http://www.invitrogen.com>); RNA concentration and purity/integrity were determined using NanoDrop technology (ND-1000 spectrophotometer; NanoDrop, Wilmington, DE, <http://www.nanodrop.com>). cDNA was reverse-transcribed from 100 ng of total RNA obtained from purified CD34<sup>+</sup> cells using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, <http://www.appliedbiosystems.com>). TaqMan polymerase chain reactions

(PCRs) were carried out with the TaqMan Universal PCR Master Mix, using TaqMan Gene Expression Assays (HS-00607978 for *CXCR4*; Applied Biosystems), by means of the ABI Prism 7300 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Assays were performed in quadruplicate. Gene expression profiling was achieved using the comparative cycle threshold ( $C_T$ ) method of relative quantitation using VIC-labeled *RNaseP* probe as the housekeeping gene (Applied Biosystems) ( $\Delta C_T$ ).

### Methylation-Specific PCR and Methylation-Specific Sequencing Analysis of *CXCR4* Promoter Methylation Status

To determine the location of CpG islands in the promoter region of *CXCR4*, we used the MethPrimer software (<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>); five CpG islands were identified, and primers for each CpG island were designed to be used in a methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) assay (reported in supplemental online Fig. 1). We also designed primers for use in a methylation-specific sequencing (MSS) assay (described below), which allowed the amplification of a 230-nucleotide region within CpG island 1 containing 22 individual CpG dinucleotides. In brief, 1  $\mu$ g of DNA obtained from CD34<sup>+</sup> cells or cell lines was treated with sodium bisulfite to induce conversion of unmethylated cytosine to uracil (Epitect Bisulfite kit; Qiagen, Hilden, Germany, <http://www1.qiagen.com>). The CpG methylase SssI from *Spiroplasma* sp., strain MQ1 (New England Biolabs, Beverly, MA, <http://www.neb.com>), was used to produce fully methylated methylated DNA from HL60 cells (positive control). MSP was performed using primers specific for either the methylated or unmethylated DNA under the following conditions for TaqGold polymerase (Applied Biosystems): 94°C for 13 minutes followed by 40 cycles at 94°C for 30 seconds, 59°C or 60°C (for methylated and unmethylated *CXCR4*, respectively) for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. Amplicons were resolved in 3% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Bisulfite-modified DNA was also used as direct template for MSS. PCR conditions were as follows: 94°C for 13 minutes; 30 cycles consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 56°C, and 30 seconds at 72°C; and 10 minutes at 72°C. The primer sequences were as follows: forward primer, 5'-gagg-ggaaagtattgtt-3'; reverse primer, 5'-aaacttacacaaaatacactcattca-3'. Amplicons were subjected to bidirectional sequencing on an ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

### In Vitro Migration Assay for CD34<sup>+</sup> Cells

For these experiments,  $2 \times 10^5$  purified CD34<sup>+</sup> cells were seeded in 500  $\mu$ l of IMDM supplemented with 10% FCS in the absence (control) or in the presence of 1  $\mu$ M 5-AzaD for 12 hours. At the end of incubation, cell aliquots were labeled with anti-CD34<sup>+</sup> FITC and anti-human CD184(CXCR4) PE to evaluate changes in CXCR4 content upon 5-AzaD exposure. Immediately before migration assay, CD34<sup>+</sup> cells were washed in serum-free media, resuspended in 100  $\mu$ l of IMDM, and loaded into Transwell filters (5  $\mu$ m pore; Transwell, 24-well cell clusters), which were then carefully transferred to wells containing 500  $\mu$ l of serum-free medium supplemented or not (for calculation of passive diffusion) with 125 ng/ml recombinant hSDF-1 $\alpha$ . Plates were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 3 hours, and then the upper chamber was carefully removed and cells in top and bottom chambers were counted; the percentage of CD34<sup>+</sup> cells undergoing migration in samples treated or not with 5-AzaD was calculated after subtracting passive diffusion.

### Statistical Analysis

Comparison between groups was performed by the Mann-Whitney *U* test or Fisher test as appropriate, using the SPSS software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, <http://www.statsoft.com>), GraphPad In-Stat software (GraphPad Software, Inc., San Diego, <http://www.graphpad.com>), or Origin software (version 7.5; OriginLab, Northampton, MA, <http://www.originlab.com>) for computation. The chosen level of significance from two-sided tests was  $p < .05$ .

## RESULTS

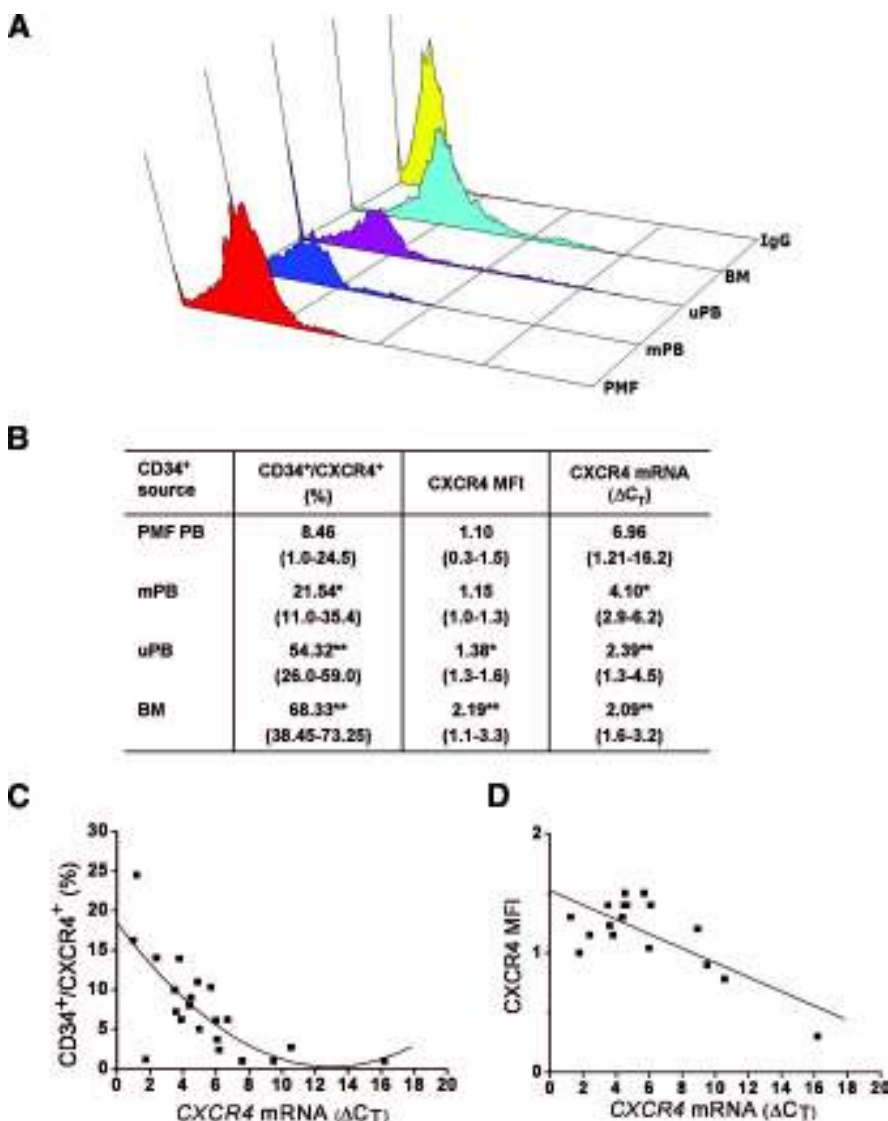
### CXCR4 Expression in PMF CD34<sup>+</sup> Cells Correlates with *CXCR4* mRNA Level

The expression of membrane CXCR4 in CD34<sup>+</sup> cells from PB of PMF patients was determined by flow cytometry (FACS) and compared with normal different sources, which included unstimulated peripheral blood (uPB) and G-CSF-mobilized peripheral blood (mPB) and BM aspirates. As shown in Figure 1A and 1B, the frequency of CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4 in the PB of PMF patients was significantly lower than in normal samples ( $p < .01$  compared with uPB or BM cells;  $p < .05$  compared with mPB). In normal samples, CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells progressively decreased from a median of 68.3% of all CD34<sup>+</sup> cells in the BM to 54.3% in uPB and to 21.5% in mPB. Also, the density of CXCR4 molecules, expressed as the MFI, was significantly lower in PMF CD34<sup>+</sup> cells compared with normal uPB or BM CD34<sup>+</sup> cells but not compared with mPB CD34<sup>+</sup> cells (Fig. 1B). Purified PMF CD34<sup>+</sup> cells expressed significantly lower *CXCR4* mRNA level than normal cells from all other sources; the highest and lowest mRNA levels were measured in CD34<sup>+</sup> cells from control BM and PMF PB, respectively, differing on the order of 4.9  $\Delta C_T$  (Fig. 1B). On the basis of the assumption that in optimized real-time quantitative (RTQ) PCR experiments a  $\Delta C_T n = 3.3$  corresponds to a 10-fold difference in mRNA level [37], it was calculated that *CXCR4* mRNA expression in PMF CD34<sup>+</sup> cells was ~40-fold lower than in normal BM CD34<sup>+</sup> cells. Both the frequency of circulating CD34<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup> cells and the CXCR4 MFI in PMF patients were correlated with *CXCR4* mRNA level, as shown in Figure 1C and 1D, respectively. The percentage of CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4, the CXCR4 MFI, and the level of *CXCR4* mRNA were all similar in patients harboring the *JAK2V617F* mutation and those not harboring it (not shown in detail).

### Reduced *CXCR4* mRNA Level Is Not Due to SDF-1-Induced Downregulation

SDF-1 level has been found to be significantly increased in the BM microenvironment and in plasma of PMF patients [28, 38]; although downregulation of CXCR4 expression on the cell membrane would be expected because of its physiologic internalization upon SDF-1 cross-linking, we also asked whether the reduced *CXCR4* mRNA level observed in PMF CD34<sup>+</sup> cells could follow ligand binding. To this end, we first determined the expression pattern of CXCR4 and *CXCR4* mRNA in three different hematopoietic cell lines: the HEL cell line, which harbors *JAK2 V617F* mutation; the BCR/ABL-positive K562 cell line; and the PML-RAR $\alpha$ -positive HL-60 cell line. We found that K562 cells were virtually negative for CXCR4 expression, whereas almost all HL60 cells expressed CXCR4 at a high level (MFI = 1.9); on the other hand, approximately 25% (range, 9.2%–49.3%) of HEL cells were CXCR4<sup>+</sup> dim (MFI = 1.2) (Fig. 2). The level of *CXCR4* mRNA mirrored the results of FACS analysis (Fig. 2B); *CXCR4* mRNA was virtually undetectable in K562 cells, highly expressed in HL60 cells, and expressed at intermediate level, approximately 15-fold lower, in HEL cells.

HEL cells were exposed to increasing concentration of SDF-1 for 3–24 hours. Starting as soon as after 3 hours of incubation, we observed a dose-dependent decline of membrane CXCR4 that became undetectable in the presence of 500 ng/ml SDF-1 (Fig. 3A, 3B); on the contrary, *CXCR4* mRNA level remained stable (Fig. 3B). CXCR4 was similarly downregulated in the presence of 500 ng/ml SDF-1 in CD34<sup>+</sup> cells from normal uPB or PMF PB; again, no concurrent modification of mRNA



**Figure 1.** Frequency of CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells in the PB of PMF patients and CXCR4 cellular expression in CD34<sup>+</sup> cells are correlated to CXCR4 mRNA level. The frequency of CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4 was determined by fluorescence-activated cell sorting analysis in the PB of PMF patients ( $n = 40$ ), in the PB of healthy subjects in the steady state (uPB;  $n = 11$ ) or after granulocyte colony-stimulating factor priming (mPB;  $n = 11$ ), and in BM aspirate from volunteer donors ( $n = 20$ ). A typical histogram for these different cell sources is presented in (A), and median value (range) of CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells and the CXCR4 expression expressed as the MFI are reported in (B). CXCR4 mRNA level was measured in purified CD34<sup>+</sup> cells by real-time quantitative polymerase chain reaction and expressed as  $\Delta C_T$  after being normalized to *RNaseP* as the housekeeping gene. Please note that higher  $\Delta C_T$  values indicate lower mRNA content. \*,  $p < .05$ ; \*\*,  $p < .01$ . The relationship between percentage of circulating CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> or the CXCR4 MFI and the level CXCR4 mRNA concurrently measured in purified CD34<sup>+</sup> cells is presented in (C) and (D), respectively. In both instances, the correlation between the two variables was statistically significant at  $p < .01$ . Abbreviations: BM, bone marrow; MFI, mean fluorescence intensity; mPB, mobilized peripheral blood; PB, peripheral blood; PMF, primary myelofibrosis; uPB, unstimulated peripheral blood.

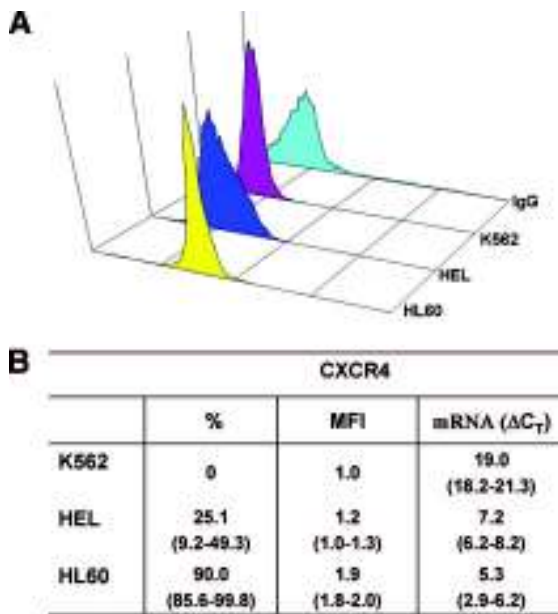
level was observed (Fig. 3C–3E). We concluded that SDF-1-induced decrease of CXCR4 expression in HEL cells and in CD34<sup>+</sup> cells was due to ligand-induced internalization of the receptor but did not involve CXCR4 transcription. We also evaluated the effect of TGF- $\beta$ , whose level is increased in PMF [39] and supposedly involved in disease pathogenesis [40, 41], and of IFN- $\gamma$ , which was shown to downregulate CXCR4 mRNA in lymphocytes and neutrophils [42, 43]; we observed that neither cytokine induced modification of CXCR4 expression or of CXCR4 mRNA level in normal uPB- and PMF PB-derived CD34<sup>+</sup> cells (supplemental online Fig. 2).

**The CXCR4 Promoter Methylation Status Correlates with CXCR4 mRNA Level**

Since epigenetic mechanisms have been shown to contribute to regulated expression of CXCR4 in solid cancer cell lines [44–46], we asked whether this mechanism might also be involved in the abnormally low CXCR4 expression in PMF CD34<sup>+</sup> cells. The promoter region of CXCR4 contains five CpG islands (supplemental online Fig. 1); an MSP assay on bisulfite-treated DNA was designed to evaluate methylation status of each of these CpG islands, whereas MSS was used for sequencing a CpG dinucleotide-rich region within CpG island 1. In the first set of experiments, we used cell lines. We found that CpG 1 and

5 were partially methylated in HEL cells, whereas K562 cells had preferential representation of the methylated allele corresponding to CpG island 1, 3, and 5; on the other hand, there was no evidence for methylated alleles in HL60 cells (Fig. 4A). By using MSS, we confirmed that HL60 cells had 100% unmethylated cytosine compared with 40%  $\pm$  8% and 74%  $\pm$  16% in HEL and K562 cells, respectively (mean  $\pm$  SD of three determinations;  $p < .01$  for both compared with HL60 cells) (Fig. 4B).

The methylation status of CXCR4 promoter was evaluated in CD34<sup>+</sup> cells purified from the BM ( $n = 4$ ) or mPB ( $n = 4$ ) of healthy controls but not from uPB because of the insufficient number of purified cells that could be obtained. According to MSP, we found that all CpG islands in the CXCR4 promoter of BM-derived CD34<sup>+</sup> cells were in an unmethylated status, whereas in CD34<sup>+</sup> purified from mPB, a faint band corresponding to the methylated allele of CpG island 1 could be observed (Fig. 5A). On the other hand, all 18 PMF patients evaluated displayed comparable representation of methylated and unmethylated alleles corresponding to CpG island 1, with faint evidence of a methylated allele for CpG island 5 also (patients 3, 4, and 7) (Fig. 5A). By using MSS analysis, we calculated that 25%  $\pm$  13% of cytosine residues in PMF CD34<sup>+</sup> cells were methylated, compared with none in normal BM CD34<sup>+</sup> cells and 9%  $\pm$  4%



**Figure 2.** Expression of CXCR4 and level of CXCR4 mRNA in three hematopoietic cell lines. Expression of CXCR4 on the membrane of HL60, K562, and HEL cells was measured by fluorescence-activated cell sorting and expressed as the percentage of CXCR4<sup>+</sup> cells and as the CXCR4 MFI. A typical histogram is presented in (A), and median value (range) from at least three individual determinations is reported in (B). The CXCR4 mRNA level was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction and expressed as  $\Delta C_T$  after being normalized to *RNaseP* as the housekeeping gene. Please note that higher  $\Delta C_T$  values indicate lower mRNA content. Abbreviation: MFI, mean fluorescence intensity.

in mPB ( $p < .01$  for both). These data, together with those presented in Figure 1, suggested that in CD34<sup>+</sup> cells from healthy subjects and PMF patients, as was observed in cell lines, the level of CXCR4 mRNA is correlated with the methylation status of CpG island 1 of the CXCR4 promoter.

