



**HAL**  
open science

**Perturbations du métabolisme oxydatif induites par  
l'activation de PDGFR $\alpha$  : mécanismes et conséquences  
dans la leucémie chronique à éosinophiles**

**FIP1L1-PDGFR $\alpha$**

Jean-Emmanuel Kahn

► **To cite this version:**

Jean-Emmanuel Kahn. Perturbations du métabolisme oxydatif induites par l'activation de PDGFR $\alpha$  : mécanismes et conséquences dans la leucémie chronique à éosinophiles FIP1L1-PDGFR $\alpha$ . Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S039 . tel-00829095

**HAL Id: tel-00829095**

**<https://theses.hal.science/tel-00829095>**

Submitted on 2 Jun 2013

**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.



Université Lille Nord de France  
Pôle de Recherche  
et d'Enseignement Supérieur

**Université de Lille Nord de France**

THÈSE délivrée par

L'Université Lille 2 – Droit et santé

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de la Vie

Présentée et soutenue publiquement par

Jean Emmanuel KAHN

Le 28 Juin 2011

**Perturbations du métabolisme oxydatif induites par l'activation  
de PDGFR $\alpha$  : Mécanismes et conséquences dans la leucémie  
chronique à éosinophiles FIP1L1-PDGFR $\alpha$**

Devant le jury composé de

Pr. Monique CAPRON, *Université Lille Nord de France*, Présidente du Jury

Pr Elizabeth MACINTYRE-DAVI, *Université Paris 5*, Rapporteur

Pr Philippe ROUSSELOT, *Université Versailles Saint Quentin en Yvelines*, Rapporteur

Pr Olivier BLETRY, *Université Versailles Saint Quentin en Yvelines*, Examineur

Pr. Lionel PRIN, *Université Lille Nord de France*, Directeur de Thèse

**EA 2686 (Directeur : Lionel Prin)**

**Auto et allo-réactivité : Empreintes sur les réponses lymphocytaires T et B**

# TABLES DES MATIERES

TABLES DES MATIERES .....	A
RÉSUMÉ.....	D
ABSTRACT.....	E
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	F
LISTES DES ABREVIATIONS .....	I
LISTES DES FIGURES ET TABLES .....	J
INTRODUCTION .....	1
I    HYPEREOSINOPHILIES ET SHE.....	2
<i>I.A Caractérisation des SHE : bases phénotypiques</i> .....	2
<i>I.B Caractérisation des SHE : bases cellulaires et moléculaires</i> .....	4
I.B.1    SHE lymphoïdes .....	4
I.B.2    SHE myéloprolifératifs et leucémies chroniques à éosinophiles .....	6
I.B.2.a    Syndromes myéloprolifératifs « classiques » et HE.....	6
I.B.2.b    La LCE associée à FIP1L1-PDGFR (LCE F/P+).....	7
I.B.2.c    Les SHE myéloprolifératifs (SHE-M) inclassés .....	8
I.B.3    Nouvelles classifications .....	8
<i>I.C Conclusion</i> .....	11
II   LA LCE F/P+ : ASPECTS PHYSIOPATHOLOGIQUES .....	11
<i>II.A Hématopoïèse et éosinophilopoïèse</i> .....	12
II.A.1    Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs.....	12
II.A.2    Eosinophilopoïèse.....	16
<i>II.B Tyrosines kinases et événements oncogènes hématopoïétiques</i> .....	20
II.B.1    Tyrosines kinases et transformation cellulaire : généralités.....	20
II.B.2    FIP1L1-PDGFR et transformation cellulaire .....	23
II.B.2.a    Induction de l'activité tyrosine kinase de F/P+ .....	23
II.B.2.b    FIP1L1-PDGFR et signaux de transduction .....	24
II.B.2.c    FIP1L1-PDGFR et ontogénèse éosinophile.....	25
II.B.2.d    A la recherche de la cellule souche leucémique F/P+ .....	27
Le concept de cellules souches leucémiques .....	27
Application à la LCE F/P+.....	29
II.B.2.e    FIP1L1-PDGFR et mécanismes de résistance .....	31
II.B.3    FIP1L1-PDGFR, éosinophiles et événement pathogènes .....	32
II.B.3.a    Les protéines cationiques .....	34
II.B.3.b    Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS).....	34
II.B.3.c    Les médiateurs lipidiques.....	34

II.B.3.d	Les traps .....	36
II.B.3.e	Cytotoxicité des PNE F/P+ .....	36
II.C	<i>Conclusion</i> .....	37
III	LE PDGFRA .....	38
III.A	<i>Généralités</i> .....	38
III.A.1	Anatomie du PDGFR $\alpha$ .....	38
III.A.2	Ligands du PDGFR $\alpha$ .....	40
III.A.3	Fonctions du PDGFR $\alpha$ .....	40
III.B	<i>Implication en pathologie des PDGFRs</i> .....	42
III.B.1	Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) .....	42
III.B.2	Polypes fibroïdes inflammatoires .....	44
III.B.3	Glioblastome .....	44
III.B.4	Autres pathologies liées à une activation de PDGFR $\alpha$ .....	44
III.C	<i>Mécanismes de transduction du signal du PDGFR<math>\alpha</math></i> .....	45
III.C.1	Protéines possédant un domaine SH2 ou PTB .....	45
III.C.2	Rôle du métabolisme oxydatif dans la signalisation PDGFR .....	46
III.C.2.a	Dérives réactifs de l'oxygène (ROS) : production et dégradation .....	47
III.C.2.b	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : une conséquence de la stimulation des PDGFRs .....	51
III.C.2.c	L'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> régule la fonction enzymatique de protéines cytoplasmiques .....	52
La peroxiredoxine-2 (PRX-2) .....	52	
Les phosphotyrosines phosphatases .....	54	
Schéma de production et d'action des ROS produits par stimulation de PDGFR $\alpha$ .....	57	
IV	RELATION PDGFRs, ROS ET HEMATOPOÏÈSE .....	59
IV.A	<i>PDGFRs et hématopoïèse</i> .....	59
IV.B	<i>ROS et hématopoïèse</i> .....	60
IV.B.1	ROS et CSH .....	60
IV.B.1.a	Influence des ROS dans l'engagement des CSH .....	60
IV.B.1.b	Niches hématopoïétiques et gradient de ROS .....	63
IV.B.2	Propriétés oncogènes des ROS dans les leucémies .....	63
IV.B.3	ROS et éosinophiles .....	64
	OBJECTIFS .....	66
	PRESENTATION DE L'ARTICLE .....	68
	DISCUSSION .....	72
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	82
	ANNEXE 1 : EXPRESSION DU PDGFR $\alpha$ SUR LES PNE ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES (TRAVAUX COMPLEMENTAIRES NON PUBLIEES) .....	83
	ANNEXE 2: ARTICLES COMPLÉMENTAIRES .....	98
	BIBLIOGRAPHIE .....	99

## RÉSUMÉ

AUTEUR : Jean Emmanuel Kahn

TITRE : Perturbations du métabolisme oxydatif induites par l'activation du PDGFR $\alpha$  : Mécanismes et conséquences dans la leucémie chronique à éosinophiles FIP1L1-PDGFR $\alpha$ .

DIRECTEUR DE THESE : Professeur Lionel Prin

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Lille, 28 Juin 2011

## RESUME

---

Le réarrangement FIP1L1-PDGFR $\alpha$  (F/P), identifié de manière récurrente dans les leucémies chroniques à éosinophiles, est à l'origine d'une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase de la chaîne  $\alpha$  du récepteur au PDGFR. Les mécanismes concourant à la prolifération éosinophile exclusive et au profil de cytotoxicité spécifique à cette leucémie sont encore mal élucidés. Ce récepteur PDGFR $\alpha$ , principalement exprimé dans les cellules mésenchymateuses, y exerce des effets prolifératifs et chimiotactiques, en partie induits par la production intracellulaire de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces constatations nous ont amené à étudier les perturbations du métabolisme oxydatif dans la leucémie F/P+, en utilisant une approche d'étude globale du protéome d'éosinophiles de sujets F/P+, comparé à des éosinophiles de sujets contrôles. Dans ce travail, nous avons démontré qu'il existe, dans les éosinophiles F/P+, une dérégulation de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation redox intracellulaire. De plus, les modifications d'expression de certaines d'entre elles (peroxiredoxine-2, src-homology-2 domain containing tyrosine phosphatase-1 ou SHP-1), non retrouvées dans les éosinophiles de patients ayant un syndrome hyperéosinophilique idiopathique, et identifiées dans une lignée cellulaire exprimant F/P, semblent spécifiquement induites par F/P. L'activation du PDGFR $\alpha$  dans les éosinophiles F/P+ est donc à l'origine d'un déséquilibre du métabolisme oxydatif dont les conséquences sur la différenciation vers le lignage éosinophile ou sur la cytotoxicité seront discutées.

## MOTS CLES

---

Eosinophiles, leucémie chronique à éosinophiles, FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , métabolisme oxydatif

## DISCIPLINE :

---

Immunologie

## ADRESSE DU LABORATOIRE

---

EA 2686, Institut d'Immunologie, 1 Place de Verdun, CHRU de Lille, 59045 LILLE Cedex

## ABSTRACT

The FIP1L1-PDGFR $\alpha$  (F/P) fusion gene, identified as a recurrent molecular finding in chronic eosinophilic leukemia, induces a constitutive activation of the kinase domain of PDGFR $\alpha$ . However, the molecular events contributing to the predominant eosinophil lineage expansion and to the singular cytotoxicity profile of eosinophils in this leukemia remain unclear. PDGFR $\alpha$ , mainly expressed in mesenchymal cells, possesses proliferative and chemotactic properties, which are, in part, mediated by the intracellular production of reactive oxygen species (ROS). These observations prompted us to investigate the disturbances of the redox signaling in the F/P-associated leukemia, using a comparative study of the proteome of F/P+-eosinophils and eosinophils of healthy controls. Here, we report, in F/P+-eosinophils, the abnormal expression of numerous proteins implicated in oxidative metabolism. Furthermore, changes in expression of particular proteins (peroxiredoxine-2 and src-homology-2 domain containing tyrosine phosphatase-1) appears specific to F/P-Eos compared to patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome, and could be demonstrated in F/P-expressing cell line EOL-1. Thus, the activation of PDGFR $\alpha$  in F/P+-eosinophils leads to a global disturbance of the redox signaling, whose consequences on the differentiation toward eosinophil lineage and cytotoxicity will be discussed.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### PUBLICATIONS

- Kahn JE, Dutoit-Lefèvre V, Duban-Deweer S, Chafey P, Pottiez G, Lefranc D, Fain O, Cordier JF, Hatron PY, Bletry O, Prin L. Comparative proteomic analysis of blood eosinophils reveals redox signaling modifications in patients with FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -associated chronic eosinophilic leukemia. *J Proteome Res.* 2011 Apr 1;10(4):1468-80.
- Arnaud L, Hervier B, Néel A, Hamidou MA, Kahn JE, Wechsler B, Pérez-Pastor G, Blomberg B, Fuzibet JG, Dubourguet F, Marinho A, Magnette C, Noel V, Pavic M, Casper J, Beucher AB, Costedoat-Chalumeau N, Aaron L, Salvatierra J, Graux C, Cacoub P, Delcey V, Dechant C, Bindi P, Herbaut C, Graziani G, Amoura Z, Haroche J. CNS involvement and treatment with interferon-alpha are independent prognostic factors in Erdheim-Chester disease: a multicenter survival analysis of 53 patients. *Blood.* 2011 Mar 10;117(10):2778-82
- JE Kahn, F Legrand, M Capron, L Prin. Hyperéosinophilies et syndromes hyperéosinophiliques. EMC (Elsevier Masson SAS), Hématologie, 13-009-A-10, 2011
- Arnaud L, Gorochov G, Charlotte F, Lvovschi V, Parizot C, Larsen M, Ghillani-Dalbin P, Hervier B, Kahn JE, Deback C, Musset L, Amoura Z, Haroche J. Systemic perturbation of cytokine and chemokine networks in Erdheim-Chester disease: a single-center series of 37 patients. *Blood.* 2011 Mar 10;117(10):2783-90.
- Puéchal X, de Bandt M, Berthelot JM, Breban M, Dubost JJ, Fain O, Kahn JE, Lequen L, Longy-Boursier M, Perdriger A, Schaeffer T, Toussirot E, Sibilia J; for the CRI. Tocilizumab in refractory adult Still's disease. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011 Jan;63(1):155-9.
- Terrier B, Bièche I, Maisonobe T, Laurendeau I, Rosenzweig M, Kahn JE, Diemert MC, Musset L, Vidaud M, Sène D, Costedoat-Chalumeau N, Le Thi-Huong D, Amoura Z, Klatzmann D, Cacoub P, Saadoun D. IL-25: a cytokine linking eosinophils and adaptive immunity in Churg-Strauss syndrome. *Blood.* 2010 Nov;116(22):4523-31.
- WW Busse, J Ring, J Huss-Marp, JE Kahn. A review of mepolizumab, an anti-interleukin-5 monoclonal antibody, treatment in hypereosinophilic syndromes and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Apr;125(4):803-13.
- Terrier B, Amoura Z, Ravaut P, Hachulla E, Jouenne R, Combe B, Bonnet C, Cacoub P, Cantagrel A, de Bandt M, Fain O, Fautrel B, Gaudin P, Godeau B, Harlé JR, Hot A, Kahn JE, Lambotte O, Larroche C, Léone J, Meyer O, Pallot-Prades B, Pertuiset E, Quartier P, Schaerverbeke T, Sibilia J, Somogyi A, Soubrier M, Vignon E, Bader-Meunier B, Mariette X, Gottenberg JE; Club Rhumatismes et Inflammation. Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum.* 2010 Aug;62(8):2458-66
- JE Kahn, C Grandpeix-Guyodo, I Marroun, E Catherinot, F Mellot, F Roufosse, O Blétry. Sustained response to mepolizumab in refractory churg-strauss syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Jan;125(1):267-70.

- JE Kahn, C Grandpeix-Guyodo, O Bletry. Syndromes hyperéosinophiliques : actualités physiopathologiques et Thérapeutiques. Rev Med Int. 2010 Apr; 31(4) : 268-276
- PU Ogbogu, BS Bochner, JH Butterfield, GJ Gleich, J Huss-Marp, JE Kahn, KM. Leiferman, TB. Nutman, F Pfab, J Ring, ME. Rothenberg, F Roufosse, MH Sajous, J Sheikh, D Simon, HU Simon, ML Stein, A Wardlaw, PF Weller, AD Klion. Hypereosinophilic syndromes: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy. J Allergy Clin Immunol. 2009 Dec;124(6):1319-25.
- JE Kahn, O Blétry, L Guillevin. Hypereosinophilic syndromes. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2008 Oct;22(5):863-82.
- ME Rothenberg, AD Klion, FE Roufosse, JE Kahn, PF. Weller, HU Simon, LB Schwartz, LJ Rosenwasser, J Ring, EF. Griffin, AE. Haig, PIH Frewer, JM. Parkin, and GJ Gleich, for the Mepolizumab HES Study Group. Treatment of Patients with the Hypereosinophilic Syndrome with Mepolizumab, N Eng J Med 2008 vol. 358 ; 12: 1215-28
- B Terrier, AM Piette, D Kerob, F Cordoliani, E Tancrède, L Hamidou, C Lebbé, O Bletry, JE Kahn. Superficial venous thrombophlebitis as the initial manifestation of hypereosinophilic syndrome: study of the first 3 cases. Arch Dermatol. 2006;142:1606-1610.

## **COMMUNICATIONS**

- JE Kahn. Les diagnostics à ne pas méconnaître devant une hyperéosinophilie. Séances éducationnelles. *Présentation orale. Congrès de la Société française d'Hématologie Paris 2011.*
- JE Kahn, F Legrand, L Fofana, A Reneville, C Preudhomme, L Prin. Fréquence des anomalies moléculaires dans une série de 544 patients présentant une hyperéosinophilie chronique nexpliquée. *Présentation Orale. Congrès de la Société National Française de Médecine Interne. Reims Juin 2010.*
- F Legrand, S Mastrilli, PY Hatron, S Dubucquoi, D Lefranc1, M Capron, L Prin, JE Kahn. Imatinib dans les syndromes hyperéosinophiliques associés ou non au réarrangement FIP1L1-PDGFRA. *Présentation Orale. Congrès de la Société National Française de Médecine Interne. Toulouse Décembre 2009.*
- JE Kahn, S Mastrili, A Reneville, S Dubucquoi, C Preudhomme, L Prin. Intérêt diagnostique de l'expression du gène WT1 dans les syndromes hyperéosinophiliques. *Présentation Orale. Congrès de la Société National Française de Médecine Interne. Ajaccio Juin 2009*
- F Ackermann, JE Kahn, C Grandpeix-Guyodo, I Marroun, AM Piette, O Blétry. Caractérisation moléculaire des syndromes hyperéosinophiliques dans une cohorte monocentrique de 49 patients. *Présentation Orale. Congrès de la Société National Française de Médecine Interne, Bordeaux Décembre 2008*
- JE Kahn, PY Hatron, F Roufosse, A Klion, O. Bletry, et le Mepolizumab HES Study Group. Epargne cortisonique induite par le mepolizumab dans les SHE FIP1L1-PDGFRA- corticodépendant. *Présentation Orale. Congrès de la Société National Française de Médecine Interne Versailles 2007.*



- Epargne cortisonique induite par le mepolizumab dans les SHE cortico-dépendants. JE Kahn, F Roufosse, HU. Simon, G Martinelli, A Klion, GJ Gleich, PY Hatron, O. Bletry, et le Mepolizumab HES Study Group – *Présentation orale. Congrès de la Société française d'Hématologie Paris 2006.*

### **COMMUNICATIONS AFFICHEES**

- F Ackermann, P Charles, C Grandpeix-Guyodo, I Marroun, AM Piette, O Bletry, JE Kahn. Hypereosinophilic syndromes : prognosis improvement in a new therapeutic area. 6th Biennial Symposium of the International Eosinophil Society. Bruges 2009

### **ENSEIGNEMENT**

- Enseignement au DESC d'Immuno-Allergologie (Pr Galanaud, Paris) : Hyperéosinophilie : Le point de Vue du biologiste. 2008, 2009, 2010, 2011.
- DIU Thérapeutiques innovantes (Pr L Guillevin, Paris) : Mepolizumab. 2009, 2011
- DIU Immuno Hématologie (Pr O Hermine et Pr M Lambert, Paris) : Eosinophiles : aspects fondamentaux et cliniques. 2009 et 2010

## LISTES DES ABREVIATIONS

15LOX-1 : 15 lipoxygénase-1	LMPP : lymphoid-primed multipotent progenitor
2D-DIGE : 2D-Differential In Gel Electrophoresis	LT : leucotriènes
AKT : protéin-kinase B	LT-CSH : CSH long-term
BFU : burst forming unit	MAPK : mitogen-activated protein kinases
BSA : bovine sérumalbumine	MBP : major basic protein
C/EBP: CCAAT/ enhancer-binding protein	MEP : megakaryocyte-erythrocyte progenitor
CFU : colony forming unit	MES : Matsumoto Eosinophilic Shinshu
CFU-E : CFU érythrocytaires	MPP : multipotent progenitor
CFU-Eo : CFU éosinophiles	NAC : N-acetyl-cystéine
CFU-GM : CFU granulocytes-monocytes	NOD : non-obèse diabetic
CMF : cytométrie en flux	PBS : phosphate buffer saline
CMP : common myeloid progenitor	PDGF : platelet derived growth factor
CSH : cellules souches hématopoïétiques	PDGFR : récepteur au PDGF
DPI : diphénylène iodonium	PI3-K : phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)
ECP : eosinophil cationic protein	PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
EDN : eosinophil derived neurotoxin	PKB : protéin-kinase B (AKT)
EGF : epidermal growth factor	PLC- $\gamma$ 1 : phospholipase C- $\gamma$ 1
EPO : eosinophil peroxydase	PRX-2 : peroxiredoxine 2
ERK : extracellular signal-regulated kinase	PTB : phosphotyrosine binding
F/P : FIP1L1/PDGFR	PTEN : Phosphatase with sequence homology to tensin
FGF : fibroblast growth factor	ROS : reactive oxygène species
FGFR : récepteur au FGF	RTK : récepteur tyrosine kinase
fMLP : formyl-méthionine-leucine-phénylalanine	RUNX1 : runt-related transcription factor 1 (AML1)
FoxO : Forkhead O	SCID : severe combined immunodeficiency
FT : facteur de transcription	SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1 (CXCL12)
GIST : tumeurs stromales gastro-intestinales	SH2 : src-homology region 2
GM-CSF :granulocyte macrophage-colony stimulating factor	SHE : syndrome hyperéosinophilique
GMP : granulocyte-monocyte progenitor	SHE-L : variant lymphoïde des SHE
H2DCF-DA : dichlorodihydrofluorescein-diacetate	SHE-M : variant myéloprolifératif des SHE
HE : hyperéosinophilie	SHP-1 : SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1
ICSBP : IFN Consensus Sequence Binding Protein (IRF-8)	Siglec : Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins
IDH : isocitrate deshydrogénase	SMP : syndrome myéloprolifératif
IFN : interféron	SOD : superoxide dismutase
IF : immunofluorescence	ST : CSH short term
IL- : Interleukine	STAT : signal transducer and activator of transcription
JM : juxta-membranaire	TARC : thymus activated and regulated chemokine
LAM : leucémies aiguës myéloblastiques	TGF : transforming growth factor
LCE : leucémie chronique à éosinophile	TK : tyrosine kinase
LFA-1 : leukocyte function adhesion antigen-1	TNF : tumor necrosis growth factor
LMC : leucémie myéloïde chronique	VEGF : vascular endothelial growth factor
LMP : common lymphoid progenitor	VLA-4 : Very late antigen

## LISTES DES FIGURES ET TABLES

Figure 1 : Fréquences des atteintes d'organes au diagnostic et au cours de l'évolution des SHE .....	2
Figure 2 : Evolution de la survie dans le SHE depuis 1975 .....	3
Figure 3 : Classification des SHE en 2010 .....	6
Figure 4 : Caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des précurseurs hématopoïétiques selon leur stade de différenciation .....	9
Figure 5 : Schéma général de l'hématopoïèse physiologique .....	10
Figure 6 : Principaux facteurs de transcription impliqués dans l'éosinophilopoïèse .....	12
Figure 7 : Schéma d'activation des PDGFRs .....	14
Figure 8 : Mécanismes de leucémogénèse et concepts de cellules souches leucémiques .....	21
Figure 9 : Anatomie des PDGFRs .....	28
Figure 10 : Interactions identifiées entre les différents dimères de PDGF et leurs récepteurs .....	29
Figure 11 : Schéma d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire .....	34
Figure 12 : Synthèse et catabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène .....	35
Figure 13 : Cycle enzymatique de réduction de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par la peroxiredoxine-2 .....	37
Figure 14 : Schéma d'activation des phosphotyrosines phosphatases de la famille SHP .....	38
Figure 15 : Mécanismes de production et de dégradation de l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> après stimulation d'un récepteur tyrosine kinase .....	40
Figure 16 : Influence des ROS sur les cellules souches hématopoïétiques .....	43
Figure 17 : Principes de l'analyse en 2D-DIGE .....	49
Table 1 : Atteintes viscérales au cours du SHE: données historiques .....	2
Table 2 : Critères diagnostiques du syndrome hyperéosinophilique .....	3
Table 3 : Cas rapportés de résistance à l'imatinib dans la LCE F/P+ .....	23
Table 4 : Principales propriétés des protéines cationiques de l'éosinophile .....	24
Table 5 : Liste exhaustive des anomalies géniques de PDGFRA identifiées en pathologie humaine .....	30

## INTRODUCTION

Le concept de leucémie chronique à éosinophiles (LCE), longtemps controversé, a été définitivement établi en 2003 suite à la mise en évidence d'une anomalie clonale récurrente dans les cellules hématopoïétiques : le gène de fusion *FIP1L1-PDGFR $\alpha$*  (F/P). Toutefois, les mécanismes à l'origine de la prolifération exclusive des éosinophiles (PNE), et des conséquences délétères spécifiques à cette leucémie sont encore mal identifiés. Dans cette optique, après un rappel bibliographique sur les nouveaux concepts de syndromes hyperéosinophiliques (SHE) et une actualisation de leur description clinique, nous aborderons plus particulièrement les propriétés physiopathologiques du récepteur tyrosine kinase (RTK) PDGFR $\alpha$ , ainsi que son implication dans la production endogène de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Cet intérêt se justifie en raison du rôle croissant attribué à ces médiateurs, connus surtout comme cytotoxiques, mais aussi impliqués dans l'homéostasie cellulaire et plus spécifiquement hématopoïétique. C'est dans cette perspective que s'inscrit le projet de mon travail de thèse. Par une approche d'analyse protéomique, nous avons apprécié les conséquences de l'activation constitutive de PDGFR $\alpha$  au cours de la LCE F/P+ sur le programme fonctionnel de l'éosinophile, et notamment sur son métabolisme oxydatif intracellulaire. Nous verrons que cette approche, dont nous discuterons la valeur mais aussi les limites, apporte des éléments instructifs indirects sur l'implication possible des ROS dans les mécanismes de prolifération et/ou de différenciation cellulaire.

## I Hyperéosinophilies et SHE

Découvert par Paul Ehrlich en 1879, le PNE est une cellule issue de la lignée myéloïde, caractérisée par l'affinité tinctoriale de ses granules cytoplasmiques pour les colorants acides comme l'éosine, donnant à la cellule un aspect rouge-orangé caractéristique. Les PNE sont classiquement à taux élevés dans le compartiment sanguin ( $> 0,5 \times 10^9/L$ ) au cours d'affections parasitaires ou allergiques. Plus rarement, une hyperéosinophilie (HE) sanguine peut être rencontrée dans un grand nombre de situations pathologiques: hémopathies myéloïdes et lymphoïdes, cancers solides, maladies inflammatoires et/ou auto-immunes (vascularites, pemphigoïde bulleuse, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), maladies spécifiques d'organes (pneumopathies chroniques ou aiguës à éosinophiles, gastro-entérites et œsophagites à éosinophiles). Ce large éventail de pathologies, parfois graves, associées à une HE justifie une démarche étiologique systématique d'investigations, reposant sur l'anamnèse, le contexte clinico-biologique et les caractéristiques de l'HE. Lorsque cette enquête demeure néanmoins infructueuse, l'hypothèse d'un syndrome hyperéosinophilique (SHE) doit être systématiquement évoquée, en raison de la sévérité potentielle de ses atteintes viscérales, en particulier cardiaques, liées à l'infiltration tissulaire par les PNE.

### I.A Caractérisation des SHE : bases phénotypiques

Jusqu'à ces dernières années, la description clinique des SHE reposait sur l'analyse de 3 cohortes de patients, publiées entre 1968 et 1989 [1-3], et sur un article de synthèse de P. Weller *et coll* [4]. Les caractéristiques communément admises étaient la nette prédominance masculine (4/1 à 9/1), la fréquence de l'atteinte cardiaque (50 à 60%) et le pronostic péjoratif de la maladie. Les autres atteintes viscérales habituellement rapportées (et détaillées Table 1), étaient digestives, pulmonaires, cutanées et neurologiques. Ces aspects ont été actualisés grâce aux données obtenues sur une large cohorte internationale, multicentrique, rétrospective de 188 patients, rapportée en 2009 [5].

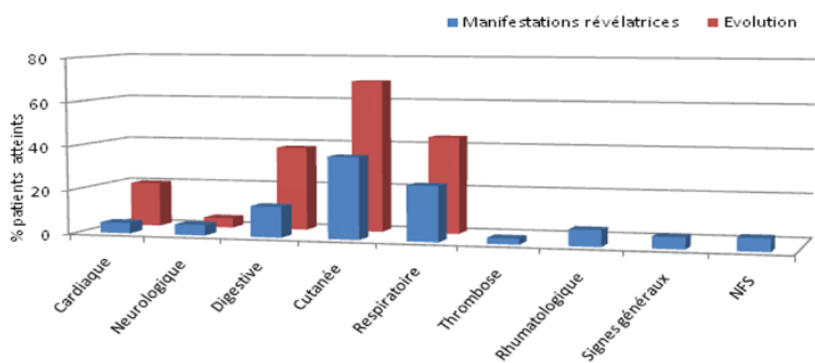
Le premier point important concerne le sex-ratio, réévalué dans cette série récente à 1/1. Les organes les plus fréquemment atteints sont la peau (69%), les poumons (44%) et le tube digestif (38%), alors que l'atteinte cardiaque ne concerne que 5% des patients au moment du diagnostic et 20% au cours de l'évolution de la maladie [5] (figure 1). De même, l'atteinte neurologique (centrale ou périphérique) apparaît moins fréquente (5%) que dans les séries historiques où elle concernait 35 à 73% des patients [4].

Quelles sont les raisons d'une telle « transformation » de la présentation clinique du SHE? Tout d'abord, la nette prédominance masculine initialement rapportée était probablement liée

**Table 1 : Atteintes viscérales au cours du SHE: données historiques**

ORGANE	ANOMALIES RETROUVEES
Système cardio-vasculaire (58%)	Myocardite Thrombus intra-cavitaire Fibrose endomyocardique
Peau (56%)	Urticaire, Angioedème Papules et nodules érythémato-prurigineux Purpura Ulcérations muqueuses
Système nerveux (54%)	Syndrome confusionnel, démence Neuropathies périphériques Accidents vasculaires
Poumons (49%)	Toux, asthme Infiltrats labiles Fibrose
Foie (30%) et rate	Hépatomégalie Cholangite Syndrome de Budd-Chiari Splénomégalie (43%)
Tube digestif (23%)	Œsophagite Gastro-entérite, colite, pancréatite Ascite

**Figure 1: Fréquence des atteintes d'organes au diagnostic et au cours de l'évolution des SHE**  
D'après Ogbogu PU, J Allergy Clin Immunol; 2009



à une sur-représentation des patients maintenant reconnus comme ayant une leucémie chronique à PNE associées à FIP1L1-PDGFRA (LCE F/P+). Ces derniers ont une fréquence accrue d'atteinte cardiaque spécifique [6], dont la gravité aboutissait à une prise en charge spécialisée et à une meilleure identification diagnostique. A *contrario*, les présentations dermatologiques ou digestives isolées, moins graves, étaient probablement sous-représentées car non identifiées comme SHE. Enfin, la moindre fréquence des atteintes sévères peut être expliquée par une prise en charge thérapeutique plus efficace, notamment grâce à l'imatinib dans les LCE F/P+, prévenant ainsi l'apparition de complications cardiaques.

Dans la publication initiale de Chusid en 1975, la survie moyenne était de 9 mois, avec une survie à 5 ans de 12% [7]. En 1990, une série française portant sur 40 patients faisait état d'une survie de 80 % à 5 ans et 42 % à 15 ans [3]. Dans cette dernière, le pronostic était principalement lié au développement d'une atteinte cardiaque (9 décès sur 11), mais aussi à l'apparition d'une leucémie aigüe (2/11). Ces données péjoratives ont été actualisées dans une série française monocentrique de 49 patients suivis depuis 2000 [8]: la survie était de 100% à 5 ans, de 87% à 10 ans et de 66% à 15 ans (figure 2). Cette amélioration significative de la survie s'explique à la fois par l'apparition des thérapeutiques ciblées (imatinib et mepolizumab), mais aussi par la moindre gravité de la maladie plus précocement diagnostiquée. En effet, dans cette cohorte, la prévalence de l'atteinte cardiaque est seulement de 12% contre plus de 50% dans les séries antérieures.

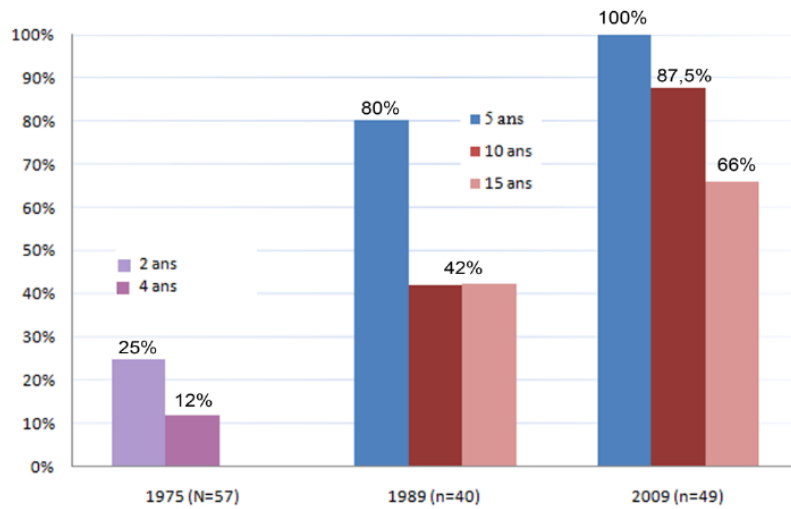
## **I.B Caractérisation des SHE : bases cellulaires et moléculaires**

Le terme de « syndrome hyperéosinophilique » a été introduit par Hardy et Anderson en 1968 [9], et des critères diagnostiques ont été ensuite établis par Chusid [7] en 1975 (tableau 2). Ces critères, à la lumière des nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires responsables d'HE (clones lymphocytaires sécrétant de l'interleukine (IL)-5, anomalies clonales de la lignée myéloïde), sont apparus insuffisants, notamment à cause d'un défaut de prise en compte de la grande hétérogénéité clinique et biologique des SHE.

### **I.B.1 SHE lymphoïdes**

Le variant « lymphoïde » du SHE (SHE-L) résulte d'une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire caractérisée par une sécrétion accrue de facteurs de croissance des éosinophiles (IL-5 principalement) par des lymphocytes de polarité Th2. Différentes études ont permis la mise en évidence, par cytométrie de flux, de phénotypes T « aberrants » [10, 11]. Il s'agit principalement de lymphocytes T CD3-CD4+ (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR non exprimés à la

**Figure 2: Evolution de la survie au cours du syndrome hyperéosinophilique**  
 D'après Chusid MJ, Médecine (Baltimore); 1975. Lefebvre C, Ann Med Interne (Paris); 1989. Ackermann F, 6<sup>th</sup> Symposium of International Eosinophil Society; 2009



**Tableau 2 : Critères diagnostiques du syndrome hyperéosinophilique**

Critères de Chusid	Critères 2010
PNE > 1.5x10 <sup>9</sup> /L	PNE > 1.5x10 <sup>9</sup> /L
Absence d'étiologie retrouvée	Absence d'étiologie retrouvée
Durée > 6 mois	Durée > 6 mois
Atteinte viscérale	OU atteinte viscérale



membrane mais présentes en intra-cytoplasmique), pouvant affecter jusqu'à 90% des lymphocytes circulants. D'autres phénotypes aberrants, associés eux aussi à une production élevée d'IL-5, ont été décrits: cellules T CD3+CD4-CD8-, ou CD4+CD7-. Ces lymphocytes expriment souvent des marqueurs de cellules T activées (HLA-DR+ et/ou CD25+) ou de cellules T mémoires (CD45RO+). L'origine des dérèglements affectant les lymphocytes T n'est pas connue. Des données récentes ont montré, dans des cellules CD3-CD4+, un défaut d'expression de CD3gamma associé à des modifications d'expression des facteurs de transcription de la famille NFAT [12], susceptibles d'expliquer le défaut d'expression membranaire du CD3.

Ces patients ont plus souvent une atteinte cutanée (dont l'angioœdème), et l'atteinte cardiaque est rare. L'élévation polyclonale des gammaglobulines, des IgE totales (dont la production est favorisée par l'IL-4) sont des marqueurs biologiques évocateurs de SHE-L, mais peu spécifiques. Le thymus activated and regulated chemokine (TARC/CCL17), ligand du récepteur CCR4 impliqué dans l'amplification de la réponse Th2, pourrait constituer un marqueur biologique de ces SHE lymphoïdes [13]. En dehors des complications liées aux propriétés cytotoxiques des PNE, le pronostic semble aussi lié au développement d'un authentique lymphome, rapporté chez plus de 10 patients [14]. Cet événement pourrait être favorisé par la survenue d'anomalies chromosomiques clonales (délétion en 6q, délétion en 10p) [15].

La fréquence des SHE-L est variable de 8 à 26% [11, 16, 17] selon les critères retenus (clonalité T, et/ou phénotype aberrant et/ou production excessive d'IL-5 dans des surnageants de culture de lymphocytes T), et la spécialité médicale concernée (possible surreprésentation des SHE-L dans des recrutements dermatologiques du fait de lymphomes T cutanés épidermotropes indolents et non diagnostiqués initialement [11]). La réponse aux corticoïdes est habituelle, avec un degré variable de corticodépendance

## ***I.B.2 SHE myéloprolifératifs et leucémies chroniques à éosinophiles***

### **I.B.2.a Syndromes myéloprolifératifs « classiques » et HE**

La présence d'une HE (avec ou sans retentissement viscéral) était, depuis de nombreuses années, connue dans un certain nombre de syndromes myéloprolifératifs (SMP) caractérisés sur la base d'anomalies génétiques. Ainsi, une HE peut être observée au cours de la leucémie myéloïde chronique (LMC) avec translocation 9-22 responsable d'un gène de fusion *BCR-ABL*, mais aussi dans d'autres SMP typiques souvent associés à la mutation V617F de *JAK2* (polyglobulie de Vaquez, thrombocytémie essentielle, myélofibrose idiopathique), ou dans le

syndrome myéloprolifératif 8p11 (stem cell leukemia-lymphoma), impliquant le récepteur de type 1 au facteur de croissance des fibroblastes (FGF). Enfin, une HE peut aussi se rencontrer au cours de la leucémie myélo-monocytaire chronique avec translocation 5-12, impliquant *PDGFRB*, codant pour la chaîne  $\beta$  du récepteur au PDGF [18], ou dans les mastocytoses systémiques avec mutation D816V de *KIT* [19].

On peut noter que toutes ces mutations ou translocations mettent en jeu des protéines à activité tyrosines kinases (TK), qu'elles soient des récepteurs membranaires (FGFR1, PDGFR $\beta$ , KIT) ou des protéines cytosoliques (ABL, JAK2). Toutefois, ces anomalies chromosomiques (décelables sur un caryotype conventionnel pour les translocations impliquant ABL, PDGFRB et FGFR1) n'étaient qu'exceptionnellement retrouvées dans les SHE.

#### I.B.2.b La LCE associée à FIP1L1-PDGFR $\alpha$ (LCE F/P+)

L'identification par Cools et coll. en 2003 du gène de fusion *FIP1L1-PDGFR $\alpha$* , non détectable sur un caryotype conventionnel car correspondant à une délétion interstitielle de 800kb sur le bras long du chromosome 4, a définitivement permis d'asseoir le concept de leucémie chronique à éosinophiles, jusque là débattu [20, 21]. En effet, les éosinophilies clonales, associées à F/P ou à d'autres anomalies génétiques, se caractérisent par la présence, dans le compartiment médullaire ou circulant, d'éosinophiles matures, de morphologie normale. On ne retrouve habituellement pas de cellules blastiques morphologiquement identifiables, qui permettent, dans d'autres situations, d'authentifier le caractère leucémique d'une hémopathie. Dans cette série princeps, ce gène de fusion F/P était retrouvé chez 7/14 patients SHE sans anomalie caryotypique, et chez deux patients avec anomalies caryotypiques multiples [20].

La prévalence de la LCE F/P+ reste mal connue. Des séries récentes l'évaluent entre 3% et 56% des HE inexplicées, dépendant principalement du type de recrutement et de l'exhaustivité de l'enquête étiologique préalable [20, 22, 23]. Dans 2 cohortes importantes et récentes de patients SHE, l'une française du Réseau Eosinophile (544 patients), l'autre internationale (188 patients), ce gène F/P est identifié respectivement chez 9% et 11% des patients ayant un SHE [5, 24]. A ce jour, moins de 10 cas féminins de LCE F/P+ ont été rapportés. Cette prédominance masculine, inexplicée, dépasse de loin celle de 1,3 à 1,8♂/1♀ rencontrée dans la LMC [25]. Outre le sex-ratio, plusieurs caractéristiques des LCE F/P+ méritent d'être individualisées: L'ensemble des organes habituellement atteints dans les SHE (peau, poumons, tube digestif) peuvent être touchés, mais l'atteinte cardiaque et les

ulcérations muqueuses semblent plus fréquentes dans ce sous groupe, et l'atteinte digestive serait en revanche plus rare [6, 17, 26]. L'élévation de la tryptase [6] et de la vitamine B12 sont quasi constantes. Les autres éléments évocateurs sont une myélofibrose, une myélémie, une thrombopénie modérée et un taux sérique d'IgE totales normal.

### I.B.2.c Les SHE myéloprolifératifs (SHE-M) inclassés

Enfin, il existe un sous-groupe de patients SHE dont les caractéristiques clinico-biologiques (hépato-splénomégalie, myélémie, cytopénie, élévation de la vitamine B12, fibrose réticulinique médullaire, résistance à la corticothérapie) évoque un SMP, mais chez lesquels l'enquête moléculaire exhaustive reste négative. L'efficacité de l'imatinib [27-30] ou d'autres inhibiteurs de tyrosines kinases [31] chez ces patients sans anomalie cytogénétique détectable suggère l'implication de tyrosines kinases par des mécanismes alternatifs : partenaires de fusions en 5' autre que *FIL1L1* comme *KIF5B* [32], *CDK5RAP2* [33], *ETV6*, *STRN* [34] ou *BCR* [35], nouvelles tyrosines kinases non encore identifiées, simple surexpression de PDGFR $\alpha$  [32, 36] ou enfin mutations ponctuelles activatrices de *PDGFRA* [37]. Cette dernière hypothèse vient d'être tout récemment étayée par la mise en évidence de 4 mutations ponctuelles, ne correspondant pas à des polymorphismes connus, et susceptibles d'induire une prolifération cellulaire *in vitro* [38]: H650Q et N659S, situées dans le 1<sup>er</sup> domaine kinase (exon 14), R748G, déjà identifiée dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) et située dans le domaine d'insertion entre les deux sites kinases (exon 16), et enfin Y849S, située dans la boucle d'activation de PDGFR $\alpha$  sur l'exon 18. D'autres mutations étaient identifiées dans ce travail, mais leur rôle pathogène paraissait incertain. Enfin, on signalera que ces mutations concernaient seulement 4,5% des 87 patients SHE F/P- explorés, et que toutes apparaissaient sensibles *in vitro* à l'imatinib [38].