### Hypomethylating Agent 5-AzaD Reverts Abnormal Methylation of CXCR4 Promoter and Increases CXCR4 Expression

The above results prompted us to evaluate the effect of demethylating agent 5-AzaD on the transcriptional activity of CXCR4. First, we evaluated different concentrations of the agent, incubation times, and cell densities in cultures of HEL cells (not shown in detail); the best conditions were represented by a 1.0  $\mu$ M concentration of 5-AzaD for 6–48 hours of incubation, using cells that had been synchronized in serum-free medium for 12–16 hours. The number of HEL cells expressing CXCR4 in synchronized cultures was lower (median, 15%; range, 9%–19%) than in passage cultures (comparison shown in Fig. 2), allowing better appreciation of any changes induced by drug treatment. In synchronized HEL cells that had been exposed to 5-AzaD for 24 hours, the percentage of CXCR4<sup>+</sup> cells increased up to a median of 47% (range, 30%–58%;  $p < .01$  vs. untreated cultures (Fig. 4C, 4D). There was no further increase in the percentage of CXCR4<sup>+</sup> cells at 48 hours of culture, but cell toxicity in the presence of 5-AzaD became significant (25%  $\pm$  10% of the cells were trypan blue-positive at that time point).

The level of CXCR4 mRNA was measured by RTQ-PCR at different times after drug exposure, from 2 to 48 hours. We observed a statistically significant increase of CXCR4 mRNA in a very narrow time interval, peaking at 8 hours of incubation and returning to pretreatment level at 24 hours; the mean CXCR4

mRNA increase at 8 hours was 6.1 ( $\pm$  0.9)-fold compared with control cultures ( $p < .01$ ; Fig. 4E). We evaluated whether enhanced transcription of CXCR4 after 5-AzaD exposure was associated with changes of promoter methylation status; to this end, cells were incubated with 5-AzaD for 24 hours, and bisulfite-treated DNA was analyzed using both MSP and MSS. As shown in Figure 4F and 4G, we observed a significant reduction in the proportion of methylated allele corresponding to CpG island 1, with no appreciable modification of CpG island 5, whereas the percentage of methylated cytosine using MSS analysis decreased from 40%  $\pm$  12% to 14%  $\pm$  8% ( $n = 3$  experiments;  $p = .003$ ). Overall, these results suggested that the CXCR4 mRNA level in HEL cells was correlated mainly with the methylation status of CpG island 1, whereas the role of CpG island 5, if any, could not be clearly ascertained.

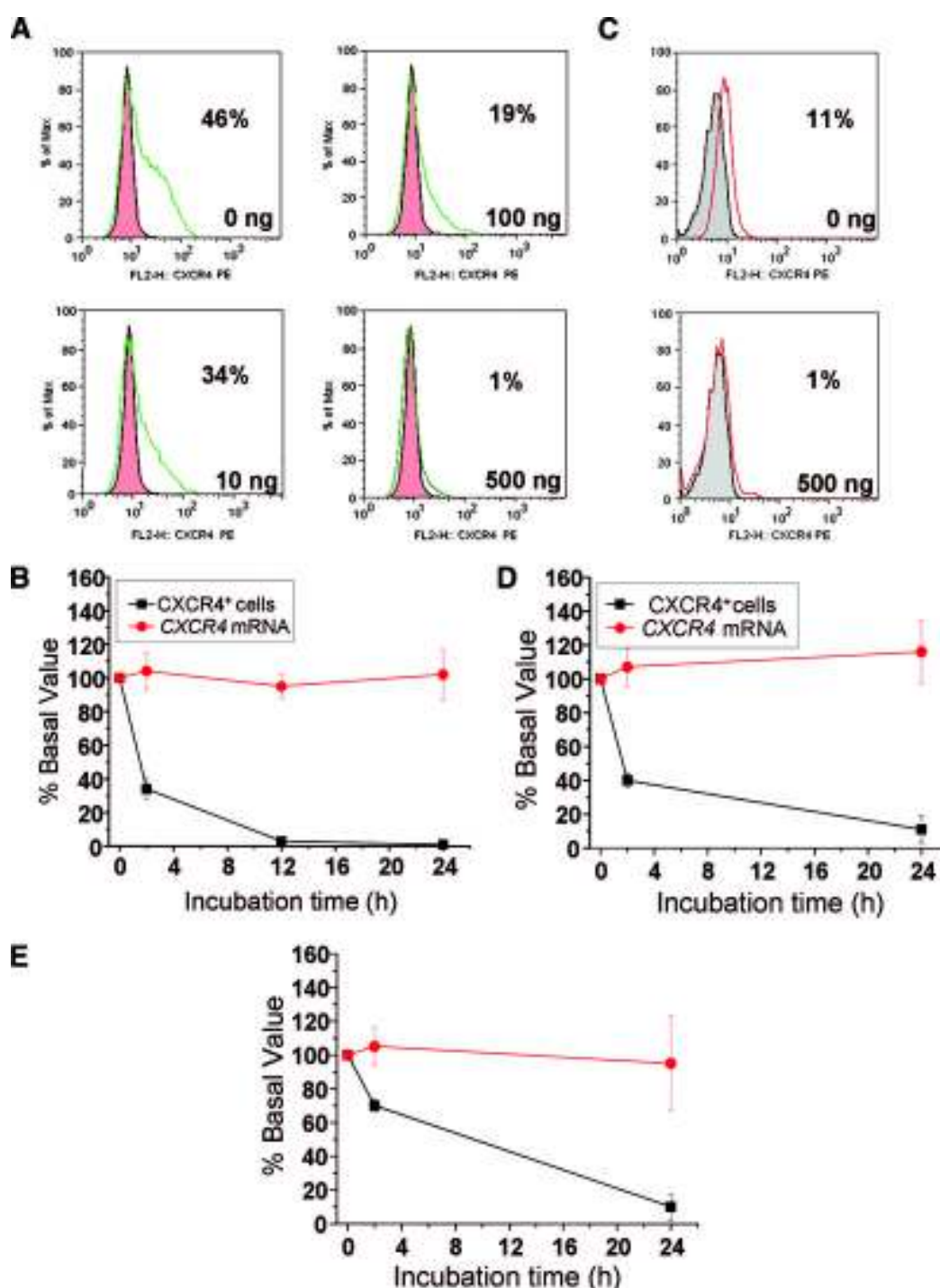
When purified CD34<sup>+</sup> cells from PMF patients were incubated for 8–24 hours with 1  $\mu$ M 5-AzaD, a 3.9-fold median increase (range, 3.5–10) in the number of CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4 was observed at 12 hours of incubation ( $p < .001$  vs. untreated cells) (Fig. 6A, 6B); concurrently, levels of CXCR4 mRNA were already increased 3.7-fold (range, 3.1–4.1) at 8 hours (Fig. 6B). Changes in methylation status of CXCR4 promoter were analyzed using MSP and MSS and are presented in Figure 6C. In all patients evaluated, MSP revealed the disappearance of the amplicon corresponding to the methylated allele of CpG island 1, whereas in cases where a methylated allele of CpG island 5 was present (i.e., patients 2, 3, and 5), no significant modification after 5-AzaD incubation could be demonstrated. These data were corroborated by the results of MSS analysis that showed a complete (as was the case for patients 1 and 3) or more than 70% (i.e., patients 4 and 5) reduction in methylated CpGs within the 230-base pair fragment corresponding to CpG island 1.

### 5-AzaD Treated PMF CD34<sup>+</sup> Cells Showed Enhanced Migrating Properties

To assess the functional consequence of increased CXCR4 expression in PMF CD34<sup>+</sup> exposed to 5-AzaD, we performed an in vitro migration assay in response to SDF-1. Purified CD34<sup>+</sup> cells from eight PMF patients were incubated with or without 5-AzaD, and their migration in response to a gradient of SDF-1 added to the lower chamber was assessed at 3 hours. After subtracting passive diffusion (i.e., the number of CD34<sup>+</sup> cells that migrated to the lower chamber in the absence of SDF-1), the percentage of CD34<sup>+</sup> cells migrating to the lower chamber in response to SDF-1 increased from a mean ( $\pm$  SD) of 6.3%  $\pm$  1.1% in controls to 23.2%  $\pm$  8.9% in CD34<sup>+</sup> cells preincubated with 5-AzaD ( $p = .007$ ). We then measured the expression of membrane and intracellular CXCR4 in nonmigrating (upper chamber) and migrating (lower chamber) cells after 5-AzaD treatment in four experiments. Although we observed no change in the ratio of membrane versus intracellular CXCR4-associated fluorescence in the upper-chamber cells, those that had migrated presented a median fourfold increase in the relative amount of intracellular versus membrane CXCR4 (data not shown in detail), indicating receptor internalization upon SDF-1 binding.

## DISCUSSION

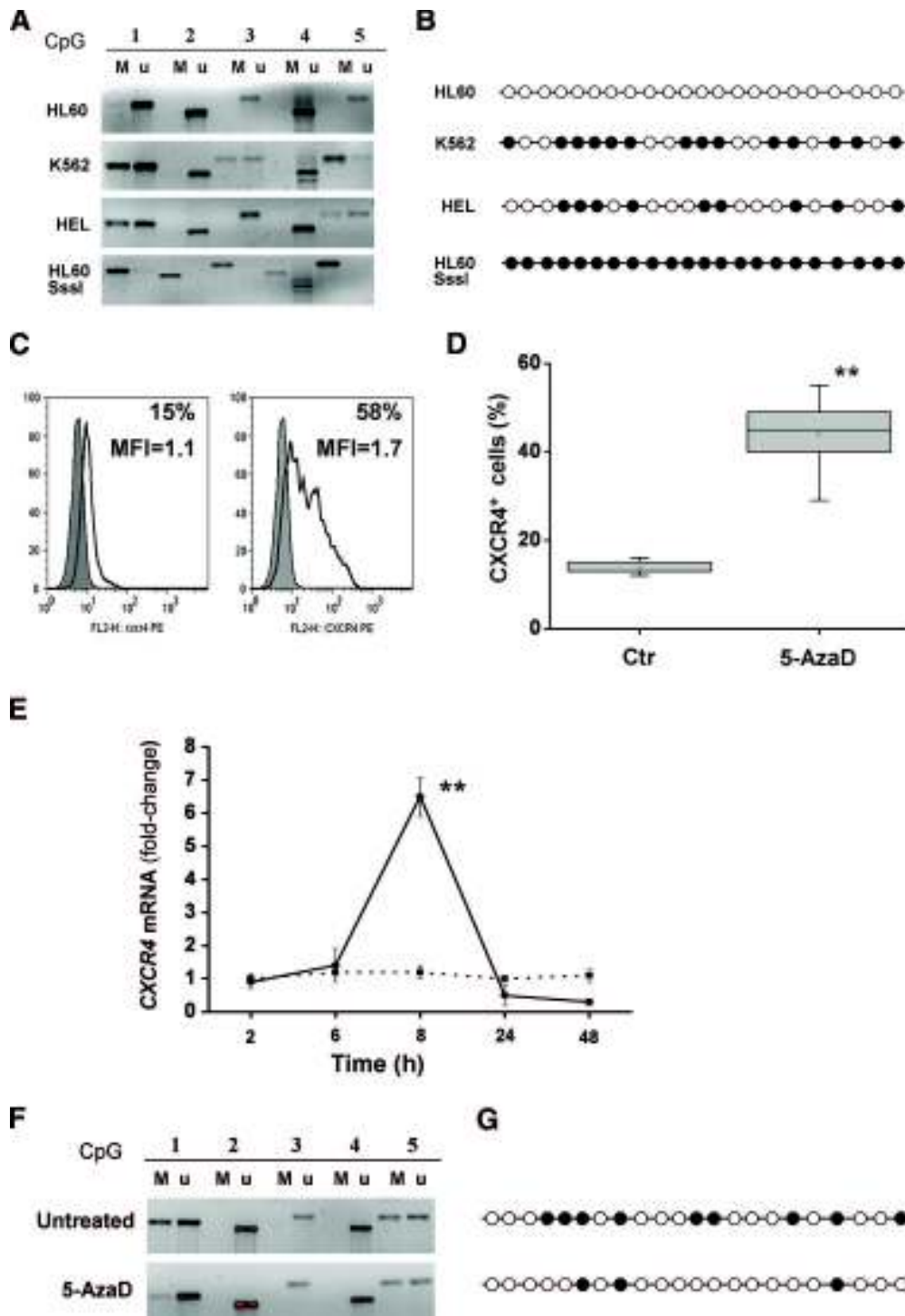
The peripheral blood of PMF patients contains more HSCs/HPCs, including more immature progenitors capable of repopulating the BM of irradiated mice [27]. Stem cell mobilization is a normal phenomenon in healthy subjects that can be magnified after administration of cytokines, particularly G-CSF, and/or



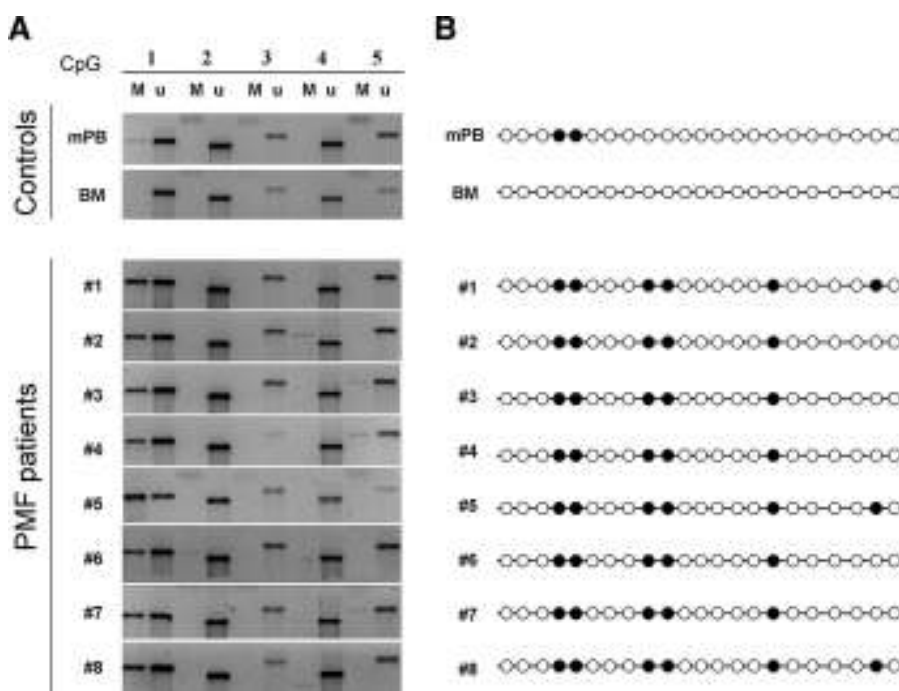
**Figure 3.** Downregulation of CXCR4 expression induced by SDF-1 in HEL or CD34<sup>+</sup> cells does not involve changes in *CXCR4* mRNA level. HEL cells (A) or purified CD34<sup>+</sup> cells from the peripheral blood from primary myelofibrosis (PMF) patients (C) were incubated with SDF-1 up to 500 ng/ml, as indicated in each plot. Variation of CXCR4 membrane expression by fluorescence-activated cell sorting analysis at 12 h in a typical experiment is depicted in (A) and (C) for HEL cells and PMF CD34<sup>+</sup> cells, respectively; the percentage of CXCR4<sup>+</sup> cells is reported inside each plot. The mean ( $\pm$  SD) percentage variation in the number of CXCR4<sup>+</sup> cells, calculated from pooled experiments with HEL cells ( $n = 3$ ) or CD34<sup>+</sup> cells purified from PMF patients ( $n = 5$ ) or normal donors ( $n = 5$ ), after being exposed to 500 ng/ml SDF-1 for different times, is shown (square symbols) in (B), (D), and (E), respectively. Concurrent modification of *CXCR4* mRNA level measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (circle symbols) is presented in (B) for HEL cells, (D) for PMF patients, and (E) for CD34<sup>+</sup> cells obtained from unstimulated peripheral blood. Abbreviations: h, hours; Max, maximum; PE, phycoerythrin.

chemotherapeutics and is mediated by neutrophil-released proteases disrupting the adhesive interaction of HSCs/HPCs with the microenvironment. As a matter of fact, elevated levels of neutrophil elastase, MMP-9, and soluble vascular cell adhesion molecule 1 were found in plasma of PMF patients and correlated

with the number of circulating CD34<sup>+</sup> cells [26]. Furthermore, it has been observed that both the number of CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4 and the CXCR4 cellular expression were significantly reduced in PMF, and such abnormalities have been attributed to reduced transcriptional activity of *CXCR4* [26, 28,



**Figure 4.** *CXCR4* promoter is differentially M in HL60, K562, and HEL cells and is sensitive to the hypomethylating activity of 5-AzaD. In (A), methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) was performed using primers specific for the M or u sequence of each of the five CpG islands located in the *CXCR4* promoter; in (B), methylation-specific sequencing (MSS) was performed on a 230-base pair region of CpG island 1. Filled circles indicate M cytosine, and empty circles indicate u cytosine. The SssI-treated DNA from HL60 cells served as positive Ctr (all M cytosines). In (C) and (D), synchronized HEL cells were exposed to 5-AzaD for 24 h, and the percentage of *CXCR4*<sup>+</sup> cells, as well as the *CXCR4* MFI, was measured by fluorescence-activated cell sorting. In (C), a typical experiment is presented, and cumulative results from four experiments are presented in (D). \*\*, *p* < .01 versus untreated cells. Boxes represent the interquartile range that contains 50% of the values, the horizontal line in the box marks the median, the small square inside indicates mean value, and bars show the range of values. The level of *CXCR4* mRNA was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction in HEL cells exposed to 1 μM 5-AzaD for 2–48 h, and the mean ± SD value from five experiments is presented in (E). The *CXCR4* mRNA level measured at 8 h in the presence of 5-AzaD was significantly different from all other time points (*p* < .001). The methylation status of the *CXCR4* promoter was evaluated after a 24 h of exposure to 5-AzaD using both MSP (F) and MSS (G) (filled circles indicate M cytosine, and empty circles indicate u cytosine). Abbreviations: 5-AzaD, 5-Aza-2'-deoxycytidine; Ctr, control; h, hours; M, methylated; MFI, mean fluorescence intensity; u, unmethylated.