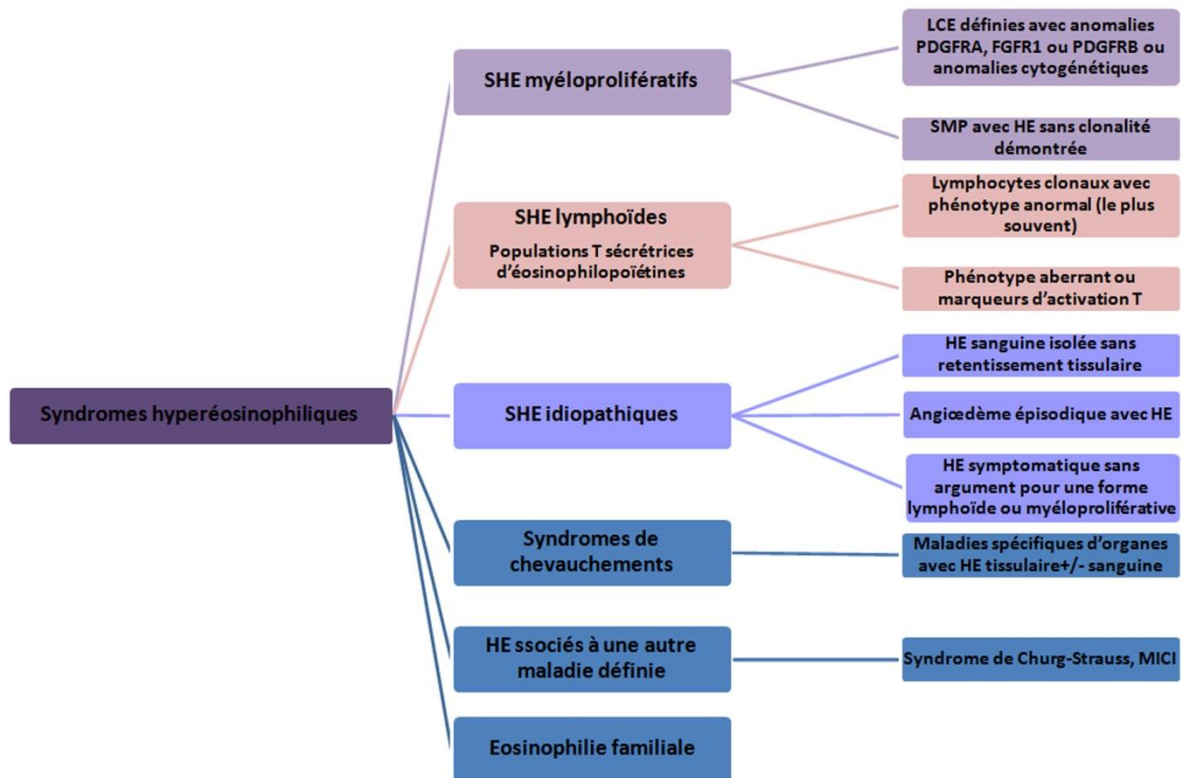
### I.B.3 Nouvelles classifications

De nouvelles classifications ont été récemment proposées, dont la plus pertinente semble celle adoptée par le Hypereosinophilic Syndromes Working Group en 2005 [39] et révisés en 2010 (figure 3) [40].

Elle inclue sous le terme de SHE l'ensemble des pathologies associées à une HE persistante, après exclusion des causes usuelles. Notion importante par rapport à la classification de Chusid, le critère d'atteinte viscérale est ici facultatif, soulignant la possibilité de diagnostics précoces, avant la survenue de complications viscérales irréversibles.

Les pathologies de mécanisme inconnu, associées à une HE sanguine et/ou tissulaire mais dont l'expression clinique était restreinte à l'atteinte d'un organe et qui pouvaient remplir les

Figure 3: Classification des SHE en 2010.  
 D'après Simon HU, J Allergy Clin Immunol; 2010



critères de Chusid (pneumopathie, gastroentérite, cystite à éosinophiles notamment), ont été incluses dans ce cadre des SHE sous le terme de « SHE de chevauchement ». De même, le syndrome de Churg-Strauss, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, fréquemment associées à une HE avec un retentissement viscéral directement lié au PNE, ont été regroupés sous l'étiquette « SHE associé à une cause définie ». Bien que ces dernières entités soient le plus souvent bien individualisées, leur regroupement sous le concept de "maladies à éosinophiles" ("eosinophilic disorders") souligne la possibilité de bases physiopathologiques communes, et surtout la possibilité de thérapeutiques ciblées communes. On citera notamment le rôle de l'IL-5 et de TARC dans les pneumopathies chroniques à éosinophiles [41] et le syndrome de Churg-Strauss [42], mais aussi, nous l'avons vu, dans les SHE lymphoïdes. Au plan thérapeutique, l'intérêt des thérapies ciblées anti-éosinophiles apparaît évident dans un nombre croissant de ces "maladies à éosinophiles". En cas de corticorésistance/dépendance, le mepolizumab et le reslizumab, anticorps monoclonaux anti-IL-5, ont montré leur intérêt potentiel dans les SHE F/P- [43], le syndrome de Churg-Strauss [44, 45], l'œsophagite à éosinophiles [46], la polypose naso-sinusienne [47].

Enfin, cette classification introduit les notions de SHE-L et de SHE-M, en identifiant les différents types de SHE-M. Parmi les SHE-M, on peut ainsi individualiser : (a) les LCE clairement définies par la mise en évidence d'une anomalie clonale ou par la présence de blastes; (b) les SMP avec HE, non classables en l'absence d'anomalie moléculaire ou cytogénétique détectables, mais définis par des « anciens » critères évocateurs de SMP : hépato-splénomégalie, élévation de la vitamine B12 sérique, de la tryptase sérique, présence d'une cytopénie, d'une myélofibrose et une corticorésistance.

Cette classification rejoint en partie celle proposée par l'OMS en 2008, qui incluait deux sous-groupes d'hémopathies myéloïdes avec HE : (a) l'une caractérisée par la présence d'anomalies de *PDGFRA*, *FGFR1* ou *PDGFRB* ; (b) l'autre dénommée « leucémie chronique à PNE non spécifiée par ailleurs » en présence d'autres anomalies cytogénétiques ou d'une blastose médullaire (>5%) ou circulante (>2%) [48, 49].

On soulignera finalement que près de 50% des SHE, regroupés sous le terme de SHE "non définis", ou idiopathiques, restent, à ce jour, sans explication physiopathologique.

L'identification de ces différents sous-groupes de SHE revêt une importance capitale à toutes les étapes de la prise en charge du patient : concernant le retentissement viscéral, la détection de complications cardiaques, symptomatiques ou non, dans les LCE F/P+ est primordiale et impose un suivi échocardiographique; la surveillance dans les SHE-L s'attachera à dépister la

survenue de lymphome, alors que l'acutisation en leucémie aigue reste la complication la plus redoutable des formes myéloprolifératives.

Enfin, concernant le traitement, la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des SHE a considérablement amélioré la prise en charge en permettant le développement de thérapies ciblées. Classiquement, la corticothérapie générale reste, à l'exclusion des formes myéloprolifératives, le traitement de première intention. L'hydroxyurée et l'interféron (seuls ou en association) peuvent être efficaces en cas d'échec des corticoïdes [50]. Dans les formes myéloprolifératives associées à des mutations/translocations impliquant *PDGFRA* ou *PDGFRB*, l'imatinib mesylate, premier inhibiteur de tyrosine kinase initialement développé dans la LMC, apparaît remarquablement efficace, permettant le plus souvent une rémission hématologique et moléculaire complète [20, 23, 51-53]. Dans les SHE idiopathiques ou lymphoïdes cortico-dépendants, les anticorps monoclonaux anti-IL-5 semblent prometteurs, permettant principalement une épargne cortisonique et une diminution de l'éosinophilie circulante, même si le bénéfice clinique n'a pu être démontrée dans ces premières études [43, 54, 55].

## **I.C Conclusion**

On voit donc l'extrême difficulté de classer certaines hyperéosinophilies chroniques. Une des avancées les plus prometteuses a été la découverte du gène de fusion *FIP1L1-PDGFR $\alpha$* , aboutissant à l'activation constitutive de l'activité kinase portée par PDGFR $\alpha$ . Cette LCE constitue la forme la plus homogène et la mieux caractérisée au plan moléculaire, et surtout celle dont le pronostic a été transformé par une thérapeutique ciblée, l'imatinib. Toutefois, l'identification de cette anomalie chromosomique ne permet pas d'établir un lien de cause à effet précis entre l'évènement moléculaire potentiellement oncogène et le retentissement sur la lignée éosinophile. Nous allons développer dans le chapitre suivant les acquis mais aussi les interrogations que posent cette anomalie moléculaire des PNE

## **II La LCE F/P+ : aspects physiopathologiques**

Le rôle oncogène de cette protéine de fusion F/P dans les LCE apparaît indiscutable et est étayé par de nombreux arguments : la réversibilité de la maladie avec un inhibiteur actif sur PDGFR $\alpha$ , l'imatinib [20] ; la réapparition de l'HE lors d'une mutation secondaire de *F/P* bloquant la fixation de l'imatinib [20] ; l'induction de la prolifération et de la différenciation en PNE de progéniteurs hématopoïétiques humains transfectés avec *F/P* en l'absence de facteur de croissance [56]. Toutefois, il existe un paradoxe majeur entre la constatation, en

pathologie humaine, d'une prolifération presque exclusive d'éosinophiles (à un moindre degré de mastocytes et de neutrophiles) et les nombreux travaux fondamentaux montrant la présence de *F/P* dans la plupart des cellules hématopoïétiques, où cette expression apparaît capable d'induire la prolifération *in vitro* et *in vivo* d'autres lignées hématopoïétiques.

Après un rappel sur l'hématopoïèse et l'éosinophilopoïèse nécessaire pour mieux appréhender les mécanismes de prolifération induite par les TK, nous aborderons dans ce chapitre les capacités de la protéine de fusion à induire, seule ou avec des cofacteurs, une prolifération myéloïde et une différenciation éosinophile. Nous nous interrogerons également sur l'identité de la cellule souche leucémique *F/P+*.

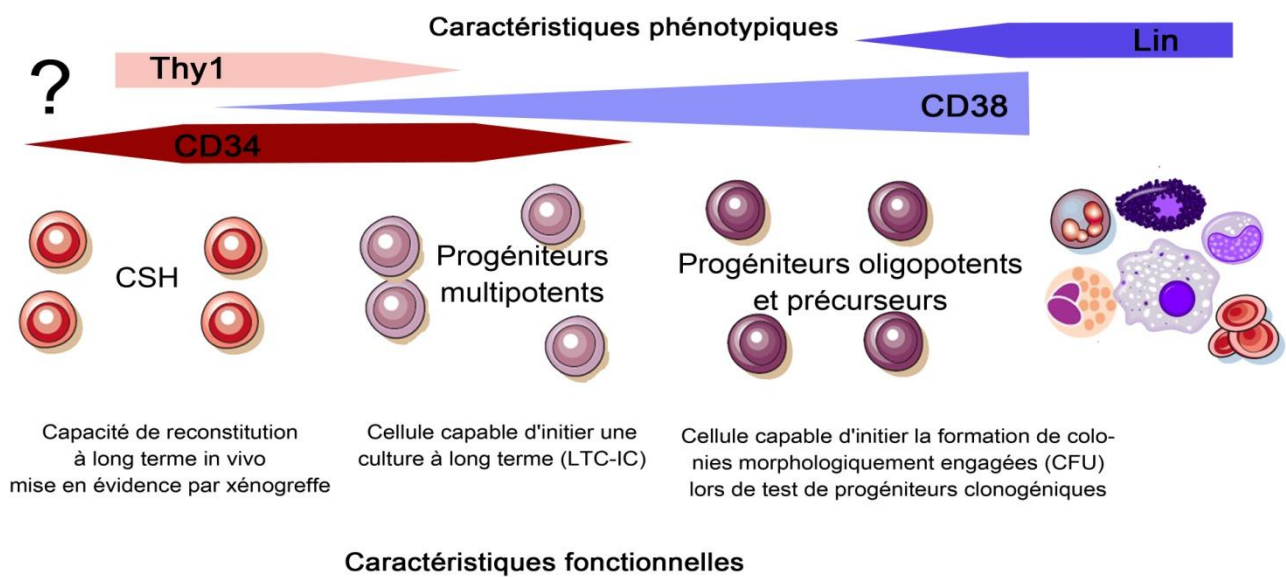
## II.A Hématopoïèse et éosinophilopoïèse

### II.A.1 Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs

L'hématopoïèse physiologique met initialement en jeu des cellules souches hématopoïétiques (CSH) totipotentes caractérisées par leur capacité de quiescence et d'auto-renouvellement. Cette propriété d'auto-renouvellement se traduit par la possibilité de repopulation hématopoïétique à la suite de xénogreffes successives chez des souris immunodéprimées préalablement irradiées de manière sub-léthale. Parmi les CSH, on distingue les « long-term »(LT)-CSH, capable de repopulation prolongée témoignant de capacités intactes d'auto-renouvellement, et les « short-term »(ST)-CSH ayant des capacités persistantes mais altérées d'auto-renouvellement. Plus précisément, chez la souris, les LT-CSH se définissent par le phénotype :  $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Sca1}^+ \text{KIT}^+ \text{FLT3}^- \text{Thy1}^{\text{low}} \text{CD34}^- \text{ou}^{\text{low}} \text{CD38}^-$ , tandis que les ST-CSH présentent le phénotype  $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Sca1}^+ \text{KIT}^+ \text{FLT3}^{\text{low}} \text{Thy1}^{\text{low}} \text{CD34}^+ \text{CD38}^-$  [57, 58]. Récemment, la présence du CD150 (SLAM) a été identifiée chez la souris comme un marqueur fiable des CSH présentant notamment des fortes capacités d'auto-renouvellement [59, 60]. Chez l'homme, en raison de la difficulté d'étude *in vivo*, les combinaisons de marqueurs actuellement utilisés pour définir une CSH sont  $\text{CD34}^+, \text{CD38}^-, \text{Thy1}^+, \text{CD33}^-, \text{CD133}^+, \text{HLA-DR}^-$ , et  $\text{Lin}^-$  (figure 4). La production et le maintien d'un pool de CSH, ainsi que la modulation de leur quiescence ou au contraire de leur engagement dans la différenciation sont régulés par de multiples facteurs, parmi lesquels on retiendra : runt-related transcription factor 1 (RUNX1 ou AML1), l'axe CXCL12-CXCR4, les cadhérines, l'angiopoïétine-1, la thrombopoïétine, l'ostéopontine [61, 62]. Enfin les différents composants de la surface endostéale (ostéoblastes, ostéoclastes, cellules stromales, cellules endothéliales, matrice extracellulaire) qui composent les « niches » de CSH, ainsi que le gradient d'oxygène et de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) jouent un rôle déterminant dans cette régulation



Figure 4: Caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des précurseurs hématopoïétiques selon leur stade de différenciation





(voir chapitre IV). C'est la modulation de ces différents facteurs qui permet la mobilisation des LT-CSH au sein des niches afin d'engager leur maturation en ST-CSH puis en progéniteurs multipotents (MPP). Sous l'influence de divers facteurs (environnement stromal, cytokines, facteurs de transcription) que nous détaillerons pour l'éosinophilopoïèse, les CSH peuvent s'engager dans une première étape irréversible de différenciation (« commitment ») en MPP, non distinguable cytologiquement, mais identifiable par des marqueurs de surface ( $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Sca1}^+ \text{KIT}^+ \text{FLT3}^{\text{low/high}} \text{Thy1}^- \text{CD34}^+$ )[57].

Le schéma général habituellement retenu de la différenciation hématopoïétique repose ensuite sur la séparation irréversible, à partir des MPP, des lignées lymphoïdes (initié par le progéniteur lymphoïde commun [CLP] [63]) et myéloïdes (initié par le progéniteur myéloïde commun [CMP] [64]) (figure 5). Le CMP donnerait respectivement naissance aux progéniteurs monocytes-granuleux (GMP), à l'origine des différents polynucléaires et de la lignée monocytes-macrophages) et aux progéniteurs mégacaryocytes-érythrocytes (MEP), à l'origine des lignées mégacaryocytaires et érythrocytaires [57, 65].

La caractéristique fonctionnelle de ces progéniteurs oligopotents CMP et CLP (perte de la capacité d'auto-renouvellement, mais possibilité d'un engagement multi-lignée) est mise en évidence par le test de Long Term culture-initiating cell (LTC-IC) sur tapis de cellules stromales en milieu liquide pendant 5 à 10 semaines, sans cytokines, complété par un test des progéniteurs clonogéniques. Ce test permet d'identifier les MPP, CMP, CLP, ainsi que les GMP et MEP [57](figure 4).

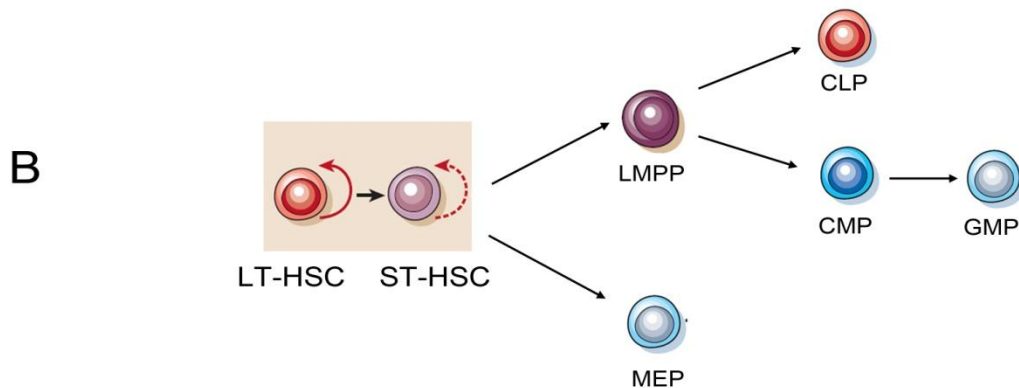
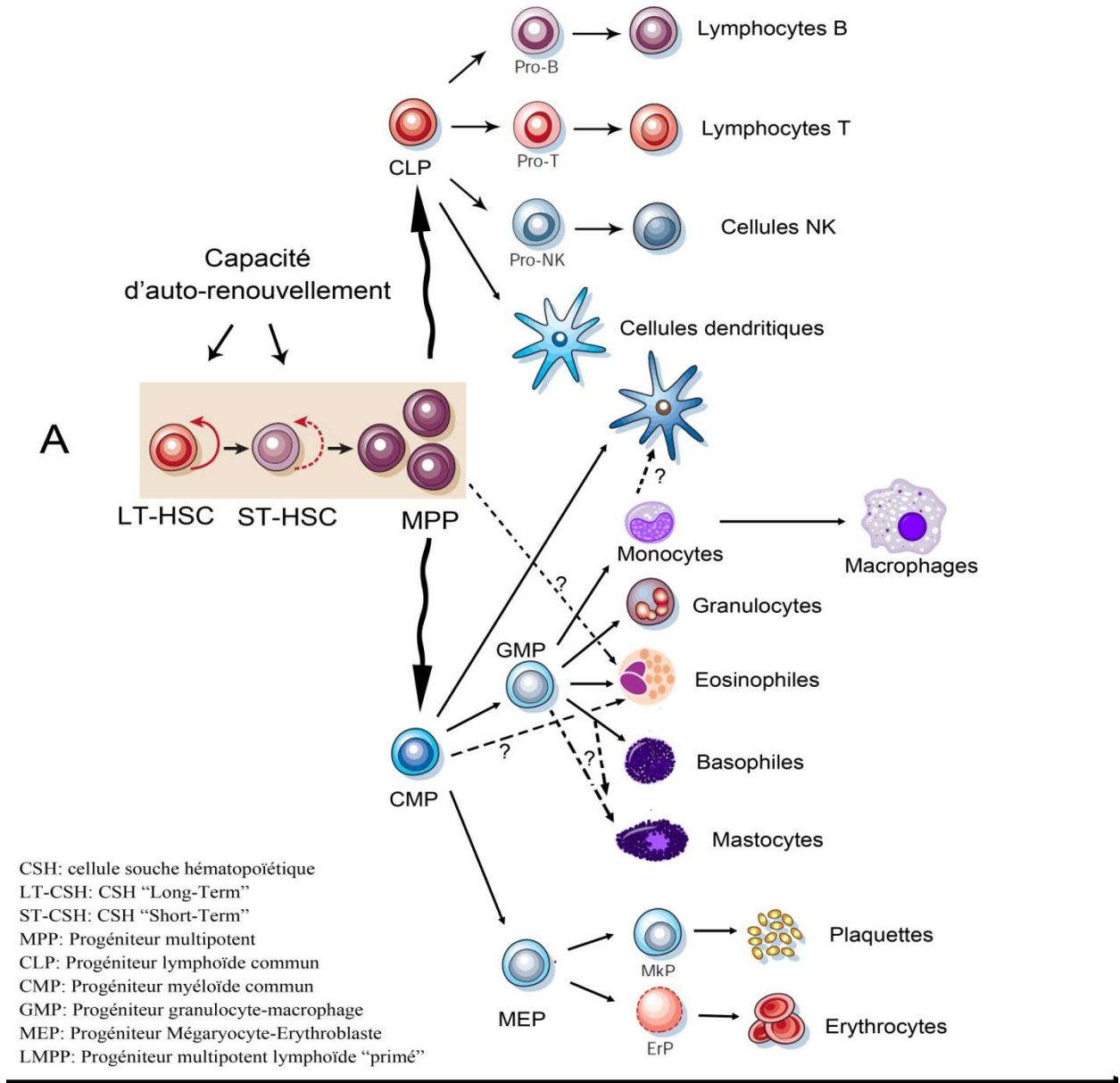
Les stades ultérieurs (Burst-Forming Unit [BFU] et Colony-Forming Unit [CFU]) correspondent aux précurseurs définitivement engagés, identifiable par des marqueurs de surfaces spécifiques ( $\text{Lin}^+$ ) et par un test des progéniteurs clonogéniques : 1 cellule (CFU), non identifiable cytologiquement, immobilisée en milieu semi-solide de methyl-cellulose avec un cocktail de cytokines donne lieu, en 7 à 14 jours, à une colonie morphologiquement identifiable mais n'ayant pas les caractéristiques définitives de la cellule mature.

La dernière étape de maturation est celle de la cellule différenciée, morphologiquement identifiable, et définit par différents marqueurs de surface Lin, (par exemple CD3 pour les lymphocytes T, CD14 pour les monocytes, CD56 pour la lignée NK...).

Cette hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques a été remise en cause en 2005 par l'identification chez la souris d'une population à potentialité myéloïde et lymphoïde, appelée « lymphoid-primed multipotent progenitor » (LMPP), mais ayant perdu la capacité à générer la lignée mégacaryocyte-érythrocytes, les MEP étant alors issue de ST-CSH [66] (figure 5). Cette ségrégation classique entre progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes vient d'être aussi

### Figure 5: Schéma général de l'hématopoïèse physiologique

A: Schéma général impliquant une séparation irréversible des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes communs. B: Hypothèse alternative supposant une séparation du lignage mégacaryocytes-érythroblastes à partir d'une CSH.



remise en question dans l'hématopoïèse humaine. A partir de sang de cordon ou de prélèvements médullaires, l'équipe de JE Dick a pu identifier une population de progéniteurs « multilymphoïdes » ( $CD34^+CD38^-Thy1^{neg/lo}CD45RA^+Flt3^+$ ) ayant, outre la capacité d'engendrer les lignées lymphoïdes T et B et les cellules NK, la possibilité de donner naissance à des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, classiquement issues des CMP [67]. D'autre part, la possibilité d'obtenir *in vitro* une différenciation terminale myéloïde (voir même éosinophile) à partir de progéniteurs préalablement engagés dans une différenciation lymphoïde souligne la complexité de ces étapes précoces de l'hématopoïèse et le fait que la(les) hypothèse(s) actuellement retenue(s) sont peut-être encore trop schématiques [68, 69] et tiennent encore insuffisamment compte des propriétés de l'environnement stromal.

### **II.A.2 Eosinophilopoïèse**

Les éosinophiles sont produits dans la moelle osseuse à partir de CSH en suivant la voie de différenciation myéloïde. Les premiers stades de différenciation vers le CMP (plutôt que vers le CLP) sont principalement dictés par l'expression du facteur de transcription (FT) PU.1 (membre de la famille ETS)[58]. Les souris déficientes en PU.1 sont incapables de produire des éosinophiles, des neutrophiles, des monocytes-macrophages, ainsi que des cellules dendritiques ou des lymphocytes B. A l'inverse, une surexpression de PU.1 augmente la différenciation myéloïde [70].

Chez la souris, le FT CCAAT/ enhancer-binding protein- $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) contrôle ensuite la différenciation en GMP puis en précurseur éosinophile (probablement commun avec le précurseur basophile), comme l'atteste à la fois l'existence d'une différenciation éosinophile accrue lors de l'expression « forcée » de C/EBP- $\alpha$  dans des progéniteurs multipotents [71] et l'absence d'éosinophiles chez les souris dont le gène codant pour C/EBP- $\alpha$  a été invalidé [72]. Si ce progéniteur éosinophile semble provenir de la différenciation d'un GMP chez la souris [73], il a été récemment suggéré que le progéniteur éosinophile humain serait directement issu d'un MPP ou d'un CMP [74].

GATA-1 (famille des facteurs à doigt de Zinc) est le 3<sup>ème</sup> FT critique de l'éosinophilopoïèse, et probablement le plus important. Situé sur le chromosome X, il tient son nom de sa capacité à lier des séquences promotrices composées des séquences GATA palindromiques. Ces sites de liaison de GATA-1 sont situés dans les régions régulatrices de nombreux gènes codant pour des protéines spécifiques des éosinophiles, dont la chaîne alpha du récepteur à l'IL-5, le CCR3 (récepteur de l'éotaxine), les protéines des granules, la galectine-10, C/EBP- $\epsilon$  ou le

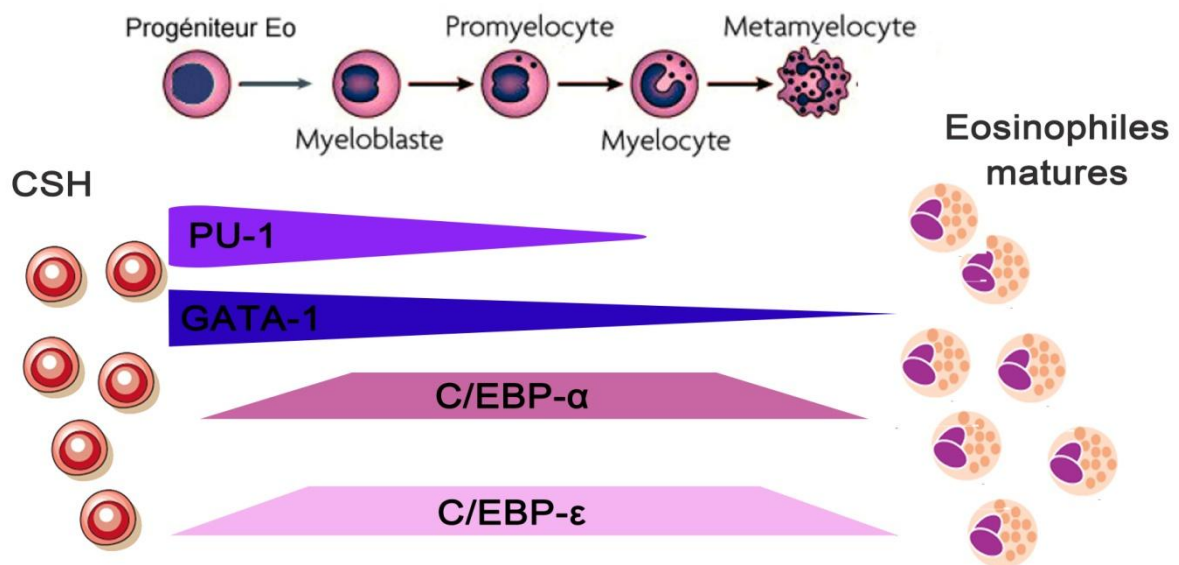
gène GATA-1 lui-même [70]. GATA-1 apparaît aussi comme un facteur de transcription de gp91<sup>phox</sup>, un composant essentiel de la NADPH oxydase phagocytaire et principale source de ROS des éosinophiles, dont nous verrons plus loin le rôle essentiel dans la production de ROS induite par les RTK [75]. L'importance de GATA-1 dans la différenciation éosinophile est illustrée par l'absence quasi complète d'éosinophiles chez les souris dont la séquence palindromique double GATA du gène GATA-1 a été modifiée [76, 77], même si des mécanismes de différenciation éosinophile alternatif ont été décrit *ex-vivo* [78]. *In vitro*, l'expression de GATA-1 dans des CSH humaines CD34+ induit une différenciation éosinophile [79].

Comme pour l'ensemble des lignées hématopoïétiques, c'est le mécanisme d'action combinatoire de ces différents FT qui confère une spécificité de lignage après un engagement singulier. Ceci se vérifie pour la lignée éosinophile [80]. Habituellement antagonistes dans la plupart des cellules hématopoïétiques, GATA-1 et PU.1 semblent avoir ici un rôle synergique dans la lignée éosinophile [81]. D'autres FT comme les isoformes activatrices p30kD et p32kD de C/EBP-ε [82], GATA-2 et plus récemment interféron-γ responsive transcription factor 8 (IRF8), aussi appelé IFN Consensus Sequence Binding Protein (ICSBP) [83] semblent jouer un rôle promoteur de l'éosinophilopoïèse. Ce rôle de l'INF-γ dans l'éosinophilopoïèse est étayé par l'absence complète de PNE (et de réponse éosinophile allergique) dans un modèle murin sur-exprimant l'INF-γ de manière T-dépendante [84]. Enfin, la cinétique d'expression des différents facteurs de transcription [85] ainsi que le niveau d'expression et de production de ces FT [58] sont des variables critiques dans la différenciation hématopoïétique et notamment éosinophile (figure 6).

Outre la différenciation éosinophile, la combinaison d'action des facteurs de transcription joue un rôle déterminant dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines des granules [81, 86]. De manière inattendue, l'une de ces protéines, la peroxydase de l'éosinophile (EPO), semble être un acteur indispensable de la différenciation éosinophile, alors que sa fonction était jusqu'alors limitée à ses propriétés effectrices toxiques. Cette potentialité est illustrée par un modèle expérimental : la souris (PHIL), obtenue en réprimant l'expression de l'EPO, est totalement déficiente en éosinophiles [87]. Cette observation souligne l'importance de la genèse des protéines cationiques dans le contrôle de l'engagement vers la lignée éosinophile par des voies encore inexplorées.

Associés ou consécutifs à l'action des FT, certains facteurs de croissance jouent un rôle primordial dans la production médullaire des PNE : l'IL-3, le granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) et l'IL-5. Ces cytokines sont codées par des gènes proches situés

Figure 6: Principaux facteurs de transcription impliqués dans l'éosinophilopoïèse



en 5q31. Leurs récepteurs hétérodimériques sont composés d'une chaîne alpha spécifique et d'une chaîne bêta commune aux trois facteurs. L'IL-3 et le GM-CSF induisent la différenciation d'autres cellules myéloïdes comme les mastocytes, mais leur synergie avec l'IL-5 promeut spécifiquement la différenciation en PNE. L'IL-5 est la plus spécifique d'entre elles, notamment en raison de l'expression presque exclusive (avec les basophiles) de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à la surface des PNE. L'expression de l'IL-5R $\alpha$  sur les progéniteurs éosinophiles apparaît la conséquence (et non pas la cause) de l'engagement des GMP dans la lignée éosinophile, suggérant que l'IL-5 supporte le développement des PNE à partir d'un précurseur éosinophile plutôt que d'induire le GMP vers la différenciation éosinophile [73]. Des souris invalidées pour le gène codant pour l'IL-5 ont un taux basal normal en éosinophiles mais sont incapables de générer des PNE lors d'infections par des helminthes ou après une stimulation allergénique [88]. De même, des traitements anticorps monoclonaux anti-IL-5 sont capables d'induire une franche diminution des éosinophiles sanguins, tissulaires ou médullaires chez l'homme [46, 89-91]. À l'inverse, une hyperéosinophilie massive est observée chez les souris sur-exprimant l'IL-5 [92, 93], chez les patients ayant un SHE lymphoïde caractérisé par une production accrue d'IL-5 par des lymphocytes T anormaux [11]. Les voies de transduction du signal mises en jeu par l'activation du récepteur à l'IL-5 sont multiples : voies janus kinases (JAK)/signal transducer and activator of transcription (STAT), voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK), et voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/protein-kinase B (PKB ou AKT). [94]. On soulignera parmi elles l'importance à la fois de la syntenin, molécule adaptatrice de l'IL-5R $\alpha$ , susceptible de le maintenir en conformation active et d'induire la différenciation éosinophile des CSH [95], et de STAT-5 [96].

Un peu plus de 72 heures sont nécessaires à la production médullaire des éosinophiles et à leur passage dans la circulation sanguine, dépendant de l'IL-5, de l'éotaxine, mais aussi de molécules d'adhésion comme le leukocyte function adhesion antigen-1 (LFA-1). À la sortie de la moelle osseuse, l'éosinophile est au stade terminal de maturation.

Si le schéma classique de l'éosinophilopoïèse a toujours envisagé la maturation intramédullaire des PNE, il a été récemment rapporté l'existence de progéniteurs éosinophiles CD34<sup>+</sup>Sca<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CCR3<sup>+</sup>IL-5R $\alpha$ <sup>+</sup> dans le tissu pulmonaire de souris après stimulation allergique, suggérant la possibilité, au moins théorique, d'une maturation finale extramédullaire [97].

## II.B Tyrosines kinases et évènements oncogènes hématopoïétiques

### II.B.1 Tyrosines kinases et transformation cellulaire : généralités

En condition physiologique, les RTK de classe III auxquels appartiennent les PDGFRs (comme FLT3, c-FMS et KIT, respectivement récepteurs de FLT3-ligand, CFS-1, SCF) voient leur activité tyrosine kinase mise en jeu après la stabilisation d'une structure dimérique provoquée par le ligand naturel (lié par les régions extracellulaires du récepteur). La dimérisation du récepteur est une étape essentielle du processus d'activation. Elle permet, dans un premier temps, le rapprochement des 2 régions juxta-membranaires (JM). La modification structurale permet alors la libération des domaines kinases, jusque là maintenu en conformation inactive par la région JM et la boucle d'activation du domaine catalytique (domaine kinase II, dans la région C-terminale) [98] (figure 7). Cette étape est suivie de la trans-phosphorylation de multiples résidus tyrosines du récepteur (plus rarement à une cys-phosphorylation)[99], aboutissant à la création de sites de recrutement pour des protéines de signalisation d'aval, essentielles à la transduction du signal, et possédant un domaine de reconnaissance des résidus phosphotyrosines (par exemple les "src- homology2 [SH2] domain" ou les "phosphotyrosine binding [PTB] domain").

De nombreuses altérations moléculaires (>100) affectant ces récepteurs ont été décrites au cours d'hémopathies malignes (leucémies aiguës, syndrome myéloprolifératifs ou myélodysplasiques, lymphome) impliquant PDGFR $\beta$ , KIT, c-FMS, le FGFR et FLT3. Dans ces hémopathies, les altérations géniques se concentrent sur 2 « hot spots »: le domaine kinase II et sa boucle d'activation, dans la région C-terminale du RTK, et la région JM [98].

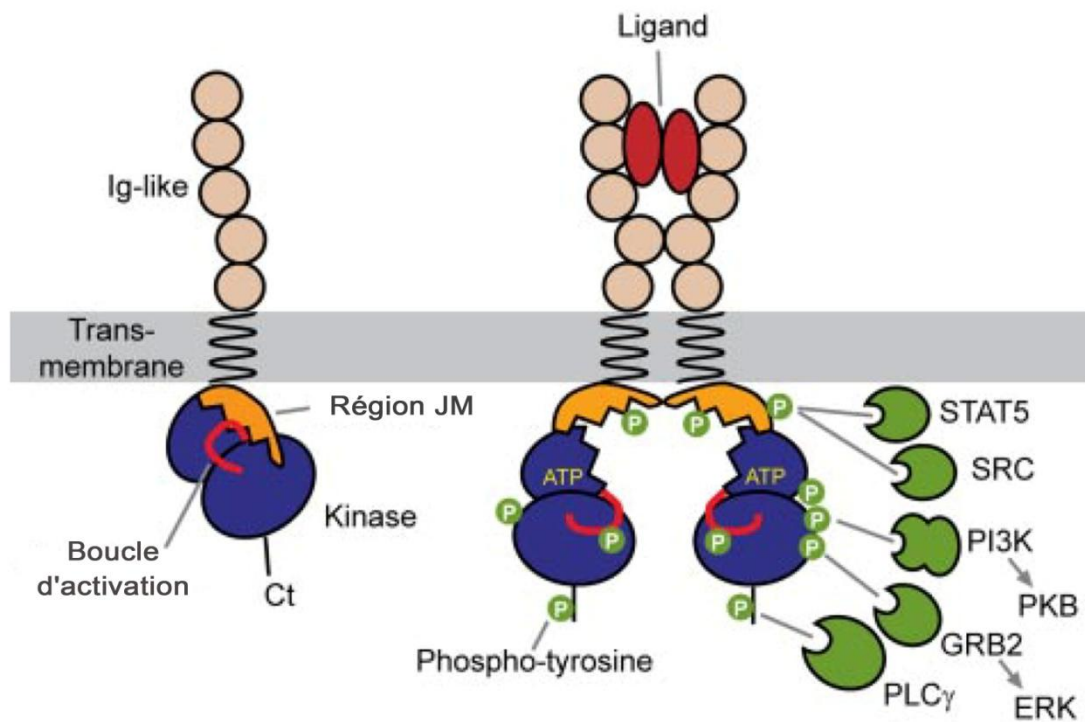
La boucle d'activation, en conformation inactive, bloque l'accès de l'ATP au domaine kinase I. La phosphorylation de résidus tyrosines de cette boucle, après activation, libère cet accès et permet la fixation du substrat (ATP) sur le domaine kinase. Cette région est principalement le site de mutations ponctuelles activatrices dont la première identifiée fut la mutation D816V de *KIT*, responsable de la mastocytose systémique [100]. Les mutations de cette région dans *KIT* [19] ou *PDGFRA* [101], peuvent induire une activité TK constitutionnelle à l'origine de GIST, ou des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) si elles concernent FLT3 [98].

La région JM est un élément régulateur essentiel de l'activation du récepteur FLT3 [102] et de c-KIT [103], ainsi que des autres RTK de classe III. Elle possède un rôle auto-inhibiteur en repliant la boucle C-terminale sur le domaine kinase, maintenant ainsi le récepteur en conformation inactive. Une altération de cette fonction inhibitrice par mutations ou délétions de *FLT3* a surtout été identifiée dans les LAM [104, 105], plus rarement par mutation de *KIT*

### Figure 7: Schéma d'activation des PDGFRs

La dimérisation du récepteur libère le domaine catalytique, jusque là maintenu en conformation inactive par la région juxta-membranaire (JM) et la boucle d'activation. Ainsi activé, le domaine kinase transphosphoryle différents résidus tyrosines du récepteur, créant ainsi des sites de liaison pour des molécules de signalisation.

Adapté de Toffalini F, Blood; 2010





(GIST, mastocytose) ou de *PDGFRA* (GIST) [98]. Plus souvent, il s'agit souvent de translocations à l'origine de protéines chimériques, principalement identifiées dans des hémopathies malignes [98]. Toutefois, à l'exclusion de rares situations [106, 107], la fonction inhibitrice de la région JM est conservée, et l'activation enzymatique TK est consécutive aux propriétés d'oligomérisation liées à la protéine partenaire du RTK. En effet, les partenaires de fusion en N-terminal des protéines porteuses de l'activité TK jouent un rôle essentiel dans l'activation des voies de prolifération. Ils contiennent habituellement des zones permettant l'oligomérisation du récepteur de manière indépendante du ligand, dont nous avons précédemment vu le rôle essentiel dans l'autophosphorylation des résidus tyrosines et l'activation de la TK [108]. Ce mécanisme d'activation, indépendant du ligand, est parfaitement établi pour les oncoprotéines chimériques BCR-ABL [109, 110], TEL-PDGFRB [111], ZNF198-FGFR1 [112]. En effet, la délétion de tout ou partie du partenaire de fusion (BCR, TEL, ZNF198) empêche l'oligomérisation de la protéine, bloquant la cascade de phosphorylation d'aval spontanément induite par la protéine chimérique sauvage et nécessaire à l'induction de la prolifération et de la survie cellulaire.

Ces récepteurs mutés, une fois traduits, peuvent activer les voies de signalisation d'aval dès leur synthèse dans le réticulum endoplasmique, au contraire des formes natives qui doivent gagner la membrane cytoplasmique pour permettre la liaison au ligand. De plus, l'adressage membranaire des protéines chimériques est le plus souvent rendu impossible par la perte de leurs régions extracellulaires et surtout transmembranaire, entraînant leur exclusion rapide du réticulum endoplasmique et du Golgi [98]. Cette localisation pourrait en partie être dictée par la protéine partenaire de fusion, capable d'influencer de manière majeure les propriétés oncogéniques de la TK. Par exemple, la TK ABL fusionnée à NUP214 est capable d'induire une transformation en leucémie aigue lymphoblastique du fait de l'adressage nucléaire dictée par NUP214, alors que la localisation cytoplasmique de BCR-ABL met en jeu d'autres voies de signalisation aboutissant à une LMC [113].

Nous ne développerons pas ici les différentes molécules de transduction du signal mises en jeu par ces RTK en raison de spécificités propres à chaque situation. On rappellera cependant que les protéines responsables des mécanismes de prolifération, d'inhibition d'apoptose des cellules hématopoïétiques dans ces hémopathies liées à des réarrangements géniques de RTK sont invariablement les protéines STAT, la PI3-K, la phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1), et la voie des MAPK [98].

## II.B.2 *FIP1L1-PDGFR $\alpha$ et transformation cellulaire*

### II.B.2.a Induction de l'activité tyrosine kinase de F/P+

La protéine chimérique FIP1L1-PDGFR $\alpha$  se distingue des autres TK chimériques impliquées dans les leucémies chroniques (ABL, PDGFR $\beta$ ) par le fait que l'activation de la TK semble être liée principalement à la perte de cette région JM auto-inhibitrice située dans l'exon 12 de *PDGFRA*. C'est justement dans cet exon 12 que sont situés invariablement les points de cassure sur le gène *PDGFRA* dans les LCE F/P+ [17, 114, 115], emportant alors tout ou partie de la région JM et déclenchant ainsi l'activation enzymatique TK, alors que les points de cassure sur FIP1L1 sont variablement situés sur différents introns ou exons de la région C-terminale [115].

Cette hypothèse a été confortée en induisant l'expression, dans des lignées cellulaires, de différentes constructions de la protéine chimérique FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , comportant ou non une délétion de la région JM. Il a pu ainsi être montré que la seule délétion de la région JM était suffisante à induire l'activité kinase de PDGFR $\alpha$  et la prolifération cellulaire [116].

Au contraire des modèles des protéines de fusion BCR-ABL ou TEL-PDGFR $\beta$ , le rôle de FIP1L1 dans la dimérisation et l'activation de la TK semble donc être négligeable. En effet, la transfection d'un gène *PDGFRA* simplement amputé de la région JM et ne comportant pas *FIP1L1* est suffisante pour induire phosphorylation, prolifération et apparition d'un SMP chez la souris, ce que n'est pas capable de produire un gène *FIP1L1-PDGFR $\alpha$*  dont on aurait conservé intacte la région JM [116].

Il n'est toutefois pas impossible d'imaginer un rôle *in vivo* à FIP1L1. Il semble tout d'abord s'agir du partenaire de fusion presque exclusif de *PDGFRA*, suggérant un avantage à cette fusion. De plus, la transcription du gène de fusion reste probablement sous le contrôle du promoteur de *FIP1L1*, permettant ainsi l'expression de la protéine PDGFR $\alpha$ , normalement peu ou pas exprimée dans les cellules hématopoïétiques [117]. Surtout, *in vitro*, l'expression de différentes constructions de PDGFR $\alpha$  spontanément activées (amputées de la région JM) dans des CSH murines est incapable d'induire la différenciation éosinophile, à la différence de *FIP1L1-PDGFR $\alpha$*  ou de *TEL-PDGFR $\alpha$*  [118], suggérant que le partenaire de fusion, s'il n'influence pas les capacités de prolifération, peut moduler la différenciation. Enfin, il a été récemment décrit une leucémie myélo-monocytaire juvénile impliquant un gène de fusion *FIP1L1-RARA*, situation pathologique où les capacités de dimérisation des autres partenaires de fusion habituellement associés à *RARA* semblent essentielles. On soulignera enfin qu'aucune fonction n'est pour l'instant attribuée à cette protéine chez l'homme, dénommée

FIP1-like 1 par analogie avec le gène FIP1 de *Saccharomyces cerevisiae*, dont la protéine est, chez la levure, impliquée dans les mécanismes de polyadénylation.