**Figure 5.** Analysis of methylation status of *CXCR4* promoter in CD34<sup>+</sup> cells from PMF patients and healthy controls (mPB or BM). In **(A)**, MSP was performed using primers specific for the M or u sequence of each of the five CpG islands located in the *CXCR4* promoter; in **(B)**, MSS was performed on a 230-base pair region of CpG island 1. Filled circles indicate M cytosine, and empty circles indicate u cytosine. Representative pictures of one of four normal controls each for BM and mPB and of 8 of 18 PMF patients analyzed are shown. Abbreviations: BM, bone marrow; M, methylated; mPB, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood; PMF, primary myelofibrosis; u, unmethylated.

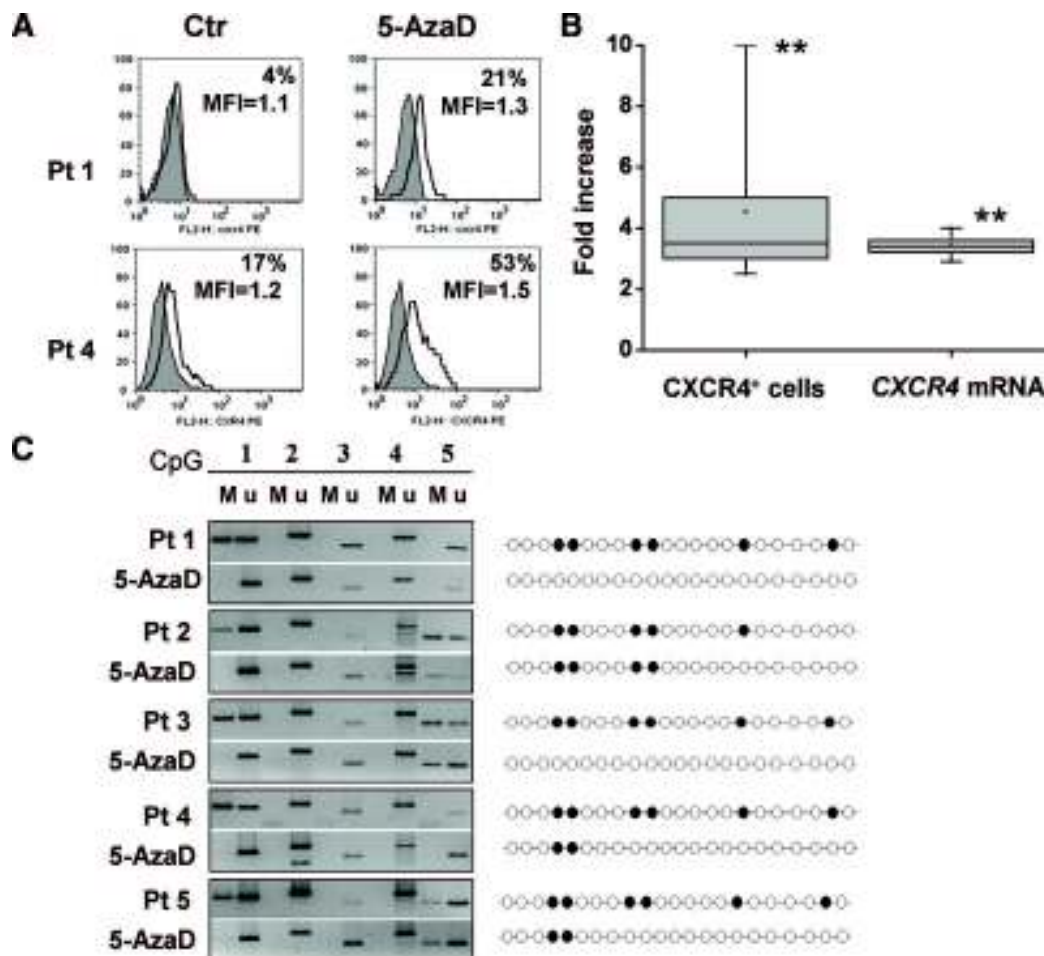
29]; accordingly, *CXCR4* was one of the mostly downregulated genes in transcriptome analysis of PMF CD34<sup>+</sup> cells [29]. Overall, these findings suggested that abnormal CD34<sup>+</sup> cell circulation in PMF is facilitated not only by increased proteolysis of target molecules, including SDF-1 and *CXCR4*, but also by defective regulation of *CXCR4*.

Understanding of the molecular mechanisms underlying PMF has been facilitated by the recent discovery of recurrent molecular abnormalities in MPDs [47, 48]. Sixty percent of PMF patients present the *JAK2V617F* mutation [49–53], whereas 8% of *JAK2* wild-type harbors genetic abnormalities in *MPL* [33, 54, 55]. However, these mutations are also displayed by patients with other MPDs, suggesting that additional events are probably involved in the pathogenesis of disease [56]. In recent years, evidence has accumulated for a critical role of epigenetics in cell transformation toward the neoplastic phenotype through aberrant gene transcription [57]. Epigenetics may be defined as the interplay of DNA methylation, histone modifications, and expression of noncoding RNAs [58], which together regulate gene expression [59] according to tissue- and cell-specific patterns [60]. A common epigenetic change in cancer is represented by aberrant hypermethylation of CpG islands in gene promoters, with reduced or absent transcription of the genes [57]. Transcriptional silencing of hypermethylated genes also depends on synergy between methylation and activity of histone deacetylases (HDAC) [61]. The presumptive role of gene silencing in oncogenesis [62, 63] and the availability of drugs capable of modifying methylation status and/or histone acetylation level [64] have fostered efforts to identify such hypermethylated loci in cancer cells [65, 66]. However, knowledge about epigenetic abnormalities in PMF, and more in generally in MPDs, is still scanty. No hypermethylation of the promoters of several cell cycle control genes was found in PMF patients [67], whereas hypermethylation of p15<sup>ARF</sup> and p16<sup>INK4A</sup> accompanied leukemic transformation in a few cases [68]. Similarly, reduced expression of the receptor RII for TGF- $\beta$  was not attributed to abnormal methylation of gene promoter [69, 70]. On the other hand, evidence of hypermethylation of *RAR $\beta$ 2* promoter-2 was found in 89% of 18 patients with PMF who presented reduced expression of *RAR $\beta$ 2*, a

candidate tumor suppressor gene [71], although this was not confirmed in another study [72]. Hypermethylation of *SOCS-1* and of *SOCS-3* has been described recently [72, 73].

In the experiments presented herein, we have identified *CXCR4* as a target of epigenetic regulation because of abnormal methylation in PMF cells. First, we extended a previous observation that reduced expression of *CXCR4* in PMF CD34<sup>+</sup> cells depends on the level of *CXCR4* transcription. Second, we provided evidence that *CXCR4* promoter is hypermethylated in ex vivo-purified PMF CD34<sup>+</sup> cells from patients and that treatment with 5-AzaD reverted such abnormal hypermethylation, promoting gene transcription and enhancing *CXCR4* expression, resulting overall in improved migration of CD34<sup>+</sup> cells in response to an SDF-1 gradient. Although definite proof that increased *CXCR4* expression in 5-AzaD-exposed PMF CD34<sup>+</sup> cells might result in their enhanced retention in the BM would require in vivo experiments in immunodeficient mice, we interpret the results of the in vitro migration assay as supportive of that possibility.

Results of this study might have relevance for PMF from two perspectives. First, they identified abnormalities of *CXCR4* as a protease-independent mechanism for the constitutive mobilization of HSCs/HPCs. Second, observed effects of 5-AzaD in the culture of CD34<sup>+</sup> cells forecast therapeutic relevance of targeting gene methylation in the therapeutic approach to PMF. Additional evidence that abnormal epigenetic regulation is concurrent with pathophysiology of PMF has recently been provided by Shi et al., who observed profound changes in PMF CD34<sup>+</sup> cells exposed to chromatin-modifying agents, including 5-AzaD and trichostatin [74]. In a semisolid assay, the proportion of clonogenic HPCs harboring *JAK2V617F* was significantly reduced when CD34<sup>+</sup> cells had been exposed to the agents. Furthermore, the number of cells expressing *CXCR4* that appeared after 9 days in cultures established with treated CD34<sup>+</sup> cells was significantly higher than that in control cultures [74]. The designs of the above study and our own are different, but the information is compellingly complementary. The long-term culture design used by Shi et al. [74] after exposure of CD34<sup>+</sup> cells to the chromatin-modifying agents likely resulted in preferential elimination of mutant cells and



**Figure 6.** The hypermethylated status of *CXCR4* promoter in CD34<sup>+</sup> cells from primary myelofibrosis (PMF) Pt is sensitive to the hypomethylating activity of 5-AzaD. CD34<sup>+</sup> cells purified from peripheral blood of PMF Pts were incubated for 8–24 hours with 1  $\mu$ M 5-AzaD. In (A), a typical fluorescence-activated cell sorting analysis of the expression of CXCR4 by CD34<sup>+</sup> cells is presented; the percentage of CD34<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> cells, and the CXCR4 MFI, after exposure to 5-AzaD for 24 hours is reported inside each plot. Two representative Pts, corresponding to those also presented in (C), are shown. Cumulative results obtained in 10 Pts are presented in (B) and expressed as fold increase of CD34<sup>+</sup> cells coexpressing CXCR4 versus untreated cells. The value measured in cultures containing 5-AzaD was significantly different from Ctr cultures at  $p < .01$ . Fold change in the level of *CXCR4* mRNA measured by real-time quantitative polymerase chain reaction at 8 hours of incubation with 5-AzaD of PMF CD34<sup>+</sup> cells is presented in (B) (from a total of nine individual determinations). Boxes represent the interquartile range that contains 50% of the subjects, the horizontal line in the box marks the median, the small square inside indicates mean value, and bars show the range of values. The effect of 5-AzaD treatment on the methylation status of *CXCR4* promoter in PMF CD34<sup>+</sup> cells was evaluated using MSP (C) and MSS (filled circles indicate M cytosine, and empty circles indicate u cytosine); representative results in five of nine PMF Pts evaluated are shown. Abbreviations: 5-AzaD, 5-Aza-2'-deoxycytidine; Ctr, control; M, methylated; MFI, mean fluorescence intensity; Pt, patient; u, unmethylated.

expansion of residual normal cells expressing physiologic level of CXCR4. On the other hand, the effects we observed in the short-term time in our experimental scheme are in support of a direct effect of 5-AzaD on the abnormal methylation status of *CXCR4* in progenitors. Overall, this would suggest that using demethylating agents in PMF, eventually in association with HDAC, might potentially have a double action mechanism against clonal progenitors, both inhibiting their growth and facilitating the re-emergence of normal progenitors, and reactivating abnormally repressed genes.

Some open questions still remain that might be addressed in future studies. One concerns possible relationships between downregulation of CXCR4 and abnormal tyrosine kinase activity due to *JAK2V617F* mutation or other functionally equivalent molecular abnormalities. In this work, we did not find differences in *CXCR4* expression in PMF CD34<sup>+</sup> cells depending on the *JAK2* mutational status, confirming previous results in CD34<sup>+</sup> cells [28]. On the other hand, the fact that *CXCR4* mRNA level was significantly reduced in the granulocytes of

PMF patients harboring a high mutant allele burden [29] would suggest additional regulatory levels dependent on the cell hierarchy or lineage belonging. In this regard, it is of interest that expression of p210/BCR-ABL has been shown to impair CXCR4 signaling through two different mechanisms depending upon its level of expression; at a low level of p210 expression, a signaling defect predominated without obvious modification of CXCR4 expression, whereas a higher level of p210 induced a marked downregulation of CXCR4 due to decreased *CXCR4* transcription [75]. In addition, it might be worthwhile to investigate possible effects of defective CXCR4 expression on the HSC/HPC proliferation and differentiation in PMF. In fact, in addition to regulating migration and homing of HSCs/HPCs, SDF-1 has an autocrine/paracrine effect by promoting survival of normal CD34<sup>+</sup> cells through suppression of apoptosis and recruitment of quiescent G0 cells in G1 phase of the cell cycle [1]. Furthermore, SDF-1 intervenes in the regulation of proliferation and maturation of progenitors committed to megakaryocytopoi-



esis [76–79]; these progenitors are the most obviously involved hematopoietic cell lineage in PMF.

## CONCLUSION

Overall, our data indicate that an abnormal degree of methylation of the *CXCR4* promoter might contribute to the constitutive migration of CD34<sup>+</sup> cells in PMF patients. However, it might also be anticipated that defective expression of *CXCR4* in PMF CD34<sup>+</sup> cells might also influence other functional aspects of the cells in addition to their unique migration and homing properties.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all physicians who referred patients for this study, and patients for their willingness to collaborate. This study was

supported by Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Milano, Italy; Ente Cassa di Risparmio di Firenze; and Ministero Italiano della Università e Ricerca (Progetti di Ricerca Cofinanziati 2006067001\_003) (to A.M.V.). The project was also supported by mobility grant Progetto Galileo-2006, Università Italo-Francese (to A.M.V. and M.-C.L.B.-K.) and grants from Istituto Toscano Tumori (ITT), Florence. A research travel grant (to P.G.) was supported by ITT. The project described herein was supported in part by Grant Number P01-CA108671 from the National Cancer Institute. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Cancer Institute or the NIH.

## DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

## REFERENCES

- Lataillade JJ, Clay D, Bourin P et al. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: Evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood* 2002;99:1117–1129.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595–599.
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591–594.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635–638.
- Peled A, Petit I, Kollet O et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999;283:845–848.
- Müller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50–56.
- Sun YX, Wang J, Shelburne CE et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem* 2003;89:462–473.
- Voermans C, van Heese WP, de Jong I et al. Migratory behavior of leukemic cells from acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2002;16:650–657.
- Tavor S, Petit I, Porozov S et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer Res* 2004;64:2817–2824.
- Peled A, Kollet O, Ponomaryov T et al. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: Role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 2000;95:3289–3296.
- Hattori K, Heissig B, Tashiro K et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001;97:3354–3360.
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology* 2002;3:687–694.
- Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y et al. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest* 2003;111:187–196.
- Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S et al. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:799–804.
- Dlubek D, Drabczak-Skrzypek D, Lange A. Low CXCR4 membrane expression on CD34(+) cells characterizes cells mobilized to blood. *Bone Marrow Transplant* 2006;37:19–23.
- Shen H, Cheng T, Olszak I et al. CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 2001;166:5027–5033.
- Kim HK, De La Luz Sierra M, Williams CK et al. G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells. *Blood* 2006;108:812–820.
- De La Luz Sierra M, Gasperini P, McCormick PJ et al. Transcription factor Gfi-1 induced by G-CSF is a negative regulator of CXCR4 in myeloid cells. *Blood* 2007;110:2276–2285.
- Brühl H, Cohen CD, Linder S et al. Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines. *Eur J Immunol* 2003;33:3028–3037.
- Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004;104:2643–2645.
- Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:952–963.
- Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23:8520–8530.
- Barosi G, Viarengo G, Pecci A et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98:3249–3255.
- Massa M, Rosti V, Ramajoli I et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23:5688–5695.
- Yoder MC, Mead LE, Prater D et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principles. *Blood* 2007;109:1801–1809.
- Xu M, Bruno E, Chao J et al. Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood* 2005;105:4508–4515.
- Xu M, Bruno E, Chao J et al. The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2005;105:1699–1705.
- Rosti V, Massa M, Vannucchi AM et al. The expression of CXCR4 is down-regulated on the CD34+ cells of patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:280–286.
- Guglielmelli P, Zini R, Bogani C et al. Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). *STEM CELLS* 2007;25:165–173.
- Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C et al. The Italian Consensus Conference on Diagnostic Criteria for Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *Br J Haematol* 1999;104:730–737.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292–2302.
- Vannucchi AM, Pancrazzi A, Bogani C et al. A quantitative assay for JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia* 2006;20:1055–1060.
- Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol* 2007;137:244–247.
- Dupriez B, Morel P, Demory JL et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: A report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996;88:1013–1018.
- Keeney M, Chin-Yee I, Weir K et al. Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. International Society of Hematology and Graft Engineering. *Cytometry* 1998;34:61–70.