Après activation par son ligand, le PDGFR $\alpha$  est physiologiquement internalisé et rapidement dégradé (30mn) grâce à une multi-mono-ubiquitination des résidus lysines du récepteur. Cette étape, modulée par Cbl (principale ubiquitine ligase E3 des RTK), permet l'adressage et la dégradation lysosomale de PDGFR $\alpha$  (l'adressage vers le protéasome étant induite par des poly-ubiquitinations) [119, 120]. En revanche, dans des lignées transfectées, la dégradation de F/P et de TEL/PDGFR $\beta$  apparaissent altérée (F/P encore détecté au bout de 12H), en rapport avec un défaut d'ubiquitination, alors même que Cbl apparaît normalement phosphorylée [121].

#### II.B.2.b FIP1L1-PDGFR $\alpha$ et signaux de transduction

Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération/différenciation cellulaires induite par F/P sont encore mal élucidées. Par analogie avec les données physiopathologiques établies dans la LMC [122], la plupart des travaux publiés à ce jour ont systématiquement étudié les voies PI3K/Akt, MAPK, et la voie JAK/STAT. Toutefois, ces molécules de signalisation semblent communes à un grand nombre de tyrosines kinases leucémogènes, mais les modalités par lesquelles ces TK activées sont capables d'induire différents phénotypes pathologiques restent mystérieuses.

Dans des CSH humaines, la transfection de F/P est capable d'induire une phosphorylation de STAT-5 [56], facteur de transcription important dans la différenciation éosinophile induite par l'IL-5 [96]. De même, dans la lignée cellulaire hématopoïétique murine Ba/F3 F/P+ ainsi que dans la lignée EOL-1, l'imatinib est capable d'induire une déphosphorylation de STAT-5 et de la protéine de fusion F/P [20, 123]. Enfin, la transduction rétrovirale d'un dominant-négatif de STAT-5a dans des CSH CD34+-F/P+ humaines est capable d'inhiber de 60% (mais pas de bloquer) la formation de CFU, soulignant là encore le rôle important de STAT-5 dans la prolifération/différenciation induite par F/P [56].

En revanche, les données sont variables concernant la voie MAPK [124]: Dans la publication princeps, l'imatinib ne semblait pas modifier la phosphorylation de ERK1 ou ERK2 dans la lignée Ba/F3 transfectée [20]. La même équipe a rapporté des résultats contradictoires, où le sorafenib, inhibiteur de TK actif sur PDGFR, était capable, aussi bien dans la lignée EOL-1 que Ba/F3 exprimant F/P, d'induire la déphosphorylation simultanée de F/P et de ERK1/2, suggérant qu'ERK1/2 pourrait constituer une cible d'aval de la protéine de fusion. Enfin, dans des progéniteurs humains CD34<sup>+</sup>, l'expression de F/P induit la phosphorylation de ERK1/2,

p38MAPK et c-AKT (PKB), alors que seul des inhibiteurs de PI3K (LY294002) et de ERK1/2 (U0126) permettent d'inhiber la formation de colonies, au contraire d'un inhibiteur de p38MAPK [56].

Les travaux les plus aboutis concernant les voies de signalisation mises en jeu par F/P et susceptibles d'influer sur la différenciation éosinophile proviennent des expériences de Fukushima *et coll.* sur les CSH murines. L'expression de F/P semble induire une phosphorylation significativement plus importante de p38MAPK et d'ERK1/2 comparativement au vecteur contrôle, alors que la phosphorylation de STAT-5 n'apparaît pas modifiée. Surtout, seuls les inhibiteurs de MEK et de p38MAPK sont capables de réduire fortement la production de précurseurs éosinophiles comparativement au contrôle (<5% des cellules transfectées *versus* 23%), aux inhibiteurs de JAK2/STAT (20%), de PI3-K (19%), de SRC (20,4%) ou de c-Jun-N-terminal kinase (JNK) (21,6%). Surtout, F/P induit rapidement (48H), avant même l'expression de l'IL-5RA en surface, une augmentation d'expression de l'ARNm de GATA-1 (45% de plus que le vecteur contrôle), GATA-2 et C/EBP $\alpha$ . Le rôle de GATA-1 dans la différenciation éosinophile induite par F/P est corroboré par l'inhibition de la formation de précurseurs éosinophiles grâce à des short-hairpin ARN (shARN) anti GATA-1. En revanche, il n'est pas observé de modification d'expression de PU-1, autre facteur de transcription clé de l'éosinophilopoïèse. On notera par ailleurs qu'une induction d'expression de GATA-1 est aussi obtenue dans des lignées mégacaryocytaires stimulée par PDGF, soulignant le lien potentiel entre les PDGFRs et GATA-1 [125].

### II.B.2.c FIP1L1-PDGFR $\alpha$ et ontogénèse éosinophile

Les modèles de souris irradiées puis greffées avec des CSH exprimant F/P et issues d'animaux syngéniques, aboutissent, avec une pénétrance de 100%, à un phénotype proche de la LMC : hyperleucocytose majeure, splénomégalie, hématopoïèse extra-médullaire hépatique, pulmonaire, rénale. L'histologie médullaire et splénique retrouve une prolifération de l'ensemble des lignées myéloïdes, avec une expansion préférentielle des neutrophiles [126]. Surtout, l'hyperéosinophilie circulante est modeste (5 à 20%), et il n'existe pas d'infiltrat éosinophile tissulaire extra-hématopoïétique qui caractérise les LCE, suggérant alors l'hypothèse d'un facteur additionnel au gène F/P nécessaire pour promouvoir l'expansion éosinophile. L'implication de lymphocytes T hyper-producteurs d'IL-5 dans les SHE-L et le rôle majeur de cette cytokine dans la différenciation éosinophile ont conduit Yamada *et coll* à induire une myéloprolifération dépendante de F/P chez des souris transgéniques sur-exprimant l'IL-5 (IL-5Tg) de manière T-dépendante [92]. Le phénotype

obtenu apparaît alors semblable à celui de la LCE humaine, avec une éosinophilie circulante de phénotype activé (exprimant l' $\alpha$ 4-intégrine CD49d et Siglec-F, analogue du Siglec 8 humain), médullaire, splénique, mais aussi des organes non hématopoïétiques classiquement touchés dans les LCE (cœur, poumons, intestin grêle) [127]. Surtout, ce tableau apparaît spécifique à *F/P* car non reproduit par la greffe de CSH transfectées avec *gp210-BCR/ABL* chez ces mêmes souris IL-5Tg. La surexpression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-5 (IL-5-R $\alpha$ ) dans les splénocytes IL-5Tg-*F/P*+ (comparativement aux splénocytes IL-5Tg ou IL-5Tg-*gp210-BCR/ABL*+) pourrait être un des mécanismes expliquant, dans ce modèle animal, la synergie entre *F/P* et l'IL-5 à promouvoir un phénotype de LCE. Cette même induction d'expression d'IL5-R $\alpha$  (58% des cellules transfectées) est constatée lorsque *F/P* est exprimé dans des CSH murines, comparativement à un vecteur contrôle (6%) et à ETV6-PDGFRB (14%) [118]. Ces cellules sont alors capable, *in vitro*, sous l'influence de l'IL-5, de générer d'authentiques PNE.

Afin d'explorer cette hypothèse d'une synergie avec l'IL-5 chez l'homme, un groupe de l'European LeukemiaNet a identifié un SNP rs4054760 sur le gène codant pour l'IL-5-R $\alpha$  dont la présence serait associée, chez les sujets *F/P*+, à une éosinophilie sanguine plus élevée et surtout à une fréquence accrue d'atteintes tissulaires, ce qui n'était pas retrouvé dans un groupe contrôle de SHE *F/P*- [128]. Ces résultats sont à confirmer, en l'absence de corrélation fonctionnelle démontrée (surexpression et/ou sensibilité accrue de l'IL-5R $\alpha$  mutée) et surtout en raison de limites des tests statistiques.

*In vitro*, la transfection avec *F/P* de progéniteurs hématopoïétiques humains CD34<sup>+</sup> de sang de cordon est, en plus de la formation de colonies éosinophiles (CFU-Eo), capable d'induire l'expansion de colonies érythrocytaire (CFU-E) et granulocytaire (CFU-GM) [56]. Dans ce système et contrairement aux données chez la souris, l'IL-5 n'apparaît ni nécessaire à la différenciation éosinophile, qui se produit en l'absence de cytokines (IL-5 et IL-3), ni synergique à *F/P*. De manière troublante, si l'imatinib permet de bloquer la formation de colonies de CSH/P transfectées avec *F/P*+ en l'absence de cytokines (aussi bien sur les CFU-Eo, CFU-E et CFU-GM), il ne modifie pas la formation de CFU-Eo en présence d'IL-3 et d'IL-5, et apparaît incapable d'induire l'apoptose de CSH/P *F/P*+ en présence d'IL-5. Ces données sont contradictoires avec l'effet de l'imatinib sur les lignées EOL-1, exprimant naturellement *F/P*, ou sur la lignée Ba/F3 transfectée avec *F/P*, sur lesquelles l'imatinib induit, à des concentrations nanomolaires, une inhibition de la prolifération par induction d'apoptose [21, 123].

Il ressort de ces travaux des éléments confortant le rôle indispensable de F/P dans l'induction de la prolifération cellulaire ainsi que dans la différenciation éosinophile, même s'il persiste des contradictions entre les modèles murins et les expériences réalisées avec des CSH *in vitro*, soulignant la possible implication de facteurs additionnels (voie de l'IL-5/IL-5RA ou d'autres voies) dans la différenciation éosinophile.

#### II.B.2.d A la recherche de la cellule souche leucémique F/P+

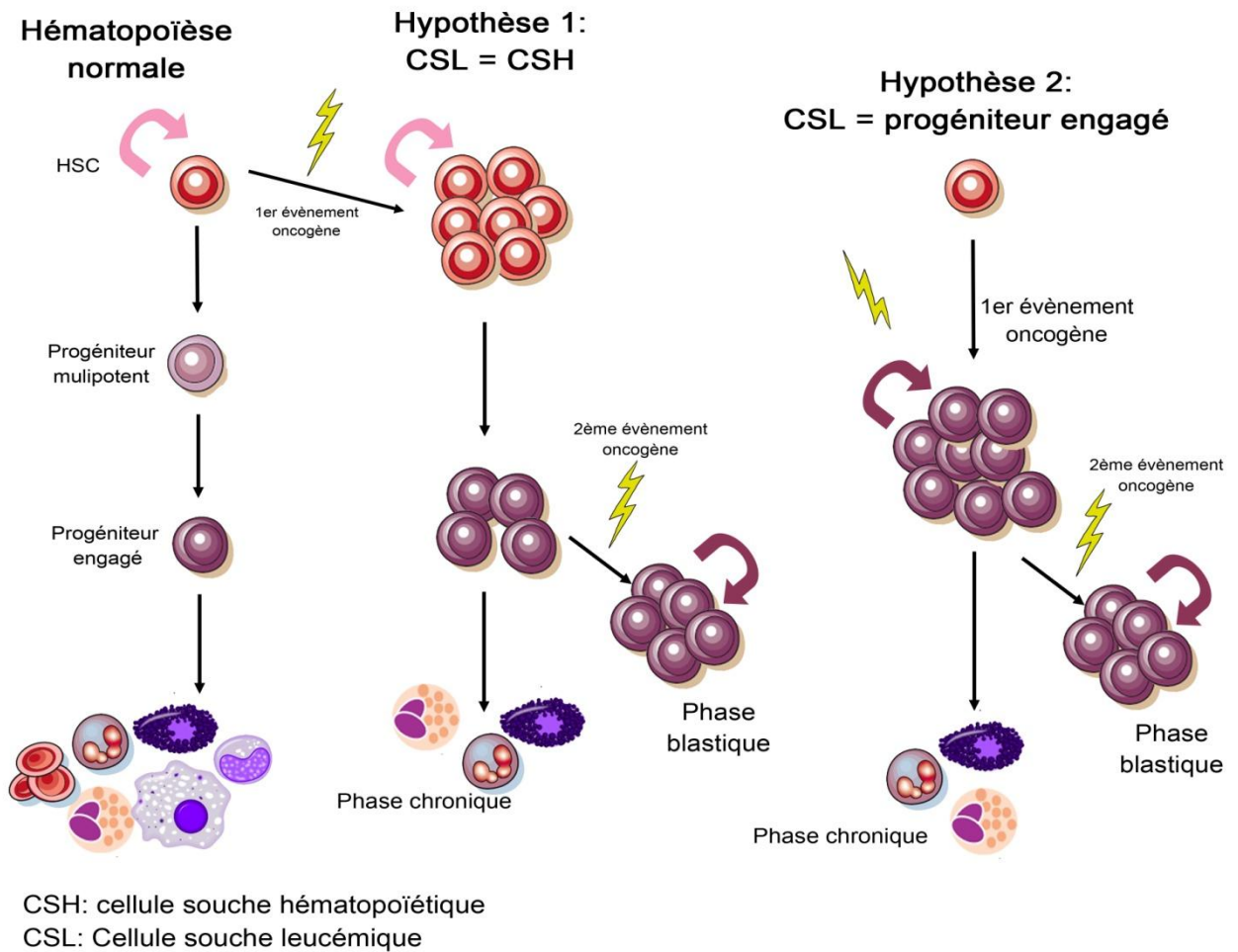
##### *Le concept de cellules souches leucémiques*

Le concept de cellule souche leucémique (CSL) a été suspectée dès les années 1970 lors de transfusions de leucocytes (obtenus par cytophèreses) de patients hyperleucocytaires atteints de LMC à des patients neutropéniques, dont la repopulation hématopoïétique comportait le chromosome Philadelphie [129, 130]. Il a été plus tard conforté dans les leucémies aiguës myéloblastiques, par l'isolement d'une cellule leucémique humaine susceptible de reproduire la maladie après transplantation chez une souris SCID (severe combined immunodeficiency) ou NOD (non obese diabetic)/SCID [131, 132]. D'une part, cette cellule doit conserver les propriétés spécifiques des CSH, à savoir sa capacité d'auto-renouvellement, mais aussi des potentialités d'engagement et de différenciation. D'autre part, la CSL doit acquérir à la fois des capacités de prolifération non régulables et des capacités de survie accrues lui conférant son caractère tumoral [133]. Comme pour les CSH, ces propriétés sont habituellement mises en évidence par la capacité de ces cellules à reproduire une leucémie identique à la leucémie d'origine dans des xénogreffes successives chez la souris [134]. Ces CSL représenteraient, selon la leucémie et le modèle murin utilisé, 1 sur  $10^4$  à  $10^7$  des cellules leucémiques médullaires. La détection de ces CSL est un enjeu majeur dans la prise en charge thérapeutique des leucémies et plus généralement des cancers. En effet, ces cellules, dans le cas de la LMC notamment, sont insensibles aux inhibiteurs de TK, rendant impossible, au moins théoriquement, l'éradication complète de la maladie [135-140]. L'état de quiescence de ces CSL explique en partie cette résistance à des traitements agissant habituellement par inhibition de la prolifération ou l'induction d'apoptose. Ces CSL peuvent alors être à l'origine de rechutes, mais surtout constituer un sanctuaire de cellules duquel émergeront des clones avec mutations additionnelles. On signalera toutefois que ces données expérimentales sont en contradiction avec des études cliniques, où une rémission moléculaire complète, persistante 12 mois après l'arrêt de l'imatinib, est constatée chez 40% des patients atteint de LMC et préalablement mis en rémission moléculaire complète pendant 2 ans [138].

Selon le modèle étudié, il semble que les CSL puissent être issues d'une CSH multipotente, ou alors d'un progéniteur plus engagé (MPP, CMP, CLP) chez lequel l'évènement oncogène induirait une immortalité et une capacité d'auto-renouvellement (figure 8). Cette dernière hypothèse a été démontrée avec différents oncogènes (MLL-AF9, MLL-ENL, MOZ-TIF2, PML-RARA) [141-145]. Dans la LMC, ces deux hypothèses n'apparaissent pas mutuellement exclusives [146]: à la phase chronique, les CSL sont au stade de CSH [142], alors que lors des phases d'accélération, à la suite d'évènements oncogéniques secondaires, les CMP et GMP peuvent acquérir les propriétés de CSL [147, 148].

Ce concept de CSL est sans cesse complexifié, que ce soit par des données récentes remettant en cause le concept d'unicité de la CSL, ou par des critiques méthodologiques des travaux passés. En effet, des publications récentes ont pu démontrer l'existence, chez un même patient, de différentes populations de CSL, aussi bien sur le plan génétique [149] que phénotypique [145]. Ces données permettent d'imaginer une hiérarchie des CSL comparable à celles des CSH, incluant des LT-CSL et des ST-CSL notamment ou alors une réelle hétérogénéité des CSL [150, 151]. Les critiques méthodologiques concernent la définition, toujours évolutive, des différentes populations hématopoïétiques humaines: autrefois caractérisées par la simple dichotomie  $CD34^+CD38^-$  pour les CSH et  $CD34^+CD38^+$  pour les progéniteurs multipotents plus différenciés, elles se définissent maintenant, nous l'avons déjà vu, par une combinaison de marqueurs beaucoup plus nombreux rendant difficile l'interprétation des travaux antérieurs et la comparaison d'études n'utilisant pas les mêmes critères phénotypiques de CSH. Ces limites de la caractérisation phénotypique sont bien illustrées par la possibilité de CSL humaines dans la LMC n'exprimant pas le CD34 [152], longtemps considéré comme LE marqueur de CSH. Nous avons vu par ailleurs que la définition d'une CSL humaine reposait sur sa capacité à induire la pathologie dans des transplantations successives chez la souris. Hors, il semble que les modèles NOD/SCID utilisés jusqu'à un passé proche, soient critiquables car non déplétés en cellules NK, population susceptible d'empêcher la repopulation hématopoïétique par les CSL. L'utilisation récente de souris NOD/SCID n'exprimant pas la chaîne commune  $\gamma$  du récepteur à l'IL-2 permet d'induire une déplétion NK complète et une meilleure repopulation hématopoïétique après xéno greffe, permettant même la xéno-transplantation de mélanome à partir d'une seule cellule [153]. Cette meilleure permissivité pourrait remettre en question les travaux antérieurs réalisés sur des modèles NOD/SCID [145, 154].

Figure 8: Mécanismes de leucémogénèse et concepts de cellules souches leucémiques  
 D'après Lane SW, Seminars Cancer Biol; 2010.





### *Application à la LCE F/P+*

A l'instar de la LMC, une analyse en hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) et/ou RT-PCR et/ou RQ-PCR a permis, dans 2 travaux différents, d'identifier le réarrangement *F/P* dans toutes les populations sanguines circulantes préalablement triées de patients LCE *F/P+* : éosinophiles, neutrophiles, mais aussi monocytes, lymphocytes T et B, et mastocytes [155, 156]. Ces données suggèrent l'apparition de l'évènement oncogénique dans une cellule souche hématopoïétique ou d'un progéniteur encore pluripotent capable d'une différenciation multi-lignage, notamment lymphoïde et myéloïde. Cette hypothèse est corroborée par la description, chez l'homme, de proliférations lymphoïdes associée à *F/P* (lymphomes lymphoblastiques T non hodgkiniens [157, 158], papulomatose lymphomatoïde [159]), mais aussi de leucémies aiguës myéloblastiques [158]. Dans ces lymphoproliférations T, l'identification de la délétion dans les cellules T clonales et la guérison parfois sous imatinib seul [158] sont des arguments forts pour une causalité directe entre la présence de *F/P* et l'hémopathie. Enfin, des anomalies lymphocytaires T, aussi bien phénotypiques qu'en terme de réarrangement clonal du TCR ont été identifiés au cours d'authentiques LCE *F/P+*, sans que leur signification soit établie (clone T réactionnel à un processus oncogène ou population T clonale *F/P+*) [160, 161]. Des résultats contradictoires ont toutefois été rapportés par Crescenzi *et coll.* [162]: en utilisant des techniques d'hybridation *in situ* sur cellules identifiées morphologiquement ou par immunophénotypage (fluorescence immunophenotypic and interphase cytogenetics for the investigation of neoplasia, ou FICTION), les auteurs n'identifiaient le gène *F/P* que dans les cellules à différenciation myéloïde (granulocytes-macrophages, érythroblastes, mégacaryocytes et PNE). Les CSH CD34+ ou CD133+, ainsi que les lymphocytes T et B des 8 patients *F/P+* analysés (cellules circulantes et/ou médullaires) n'exprimaient par *F/P*. Dans une population contrôle de patients BCR-ABL+, le gène de fusion était en revanche retrouvé dans les CSH en plus des autres lignées.

Afin, d'évaluer l'influence du degré de différenciation hématopoïétique de la cellule dans laquelle survient l'évènement oncogène, Fukushima *et coll.* ont réalisé des expériences de transfections de *F/P* dans des progéniteurs hématopoïétiques murins à différents stades de maturation [118]. Tout d'abord, seule l'expression de *F/P* dans des CSH murines (et pas dans les CMP) permet d'induire leur immortalité, d'augmenter leur auto-renouvellement, sans toutefois pouvoir reproduire systématiquement une leucémie (3 SMP et une LAM sur 5 tentatives) chez la souris syngénique greffée. Toutefois, comme dans des CSH, l'expression de *F/P* dans des CMP accroît le développement de cellules Gr-1<sup>+</sup>IL-5R $\alpha$ <sup>+</sup> (considérés comme précurseurs de PNE) comparativement à un vecteur contrôle (56% vs 6%). Plus surprenant,

l'expression de *F/P* dans des MEP ou des CLP, déjà engagées dans une différenciation considérée comme irréversible, permet d'obtenir plus de 50% de précurseurs éosinophiles exprimant *IL-5R $\alpha$* , associé à une inhibition de la différenciation érythrocytaire/mégacaryocytaire ou lymphoïde, respectivement. Les progéniteurs *IL-5R $\alpha$* + obtenus à partir des CLP pouvaient être différenciés en éosinophiles matures par rajout d'*IL-5* dans le milieu de culture. Ces résultats suggèrent que la CSL dériverait bien d'une CSH, à l'origine de la prolifération éosinophile, mais que des progéniteurs engagés (CLP et CMP) exprimant *F/P* pourraient malgré tout eux aussi se différencier en éosinophiles, sans pour autant posséder des capacités d'auto-renouvellement spécifiques des CSL.

Cools *et coll.* ont réalisé une série d'expériences transposables dans des précurseurs hématopoïétique humains [56]. Alors que toutes les cellules transfectées (CSH, CMP, GMP) étaient capables de générer des précurseurs granuleux et éosinophiles, la seule absence de développement de colonies érythrocytaires dans les GMP-*F/P*+ comparativement aux CSH-*F/P*+ et aux CMP-*F/P*+ a fait conclure aux auteurs, probablement trop rapidement, que la CSL se situait à un stade avancé de différenciation. De plus, les expériences de xénogreffe, de test d'immortalité ou d'auto-renouvellement ne figurent pas dans cet article, limitant l'interprétation des résultats.

Au total, les données actuelles ne permettent pas de conclure formellement sur l'origine précise de la CSL dans les LCE *F/P*+, notamment en l'absence de travaux montrant la capacité d'un progéniteur humain *F/P*+, quelque qu'il soit, à développer la maladie dans une xénogreffe murine. Les travaux les plus convaincants chez la souris, ainsi que les données indirectes chez l'homme permettent de supposer que la CSL dans les LCE *F/P*+ dérive d'une CSH, mais que d'autres progéniteurs engagés pourraient se différencier vers la lignée éosinophile, sans toutefois posséder une capacité d'auto-renouvellement.

#### II.B.2.e FIP1L1-PDGFR $\alpha$ et mécanismes de résistance

La survenue d'une résistance à l'imatinib a été, dès la découverte en 2003 du gène de fusion, une préoccupation majeure. En effet, l'existence d'une mutation ponctuelle T674I sur le domaine kinase I de PDGFR $\alpha$  a été identifiée dans la série princeps de Cools *et coll* [20]. Cette mutation T674I est située dans une position analogue à la mutation T315I qui confère une résistance à l'imatinib dans la LMC [163]. Le mécanisme de résistance passe par une modification conformationnelle de la poche de fixation de l'ATP et de l'imatinib, empêchant la liaison de ce dernier.

Toutefois, seulement 8 autres cas de résistance à l'imatinib (tableau 3) ont été décrits depuis 8 ans [20, 21, 164-172]. Dans 7 cas, cette résistance était expliquée par une mutation additionnelle de F/P : T674I (n=4), D842V (n=1), T674I puis D842V (n=1), S601P (n=1). Au contraire de la LMC, tous ces cas sont liés à des mutations ponctuelles situées dans le domaine kinase I ou II. La transfection de F/P mutée T674I dans la lignée hématopoïétique murine Ba/F3 induit une résistance 1 000 fois supérieure à l'imatinib (par rapport à la transfection de F/P sauvage). Un patient F/P+ a développé successivement une mutation T674I (conjointement à la disparition moléculaire du F/P sauvage sous imatinib), puis un mutant pan-résistant D842V (conjointement à la disparition moléculaire du F/P-T674I sous sorafenib) conduisant au décès du patient [169]. *In vitro*, le mutant D842V est hautement résistant à l'imatinib, au sorafenib, au dasatinib (Sprycell®) et au PKC412 (Midostaurin®) [169]. Enfin, un cas unique de résistance primaire à l'imatinib a été attribuée à une mutation S601P [167]. L'étude *in vitro* de l'effet de plusieurs inhibiteurs de TK sur les réponses prolifératives a permis d'établir que ni l'imatinib, ni le sorafenib, inhibant pourtant le mutant T674I de FIP1L1-PDGFR, étaient en mesure d'inhiber la prolifération de lignées Ba/F3 transfectées avec le mutant S601P de la protéine de fusion [168]. Dix années après la découverte du F/P, la fréquence des résistances à l'imatinib apparaît toutefois minime, même si son pronostic est alors redoutable. Au contraire de la LMC, au cours de laquelle de nombreux mécanismes de résistance semblent indépendant de la protéine de fusion, les cas identifiés de résistance à l'imatinib mettent toujours en jeu des mutations additionnelles du gène chimérique.

### ***II.B.3 FIP1L1-PDGFR, éosinophiles et évènement pathogènes***

Le potentiel d'infiltration tissulaire et de cytotoxicité des PNE existe quels que soit les mécanismes sous-jacents de l'HE et la maladie causale. Pour preuve, les infiltrations dermiques de PNE peuvent se rencontrer dans des hyperéosinophilies médicamenteuses, des lymphomes T cutanées épidermotropes, des hyperéosinophilies parasitaires ou les syndromes hyperéosinophiliques. Un autre exemple est celui de la fibrose endomyocardique, maladie dont la prévalence peut atteindre 30% en Ouganda [173], et dont le mécanisme actuellement retenu, bien que controversé [174], est une infiltration éosinophilique d'origine parasitaire. Cette fibrose, complication la plus redoutable chez les patients atteints de LCE F/P+, a aussi été décrite au cours d'HE secondaire à un lymphome de Hodgkin [175], à une HE d'origine médicamenteuse [176], d'une HE associée au syndrome éosinophilie-myalgie ou au syndrome de Churg-Strauss [177, 178].

Tableau 3: Cas rapportés de résistance à l'imatinib dans la LCE F/P+

	Sexe/Âge	Diagnostic	TTT	Rémission sous IM	Délai rechute	Rechute	Mutation	Evolution
Simon, 2008	H/59	SHE Caryotype normal	CS, IFN, HU, Mepolizumab IM 400mg	Non	NA	NA	S601P L629P (sans effet)	Décès Resistance primaire
Stein, 2006	H/53	ND	CS, Hydroxyurée IM (dose ?)	Non	ND	ND	ND	ND
Score, 2009	ND	ND	IM 100mg/	Pas de RMC	?	?	T674I	?
Cools, 2003 Griffin 2003	H/39	LAM Trisomie 8 et 19, add2q, del16q	HU, CS, Cytarabine IM 100mg/j	RHC	5 mois	LAM Pleurésie ↗ PNE ?	T674I Disparition de la trisomie 8	Décès
Von Buhnoff, 2005	H/67	SHE Caryotype normal	IM 100mg/j	RHC	6 mois	LAM Pleurésie ↗ PNE	T674I Trisomie 8 lors de la rechute	Décès
Ohnishi, 2006	H/25	Histycytose SHE Caryotype : trisomie 8	Vinblatine, 6MP, MTX, cladribine IM (dose ?)	RHC	2 mois	Pleurésie ↗ PNE	T674I	Inconnue
Lierman, 2009	H/65	LAM Caryotype normal	Idarubicine, cytarabine IM 100mg/j	RHC +RMC	7 mois	LAM	T674I D842V	Sorafénib (efficace 3 mois) Echec nilotinib- décès
Ikezoe, 2010	H/59	SHE Caryotype normal	IM : 100mg/j puis 400mg/j	RHC	5 mois	↗ PNE	Non identifiée (absence T674I et D842V)	Nilotinib (800mg/j) : RHC
Sorour, 2009	H/25	LAM Caryotype complexe (anomalies 1, 3, 8, 16)	Idarubicine, fludarabine, cytarabine Allogreffe Imatinib 400mg/j	RHC PCR F/P+	12 mois	LAM	D842V	Décès

### II.B.3.a Les protéines cationiques

De longue date, la cytotoxicité des éosinophiles a été, en grande partie, attribuée aux granules secondaires des éosinophiles. Ceux-ci peuvent être relargués dans le milieu extérieur de manière complète ou incomplète (« piecemiell degranulation »), et surtout agir de manière autonome dans le milieu extracellulaire [179]. Ces granules spécifiques contiennent principalement des protéines basiques : la protéine basique majeure de l'éosinophile (MBP), la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN) et l'EPO. Ces protéines peuvent altérer ou détruire de nombreuses cibles : larves de parasites helminthes [180] mais aussi cellules tumorales [181-183], ou encore cellules épithéliales de l'hôte. Leurs propriétés ont été largement explorées depuis 40 ans et sont résumées dans le tableau 4 [70, 184]. Toutefois, le rôle majeur des protéines cationiques n'exclut pas l'influence des nombreux autres médiateurs sécrétés par les PNE.

### II.B.3.b Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

Les ROS produits par le PNE désignent principalement l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyl, et les acides hypohalogéneux produit à partir de l'EPO. L'éosinophile exprime de manière fonctionnelle tout l'équipement enzymatique nécessaire à la production de ROS, et principalement Rac-1, Rac-2 et la NADPH oxydase phagocytaire [185]. Surtout le PNE activé possède une capacité de production de ROS plus de 3 fois supérieure à celle des neutrophiles [185]. Ces ROS, en plus de leurs propriétés toxiques, ont une activité de maturation post-traductionnelle sur les protéines des granules, singulière à l'éosinophile [186]. Ils induisent, en collaboration avec l'EPO, une nitrosylation de résidus tyrosines des protéines cationiques au cours de la maturation de l'éosinophile. La signification fonctionnelle de cette nitrosylation n'est toutefois pas connue.

### II.B.3.c Les médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques eicosanoïdes (leucotriènes, éoxines et prostaglandines) sont des métabolites de l'acide arachidonique, stockés dans des vésicules cytoplasmiques appelées corps lipidiques. Ces métabolites sont produits après activation par divers facteurs comme des chimiokines, des cytokines ou des composants de la matrice extracellulaire [187]. Les prostaglandines PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> et le thromboxane B<sub>2</sub> sont produites via les cyclooxygénases. La 5-lipoxygénase est l'enzyme clé de la voie des leucotriènes (LT), permettant la conversion d'acide arachidonique en LTA<sub>4</sub>, à l'origine de l'ensemble des cysteinyl-LT actifs (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>). Ces LT ont des propriétés bronchoconstrictrices et pro-inflammatoires. Enfin, la 15-lipoxygénase-1 (15LOX-1) permet la synthèse de lipoxines (aux propriétés pro-

**Tableau 4 : Principales propriétés des protéines cationiques de l'éosinophile**

	<b>EFFETS BENEFIQUES</b>	<b>EFFETS DELETERES</b>
<b>MBP</b>	Helminotoxique Bactéricide Activation des mastocytes, PNN, basophiles	HRB et destruction de l'épithélium respiratoire Histamino-libératrice (activation mastocytaire) Agoniste plaquettaire ↗ perméabilité capillaire
<b>EPO</b>	Helminotoxique Bactéricide Tumoricide	Cytotoxique par formation d'acides hypohalogeneux Agoniste plaquettaire
<b>ECP</b>	Helminotoxique Bactéricide Ribonuclease (anti virale) Activation mastocytaire	Histamino-libératrice (activation mastocytaire) Toxicité cutanée Neurotoxine (Phénomène de Gordon) Procoagulant par neutralisation de l'héparine ?
<b>EDN</b>	Helminotoxique Bactéricide Ribonuclease (anti virale) Alarmine (maturation cellules dendritique via TLR2)	Histamino-libératrice Toxicité cutanée Neurotoxine (Phénomène de Gordon)

ou anti-inflammatoires), et d'éoxines, molécules d'identification récente et ayant une action pro-inflammatoire aussi puissante que les LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> en augmentant la perméabilité vasculaire de façon beaucoup plus importante que ne le fait l'histamine [188]. Ces différents métabolites des acides gras peuvent aussi générer des ROS lors des étapes de peroxydation.

#### II.B.3.d Les traps

Un dernier mécanisme de cytotoxicité, original mais commun aux neutrophiles [189] et aux mastocytes [190], fait intervenir le « catapultage » de filaments d'ADN mitochondrial et de protéines des granules (ECP, MBP) dans le milieu extracellulaire [191]. Les filaments ainsi constitués (appelés « traps ») forment, une fois libérés, des réseaux capables de piéger et de tuer des bactéries. Ces traps d'éosinophiles ont été identifiés dans l'asthme [192], des parasitoses digestives (schistosomes) ou cutanées (gale, larva migrans) mais aussi dans des contextes de maladies cutanées à éosinophiles d'origine auto-immune (pemphigoïde bulleuse) ou inflammatoire (cellulite de Wells), au cours desquels ils pourraient participer aux processus d'agression tissulaire [191, 193]. Contrairement aux neutrophiles où cet événement implique la mort cellulaire [194], les éosinophiles survivent à ce processus. De façon là encore originale, les ROS constitueraient un facteur déclenchant indispensable à la libération d'ADN mitochondrial. Cette hypothèse est illustrée par l'inhibition de la libération de traps par le diphénylène iodonium (DPI), un inhibiteur sélectif de la NADPH oxydase, mais surtout par l'absence de libération d'ADN mitochondrial par des éosinophiles déficients en NADPH oxydase (purifiés chez un patient présentant une granulomatose chronique), et donc incapable de produire des ROS.

#### II.B.3.e Cytotoxicité des PNE F/P+

Cependant, aucun de ces mécanismes n'a jamais été spécifiquement étudié dans les LCE F/P+. Si les particularités cliniques de la LCE F/P+ sont bien identifiées (ulcérations muqueuses, atteinte cardiaque notamment), rien ne permet, à ce jour, d'expliquer ce tropisme tissulaire singulier des PNE, notamment cardiaque. Aucune donnée de la littérature ne permet actuellement d'évoquer une expression particulière de molécules d'adhésion à la surface des PNE F/P+ susceptibles d'expliquer une domiciliation cardiaque, ni d'argument solide suggérant l'implication d'une protéine cationique spécifique. Seul le couple CCL2 (appelée aussi Monocyte chemoattractant protein ou MCP-1)/CCR2 (récepteur de CCL2) a été récemment identifié comme effecteur autocrine de l'effet prolifératif induit par F/P dans les cellules EOL-1, mais aucune donnée sur le chimiotactisme n'était disponible dans ces travaux [195, 196]. Parmi les pistes prometteuses, les propriétés spécifiques des PDGFRs doivent être



envisagées. Leur implication dans le chimiotactisme des cellules mésenchymateuses est bien établie (voir chapitre III) et passerait par une interaction avec différentes intégrines, selon le type cellulaire étudiée [197]. Une hypothèse pertinente, non évaluée à ce jour, serait que l'expression anormale du PDGFR $\alpha$  influencerait le programme d'expression de molécules d'adhérences, déterminant ainsi son tropisme tissulaire si singulier.

Une autre piste, basée sur la constatation clinique d'une fibrose endomyocardique chez les patient F/P+, conduit aux propriétés pro-fibrosantes des PDGFs. En effet, différents travaux ayant étudié les fonctionnalités de cellules non phagocytaires exprimant une activation du PDGFR $\alpha$ , ont suggéré, de manière indirecte, un rôle pro-fibrosant de cette voie d'activation cellulaire. Dans un modèle murin d'étude de la fibrillation auriculaire, une sécrétion accrue de PDGF-AA, dépendante des mastocytes, induisait une prolifération fibroblastique, une synthèse accrue de collagène, à l'origine d'une fibrose myocardique [198]. Le PDGF-CC, ligand du PDGFR $\alpha$  peut induire, selon le lieu de surexpression, une fibrose cardiaque, hépatique ou rénale [199]. Au cours de la sclérodémie systémique, l'activation *in vitro* par le PDGF-BB de fibroblastes cutanés de patients entraîne une sécrétion accrue de ROS et de collagène [200]. Chez l'homme, l'activation fibroblastique responsable de la sclérose cutanée dans la sclérodémie systémique et la réaction du greffon contre l'hôte a été, un temps, mis sur le compte d'anticorps circulant anti-PDGFRs activateurs, retrouvé dans le sérum des patients, et capable d'induire la phosphorylation du récepteur, la production de ROS et la synthèse de collagène [201, 202]. Ces résultats ont par la suite été remis en question, aussi bien concernant la présence de ces anticorps que sur le pouvoir pro-activateur de fibroblastes du sérum des patients atteint de sclérodémie [203, 204].

Enfin, les PDGFRs, une fois activés dans des cellules non phagocytaires, sont à l'origine d'une production accrue de ROS, dont nous avons vu le potentiel cytotoxique lors d'une activation des PNE. Ces données seront détaillées dans le chapitre suivant.

## **II.C Conclusion**

Pour conclure, nous pouvons indiquer que la protéine de fusion F/P pourrait induire de multiples effets potentiels. F/P pourrait conduire à une différenciation éosinophile par l'induction de l'expression de GATA-1 dans des CSH ou des progéniteurs déjà engagés. Les voies STAT-5, RAS/MEK/ERK1/2, p38MAPK et PI3-K/AKT constitueraient des cibles d'aval de la protéine de fusion. Toutefois, ces cibles, en dehors de GATA-1 ont déjà été impliquées dans d'autres modèles leucémiques impliquant une TK, et ne peuvent expliquer les différents phénotypes observés selon qu'il s'agisse d'une activation d'ABL, de PDGFRB,



de JAK2 ou de c-KIT notamment. L'implication de l'IL-5, ou de son récepteur, comme cofacteur à F/P+ dans l'apparition d'un phénotype éosinophile est évoquée, mais nécessiteraient la survenue simultanée de 2 évènements, chacun exceptionnellement rare. Les médiateurs de la domiciliation tissulaire et de la toxicité des PNE propres à la LCE F/P+ ne sont pas encore identifiés. Ces incertitudes sur les mécanismes impliqués tiennent en partie au fait que le champ d'investigation des voies de signalisation d'aval étudiées à ce jour a été déterminée par les connaissances acquises dans la LMC et dans les leucémies impliquant PDGFR $\beta$ , mais sans jamais tenir compte des spécificités de l'éosinophile ni des fonctions connues du PDGFRA dans d'autres type cellulaire que les cellules hématopoïétiques.

### III Le PDGFR $\alpha$

L'ensemble des données de la littérature précédemment évoquées ont abordé les causes et conséquences de la myéloprolifération des PNE induite par l'expression de F/P, sans tenir compte spécifiquement des propriétés connues de PDGFR $\alpha$ . Peu ou pas exprimés dans les cellules hématopoïétiques en condition physiologique, la chaîne  $\alpha$  du PDGFR est exprimée dans un grand nombre d'autres cellules où elle joue alors un rôle majeur, notamment dans l'organogénèse. Nous aborderons dans ce chapitre les fonctions prouvées du PDGFR $\alpha$  en physiologie et en pathologie non hématologique, avec comme perspective une meilleure évaluation des éventuelles conséquences que sa dérégulation pourrait entraîner sur des cellules hématopoïétiques.

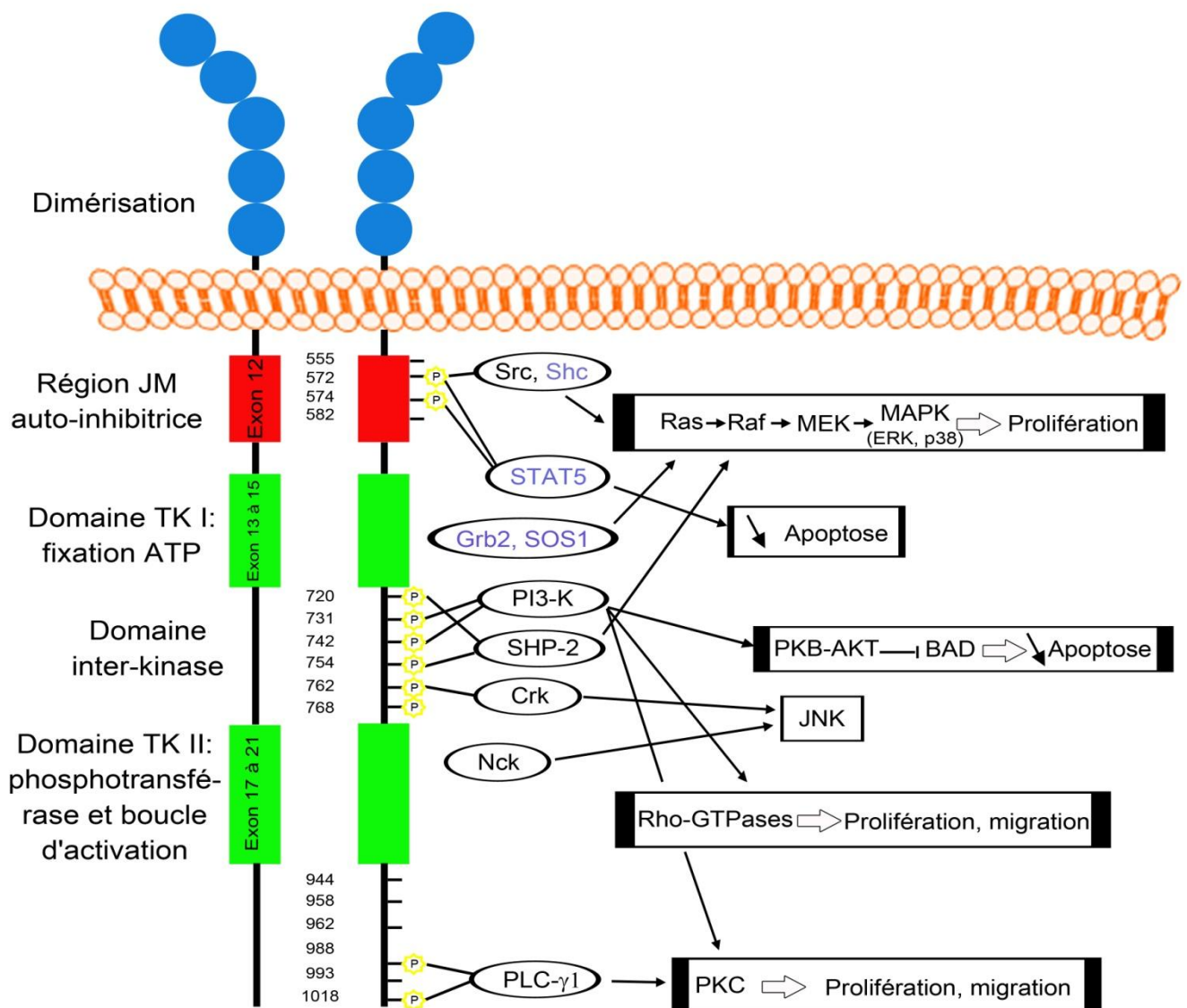
#### III.A Généralités

##### III.A.1 Anatomie du PDGFR $\alpha$

Le gène *PDGFRA*, situé sur la région q12 du chromosome 4, code pour une protéine de 1063 acides aminés, et de 140kD [205]. Cette chaîne  $\alpha$  du récepteur au PDGF, comme la chaîne  $\beta$  (ils partagent 30% d'acides aminés similaires), appartiennent à la classe III des récepteurs TK. Ces RTK partagent une structure commune, incluant 5 domaines Ig-like extracellulaires, une région transmembranaire, une région JM dont nous avons vu le rôle auto-inhibiteur dans la LCE F/P+, et enfin deux éléments conservés formant le domaine kinase (TKI et TKII), séparés par un domaine inter-kinase (figure 9). La région JM, comprise dans l'exon 12, est un élément régulateur essentiel, puisqu'elle maintient inactif le domaine kinase en interagissant avec des éléments clés du site. La *trans*-phosphorylation de résidus tyrosines de cette région JM déstabilise ces interactions auto-inhibitrices, libérant ainsi la fonction kinase, localisée dans le domaine kinase II [206]. Le domaine kinase II (exon 17 à 21) contient la boucle

**Figure 9: Anatomie des PDGFRs**

Représentation des différents sites de phosphorylation et de liaison des protéines de signalisation des PDGFRs. Les sites tyrosines phosphorylés après activation du récepteur sont représentés par une étoile jaune. En regard sont spécifiées les liaisons connues avec les protéines de transduction du signal et leurs conséquences fonctionnelles. En bleu sont signalés certains adaptateurs dont la liaison n'a été prouvée qu'avec la chaîne  $\beta$



d'activation TK du PDGFR $\alpha$ , ainsi que le domaine phosphotransférase. Celui-ci, maintenu auto-inhibée en *cis* en l'absence de ligand, est libéré de ses interactions intra-moléculaires après liaison du ligand et dimérisation, permettant d'enclencher la cascade de *cis*- et *trans*-phosphorylation. Le site de fixation de l'ATP est situé dans le domaine kinase I (exon 13 à 15).