- 36 Vannucchi AM, Pancrazzi A, Guglielmelli P et al. Abnormalities of GATA-1 in megakaryocytes from patients with idiopathic myelofibrosis. *Am J Pathol* 2005;167:849–858.
- 37 van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003;17:1013–1034.
- 38 Migliaccio AR, Martelli F, Verrucci M et al. Altered SDF-1/CXCR4 axis in patients with primary myelofibrosis and in the GATA1 low mouse model of the disease. *Exp Hematol* 2008;36:158–171.
- 39 Martyr MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol* 1994;88:9–16.
- 40 Chagraoui H, Komura E, Tulliez M et al. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood* 2002;100:3495–3503.
- 41 Vannucchi AM, Bianchi L, Paoletti F et al. A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood* 2005;105:3493–3501.
- 42 Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M et al. Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2002;71:711–717.
- 43 Shirazi Y, Pitha PM. Interferon downregulates CXCR4 (fusin) gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Hum Virol* 1998;1:69–76.
- 44 Sato N, Matsubayashi H, Fukushima N et al. The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2005;4:70–76.
- 45 Mori T, Kim J, Yamano T et al. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res* 2005;65:1800–1807.
- 46 Kubarek L, Jagodzinski PP. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2007;581:1441–1448.
- 47 Levine RL, Pardanani A, Tefferi A et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673–683.
- 48 Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006;355:2452–2466.
- 49 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;7:387–397.
- 50 Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006;107:2098–2100.
- 51 Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* 2007;110:4030–4036.
- 52 Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–1790.
- 53 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–1061.
- 54 Pardanani AD, Levine RL, Lasho T et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: A study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–3476.
- 55 Pikman Y, Lee BH, Mercher T et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
- 56 Skoda R. The genetic basis of myeloproliferative disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;2007:1–10.
- 57 Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000;16:168–174.
- 58 Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A et al. MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients. *Exp Hematol* 2007;35:1708–1718.
- 59 Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: Implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 2006;75:243–269.
- 60 Eckhardt F, Lewin J, Cortese R et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 2006;38:1378–1385.
- 61 Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 1999;21:103–107.
- 62 Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New Engl J Med* 2003;349:2042–2054.
- 63 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews* 2002;3:415–428.
- 64 Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:38–51.
- 65 Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000;24:132–138.
- 66 Rakyan VK, Hildmann T, Novik KL et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biology* 2004;2:e405.
- 67 Kumagai T, Tefferi A, Jones L et al. Methylation analysis of the cell cycle control genes in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Leuk Res* 2005;29:511–515.
- 68 Wang JC, Chen W, Nallusamy S et al. Hypermethylation of the P15INK4b and P16INK4a in agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and AMM in leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2002;116:582–586.
- 69 Hemavathy KC, Chang TH, Zhang H et al. Reduced expression of TGF beta1RII in agnogenic myeloid metaplasia is not due to mutation or methylation. *Leuk Res* 2006;30:47–53.
- 70 Li J, Bench AJ, Huntly BJ et al. Mutation and methylation analysis of the transforming growth factor beta receptor II gene in polycythemia vera. *Br J Haematol* 2001;115:872–880.
- 71 Jones LC, Tefferi A, Idos GE et al. RARbeta2 is a candidate tumor suppressor gene in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Oncogene* 2004;23:7846–7853.
- 72 Jost E, do ON, Dahl E et al. Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2007;21:505–510.
- 73 Capello D, Deambroggi C, Rossi D et al. Epigenetic inactivation of suppressors of cytokine signalling in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2008;141:504–511.
- 74 Shi J, Zhao Y, Ishii T et al. Effects of chromatin-modifying agents on CD34+ cells from patients with idiopathic myelofibrosis. *Cancer Res* 2007;67:6417–6424.
- 75 Geay JF, Buet D, Zhang Y et al. p210BCR-ABL inhibits SDF-1 chemotactic response via alteration of CXCR4 signaling and down-regulation of CXCR4 expression. *Cancer Res* 2005;65:2676–2683.
- 76 Wang JF, Liu ZY, Groopman JE. The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 1998;92:756–764.
- 77 Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J et al. Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 2000;96:4142–4151.
- 78 Hodohara K, Fujii N, Yamamoto N et al. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) acts together with thrombopoietin to enhance the development of megakaryocytic progenitor cells (CFU-MK). *Blood* 2000;95:769–775.
- 79 Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest* 2005;115:3339–3347.



See [www.StemCells.com](http://www.StemCells.com) for supplemental material available online.



**6/ L'adaptateur LNK se lie différenciellement à Jak2V617F et modifie la régulation de la signalisation JAK/STAT chez les patients atteints de néoplasmes myéloprolifératifs.**

« Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms ».

**Baran-Marszak F, Magdoud H, Desterke C, Alvarado A, Roger C, Harel S, Mazoyer E, Cassinat B, Chevret S, Tonetti C, Giraudier S, Fenaux P, Cymbalista F, Varin-Blank N, Le Bousse-Kerdilès MC, Kiladjian JJ, Velazquez L.**

**Blood. 2010 Dec 23;116(26):5961-71.**

LNK est un adaptateur intracellulaire qui peut se lier à Jak2 et transmettre des signaux de signalisation.

Au cours de cette étude réalisée par le groupe de Laura Velasquez, nous avons montré que l'expression de LNK est modulée dans les cellules hématopoïétiques de patients atteints de NMP. LNK se lie différenciellement à Jak2V617F avec, pour conséquence, une modulation de la signalisation intracellulaire. Enfin, nous avons pu identifier la présence d'une nouvelle mutation de LNK chez un patient atteint de NMP.



## Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms

Fanny Baran-Marszak,<sup>1,2</sup> Hajer Magdoud,<sup>2,3</sup> Christophe Desterke,<sup>4</sup> Anabell Alvarado,<sup>2,3</sup> Claudine Roger,<sup>1</sup> Stéphanie Harel,<sup>5</sup> Elizabeth Mazoyer,<sup>1</sup> Bruno Cassinat,<sup>6</sup> Sylvie Chevet,<sup>7</sup> Carole Tonetti,<sup>8</sup> Stéphane Giraudier,<sup>8</sup> Pierre Fenaux,<sup>5</sup> Florence Cymbalista,<sup>1</sup> Nadine Varin-Blank,<sup>2,3</sup> Marie-Caroline Le Bousse-Kerdilès,<sup>4</sup> Jean-Jacques Kiladjan,<sup>2,3,9</sup> and Laura Velazquez<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service d'Hématologie Biologique, Bobigny, France; <sup>2</sup>Inserm U978, Laboratoire des Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, Bobigny, France; <sup>3</sup>Université Paris 13, UFR SMBH, Bobigny, France; <sup>4</sup>Inserm U972, Institut André Lwoff, Université Paris XI, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France; <sup>5</sup>Hôpital Avicenne, AP-HP, Service d'Hématologie Clinique, Bobigny, France; <sup>6</sup>Hôpital Saint-Louis, Unité de Biologie Cellulaire, Paris, France; <sup>7</sup>Hôpital Saint-Louis, Département de Biostatistique et Informatique Médicale, Paris, France; <sup>8</sup>Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; and <sup>9</sup>Hôpital Saint-Louis, Clinical Investigation Center and French Intergroup of Myeloproliferative Disorders (FIM), Paris, France

Activating mutations in signaling molecules, such as JAK2-V617F, have been associated with myeloproliferative neoplasms (MPNs). Mice lacking the inhibitory adaptor protein Lnk display deregulation of thrombopoietin/thrombopoietin receptor signaling pathways and exhibit similar myeloproliferative characteristics to those found in MPN patients, suggesting a role for Lnk in the molecular pathogenesis of these diseases. Here, we showed that *LNK* levels are up-regulated

and correlate with an increase in the JAK2-V617F mutant allele burden in MPN patients. Using megakaryocytic cells, we demonstrated that Lnk expression is regulated by the TPO-signaling pathway, thus indicating an important negative control loop in these cells. Analysis of platelets derived from MPN patients and megakaryocytic cell lines showed that Lnk can interact with JAK2-WT and V617F through its SH2 domain, but also through an unrevealed JAK2-binding site within its N-terminal region. In

addition, the presence of the V617F mutation causes a tighter association with Lnk. Finally, we found that the expression level of the Lnk protein can modulate JAK2-V617F-dependent cell proliferation and that its different domains contribute to the inhibition of multilineage and megakaryocytic progenitor cell growth in vitro. Together, our results indicate that changes in Lnk expression and JAK2-V617F-binding regulate JAK2-mediated signals in MPNs. (*Blood*. 2010;116(26):5961-5971)

### Introduction

Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal hematopoietic stem cell (HSC) diseases characterized by deregulated proliferation of one or several myeloid lineages. These heterogeneous and phenotypically related disorders include chronic myeloid leukemia, polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF).<sup>1</sup> The molecular pathogenesis of MPNs was poorly understood until the identification of the JAK2-V617F mutant allele. This acquired somatic mutation (valine to phenylalanine substitution at position 617, V617F) renders the kinase constitutively active, confers cytokine hypersensitivity, independent growth to hematopoietic cells, and reproduces an MPN phenotype in murine bone marrow transplantation assays.<sup>2-6</sup> The JAK2-V617F mutant protein has been identified in approximately 95% of PV, 60% of ET, and 50% of PMF patients.<sup>2,7</sup> Recently, gain-of-function point mutations were identified in the cytoplasmic domain of the myeloproliferative leukemia virus oncogene (MPL), the receptor for thrombopoietin (TPO), in 2% to 5% of ET and PMF patients, respectively. These mutations (*MPL*-W515L) were shown to induce MPN with marked thrombocytosis in a mouse model.<sup>8,9</sup> These findings therefore show that abnormal activation of signaling molecules plays an important role in the pathogenesis of MPNs. However, how defects in these

molecules can lead to myeloproliferation in patients remains unknown.

Lnk [also known as Src homology 2 (SH2) B3] is a member of the adaptor protein family composed of SH2-B (SH2B1) and APS (SH2B2). These proteins share common protein-protein interaction domains and motifs: a dimerization domain and proline-rich motifs at the N terminus, a pleckstrin homology (PH) and SH2 domains, and a conserved tyrosine at the C terminus.<sup>10</sup> *Lnk*-deficient mice have demonstrated the importance of this adaptor as a negative regulator of cytokine signaling during hematopoiesis. Analysis of *Lnk*<sup>-/-</sup>-derived HSC and myeloid progenitors has shown that Lnk controls TPO-induced self-renewal, quiescence and proliferation of these cells.<sup>11-14</sup> Moreover, *Lnk*<sup>-/-</sup> animals displayed not only disrupted B lymphopoiesis, but also abnormal megakaryopoiesis and erythropoiesis, as a result of the absence of negative regulation of TPO and erythropoietin (EPO) signaling pathways, respectively.<sup>15-17</sup> Indeed, Lnk, through its SH2 domain, negatively modulates MPL, and EPO receptor (EPOR) signaling by attenuating JAK2 activation. Recently, Lnk was also shown to bind and regulate MPL-W515L and JAK2-V617F forms when expressed in hematopoietic cell lines.<sup>11,18,19</sup> These results suggest that these mutant proteins can still undergo Lnk negative regulation.

Submitted December 4, 2009; accepted September 12, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, September 24, 2010; DOI 10.1182/blood-2009-12-256768.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

**Table 1. Characteristics of patients**

	MPN (n = 74)	PV (n = 29)	ET JAK2-WT (n = 27)	ET JAK2-V617F (n = 14)	RT (n = 16)	HD (n = 21)
History of thrombosis	31% (23/74)	34.5% (10/29)	11% (3/27)	64% (9/14)	0	0
Splenomegaly	33% (22/66)	26% (7/27)	22% (6/27)	36% (5/14)	0	ND
WBC at diagnosis, 10 <sup>9</sup> /L	8.7 (6.95-10.35)	9.2 (7.8-10.9)	7.6 (7.1-9.7)	8.2 (6.9-12.2)	10.8 (9.5-14.9)	6.5 (5.9-8.9)
ANC at diagnosis, 10 <sup>9</sup> /L	5.55 (4.25-7.37)	5.95 (4.55-8.67)	5.1 (3.97-6.5)	4.9 (3.4-8)	ND	ND
Hb at diagnosis, g/dL	14 (13-15.9)	16.9 (14.8-19.1)	13 (12.6-13.5)	14.2 (13.3-14.2)	10.6 (9.6-11.5)	13.8 (12.6-15)
Hematocrit at diagnosis, %	42.25 (39.3-50.12)	50.5 (44.7-61.4)	39.3 (38.7-41)	41.7 (40-42.1)	32.8 (29.8.1-35.3)	41.5 (38-43.2)
Platelets at diagnosis, 10 <sup>9</sup> /L	599.5 (400-766)	448 (322-626)	739 (619-918)	682 (481-807)	652 (595-702)	237 (225-277)
% JAK2-V617F	30 (15-40)	35 (17-45)	0	17 (11-29)	ND	ND
Epo, U/L	8.8 (7.15-12.9)	6.4 (5.12-8.15)	11.6 (8.8-13.7)	11 (8.6-12.9)	ND	ND

MPN, myeloproliferative neoplasm; PV, polycythemia vera; ET, essential thrombocythemia; RT, reactive thrombocytosis; HD, healthy donors; ND, not done; MPN includes 29 PV, 41 ET, and 4 PMF patients (the latter are not detailed in this table). Statistics are given as percentage for categorical values, or as median (first - third quartile) for continuous variables; WBC, white blood cell count; ANC, absolute neutrophil count; Hb, hemoglobin; % JAK2-V617F, percentage of JAK2-V617F allele in granulocytes of JAK2-V617F patients; Epo, serum erythropoietin level.

Of interest is the resemblance between the phenotype displayed by *Lnk*<sup>-/-</sup> mice and the biological and clinical characteristics found in MPN patients: hypersensitivity to cytokines, increased number of in vitro multilineage (CFU-GEMM), erythroid (CFU-E), and megakaryocytic (CFU-MK) progenitor colonies, high platelet counts, splenomegaly together with fibrosis, and extramedullary hematopoiesis.<sup>20,21</sup>

In the present study, we aimed to identify molecular defects in *Lnk* that might explain the myeloproliferative status in MPN patients, notably in those negative for the JAK2-V617F, MPL and *Lnk* mutations. Expression analysis showed that *LNK* mRNA was overexpressed in MPN patients and positively correlated with the JAK2-V617F allele burden. Furthermore, our findings demonstrated that *Lnk* is involved in the regulatory loop TPO, MPL and JAK2 implicated in megakaryopoiesis. Analysis of the *Lnk*/JAK2 interaction revealed a novel JAK2-binding site within the N-terminal region of *Lnk*, whose binding was modified by the expression of the JAK2-V617F form. Cell proliferation assays in a JAK2-V617F context showed that the level of expression of *Lnk* could modulate V617F-dependent cell growth. Together, our results indicate that *Lnk* can regulate activation of the JAK2-mediated signals associated with MPNs.

## Methods

### Patient samples and cell purification

MPNs (74; 41 ET, 29 PV, and 4 PMF diagnosed according to World Health Organization criteria), 16 reactive thrombocytosis (RT; secondary to postsurgery inflammatory syndrome) patients, and 21 healthy people were studied, and their characteristics are summarized in Table 1. JAK2-V617F mutation detection was performed by single nucleotide polymorphism genotyping assay on purified granulocytes DNA.<sup>22</sup> Twenty-seven of 41 ET patients (66%) were found JAK2-WT and MPL-WT by direct sequencing.<sup>23</sup> The study was approved by the Institutional Review Board of the PV-Nord group. Informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

Platelets were purified using the platelet-rich plasma (PRP) technique (supplemental data, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) and resuspended in TRIzol reagent (Invitrogen) for subsequent RNA extraction. Bone marrow or peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells were FicolI-purified (Amersham Biosciences) followed by magnetic-activated cell sorting selection according to the manufacturer's protocol (Miltenyi Biotec). CD34<sup>+</sup> cell purity was verified by flow cytometry (> 95%) and 10<sup>5</sup> cells were directly resuspended in TRIzol.

### Cell cultures and reagents

The human megakaryoblastic UT7/Mpl (clone 5.3, generously provided by D. Duménil, Institut Cochin, Paris, France) and the erythroleukemia HEL cell lines were grown in  $\alpha$ -minimum essential medium (MEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and antibiotics. UT7/Mpl cells were cultivated in the presence of 2 ng/mL of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; PromoCell). COS7 cells were maintained in Dulbecco Modified Eagle Medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. UT7/Mpl cells were starved in  $\alpha$ -MEM plus 0.4% bovine serum albumin and 25  $\mu$ g/mL transferrin for 12 hours before stimulation with TPO (PromoCell) for the indicated times at 37°C. Cells were washed in ice-cold phosphate buffer saline (PBS) and immediately resuspended in TRIzol.

### RNA preparation and quantitative real-time PCR

Total RNA from platelets, CD34<sup>+</sup>, or UT7/Mpl cells was isolated using RNeasy Mini kit (QIAGEN). Reverse transcription was performed with 5 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) on all purified RNAs. *LNK* expression was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR; supplemental data). All amplification steps were performed in duplicate.

### Immunoprecipitation and immunoblotting

Purified platelets were TPO-stimulated or not, washed in PBS, and either resuspended in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer or lysed for immunoprecipitation. UT7/Mpl cells were starved before stimulation with TPO. HEL cells were washed in PBS before EPO-stimulation. All cells were lysed in ice-cold 1% Nonidet P-40 lysis buffer<sup>24</sup> for 30 minutes on ice. Insoluble material was removed by centrifugation at 27 000g for 10 minutes at 4°C, and soluble proteins were immunoprecipitated for 2 hours at 4°C. Immunocomplexes were solubilized in SDS sample buffer, analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis PAGE gels, transferred, and subjected to immunoblotting. Antibody complexes were detected with either horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin (Cell Signaling Technology) and revealed by enhanced chemiluminescence (ECL; GE Healthcare).

### GST pull-down experiments

The N-terminal plus PH domain, SH2 domain, and R364M constructs were previously described.<sup>24</sup> The *Lnk* PH domain (residues 143 to 288) construct was generated by PCR, sequenced, and cloned in pGEX to create an in-frame fusion protein with glutathione s-transferase (GST). The constructs were expressed in BL21 bacteria and purified on glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare Amersham). All cell lysates were incubated with 5  $\mu$ g of GST fusion protein for 2 hours at 4°C. The precipitated proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to immunoblotting.

### Lin<sup>-</sup> progenitor cells purification, retroviral transduction, and in vitro colony assays

Lnk point mutations and retroviral supernatant preparation were previously described.<sup>24</sup> APS cDNA was subcloned into the MSCV-IRES-GFP (MIG) retroviral vector. Lin<sup>-</sup> progenitor cells from wild-type (WT), *Lnk*<sup>-/-</sup> mice<sup>21</sup> or hematopoietic cell lines were retrovirally infected and GFP<sup>+</sup> sorted.<sup>24</sup> Expression of the transduced genes was verified by reverse transcription PCR (RT-PCR). Triplicate samples of 10<sup>3</sup> cells (for CFU-GEMM) or 5 × 10<sup>3</sup> cells (for CFU-Meg) were seeded in methylcellulose media (MethoCult M3434; Stem Cell Technologies) or in collagen-based media (MegaCult-C), respectively, and incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. CFU-GEMMs were counted at 8 days after benzidine (Sigma-Aldrich) staining. CFU-Megs were stained for acetylcholinesterase activity (Sigma-Aldrich) and counted after 6 days of incubation.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed on R package (<http://www.R-project.org>). Summary statistics were computed, namely percentages for qualitative variables and median with interquartile range for continuous variables. Wilcoxon rank sum tests were used to compare distribution function of Lnk according to subsets of patients.

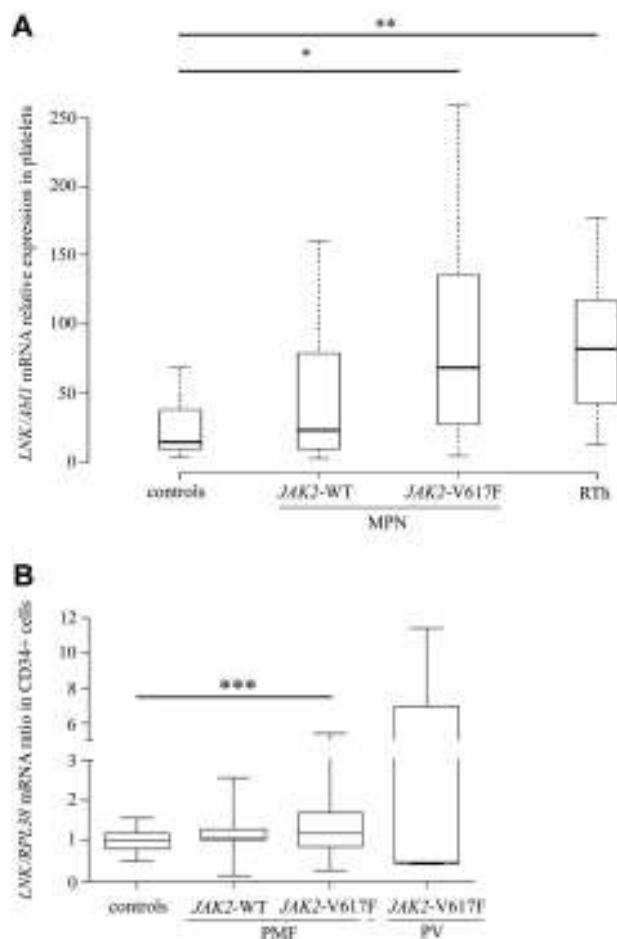
## Results

### Rare Lnk mutations are associated with MPNs

Activating point mutations in signaling molecules have been associated with MPNs. This has raised the question whether aberrant expression/function of molecules in cytokine receptor signaling can explain MPN clinical phenotypes. Because loss of Lnk in mice results in similar characteristics to those found in MPN patients, we initially searched for mutations in the *LNK* gene. Recently, 2 different mutations in the PH domain of Lnk were described in 2 of 33 (6%) ET and PMF patients studied.<sup>25</sup> We have found one mutation (not reported in public single-nucleotide polymorphism databases) in the N-terminal region of Lnk (G152R) in 1 of 73 (1.4%) ET (*JAK2*-WT and *MPL*-WT) patients by granulocyte DNA analysis. Our result combined with those previously published, confirm that Lnk mutations are very rare events, probably less than 5%, and therefore, their role in the pathogenesis of MPNs has to be confirmed by functional assays. Consequently, we aimed in this study to search for molecular defects, other than mutations, that could play a role in the pathogenesis of MPNs.

### Lnk expression is up-regulated in MPN patients

We first examined the expression level of *LNK* in MPNs and whether this could correlate with the percentage of *JAK2*-V617F mutant allele. *LNK* mRNA expression was measured by real-time qPCR analysis in platelets from 74 MPNs, 16 RT patients, and 21 healthy people. MPN patients (*JAK2*-WT and V617F) showed significantly higher expression of *LNK* transcripts than healthy controls (Figure 1A). Among these patients, no difference in *LNK* expression was observed between ET and PV samples ( $P = .74$ ). However, *LNK* expression was significantly higher in *JAK2*-V617F-positive patients compared with controls (median [Q1-Q3]: 69 [27-135] vs. 15 [10-38]). Moreover, a positive correlation between the percentage of *JAK2*-V617F mutant allele and *LNK* mRNA expression was observed in MPN platelets (supplemental Figure 1). Furthermore, *LNK* mRNA expression in platelets derived from RT patients was also significantly higher (82 [43-112]) than healthy controls, but relatively similar to *JAK2*-V617F MPN patients ( $P = .09$ ). Because RT patients often exhibit elevated



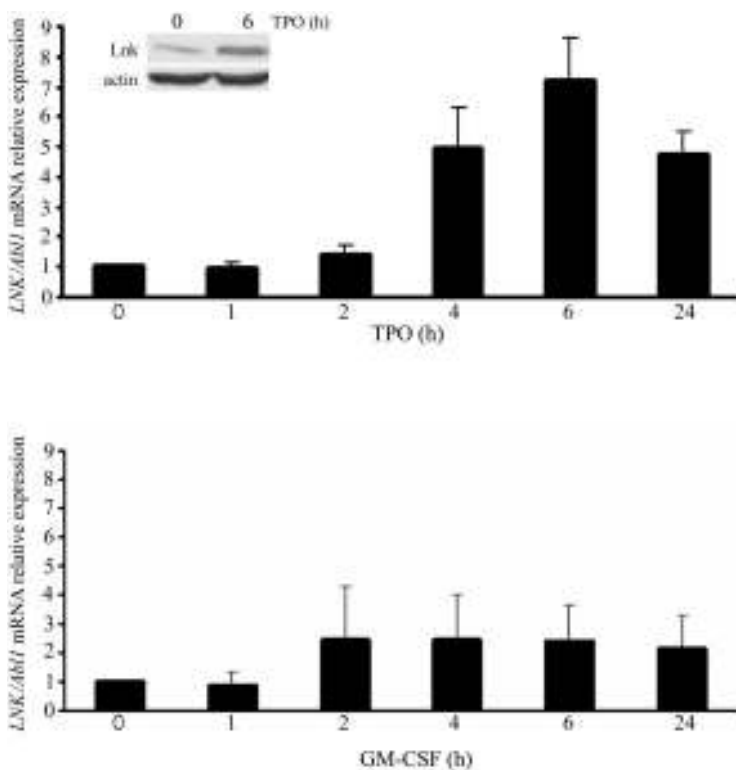
**Figure 1. Lnk is overexpressed in MPNs.** (A-B) Relative expression of total *LNK* mRNA was determined by real-time PCR using either the TaqMan method on purified platelets (A) or the SYB Green method on sorted CD34<sup>+</sup> cells (B). Relative *LNK* mRNA levels are expressed in arbitrary units (A) or log<sub>2</sub> (B) of ratios obtained using housekeeping genes for normalization. The horizontal line in the box marks the median and bars indicate the range of values. All *P* values were 2-sided with  $P \leq .05$  denoting statistical significance: \* $P = .0076$ ; \*\* $P < .0001$ ; \*\*\* $P = .004$ . All patients were studied in duplicate. RT, reactive thrombocytosis; PV, polycythemia vera; PMF, primary myelofibrosis.

serum TPO levels, our findings suggest that *LNK* overexpression in these patients is caused by an activation of the TPO signaling pathway.<sup>26</sup>

We next examined the expression of *LNK* mRNA in CD34<sup>+</sup> cells isolated from peripheral blood of PMF patients (*JAK2*-V617F,  $n = 26$  and *JAK2*-WT,  $n = 17$ ) by real-time qPCR. Figure 1B showed that *LNK* expression was significantly increased in CD34<sup>+</sup> cells from *JAK2*-V617F PMF patients ( $1.56 \pm 1.19$ ) compared with cells from healthy donors (bone marrow and peripheral blood controls:  $1.03 \pm 0.29$ ;  $n = 16$ ). In contrast, there was no significant difference between *JAK2*-WT PMF and healthy controls. Markedly increased expression of *LNK* was also found in 2 of 5 CD34<sup>+</sup> cells derived from *JAK2*-V617F PV bone marrow (Figure 1B), suggesting that *LNK* overexpression can be found in a proportion of MPN immature progenitors.

No correlation was found between *LNK* mRNA levels and most of the clinical and biological parameters examined, including history of thrombosis, splenomegaly, WBC, ANC, hemoglobin, platelet counts, and EPO level (Table 1). However, cytoreductive treatment seemed to affect *LNK* mRNA levels; MPN patients treated with interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) displayed significantly lower levels of *LNK* mRNA ( $39 \pm 36$ ;  $n = 18$ ) than those treated with





**Figure 2. Lnk expression is regulated by TPO-mediated signaling in megakaryocytic cells.** Relative expression of total *LNK* mRNA was determined as Figure 1A in UT7/Mpl cells starved for 12 hours and stimulated for the indicated times with TPO (50 ng/mL, top graph) or GM-CSF (2.5 ng/mL, bottom graph). Data represent the mean  $\pm$  SD (error bars) of *LNK/Actin* mRNA relative expression from 3 independent assays. Western blot analysis of Lnk expression in UT7/Mpl cells was performed with anti-Lnk antibodies and anti-actin as loading control.

hydroxyurea ( $145 \pm 235$ ;  $n = 34$ ;  $P = .04$ ), suggesting that IFN- $\alpha$  can modulate *LNK* expression. Together, these results show that Lnk is up-regulated in MPNs, notably in those bearing the JAK2-V617F mutation, at the mature cell level, as well as in CD34<sup>+</sup> progenitors.

#### Lnk is regulated by TPO-mediated signaling pathways in megakaryocytes

The elevated *LNK* expression in RT and JAK2-V617F MPN patients suggested that JAK2 was involved in the induction of *LNK* mRNA via constitutive activation of TPO signaling. Because proliferation and differentiation of megakaryocytes are mainly controlled by TPO,<sup>27</sup> we investigated whether this cytokine could regulate *LNK* expression in megakaryocytes. Consequently, we quantified the expression of *LNK* mRNA in UT7/Mpl cells at different time points after TPO stimulation. Real-time qPCR showed that maximal *LNK* expression is induced after 6 hours of TPO stimulation (Figure 2 top graph). Moreover, concomitant with the increase in mRNA, a 2-fold increase in Lnk protein was also observed after 6 hours of TPO treatment (Figure 2 inset top graph). In contrast, incubation of UT7/Mpl cells with GM-CSF for different times had no effect on the expression level of *LNK* transcripts, despite expression of the GM-CSF receptor (Figure 2 bottom graph). These results indicate that TPO-mediated signaling specifically regulates Lnk expression at both mRNA and protein levels in human megakaryocytic cells.

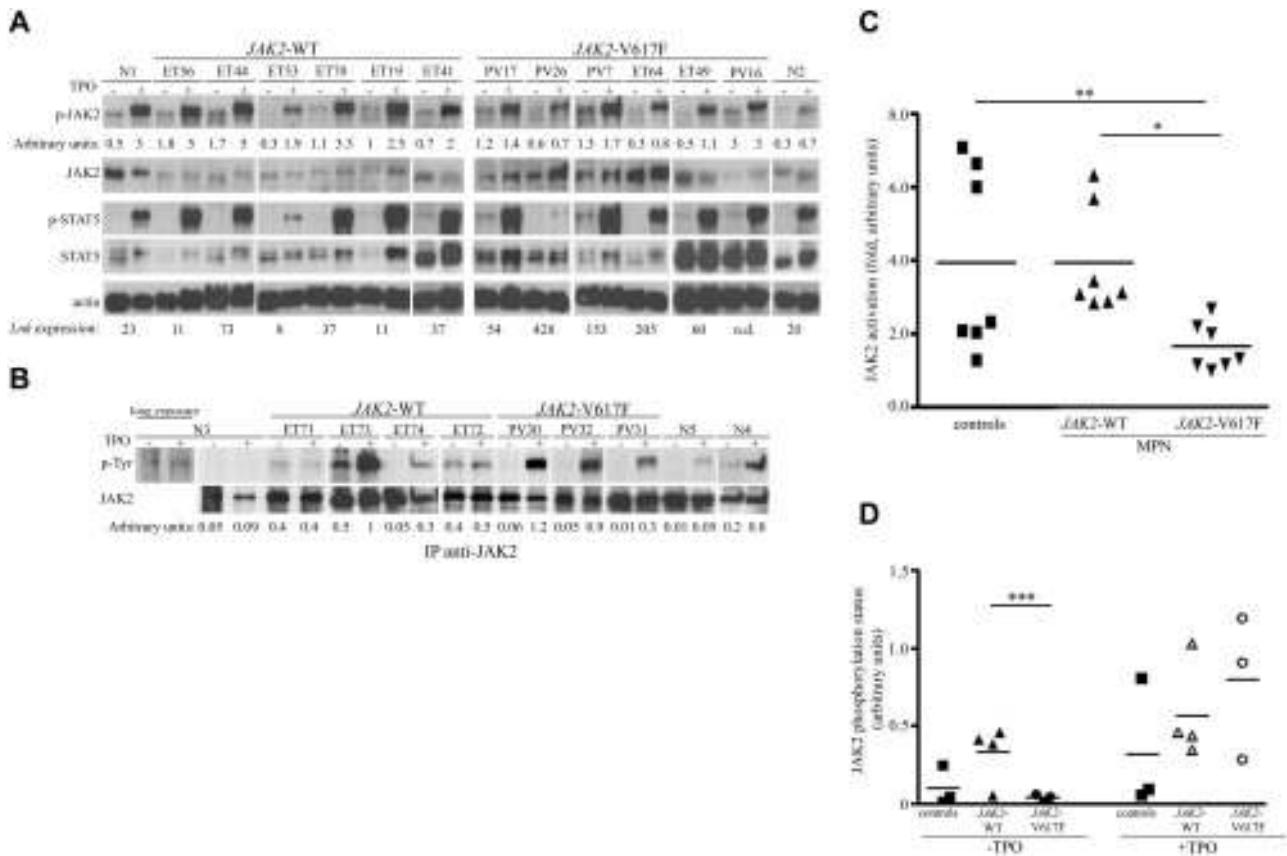
Constitutive JAK/STAT signaling has been associated to JAK2-V617F-positive MPNs, as shown in hematopoietic cell lines or animal models. Because *LNK* expression was clearly increased in these patients, we examined whether Lnk could affect JAK2 and STAT5 activation in V617F-positive and negative MPNs. Purified platelets were TPO-stimulated or not, and total cell lysates were analyzed with anti-phospho-JAK2- and anti-phospho-STAT5-specific antibodies. JAK2/STAT5 activation was detected in all samples analyzed (Figure 3A and supplemental Figure 2). How-

ever, JAK2-V617F-fold activation was significantly lower compared with JAK2-WT samples and controls (Figure 3C). Conversely, the *LNK* expression level in JAK2-V617F samples was elevated (Figure 3A), suggesting an inhibitory role of Lnk on JAK2 activation. Furthermore, JAK2 immunoprecipitations followed by anti-phosphotyrosine-specific antibodies analysis showed a significant difference in JAK2 basal phosphorylation in JAK2-V617F compared with JAK2-WT samples (Figure 3B-D). However, both JAK2 forms displayed high TPO-induced phosphorylation. Altogether, these results suggest that the activation/phosphorylation of JAK2-WT and V617F forms is regulated differently by Lnk in MPN patients.