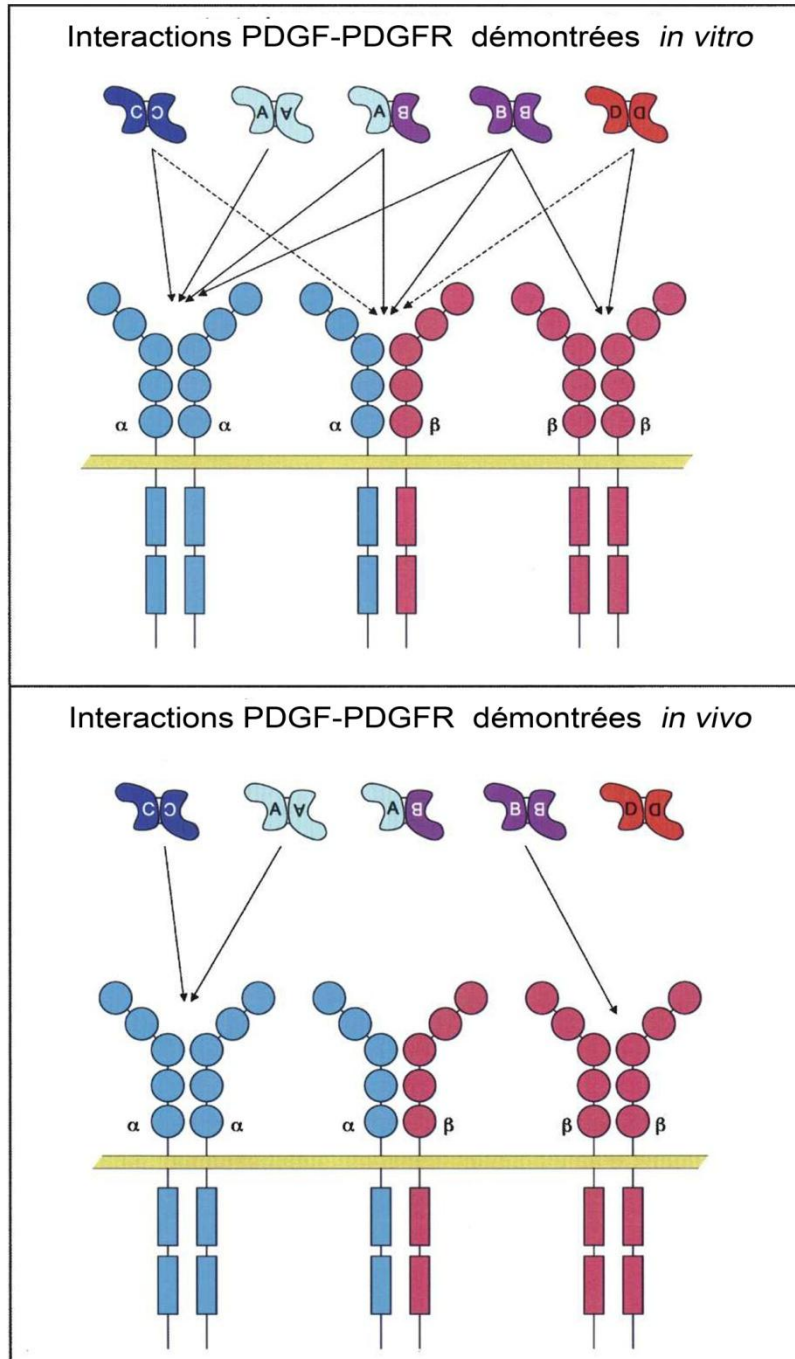
### III.A.2 Ligands du PDGFR $\alpha$

Le système PDGFR/PDGF inclut 2 récepteurs ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et 4 ligands (PDGF-A, -B, -C, -D). Les récepteurs et les ligands existent sous formes dimériques. Les homodimères PDGFR $\alpha$  sont, *in vivo*, capables de lier, et d'être activés par PDGFR-AA et -CC, tandis que les homodimères PDGFR $\beta$  lient principalement le PDGF-BB et -DD (figure 10). On signalera toutefois que les combinaisons récepteur/ligand, fonctionnelles *in vitro*, sont plus nombreuses que celles suscitées *in vivo* [197], rendant parfois hasardeuses la transposition à l'homme de travaux *in vitro* selon le type de ligand utilisé. Ainsi, le PDGFR $\alpha$  pourrait lier le PDGF-BB et -AB, et le PDGFR $\beta$  plus faiblement le PDGFR-AB. Il apparaît donc extrêmement difficile de séparer l'action des 2 chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , qui peuvent en outre se dimériser entre-elle. Ainsi, nous mentionnerons dans ce chapitre les principales connaissances acquises sur les fonctionnalités de l'une et l'autre de ces chaînes.

### III.A.3 Fonctions du PDGFR $\alpha$

Le PDGFR $\alpha$  est exprimé principalement dans les cellules mésenchymateuses, dès le stade embryonnaire (progéniteurs pulmonaires, cutanés, intestinaux et oligodendrocytes), et joue un rôle physiologique majeur dans l'organogénèse, contrôlant en partie la différenciation épithéliale pulmonaire, digestive, la morphogénèse capillaire, la spermatogénèse (différenciation des cellules de Leydig), l'oligodendrogénèse et le développement du squelette axial, du palais et des dents [197]. Ces fonctions dans la morphogénèse ont été bien étudiées grâce aux modèles d'inactivation génique. La souris naturellement mutante pour PDGFR $\alpha$  (souris *Patch* ou *Ph*) [207] se caractérise, en condition hétérozygote, uniquement par une dépigmentation cutanée traduisant un défaut de migration des mélanocytes. En revanche, seulement 1/3 des souris homozygotes *Ph* survivent, avec des anomalies cranio-faciales, et squelettiques (sternum, côtes, spina bifida) [208]. Des anomalies du tube neural sont aussi observées chez des patients ayant des anomalies du promoteur de *PDGFRA* [209]. Le couple PDGF-BB/PDGFR $\beta$  joue aussi un rôle primordial dans l'angiogénèse et la glomérulogénèse. Si les homodimères  $\alpha\alpha$  et  $\beta\beta$  possèdent des propriétés mitogènes, seuls les dimères  $\alpha\beta$  et  $\beta\beta$  semblent avoir un rôle dans le chimiotactisme des fibroblastes et des cellules musculaires

Figure 10: Interactions identifiées entre les différents dimères de PDGF et leurs récepteurs.  
 D'après Andrae J, Genes Dev 2008



lisses [210]. Leur expression peut être induite par le transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , l'IL-1 $\alpha$ , les œstrogènes, le FGF-2, le tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  [117], notamment dans des cellules inflammatoires comme les monocytes, macrophages ou plaquettes ou dans des cellules endothéliales [211].

### III.B Implication en pathologie des PDGFRs

Les PDGFRs sont impliqués dans un éventail de plus en plus large de pathologies, incluant des tumeurs secondaires à une signalisation PDGF non contrôlée, des processus fibrosants, et des maladies vasculaires. De manière concordante à l'expression tissulaire des différents PDGFRs, on remarquera que les tumeurs, notamment mésenchymateuses, et les processus fibrosant sont principalement liés à une dérégulation de PDGFR $\alpha$ , alors que PDGFR $\beta$  est surtout impliqués dans les atteintes vasculaires.

En pathologie tumorale, l'activation des PDGFRs peut conduire à la prolifération cellulaire suite à des altérations géniques activatrices du récepteur, mais aussi de manière autocrine par la co-expression simultanée et anormale de PDGF et PDGFRs [212, 213]. De plus, diverses tumeurs, elles-mêmes non sensible au PDGF, peuvent produire ce facteur de croissance dont l'action sur le microenvironnement tumoral (fibroblastes du stroma et vaisseaux péri-tumoraux), pourront influencer sur la croissance tumorale, l'angiogénèse et augmenter leur pouvoir métastatique [214-219]. Outre les leucémies chroniques à éosinophiles, les principales tumeurs associées à une anomalie génétique des PDGFR $\alpha$  sont les GIST, les polypes fibroïdes inflammatoires et le glioblastome (tableau 5).

#### III.B.1 Tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)

Les GIST, développées au dépend des cellules interstitielles de Cajal, sont les tumeurs mésenchymateuses les plus fréquentes du tube digestif. Près de 85% des GIST possèdent des mutations ou délétions activatrices de *KIT*, habituellement situées, comme F/P+, dans la région JM et donc sensibles à l'imatinib [19]. Des mutations activatrices de *PDGFRA*, mutuellement exclusives de celles de *KIT*, ont été identifiées dans 30% des GIST sans anomalies de *KIT*, soit environ 5% des patients [101, 220, 221]. Elles sont associées à une localisation gastrique des GIST [222]. Les mutations les plus fréquentes (80 à 90%) décrites à ce jour touchent l'exon 18 dans le domaine kinase II, et sont principalement représentées par la mutation D842V (63% des GIST avec anomalie de *PDGFRA*) [223]. De nombreuses autres anomalies de l'exon 18 (mutations, délétions) ont été décrites (tableau 5). Plus rarement ont été signalées des mutations touchant l'exon 14 (domaine kinase I) ou l'exon 12 de la région JM auto-inhibitrice (mutation V561D, insertions, délétions) [220, 223]. Malheureusement, les

**Tableau 5: Liste exhaustive des anomalies géniques de PDGFRA identifiées en pathologie humaine**

La plupart des anomalies identifiées du PDGFRA touche les exons 12, 14 et 18, et ce indépendamment de la tumeur. Toutefois, la localisation des mutations/délétions dans ces exons n'est pas toujours prédictive d'une sensibilité à l'imatinib, à l'exclusion des translocation impliquant l'exon 12 dans les LCE

LCE : leucémies chroniques à éosinophiles ; GIST : tumeurs stromales gastro-intestinales ; PFI : polypes fibroïdes inflammatoires ; LAM : leucémie aigue myéloblastique ; LAL : leucémie aigue lymphoblastique ; F/P : FIP1L1-PDGFR

\* : mutation, délétions ou insertions sensibles à l'imatinib dans les LCE ou les GIST

° : autres gènes de fusions associées à des LCE: KIF5B-PDGFR, CDK5RAP2-PDGFR, ETV6-PDGFR et STRN-PDGFR, BCR-PDGFR

	LCE	GIST	Autres
<b>Domaine JM</b>  <b>Exon 12</b>	- Zone de cassure dans F/P* - Autres translocations associées aux LCE impliquant PDGFRA*°	- V561D* - Del RV560-561, Del RVIES560-564 Ins ER561-562*, SPDGHE566-571R*, SPDGHE566-571K, Ins YDSRW582-586	<b>PFI</b> - V561D - Délétions/insertions entre 556 et 591 (la plus fréquentes étant DelIns S566-571E)
<b>Domaine Kinase I</b>  <b>Exon 13-15</b>	- H650Q* et N659S* - Mutation T674I, L629P et S601P induisant une résistance de F/P à l'imatinib	- Mutation N659K*	
<b>Domaine inter-kinase</b>	R748GS*		
<b>Domaine Kinase II</b>  <b>Exon 17-21</b>	- Mutation Y849* - D842V induisant une résistance de F/P à l'imatinib	- D842V, D842Y*, D842I, DI842-843IM, D846Y*, Y849C*, Del D842, Del I843*, Del RD841-842, Del DIM842-844, Del DIMH842-845*, Del IMHD843-846*, Del MHDS844-847, RD841-842KI, DIMH842-845A, DIMH842-845V, DIMHD842-846E, DIMHD842-846S, DIMHD842-846N, DIMHD842-846G, IMHDS843-847T, HDSN845-848P*	<b>PFI :</b> - D842V/I - Délétions 824 à 848 <b>LAM :</b> - F808L (exon 17) - N870S (exon 19)
<b>Autre</b>			<b>LAL :</b> A509D, exon 10 (5 <sup>ème</sup> domaine Ig-like extra cellulaire) <b>Glioblastome :</b> - C235Y (exon 5) - W349C (exon 7) - V536E (exon 11) - Délétion 2pb de l'exon 23 (région C T <sup>ale</sup> ) - Délétion 243 pb des exons 8 et 9



anomalies, les plus fréquentes, touchant le codon 842 (dont la mutation D842V qui correspond à la mutation D816V de KIT observée dans la mastocytose) sont résistantes à l'imatinib, expliquant une réponse clinique sous imatinib chez seulement 30% des patients GIST avec mutation de *PDGFRA* [221, 223].

### **III.B.2 Polypes fibroïdes inflammatoires**

Les polypes fibroïdes inflammatoires, anciennement appelés « granulome sous-muqueux avec infiltration éosinophile » ou « tumeurs de Vanek », sont des tumeurs mésoenchymateuses bénignes rares du tube digestif, constituées de cellules souvent CD34+ (dans les formes classiques, caractérisées par une prolifération de cellules fusiformes en bulbes d'oignons périvasculaires). Des travaux ont récemment montré que plus de 90% de ces tumeurs exprimaient fortement *PDGFRA* en immunohistochimie [224, 225]. Surtout, des mutations de *PDGFRA* étaient identifiées dans 55% des tumeurs analysées. Les exons principalement touchés sont, comme dans les LCE et les GIST, les exons 12, 14 et 18, avec toutefois un point chaud sur l'exon 12 où les délétions/insertions pourraient représenter près de 50% de l'ensemble des mutations identifiées [225]. De manière intéressante, l'une des caractéristiques histologiques de ces tumeurs est l'existence d'un fort contingent éosinophile [226], dont la signification n'est pas élucidée.

### **III.B.3 Glioblastome**

Une amplification génique de *PDGFRA* a été identifiée dans près de 11% des glioblastomes multiples, tumeurs astrocytaires malignes [227, 228]. Dans ces tumeurs caractérisées par une amplification de *PDGFRA*, des délétions [229, 230], mutations [231] et gène de fusion de *PDGFRA* (*KDR-PDGFRA*, dont le point de cassure sur *PDGFRA* est situé dans la région extracellulaire sur l'exon 10, correspondant au 5<sup>ème</sup> domaine Ig-like) [228] ont été mises en évidence, et leur pouvoir transformant a pu être établi dans des lignées cellulaires. La plus fréquente est une délétion de 243pb emportant 81AA des exons 8 et 9 de la région extracellulaire, retrouvés dans 2,8% des glioblastomes [228]. La rareté de ces mutations expliquent en partie les résultats décevants des premiers essais testant l'imatinib dans le glioblastome [232-234].

### **III.B.4 Autres pathologies liées à une activation de *PDGFRA***

Des anomalies touchant le gène *PDGFRA* ont aussi été retrouvées dans des leucémies aiguës myéloblastiques [235] ou lymphoblastiques [37].

Enfin, on signalera l'existence d'une tumeur liée à une hyper-expression non pas du récepteur, mais du ligand. Le dermatofibrosarcome protuberans, anciennement maladie de Darrier-Ferrand, et sa forme pédiatrique le fibroblastome à cellules géantes, sont des tumeurs fibroblastiques induites par une translocation t(17;22)(q22;q13) aboutissant à un gène de fusion entre *PDGF-B* et *COL1A1* codant pour le collagène de type 1 $\alpha$  1 [236]. Le gène *PDGF-B* étant alors placé sous le contrôle de *COL1A1*, largement exprimé dans le tissu conjonctif.

A côté du rôle pathogénique établi des PDGFRs activés par des anomalies géniques dans les processus tumoraux, de multiples études récentes ont démontrées de manière convaincante une dérégulation évidente de l'axe PDGF/PDGFRs dans les pathologies vasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle pulmonaire, la rétinopathie proliférative diabétique, impliquant alors plus souvent le PDGFR $\beta$  [197]. Cet effet pro-angiogénique, néfaste dans la rétinopathie, a été utilisé positivement dans les ulcères cutanés pour lesquels un gel de PDGF-BB (Becaplermin, Regranex<sup>®</sup>), approuvé par la Food and Drug Administration, a montré son efficacité dans la rapidité de cicatrisation [237, 238].

Les PDGFRs sont largement exprimés par les fibroblastes et leurs implications dans les processus fibrosant a été largement confirmé au cours de multiples atteintes organiques [197, 239]. Surtout, l'imatinib a pu, parfois, montrer son efficacité au cours de processus fibrosant pulmonaire [240], hépatique [241], cardiaque, dermique [242], rénal [243] mais aussi dans la sclérodermie [200] ou la réaction du greffon contre l'hôte [201, 244, 245], en rappelant que la production de TGF- $\beta$ , acteur important de l'activation fibroblastique, peut être induit par ABL, lui-même inhibé par l'imatinib.

### **III.C Mécanismes de transduction du signal du PDGFR $\alpha$**

#### **III.C.1 Protéines possédant un domaine SH2 ou PTB**

Comme précédemment décrit, le ligand du PDGFR $\alpha$  induit physiologiquement sa dimérisation, permettant alors l'autophosphorylation de résidus tyrosines spécifiques dans le domaine cytoplasmique. Ces phosphorylations vont alors permettre la liaison de protéines de signalisation possédant un domaine SH2 ou PTB notamment, qui vont initier une cascade de réponse intracellulaire. Grâce à des mutagénèses ponctuelles de ces résidus tyrosines, les différents ligands de chacun de ces résidus tyrosines ont pu être partiellement identifiés, avec toutefois une cartographie concernant le PDGFR $\alpha$  beaucoup moins précise (car moins étudiée) que pour la chaîne  $\beta$  (figure 9). Il s'agit de molécules de transduction du signal comportant une activité enzymatique comme la PI3-K, la PLC- $\gamma$ , la famille des Src-kinases,



les phosphotyrosines phosphatase (PTP), ainsi que de molécules adaptatrices (Nck, Crk) qui favorisent la liaison entre le récepteur et d'autres composants [197, 211, 246]. Il n'existe pas à ce jour d'argument direct (faute d'étude sur le récepteur  $\alpha$ ) établissant une liaison entre les facteurs de transcription STATs (notamment STAT-5), les enzymes Ras GTP-activating protein (GAP), ou les protéines adaptatrices Grb2, Sos1, Grb7, Grb14, Shc, alors qu'elles ont été largement démontrées sur le PDGFR  $\beta$  [246]. Si ces voies métaboliques sont parfois redondantes et leurs exploration *in vitro* difficiles à séparer, il apparaît néanmoins que la voie PI3-K semble indispensable à la plupart des effets biologiques induits par l'activation de PDGFR $\alpha$ , aussi bien dans la migration cellulaire et le chimiotactisme [247], la prévention *in vivo* de l'apoptose [248], et la prolifération [249, 250].

A l'échelon cellulaire, ces voies de signalisations sont à l'origine d'un pouvoir mitogène accrue, d'une inhibition de l'apoptose, d'une mobilisation du calcium intracellulaire, d'une différenciation. La mobilité cellulaire et le chimiotactisme sont manifestement induites par le PDGFR $\beta$  grâce à la réorganisation des fibres d'actine (via les Rho-GTPases) et des liaisons avec les intégrines (notamment  $\alpha 2\beta 1$  dans les cellules musculaires lisses) [251]. L'action du PDGFR $\alpha$  sur le chimiotactisme est quand à elle variable selon le modèle cellulaire, parfois positive [247], parfois négative [252, 253].

Le métabolisme des PDGFRs nécessite leur internalisation dans des endosomes et la fusion avec le système lysosomal, mais aussi leur ubiquitination qui conduit à une dégradation dans le protéasome. Toutefois, le système de rétrocontrôle négatif le plus important implique les PTPs, capables de déphosphoryler les résidus tyrosines du récepteur activé ou des cibles d'aval [254]. Parmi les PTP identifiées comme susceptibles de déphosphoryler les PDGFR, on citera principalement les SH2 domain-containing phosphatases (SHP) [255]. La SHP-2 a été identifiée comme ligand du PDGFR $\beta$ , avec la particularité d'avoir, selon les conditions, un effet positif sur la signalisation PDGF en étant capable de lier Grb2 et ainsi activer la voie MAPK [256, 257] ou un effet négatif [258]. La SHP-1, capable de lier le PDGFR $\beta$  et la PI3-K, semble en revanche avoir un rôle freinateur de la signalisation [259]. Toutefois, leurs rôles dans la signalisation PDGFR $\alpha$  n'a jamais été évalué.