#### Lnk associates with active JAK2-WT and V617F via its SH2 domain

Members of the SH2B family have been shown to directly associate with JAK2 via their SH2 domain and the phosphorylated tyrosine residue 813 (pY813) in JAK2. This association is required for the regulation of JAK2 activity and phosphorylation of the adaptors by the kinase.<sup>28,29</sup>

To determine whether the Lnk/JAK2 interaction has a pathophysiological significance in MPNs, we examined their association in platelets derived from healthy donors, RT, and MPN (JAK2-WT and V617F) patients. Platelets lysates previously TPO-stimulated or not were immunoprecipitated with anti-Lnk antibodies and immunoblotted with anti-phosphotyrosine, anti-JAK2 and anti-Lnk antibodies. Lnk coimmunoprecipitated with JAK2 in control samples (healthy donors and RT) after TPO-stimulation, which resulted in Lnk phosphorylation (Figure 4A). However, a weak Lnk/JAK2 interaction was sometimes detected in nonstimulated cells. In contrast, Lnk was constitutively associated with JAK2 and phosphorylated in WT and V617F MPNs cells. These data show for the first time in the context of RT and MPN platelets that Lnk binds to activated JAK2 and subsequently becomes a substrate of the kinase. This interaction was also detected with the JAK2-V617F



**Figure 3. Activation of JAK/STAT signaling pathways in MPN platelets.** (A) Total platelet lysates from MPN patients (JAK2-WT and V617F) and healthy donors (N) were stimulated (+) or not (-) for 10 minutes with TPO (100 ng/mL) and then subjected to immunoblot analysis with anti-phospho-JAK2 (p-JAK2) and anti-phospho-STAT5 (p-STAT5) antibodies. Total JAK2 and STAT5 levels were analyzed with anti-JAK2 and anti-STAT5 antibodies. Blot quantification was performed with multi Gauge software (Fujifilm). Numbers under the phospho-JAK2 blots show the ratios (arbitrary units) of phospho-JAK2/total JAK2. Actin blot is shown as loading control; numbers under this blot denote the mRNA expression level of *LNK* for each patient. (B) Platelet lysates from healthy donors (N), JAK2-WT and V617F MPN patients were stimulated with or without TPO for 10 minutes and immunoprecipitated with anti-JAK2 antibodies. Western blot analysis with anti-phosphotyrosine (anti-p-Tyr) antibodies allowed identification of phosphorylated JAK2 protein (top panel). Total JAK2 protein expression is shown (bottom panel). Numbers under the p-Tyr blots show the ratios (arbitrary units) of phospho-JAK2/total JAK2. ET, essential thrombocythemia; PV, polycythemia vera; n.d., not done. (C) Graphic representation of JAK2-fold activation. Data represent the normalized ratios of TPO-induced phospho-JAK2/nonstimulated phospho-JAK2 from (A). Statistical significance was determined using the Student *t* test: \**P* = .0025; \*\**P* = .0386. (D) Graphic representation of JAK2 phosphorylation status, data represent the normalized ratios of p-TyrJAK2/total JAK2 (arbitrary units) from panel B, \*\*\**P* = .047.

mutant form demonstrating that this mutation does not affect the Lnk/JAK2 association.

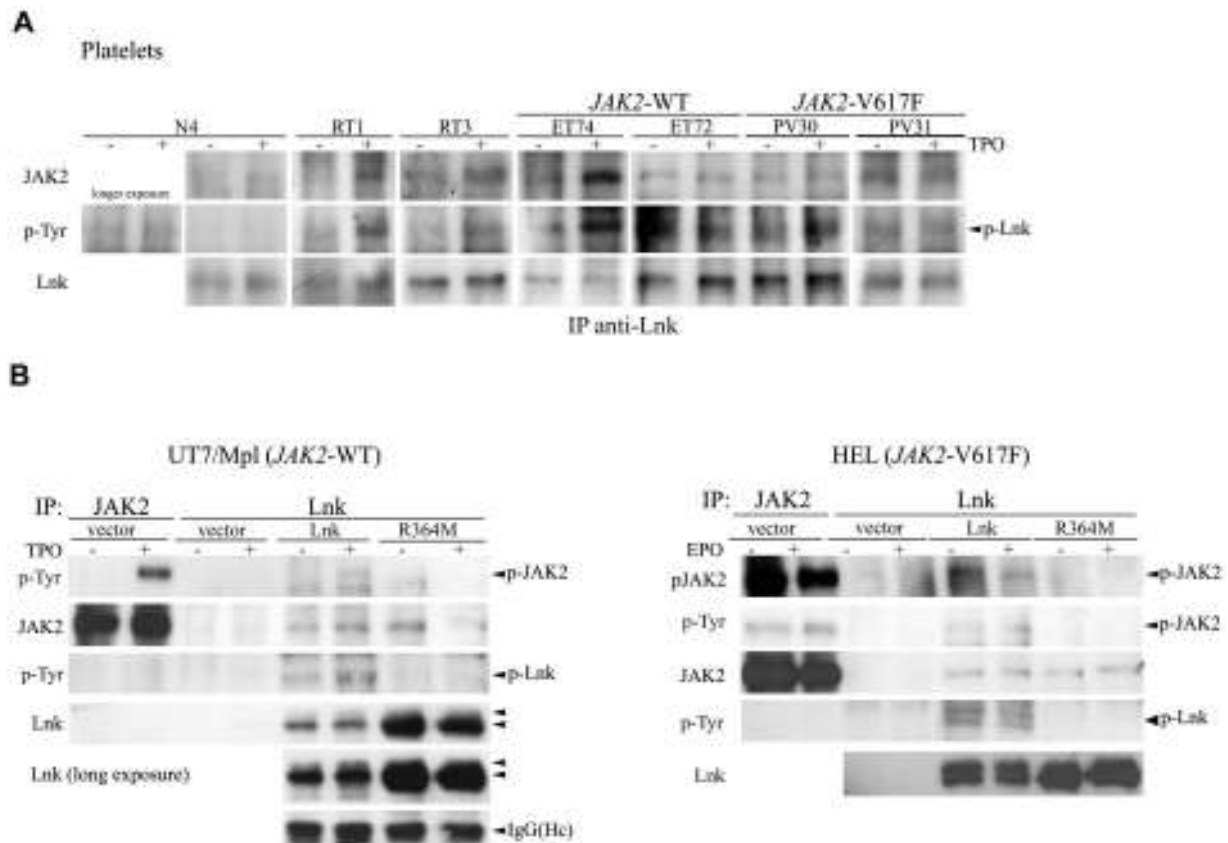
Lnk was recently reported to interact with JAK2 through its SH2 domain in response to TPO stimulation. We examined whether this domain was necessary for Lnk/JAK2 association in a JAK2-WT and V617F context. First, we infected UT7/Mpl (*JAK2*-WT) cells with retroviral supernatants expressing control vector, WT, or SH2-inactive Lnk mutant (R364M) form. Lnk immunoprecipitation analysis on UT7/Mpl infected cells showed that only WT Lnk associated with activated JAK2-WT, this interaction resulting in Lnk phosphorylation (Figure 4B first and third left panels). In contrast, the R364M mutation highly diminished Lnk association with activated JAK2-WT and abolished Lnk phosphorylation. Interestingly, we could detect an interaction between WT or R364M Lnk and nonphosphorylated JAK2 (Figure 4B second left panel), which suggests that Lnk can bind to inactive JAK2 through another domain.

We next analyzed Lnk/JAK2 interaction in a V617F context. HEL (*JAK2*-V617F) cells infected with the different Lnk forms, as described above, were stimulated with EPO and immunoprecipitated with anti-Lnk antibodies. Our data confirmed that Lnk also binds JAK2-V617F form via its SH2 domain, resulting in constitu-

tive Lnk phosphorylation (Figure 4B right panels). Moreover, an interaction with R364M Lnk could now be observed with this JAK2 active form, suggesting a change in the Lnk/JAK2 interaction in the presence of the V617F mutation (Figure 4B third right panel). This result also supports the implication of a second Lnk domain in its association with JAK2.

#### A second JAK2-binding site within Lnk N-terminal region

To identify other domains of Lnk involved in its interaction with JAK2, we performed GST pull-down experiments using GST fusion proteins expressing either the Lnk SH2 domain (SH2), the SH2 inactive form (R364M), the PH domain alone (PH) or together with the N-terminal region (NPH; Figure 5A). UT7/Mpl cells treated with or without TPO were incubated with equal amounts of the different Lnk GST fusion proteins (Figure 5B, bottom panel), and bound proteins were analyzed with anti-phosphotyrosine and anti-JAK2 specific antibodies. Only WT Lnk SH2 domain was able to bind to phosphorylated JAK2 (Figure 5B). Neither the R364M, nor the NPH protein could associate with the activated kinase. However, weak binding between the NPH fusion protein and JAK2 was observed in untreated cells when probed with anti-JAK2



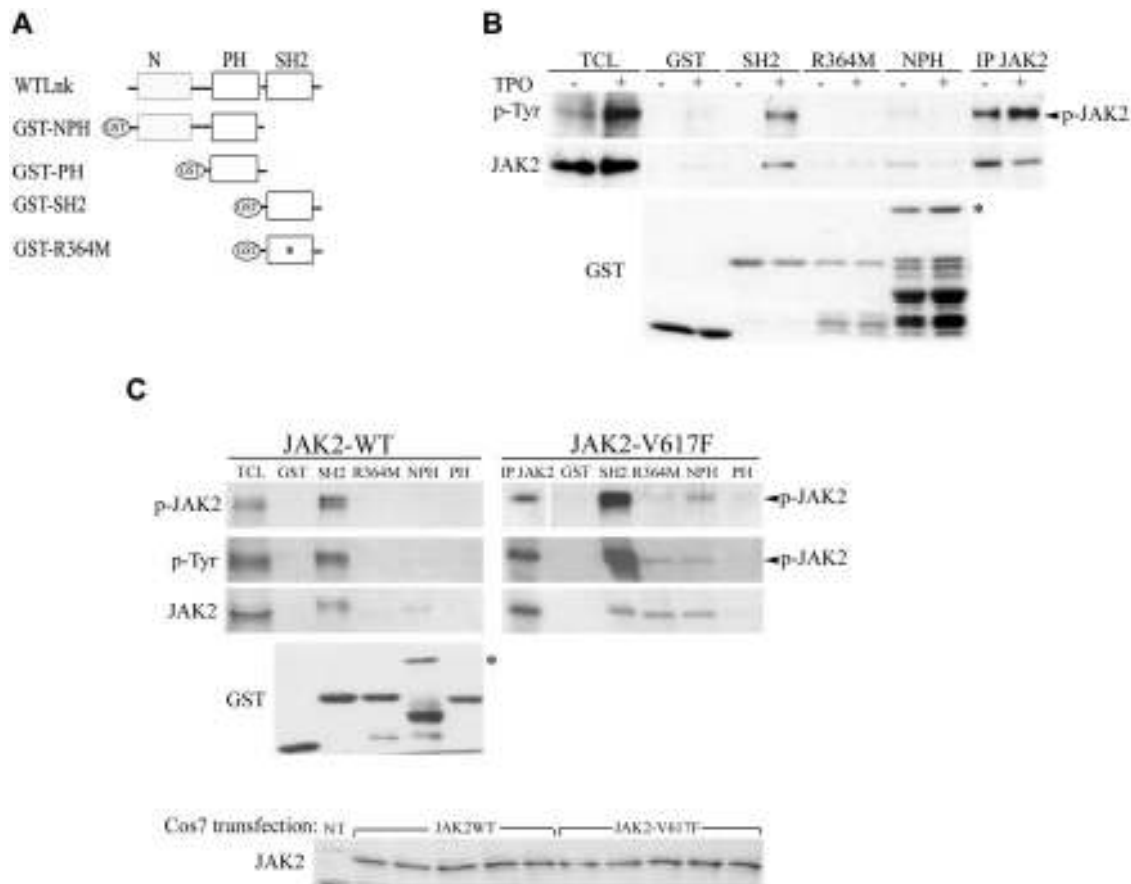
**Figure 4. Lnk interacts with JAK2-WT and V617F via its SH2 domain.** (A) Platelets from healthy donor, RT and MPN patients were stimulated as in Figure 3 and immunoprecipitated with anti-Lnk antibodies. Western blot analysis with anti-JAK2 antibodies revealed associated JAK2 (top panel). Phosphorylated Lnk was detected with anti-p-Tyr antibodies (middle panel) and Lnk protein expression is shown with anti-Lnk antibodies (bottom panel). (B) Total lysates from UT7/Mpl (left panel) or HEL (right panel) cells expressing control vector or Lnk forms were stimulated with TPO (100 ng/mL) or EPO (50 U/mL), respectively, for 10 minutes and then immunoprecipitated with anti-Lnk antibodies. Western blot analysis was performed with anti-phosphotyrosine and anti-phospho-JAK2 antibodies (top right panel). Anti-JAK2 immunoprecipitations are shown as control for JAK2 size. JAK2 and Lnk protein expression were detected with anti-JAK2 and anti-Lnk, respectively. A longer exposure of the Lnk blot (left panels) shows Lnk as a doublet (arrows). IgG (Heavy chain, Hc) blot is shown as immunoprecipitation control in left panel. All shown experiments have been repeated at least 3 independent times.

antibodies, suggesting an interaction between these domains of Lnk and nonphosphorylated JAK2 (Figure 5B, top panels). A similar result was obtained in COS7 cells transiently expressing JAK2-WT (Figure 5C, left panels). The Lnk SH2 domain was able to pull-down activated JAK2 as revealed by anti-phospho-specific JAK2 and anti-phosphotyrosine antibodies, whereas the NPH protein weakly precipitated probably with nonphosphorylated JAK2 as shown by anti-JAK2 immunoblotting. No JAK2 binding was detected with the GST fusion protein alone or expressing the PH domain. These results suggest that a second Lnk binding site for JAK2 lies within the N-terminal region of the adaptor.

We next examined the impact of the V617F mutation on JAK2 binding to the different domains of Lnk. After transfection of COS7 cells with JAK2-V617F form (Figure 5C, bottom panel), cell lysates were incubated with equal amounts of the different GST fusion proteins (Figure 5C, GST blot) and immunoblotted with anti-phospho-specific JAK2, anti-phosphotyrosine and anti-JAK2 antibodies. A stronger interaction between Lnk SH2 domain and JAK2-V617F was detected compared with JAK2-WT (Figure 5C, right panels). However, binding was now observed with the NPH and R364M proteins. These results indicate that the expression of the V617F mutation modifies the binding affinity between JAK2 and the adaptor, but not its specificity for Lnk N-terminal region, as shown by the lack of association with the PH domain alone (Figure 5C).

#### Lnk SH2 domain is necessary for inhibiting JAK2-V617F-mediated proliferation

Lnk is a potent inhibitor of cytokine-dependent cell growth in normal hematopoietic cells.<sup>11,16,17,21,24</sup> Therefore, we analyzed the effect of Lnk on cell proliferation in a JAK2-V617F context. Expression of WT Lnk in HEL cells led to significant growth inhibition compared with cells expressing control vector. However, the R364M Lnk mutant form completely abolished this inhibitory function (Figure 6A). Similar results were obtained in the presence of EPO (data not shown). To further emphasize the specific role of Lnk in cell proliferation, cells were infected with APS, a member of the Lnk family. No cell growth inhibition was observed in these cells, demonstrating that this inhibitory function is specific to Lnk. Fluorescence-activated cell sorting (GFP-expressing cells) and Western blot analysis further confirmed the level of Lnk, R364M, and APS expression in the culture (Figure 6A-C). We also measured cell proliferation on the same clones 4 weeks later. Cells expressing Lnk seemed no longer able to inhibit cell growth, similarly to vector, R364M, and APS-expressing cells (Figure 6B). Although the same percentage of cells expressed Lnk at day 35 than at day 0 (assessed by the percentage of GFP<sup>+</sup> cells), one-third of these cells now expressed lower levels of Lnk. This reduction in expression was shown by the appearance of a second population that results in a lower mean fluorescence intensity of the overall



**Figure 5. Lnk interacts differently with JAK2-WT and V617F.** (A) Schematic representation of GST-Lnk fusion proteins used; R364M mutation is indicated with an asterisk (\*). (B) UT7/Mpl stimulated as previously indicated were incubated with GST alone or different GST-fused Lnk domains. (C) COS7 cells transiently transfected with either WT (left panel) or JAK2-V617F (right panel) forms by the polyethyleneimine (PEI; Sigma-Aldrich) method were harvested 48 hours after transfection and lysed as described in methods section. Anti-JAK2 Western blot confirms similar expression of both JAK2 forms. Cell lysates were incubated with GST alone or different GST-fused Lnk domains. Immunoblotting with anti-p-Tyr, anti-phospho-JAK2 and anti-JAK2 antibodies allowed detection of bound activated JAK2 protein. Anti-JAK2 immunoprecipitation and total cell lysate (TCL) are shown as control for JAK2 size. Anti-GST blots are shown as control of equal GST proteins used in the assay; asterisk (\*) in panels B-C marks NPH GST protein. All experiments have been performed at least 3 independent times. White space gaps in panels B and C indicate repositioned gel lanes.

GFP<sup>+</sup> cells (205 mean fluorescence intensity at day 35 vs 609 at day 0) and by Western blot analysis (Figure 6A-C).

We further studied the impact of Lnk expression level on the activation of the JAK/STAT and MAPK pathways. High level of WT Lnk correlated with down-regulation of JAK2, STAT5, and MAPK activation, whereas vector, R364M and APS-expressing cells had no effect on these signaling pathways (Figure 6D left panels). In contrast, activation of JAK/STAT and MAPK pathways was no longer inhibited in cells expressing lower WT Lnk level (Figure 6D right panels). These results indicate that the level of Lnk expression is important for modulating JAK2-V617F-mediated responses.

#### Lnk domains contribute differently to the proliferation of multilineage and megakaryocytic progenitors

A common characteristic of ET, PMF, and *Lnk*<sup>-/-</sup> multilineage and megakaryocytic progenitors is a hypersensitivity to growth factors that confers them proliferative advantage over normal cells. To determine which domain(s) of Lnk is able to control proliferation of multilineage (CFU-GEMM) and megakaryocytic (CFU-Meg) progenitor cells, we retrovirally expressed WT Lnk or mutated forms at its individual domains in Lin<sup>-</sup> progenitor cells derived from *Lnk*-deficient animals (Figure 7A left panel). To confirm Lnk specificity, *Lnk*<sup>-/-</sup>Lin<sup>-</sup> cells were also infected with WT APS. Lin<sup>-</sup>-transduced cells were then sorted based on GFP expression

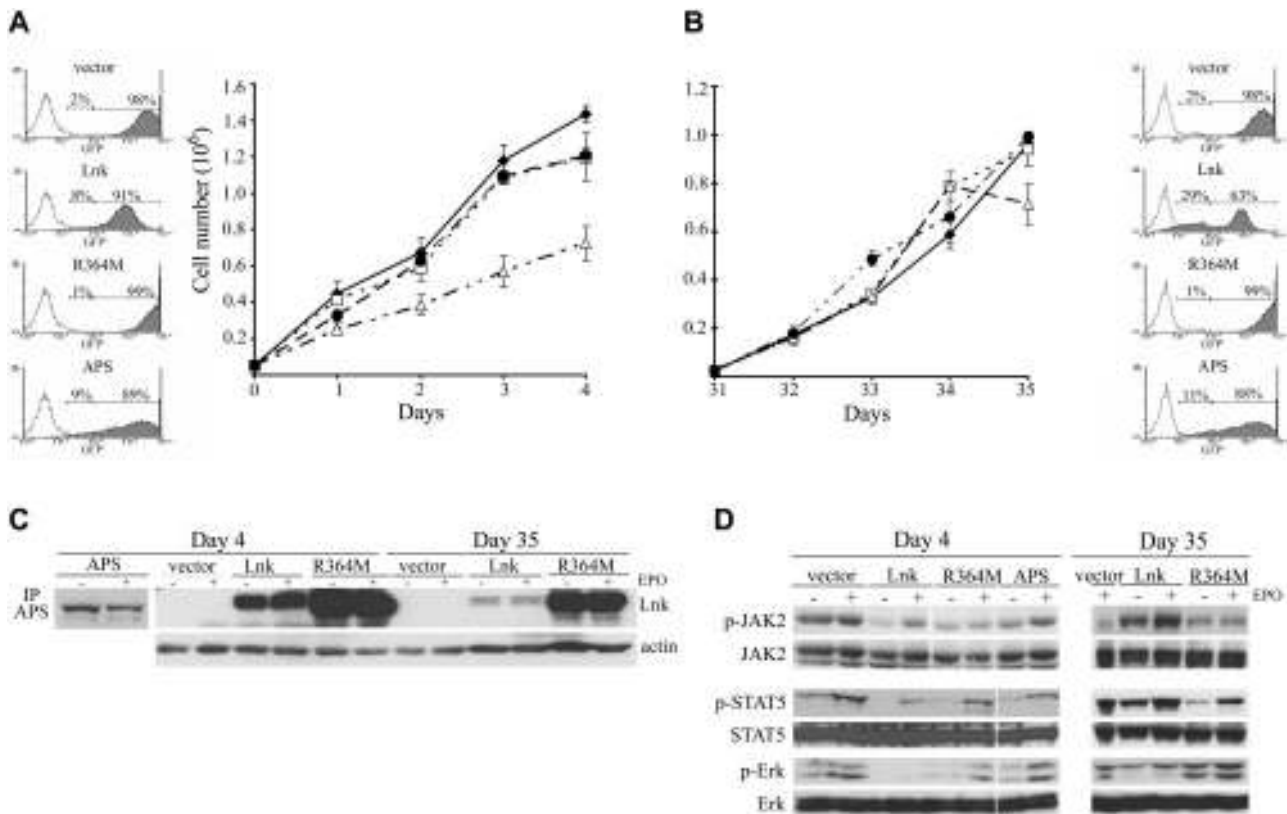
and grown in vitro in methylcellulose media supplemented with different combination of cytokines to assess their clonogenic potential. The expression of the different Lnk forms and APS in Lin<sup>-</sup> cells was confirmed by RT-PCR (Figure 7A right panel).

Expression of WT Lnk reestablished normal numbers of CFU-GEMM colonies in *Lnk*<sup>-/-</sup> progenitors similarly to Lin<sup>-</sup> cells derived from wild-type animals. Expression of either PH inactive (W270A) form or Lnk mutated at the C-terminal tyrosine (Y536F), moderately reestablished multilineage colony numbers in contrast to the R364M mutant protein (Figure 7B). This result shows that the SH2 domain is important for inhibiting multilineage cell growth. In this context, the adaptor APS could not replace Lnk function at the progenitor level.

In contrast to CFU-GEMM, analysis of CFU-Meg colonies showed that the R364M mutant displayed a similar effect as the W270A form (Figure 7C). Together, these results indicate that the individual domains and Y536 of Lnk contribute differently to its inhibitory function during expansion of multilineage and megakaryocytic progenitors.

## Discussion

*Lnk*-deficient mice display a phenotype reminiscent of MPNs that has suggested a role for Lnk in the development of these diseases.



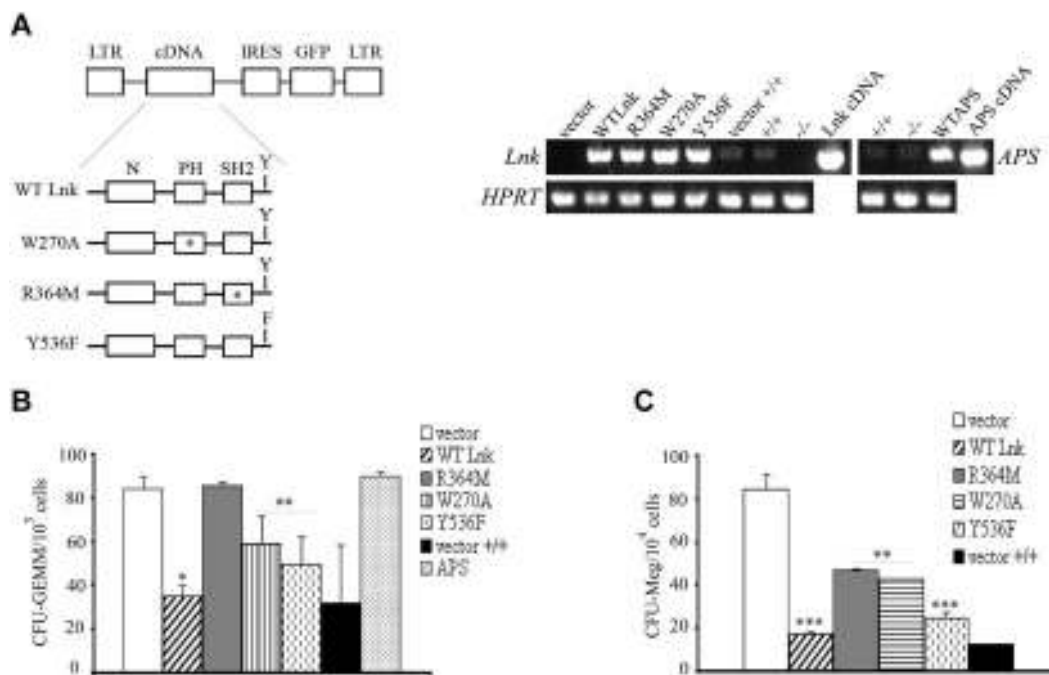
**Figure 6. Lnk inhibits cell growth and signaling in HEL cells.** (A-B) HEL cells ( $5 \times 10^5$ ) expressing different Lnk forms or WT APS were cultured in complete media, and viable cell numbers were determined by trypan blue exclusion at the indicated times with 4 weeks interval (B). Data represent the mean counts  $\pm$  SD (error bars) of viable cells from triplicate determinations and are representative of at least 3 independent experiments. GFP expression level in all clones was determined by fluorescence-activated cell sorting; (C) WT and R364M Lnk forms and APS protein expression was assessed with anti-Lnk and anti-APS antibodies, respectively. Actin blot is shown as equal loading control. Vector,  $\blacklozenge$ ; R364M,  $\square$ ; APS,  $\bullet$ ; Lnk,  $\Delta$ . (D) Total lysates from HEL cells expressing different Lnk forms or WT APS were prepared as in Figure 4B at day 4 (left panels) and day 35 (right panels) of culture. JAK2, STAT5, and MAPK activation was assessed by immunoblotting with anti-phospho-JAK2 (p-JAK2), anti-phospho-STAT5 (p-STAT5) or anti-phospho-Erk1/2 (p-Erk) antibodies, respectively. Total JAK2, STAT5, and Erk levels were analyzed by immunoblotting. White space gaps indicate repositioned gel lanes.

Recently, the first Lnk mutations in ET and PMF patients have been identified.<sup>25</sup> We confirm that the prevalence of such mutations is rare (5% or less) in JAK2-WT ET patients and therefore, the significance of Lnk mutations in MPN pathogenesis remains unclear. In this study, we have addressed the question of other mechanisms accounting for abnormal Lnk function by analyzing cells derived from MPN patients, *Lnk*<sup>-/-</sup> progenitors and hematopoietic cell lines expressing WT or mutated forms of either JAK2 or Lnk. Our results show that Lnk expression is up-regulated by the TPO/MPL/JAK2 pathway in megakaryocytic and MPN primary cells. Furthermore, we demonstrate that changes in the level of Lnk expression and in its binding to JAK2-V617F can modulate the responses mediated by the JAK2 forms expressed in these diseases.

Our previous analyses of *Lnk*<sup>-/-</sup> mice suggested tight regulation of Lnk during hematopoiesis.<sup>21</sup> In the present work, we found that Lnk mRNA and protein expression were regulated by TPO-activated signaling pathways in megakaryocytic cells. This was further confirmed in platelets isolated from RT patients, which are often associated with elevated TPO levels.<sup>26</sup> Consistent with our results, recent studies have demonstrated that *LNK* expression is regulated by early-acting (Stem Cell Factor and TPO) and lineage-specific (EPO) growth factors, cytokine receptors (MPL) and JAK2 signaling pathways in HSC, bone marrow cells and hematopoietic cell lines.<sup>12,18,19,30,31</sup> Furthermore, the Lnk protein was shown to down-regulate MPL, EPO receptor, and JAK2 kinase signaling after TPO and EPO stimulation, respectively.<sup>16,17</sup> Altogether, these results place Lnk as part of an important negative regulatory loop

(cytokine receptor/JAK2 kinase/Lnk regulator) in hematopoiesis. Similarly, the SOCS family of negative regulators is induced by the JAK/STAT pathway upon cytokine receptor stimulation. It thereafter acts within a classical negative feedback loop both to suppress activation of the receptor and JAK2 and to target them for proteasomal degradation.<sup>32</sup> These parallels indicate that hematopoietic negative regulators exert their function through finely controlled processes that allow precise modulation of the cell's intrinsic sensitivity to cytokines.

Some of the cytokine signaling pathways that regulate Lnk are also deregulated in MPNs, suggesting that the expression and function of Lnk could be affected in these disorders. Indeed, we found that *LNK* mRNA expression was significantly increased in all MPNs examined (ET, PV, PMF) and notably in JAK2-V617F patients, where *LNK* overexpression correlated with a higher JAK2-V617F allele burden and JAK2 activity. However, how JAK2 expressed in MPN cells can surmount Lnk inhibition is still unclear. Moreover, this observation seems to contrast with the Lnk inhibition of JAK2-V617F-dependent signaling and proliferation, we and others have shown in hematopoietic cell lines (this work and<sup>19,30</sup>). This apparent paradox can be explained by the fact that the ratio of expression level of JAK2-V617F in respect to Lnk may be different between MPN cells and hematopoietic cell lines, thus modulating Lnk inhibitory function. In the initial phase of MPNs, a low ratio of mutant JAK2/Lnk may be present (*JAK2*-V617F heterozygous state). In this context, low signaling through JAK2-V617F would induce Lnk, which would then down-regulate



**Figure 7. Lnk domains and Y537 contribute differently to the expansion of myeloid and megakaryocytic progenitors.** (A) Schematic representation of WT and Lnk mutant forms cloned into the MIG retroviral vector. Point mutations in the PH domain (W270A), SH2 domain (R364M), and in the C-terminal tyrosine (Y536F) are indicated with an asterisk (\*) or F. Total RNA was extracted from WT (+/+) or *Lnk*<sup>-/-</sup>Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> progenitor cells transduced with either vector alone, WT, or mutant forms of Lnk, and WT APS and subjected to RT-PCR with specific primers for *Lnk* and *APS* (top panels) or *HPRT* (bottom panels) as control. (B-C) WT or *Lnk*<sup>-/-</sup>Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> transduced cells were assessed for their in vitro colony-forming ability of multilineage (B) or megakaryocytic (C) progenitors in methylcellulose media containing optimal concentrations of appropriate recombinant growth factors. Data represent the mean  $\pm$  SD (error bars) of number of colonies/10<sup>3</sup> (for CFU-GEMM) or 1.5  $\times$  10<sup>4</sup> (for CFU-Meg) Lin<sup>-</sup>GFP<sup>+</sup> cells from triplicate samples from 3 independent assays using 3-5 mice of each genotype. Statistical significance was determined using the Student *t* test: \**P*  $\leq$  .002; \*\**P*  $\leq$  .02; \*\*\**P*  $\leq$  .01. CFU-GEMM, colony-forming unit of granulocyte, erythroid, macrophage, and megakaryocyte cells; CFU-Meg, colony-forming unit of megakaryocyte cells.

JAK2-WT, rather than JAK2-V617F signaling. This would increase the ratio JAK2-V617F/Lnk, but would maintain the proliferative advantage of V617F-expressing cells. In hematopoietic cell lines (homozygous for JAK2-V617F or exogenously expressing it), the initial ratio JAK2-V617F/Lnk is very low because of overexpression of Lnk. This allows the adaptor to down-regulate JAK2, and other signaling effectors (such as MAPK). The subsequent reduction in Lnk expression inversely changes the JAK2-V617F/Lnk ratio, thereby abolishing inhibition of V617F-mediated signals just like in MPN cells. Our results on HEL cells expressing different levels of the Lnk protein, together with the phenotype displayed by *Lnk*<sup>+/-</sup> mice (intermediate between that of wild-type and homozygous mice),<sup>21</sup> support this argument. Alternatively, it is possible that activation of a signaling effector or pathway, other than JAK2 and insensitive to Lnk inhibition, may be responsible for the uncontrolled cellular proliferation in MPNs. Further experiments are required to test whether Lnk dosage in MPN cells would have pathophysiological consequences on these diseases.

Recent studies have shown that *LNK* mRNA levels were also elevated in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia cells.<sup>30</sup> Together with our data on MPNs, these results suggest a relevant role for Lnk in these proliferative hemopathies.

On the other hand, the data on the inhibition of JAK2-V617F-mediated responses suggest that Lnk is an important inhibitor of mutated JAK2, similarly to the JAK/STAT inhibitor SOCS2.<sup>33</sup> Interestingly, Lnk and SOCS2 can inhibit cytokine signaling through interaction with both the cytokine receptor and JAK2.<sup>11,18,32</sup> In contrast, SOCS3, who acts mainly on the kinase, is unable to inhibit JAK2-V617F, but rather enhances its kinase activity.<sup>34</sup> These results suggest that regulation of the mutated JAK2 is

complex and that it may require the combination of several inhibitory mechanisms.

Our analysis of JAK2 activation status in MPN platelets has shown a difference between JAK2-WT and JAK2-V617F MPN samples that correlated with the level of Lnk expression in these patients. This suggests a distinct Lnk-mediated regulatory mechanism for each JAK2 form. We and others have shown that Lnk does not significantly inhibit the initial activation of cytokine-mediated signaling pathways, but it rather diminishes the duration of their activation after cytokine stimulation.<sup>16,17,21,24</sup> Consistent with this, we have observed a prolonged phosphorylation of JAK2 in V617F-expressing MPN cells at longer TPO-stimulation times that suggests Lnk inability to inhibit the kinase activation (data not shown). As for JAK2-WT MPN patients, the regulation of JAK2 activation appears more complex, possibly involving a molecular event, yet to be characterized, that regulates the kinase activity in these patients.

Several studies have shown that Lnk interacts with phosphorylated WT and V617F JAK2 in hematopoietic cell lines, resulting in the subsequent phosphorylation of the adaptor.<sup>11,19,30</sup> Our results showed for the first time that this interaction occurs in platelets derived from RT and MPN (WT and mutated JAK2) patients. Moreover, we found that Lnk binding to activated JAK2 is required for the phosphorylation of the adaptor by the kinase, and this function is dependent on the Lnk SH2 domain. However, the role of Lnk phosphorylation on JAK2 inhibition is still unclear. Interestingly, HEL cells expressing Lnk mutated at Y536 (Y536F) displayed a significant reduction in Lnk phosphorylation and JAK2-V617F down-regulation, suggesting a role for this tyrosine

in both JAK2-mediated Lnk phosphorylation and inhibitory function (A.A. and L.V., unpublished data). In addition, our GST pull-down experiments revealed a novel moderate interaction involving the N-terminal region of Lnk that enables it to associate with inactive JAK2. A similar binding site has been reported for SH2-B and APS, the other members of the Lnk family. In these proteins, the second JAK2-binding site includes the PH domain and the PH-SH2 domain linker region and appears to be inhibitory in nature.<sup>28,29,35</sup> For the Lnk protein, we showed that this site does not involve the PH domain, contrary to the recent report by Gery et al.<sup>19</sup> This discrepancy might be a result of the length of the PH domain fragment used in each study. Furthermore, we observed that in the presence of the V617F mutation, JAK2 binds stronger to this second Lnk site, suggesting that the mutant kinase displays a different affinity for the adaptor than the WT form. It is then conceivable that the change in JAK2 binding affinity for this site may allow a stronger Lnk inhibition of JAK2 at the basal level. However, it will also affect the kinase subsequent interaction with Lnk SH2 domain, resulting in failure to inhibit JAK2-V617F cytokine-mediated activation. Our recent identification of an Lnk mutation in this region further supports this model. Detailed analysis of the amino acids involved in this Lnk/JAK2 interaction may shed light into the molecular mechanism implicated in Lnk-mediated JAK2 inhibition.

Recent studies have suggested that in MPNs, other genetic modifications, like the *TET2* gene mutations<sup>36</sup> and the newly identified rare mutations in Lnk (this work and<sup>25</sup>), could confer a proliferative advantage to hematopoietic progenitors.<sup>37</sup> Interestingly, expression of the JAK2-V617F form in *Lnk*<sup>-/-</sup> progenitors increased the number of cytokine-independent colonies in these cells compared with wild-type cells expressing JAK2-V617F and accelerates oncogenic JAK2-induced MPNs in mice.<sup>19,38</sup> Together with our data obtained in PMF and PV CD34<sup>+</sup> and mature (platelets) cells from MPN patients, these results indicate that Lnk regulation is important during all stages of myeloid differentiation and can contribute to the development of MPNs and probably of other human hematopoietic malignancies.

The studies presented here on *Lnk*<sup>-/-</sup>Lin<sup>-</sup> progenitors expressing either WT or mutant forms of Lnk have helped to better define its inhibitory role in the expansion of hematopoietic progenitors. Indeed, we showed that the SH2 domain contributes mainly to inhibition of the proliferation of multilineage progenitors. In contrast, analysis of megakaryocytic progenitors indicated that both SH2 and PH domains are important for Lnk-mediated growth inhibition of these cells. This function is specific to Lnk because expression of *Aps* in these cells does not compensate for the lack of Lnk.

In summary, this is the first comprehensive study of the role of Lnk in a representative cohort of MPN patients showing that Lnk levels and JAK2-binding can modulate the cellular responses mediated by the JAK2 forms present in these diseases. In addition, our findings provide evidence that Lnk participates, together with the Mpl receptor and the JAK2 kinase, in a finely controlled feedback mechanism essential for the regulation of TPO-mediated

megakaryopoiesis and consequently, thrombopoiesis. Finally, we identified a novel interaction site between Lnk and JAK2, which together with the SH2 domain may play a major role in the down-regulation of both normal and MPN-derived hematopoiesis. Defining the signaling pathways and effectors, other than JAK2, regulated by Lnk will help to better understand the role of this adaptor in the pathogenesis of MPNs and determine its potentially therapeutic value.

## Acknowledgments

We thank the patients who donated their cells to support this research, the PV-Nord group, Nicole Boggetto for assistance with flow cytometry sorting, François Delhommeau for providing CD34<sup>+</sup> cells from PV patients, and the sequencing device of Hôpital Henri Mondor (Créteil).

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (Inserm)—Avenir, the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC)—Comité St. Denis, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Association Laurette Fugain, and the Association Nouvelles recherches Biomédicales (NRB). H.M. is the recipient of a PhD scholarship from the Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT). A.A. was supported by a postdoctoral fellowship from the Universidad de Guadalajara (Mexico).

## Authorship

Contribution: F.B.M. designed the research, analyzed and interpreted the data, and contributed to writing the manuscript; H.M., C.D., C.R., and A.A. performed experiments; S.H. collected clinical characteristics from all the patients; E.M. contributed to cellular experiments; S.C. performed statistical analysis; B.C. contributed genotyping analysis; S.G. and C.T. contributed MPL and Lnk sequencing; P.F., F.C., and N.V.B. contributed scientific discussion and reviewed the manuscript; M.C.L.B.K. contributed to the recruitment of patients, interpretation of the data, and writing the paper; J.J.K. contributed to the recruitment of patients, analyzing the data, designing the research and writing the manuscript; and L.V. designed and performed research, analyzed the data, and wrote the paper.

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

The current affiliation for A.A. is Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Mexico.

Correspondance: Laura Velazquez, UMR U978 Inserm/ Université Paris 13, Adaptateurs de Signalisation en Hématologie, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93 017 Bobigny Cedex, France; e-mail: [laura.velazquez@inserm.fr](mailto:laura.velazquez@inserm.fr); and Jean-Jacques Kiladjian, Clinical Investigation Center, Hôpital Saint-Louis and French Inter-group of Myeloproliferative Disorders, 1 Avenue Claude Vellefaux, Paris 75010, France; e-mail: [jean-jacques.kiladjian@sls.aphp.fr](mailto:jean-jacques.kiladjian@sls.aphp.fr)

## References

- Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2008;355(23):2452-2466.
- Baxter JE, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464):1054-1061.
- James C, Ugo V, Le Couédic J-P, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037):1144-1148.
- 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.
- 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.
- Zhao R, Xing S, Li Z, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005;280(24):22788-22792.
- Cazzola M, Skoda RC. Gain of function, loss of

- control—a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2005;90(7):871-874.
8. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-3476.
  9. 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.
  10. Rudd EC. Lnk adaptor: novel negative regulator of B cell lymphopoiesis. *Science STKE*. 2001;PE1.
  11. Bersenev A, Wu C, Balcerek J, Tong W. Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2832-2844.
  12. Buza-Vidas N, Antonchuk J, Qian H, et al. Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev*. 2006;20(15):2018-2023.
  13. Ema H, Sudo K, Seita J, et al. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Develop Cell*. 2005;8(6):907-914.
  14. Seita J, Ema H, Ooehara J, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2349-2354.
  15. Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol*. 2008;36(7):897-906.
  16. Tong W, Lodish FH. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med*. 2004;200(5):569-580.
  17. Tong W, Lodish FH. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005;105(12):4604-4612.
  18. Gery S, Gueller S, Chumakova K, Kawamata N, Liu L, Koeffler HP. Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2007;110(9):3360-3364.
  19. Gery S, Qi C, Gueller S, Hongtao X, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leuk Biol*. 2009;85(6):957-965.
  20. Takaki S, Morita H, Tezuka Y, Takatsu K. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med*. 2002;195(2):151-160.
  21. Velazquez L, Cheng MA, Fleming EH, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med*. 2002;195(12):1599-1611.
  22. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon  $\alpha$ -2a. *Blood*. 2006;108(6):2037-2040.
  23. Chaligne R, James C, Tonetti C, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(10):3735-3743.
  24. Simon C, Dondi E, Chaix A, et al. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood*. 2008;112(10):4039-4047.
  25. Oh ST, Simonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(6):988-992.
  26. Ishiguro A, Suzuki Y, Mito M, et al. Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytosis in acute infections. *Br J Haematol*. 2002;116(3):612-618.
  27. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3339-3347.
  28. Kurzer JH, Saharinen P, Silvennoinen O, Carter-Su C. Binding of SH2-B family members within a potential regulatory region maintains JAK2 in an active state. *Mol Cell Biol*. 2006;26(17):6381-6394.
  29. Maures TJ, Kurzer JH, Carter-Su C. SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;18(1):38-45.
  30. Gery S, Gueller S, Nowak V, Sohn J, Hofman WK, Koeffler HP. Expression of the adaptor protein Lnk in leukemia cells. *Exp Hematol*. 2009;37(5):585-592.
  31. Kent DG, Dykstra BJ, Cheyne J, Ma E, Eaves CJ. Steel factor coordinately regulates the molecular signature and biologic function of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2008;112(3):560-567.
  32. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Develop Biol*. 2008;19(4):414-422.
  33. Quentmeier H, Geffers R, Jost E, et al. SOCS2: inhibitor of JAK2V617F-mediated signal transduction. *Leukemia*. 2008;22(12):2169-2175.
  34. Hookham MB, Elliott J, Suessmuth Y, et al. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood*. 2007;109(11):4924-4929.
  35. Rui L, Gunter DR, Herrington J, Carter-Su C. Differential binding to and regulation of JAK2 by the SH2 domain and N-terminal region of SH2-Bbeta. *Mol Cell Biol*. 2000;20(9):3168-3177.
  36. Delhommeau F, DuPont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.
  37. Delhommeau F, DuPont S, Tonetti C, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;109(1):71-77.
  38. Bersenev A, Wu C, Balcerek J, et al. Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2058-22069.







## RESUME

La myélofibrose primitive (MFP) est un néoplasme myéloprolifératif (NMP) chronique *BCR-ABL1*-négatif associant une dérégulation de l'hématopoïèse (myéloprolifération, dysmégacaryopoïèse et migration des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSH/PH)) à une altération du stroma médullaire et splénique (fibrose ostéomyélosclérose, néoangiogenèse). Le mégacaryocyte (MK) est un acteur majeur de sa pathogenèse, via la production de cytokines et facteurs fibrosants, dans un contexte inflammatoire. Plusieurs arguments suggèrent que les mutations JAK2V617F et MPL515L/K qui caractérisent les NMP ne sont pas les événements initiaux de la MFP car elles ne sont retrouvées que chez la moitié des patients. L'objectif de mon travail a été de rechercher si d'autres anomalies, géniques ou non, pouvaient expliquer la pathogenèse de la MFP. Pour cela, parallèlement à une démarche génomique (transcriptome et CGH array), nous avons développé une approche de biologie cellulaire ciblée sur le rôle du stroma hématopoïétique.

Bien que n'ayant pas identifié d'autres anomalies génomiques que celles décrites dans la littérature et en particulier, la délétion 13q, les approches génomiques que nous avons développées nous ont permis de préciser les bornes de cette délétion dans les PH CD34<sup>+</sup> et les polynucléaires des patients. Cette délétion (région chromosomique minimale 13q14-13q21) est située à 2 mégabases (télomérique) du cluster FLT où est localisé le gène *FLT3*. Plusieurs arguments nous ont ensuite conduits à rechercher si le couple Flt3-ligand/Flt3 était impliqué dans la dérégulation de l'hématopoïèse et plus particulièrement dans la dysmégacaryopoïèse observée chez les patients. Parmi ceux-ci, citons : 1) l'existence d'une modulation d'expression de gènes inclus dans la zone de délétion 13q et dans le cluster FLT, dont le gène *FLT3* et 2) le fait que Flt3, un récepteur clé de la régulation de l'hématopoïèse primitive, soit souvent impliqué dans la pathogenèse d'hémopathies malignes et que son ligand, Flt3-ligand, soit majoritairement produit par le stroma hématopoïétique.

Notre étude montre une dérégulation de Flt3 et des MAPKs p38 dans les PH CD34<sup>+</sup> et les MK des patients atteints de MFP et ceci, quelque soit leur statut mutationnel Jak2. Elle démontre également que la persistance de la stimulation de l'axe Flt3/p38 en réponse à une production accrue de Flt3 ligand, participe à la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la maladie. En effet, nous avons mis en évidence : 1) une augmentation du taux sérique de Flt3 ligand et de son expression par les cellules du stroma médullaire et splénique ainsi que par les PH des patients atteints de MFP, 2) une surexpression spécifique de son récepteur Flt3 et de sa phosphorylation dans les CSH/PH CD34<sup>+</sup> et les progéniteurs mégacaryocytaires (MK), qui persistent au cours de la différenciation MK, quelque soit le statut mutationnel de Jak2 des patients, 3) une activation de Flt3 dans les progéniteurs MK en réponse au Flt3 ligand conduisant à la phosphorylation en cascade de la voie de signalisation des MAPKs p38 et à l'expression de ses gènes cibles tels que AP-1, p53, NFATc4, ATF2, IL-8, 4) une restauration de la mégacaryopoïèse et une inhibition de la migration (Flt3-ligand)-dépendante des progéniteurs MK des patients après inhibition de Flt3 ou de p38.

Nos résultats confirment l'importance d'une altération des MAPKs dans une dérégulation de l'hématopoïèse et soulignent le rôle d'une activation persistante de la voie p38, via le couple Flt3-ligand/Flt3, dans la dysmégacaryopoïèse qui caractérise la myélofibrose primitive. Ils suggèrent également que cette dérégulation participe au processus inflammatoire à l'origine de la réaction stromale et « lit » d'une transformation leucémique potentielle. Ce dialogue altéré entre les cellules hématopoïétiques pathologiques (Bad seeds), en particulier mégacaryocytaires et les cellules stromales (Bad soil), conforte notre concept « Bad seeds in Bad soil ». Ce travail pourrait contribuer à l'amélioration de ce dialogue par des approches thérapeutiques ciblées sur l'axe Flt3-ligand/Flt3 médié par l'activation de p38 qui, en réduisant le processus inflammatoire, rétablirait un lien entre le « Seed » et le « Soil ».