### ***III.C.2 Rôle du métabolisme oxydatif dans la signalisation PDGFR***

Si les protéines de transduction du signal décrites ci-dessus jouent un rôle évident dans la signalisation PDGF, un nouvel acteur majeur et inattendu est apparu ces dix dernières années : le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L' $H_2O_2$  est une petite molécule diffusible, ubiquitaire, rapidement synthétisée et détruite. Elle est capable d'affecter la fonction de nombreuses

protéines kinases, phosphatases, phospholipases, ou facteurs de transcription et protéines G [260]. Ces capacités en font potentiellement un messager intracellulaire à l'instar du monoxyde d'azote. Cette éventualité a été longtemps négligée, car la communauté scientifique n'a longtemps retenu que les propriétés cytotoxiques des dérivés réactifs de l'oxygène. Après un rappel sur les voies de synthèse et de catabolisme des ROS, nous décrivons leur rôle dans la signalisation PDGFR/PDGFR, tout en signalant que cette capacité de production de ROS endogènes est partagée par de nombreuses autres tyrosines kinases dont les récepteurs à l'EGF, VEGF, FGF [261], mais aussi par ABL, impliquée dans la LMC, des récepteurs de cytokines (dont l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF [262, 263]), ou des récepteurs couplés une protéine G (récepteurs à l'angiotensine, à la thrombine, à l'histamine notamment) [264].

### III.C.2.a Dérives réactifs de l'oxygène (ROS) : production et dégradation

Le premier produit de la dégradation de l'oxygène est l'anion superoxyde  $O_2^-$ , généré par la NADPH oxydase, qui permet l'addition d'un électron à une molécule d' $O_2$ . Dans les phagocytes (neutrophiles, éosinophiles, macrophages), la NADPH oxydase est un complexe enzymatique constitué d'un flavocytochrome  $b_{558}$  enchâssé dans la membrane, lui même constitué d'un hétérodimère gp91<sup>phox</sup> (ou Nox2) - p22<sup>phox</sup> (figure 11) [265]. Des protéines cytosoliques de régulation (p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, et p67<sup>phox</sup>) s'associent à ce cytochrome pour générer un complexe actif, sous l'influence de Rac, une protéine de la famille des Rho GTPases (Rac2 dans les phagocytes et cellules hématopoïétiques) et de protéines kinases (notamment de la PI3-K par la production de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphates, ou PIP<sub>3</sub>).

L'anion superoxyde, produit habituellement dans le milieu extracellulaire, est peu réactif, relativement stable et non diffusible. Il est « dismuté » par les superoxydes dismutases (SOD) en  $H_2O_2$ , molécule stable, lipophile et donc très facilement diffusible en intracellulaire. L' $H_2O_2$  étant une molécule potentiellement toxique, la plupart des cellules sont équipées d'une machinerie de détoxification. Elle regroupe principalement 3 enzymes, capable de dégrader l' $H_2O_2$  en eau: la catalase (principalement contenu dans les peroxysomes), les peroxiredoxines et les glutathione peroxidases (cytosoliques) (figure 12).

Dans les cellules phagocytaires, l' $H_2O_2$  peut être converti en métabolites hautement toxiques. La myéloperoxidase du neutrophile et l'EPO sont des haloperoxidases capables d'oxyder des halogènes  $Cl^-$ ,  $Br^-$ , ou  $I^-$  (mais aussi les pseudo-halogènes  $SCN^-$  et  $NO_2^-$ ) en présence d' $H_2O_2$ , à l'origine d'acides hypohalogéneux, sources de ROS toxiques (figure 12).

### Figure 11 : Schéma d'activation de la NADPH oxydase phagocytaire

L'activation de la NADPH oxydase requiert l'assemblage de 5 sous-unités "phox", dont la sous-unité catalytique gp91<sup>phox</sup> qui permet la formation d'anion superoxyde. Cet assemblage est favorisé par la phosphorylation de RAC-GDP, et par la synthèse de PIP3, eux même sous la dépendance de différents facteurs, dont l'activation de tyrosines kinases. Adapté de Lambeth JD, Nat Rev Immunol; 2004

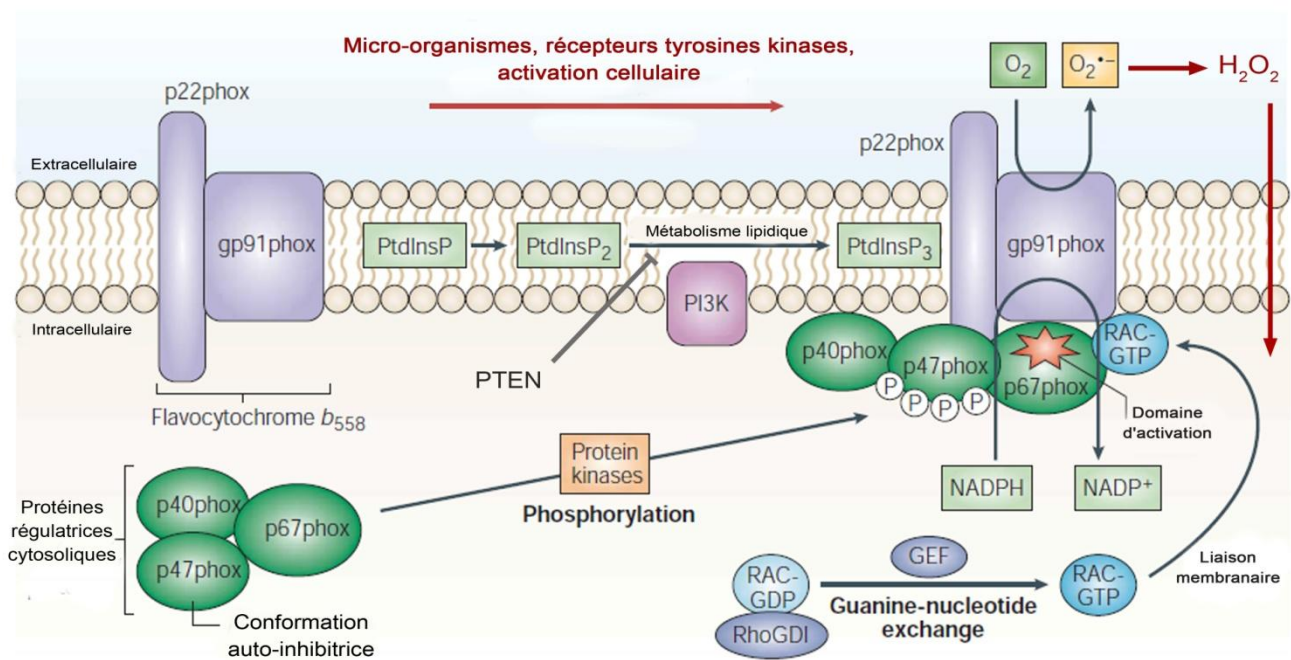
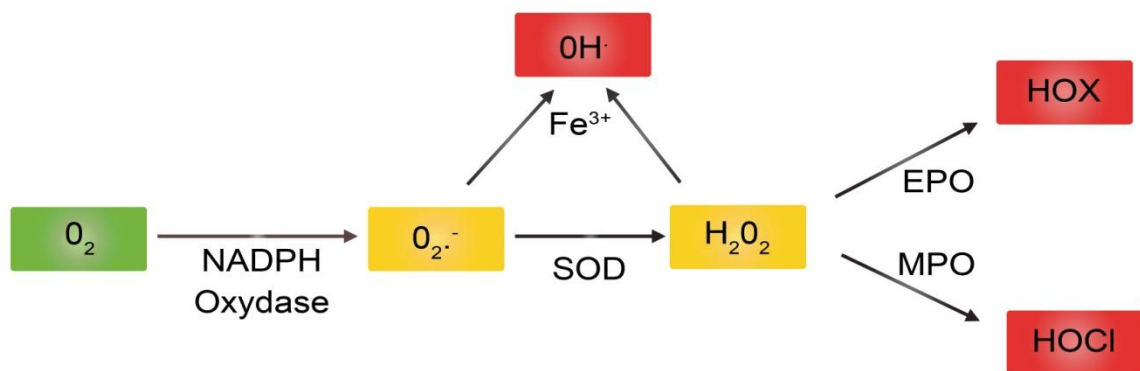


Figure 12: Synthèse et catabolisme des dérivés réactifs de l'oxygène



- Superoxyde dismutase (SOD) :  $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- Catalase :  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- Glutathion peroxydase:  $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GS-SG + 2H_2O$   
(GSH = glutathion, et GS-SG = glutathione disulfide oxydée).
- Glutathion réductase :  $GS-SG + NADPH + H^+ \rightarrow 2 GSH + NADP^+$
- Haloperoxydase :  $2H_2O_2 + H^+ + X^- \rightarrow H_2O + HOX$  (X = Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, SCN<sup>-</sup> et NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)
- EPO: eosinophil peroxydase; MPO: myéloperoxydase

La myéloperoxidase peut, en présence de chlore, engendrer de l'hypochlorite (HOCl), lui-même à l'origine du radical hydroxyl HO·, le ROS ayant la plus forte capacité oxydante et donc toxique. Ce dernier, dont la production peut aussi provenir de la réaction de Fenton avec du fer ferreux ou du cuivre, interagit directement avec les sucres, lipides, acides aminés et acides nucléiques, créant ainsi des réactions radicalaires en chaîne, responsables de modifications irréversibles des macromolécules et des organites cellulaires. L'EPO interagit préférentiellement avec les ions thiocyanate SCN<sup>-</sup>, à l'origine de radical hydroxyl, mais aussi d'HOSCN qui jouerait un rôle prépondérant dans la diathèse thrombotique des SHE en entraînant l'activation du facteur tissulaire [266].

Si la plupart des ROS sont produits grâce à l'activation de la NADPH oxydase, on notera toutefois que l'hydroperoxydation des lipides (acide linoléique et linoléique) par les lipoxygénases contribue aussi à la synthèse intracellulaire de ROS. De manière plus anecdotique, la xanthine oxydase, la NO synthase, le cytochrome P450 et la respiration mitochondriale sont des sources potentielles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais dont le rôle est probablement négligeable dans le cas des RTK [264].

Les cellules les plus grandes productrices de ROS sont les cellules phagocytaires mononuclées (macrophages), et polynucléées (neutrophiles et plus encore éosinophiles) [185]. C'est à travers les neutrophiles, plus facilement accessibles et plus stables pour une analyse en laboratoire, qu'ont été initialement investiguées les propriétés des ROS, et exclusivement sous l'angle de leurs capacités bactéricides. Surtout, c'est principalement sous la forme de **ROS extracellulaires**, sécrétées, qu'ils ont été étudiés. Le meilleur exemple en est la granulomatose (septique) chronique familiale, déficit immunitaire héréditaire lié à l'X et provoqué par des mutations inactivatrices de l'une des sous-unités de la NADPH oxydase. Cette dernière devient incapable, dans les neutrophiles et macrophages, de produire un taux de ROS suffisant à la destruction de micro-organismes habituellement non pathogènes, entraînant des complications infectieuses graves et souvent mortelles.

Dans les années 1990, l'amélioration des techniques de détection des ROS ont permis l'identification de faibles quantités de **ROS intracellulaires** dans de nombreux types cellulaires [265, 267]. Ces progrès techniques proviennent principalement du dichlorodihydrofluorescein-diacétate (H<sub>2</sub>DCF-DA), molécule diffusant librement en intracellulaire et dont la fluorescence n'apparaît qu'après clivage par des estérases cytosoliques puis oxydation par les ROS intracellulaires. Les limites de cet outil d'analyse sont l'absence de spécificité du H<sub>2</sub>DCF-DA (oxydation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais aussi l'HO·, l'HOCl, le NO notamment), son auto-oxydation et sa photo-oxydation [268]. C'est ensuite grâce à la

mise en évidence d'un complexe NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires [269] qu'a pu être confortée la possibilité de production de ROS à des niveaux sub-toxiques et faire envisager un rôle de messager intracellulaire au plus stable d'entre eux, l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### III.C.2.b $\text{H}_2\text{O}_2$ : une conséquence de la stimulation des PDGFRs

La première preuve de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  induite par le PDGF a été apportée par Sundaresan *et coll*, qui ont pu montrer que le PDGF-AB augmentait d'un facteur 50 à 100 la concentration intracellulaire en ROS dans des cellules musculaires lisses vasculaires, avec un pic obtenu en 5 minutes et une décroissance rapide au bout de 30 minutes [267]. Cette production de ROS induite par le PDGF, s'accompagnait d'un niveau élevé de protéines comportant des résidus tyrosines phosphorylées, et de phosphorylation des MAPK. Ces phosphorylations étaient reproduites par l'adjonction d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu extracellulaire (sans stimulation par le PDGF-AB), et inhibées lorsque les ROS étaient dégradés par la catalase ou la N-acétyl-Cystéine (NAC). A l'échelon cellulaire, les réponses mitogènes et chimiotactiques induites par le PDGF pouvait là encore être bloquée par ces molécules antioxydantes.

C'est l'équipe de SG Rhee à Séoul qui a permis, par la suite, de mieux comprendre les différents mécanismes concourant à la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ils ont tout d'abord exploré un lien éventuel entre les protéines contenant un domaine SH2 (et recrutées après stimulation du PDGFR $\beta$ ) et la production de ROS. En réalisant sur le gène *PDGFRB* des mutations de résidus tyrosines spécifiques à chacune d'entre-elles, ils ont pu montrer, après transfection dans des cellules HepG2 et stimulation par le PDGF-BB, que l'invalidation des sites de liaison de la PI3-K était nécessaire et suffisante pour abolir l'augmentation intracellulaire de ROS, alors que l'invalidation des sites de liaison de SHP-2, GAP ou la PLC- $\gamma$ 1 semblait augmenter légèrement les ROS [270]. Ce rôle essentiel de PI3-K dans la génération de ROS intracellulaires était renforcé par l'inhibition complète de leur production par des inhibiteurs spécifiques de PI3-K (LY293004 et wortmannin). Le cofacteur d'aval essentiel pour la production de ROS induite par la PI3-K identifié dans ce travail était Rac-1, molécule adaptatrice indispensable à l'activation de la NADPH oxydase. En revanche, Akt n'influe pas sur le niveau de ROS produit après stimulation PDGF [270]. Enfin, l'effecteur final de cette production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  induite par le PDGF dans les cellules phagocytaires était finalement identifié comme étant la NADPH oxydase [271].

Si ces travaux princeps avaient comme cible d'étude le PDGFR $\beta$ , plusieurs travaux récents ont pu établir des résultats analogues après stimulation du PDGFR $\alpha$  dans des cellules non

phagocytaires. Le PDGFR-AA induit aussi la production de ROS intracellulaires en activant le PDGFR $\alpha$ , et cette production est contrôlée par la NADPH oxydase [272]. Plus spécifiquement, la PI3-K, activée après stimulation de PDGFR $\alpha$ , induirait une translocation membranaire de Rac-1 et de la sous-unité p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase, permettant l'assemblage des autres sous-unités puis l'activation de cette dernière pour produire des ROS. Là encore, la PI3-K apparaissait nécessaire et suffisante pour la production de ROS, au contraire des autres protéines adaptatrices susceptibles de lier le PDGFR $\alpha$  [272], mais aussi pour la prolifération ou le chimiotactisme dépendant de PDGFR $\alpha$  [247]. Toutefois, les ROS semblaient n'avoir qu'un effet chimiotactique, mais pas mitogène, dans ce modèle de lignée cellulaire [272].

Enfin, on signalera la description, *in vitro*, d'une phosphorylation et d'une activation du PDGFR $\alpha$  par l'intermédiaire d'une production de ROS dépendantes d'autres facteurs de croissance [273].

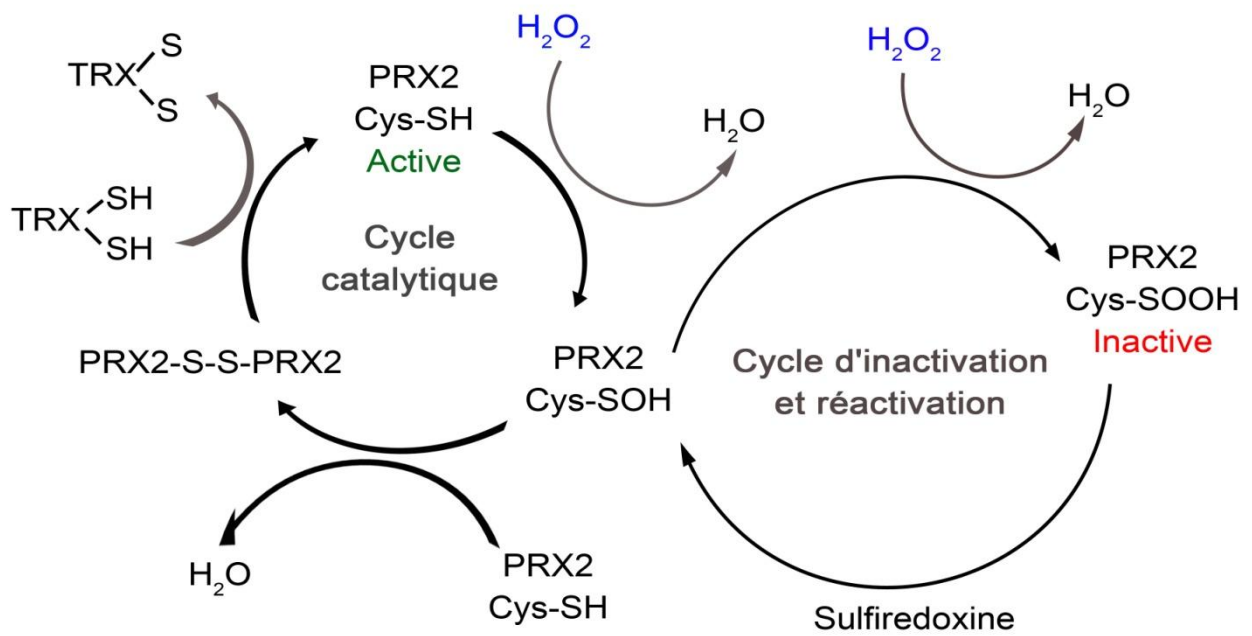
### III.C.2.c L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> régule la fonction enzymatique de protéines cytoplasmiques

#### *La peroxiredoxine-2 (PRX-2)*

Un acteur majeur de cette signalisation PDGFR a été caractérisé en 2005 : la peroxiredoxine 2 (PRX-2) [274]. La PRX-2 appartient à la famille des 2-Cys peroxiredoxines, molécules capables de réduire l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O grâce à 2 résidus cystéines indispensables à la réaction catalytique, faisant de ces enzymes un substrat de la réaction d'oxydoréduction (figure 13)[275]. L'enzyme alors oxydée a besoin d'être réduite, grâce à la thioredoxine, pour être restaurer dans sa forme active. La PRX-2 est présente majoritairement dans le cytoplasme, en grande quantité (représente 0,2 à 1% des protéines dans les cellules de mammifères [276]), et a une forte affinité pour l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en faisant un candidat théorique idéal pour la régulation des ROS intracellulaires. En invalidant le gène de la PRX-2 dans une lignée embryonnaire fibroblastique murine, Choi et coll ont mis en évidence une production de ROS intracellulaires amplifiée d'un facteur 2 après 10mn de stimulation PDGF-BB, ainsi qu'une augmentation concomitante de la phosphorylation de résidus tyrosines, et plus spécifiquement de la PLC- $\gamma$ 1 [274]. Ce renforcement de la réponse au PDGF s'accompagnait d'une prolifération et d'un chimiotactisme accrus, mais réversible après expression rétrovirale de la PRX-2 dans la lignée PRX-2<sup>-/-</sup>. Le rôle de la PRX-2 dans la signalisation PDGF était confirmée *in-vivo* dans un modèle murin de plaie carotidienne. Comparativement aux souris sauvages, l'épaisseur intimale, liée à l'afflux de cellules musculaires lisses, était significativement plus importante chez la souris PRX-2<sup>-/-</sup>, et pouvait être aboli par



Figure 13 : Cycle enzymatique de réduction de l' $H_2O_2$  par la peroxyredoxine-2  
 PRX-2: peroxyredoxine-2; TRX: thioredoxine;





l'administration préalable d'un inhibiteur du PDGFR $\beta$ . Ce travail confirmait donc de manière convaincante le rôle de l' $H_2O_2$  endogène dans l'amplification de la phosphorylation induite par PDGFR, mais surtout identifiait la PRX-2 comme un régulateur important de l' $H_2O_2$  et donc de cette cascade de phosphorylation.

Cette relation PRX-2/  $H_2O_2$  est bidirectionnelle, puisque si la PRX-2 régule le niveau d' $H_2O_2$ , l' $H_2O_2$  est capable d'inactiver les peroxyredoxines cytosoliques par des modifications post-traductionnelles : phosphorylation de la PRX-1 induisant son inactivation, mais aussi oxydation du résidu cystéine de la PRX-2 en acide sulfénique, induisant là encore son inactivation [277, 278]. Dans ce dernier cas, la PRX-2 oxydée est régénérée par une sulfiredoxine [279] (figure 13). Ainsi, l' $H_2O_2$ , produit après stimulation du PDGFR entrainerait une oxydation de la PRX-2, induisant son inactivation et autorisant l' $H_2O_2$  à poursuivre, au moins temporairement, ses effets biologiques, notamment sur les PTP [277].

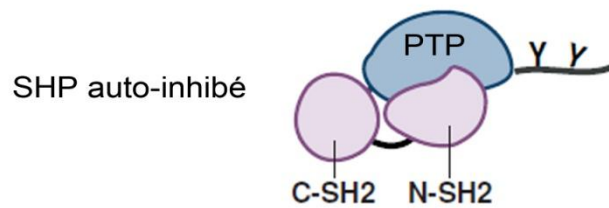
La catalase, dismutase capable de réduire l' $H_2O_2$ , est principalement située dans les peroxysomes. Cette localisation explique son rôle prédominant de cataboliseur de l' $H_2O_2$  dans l'oxydation des acides gras, mais n'est probablement que peu impliquée dans le catabolisme de l' $H_2O_2$  cytosolique produit par des facteurs de croissance [278].

### *Les phosphotyrosines phosphatases*

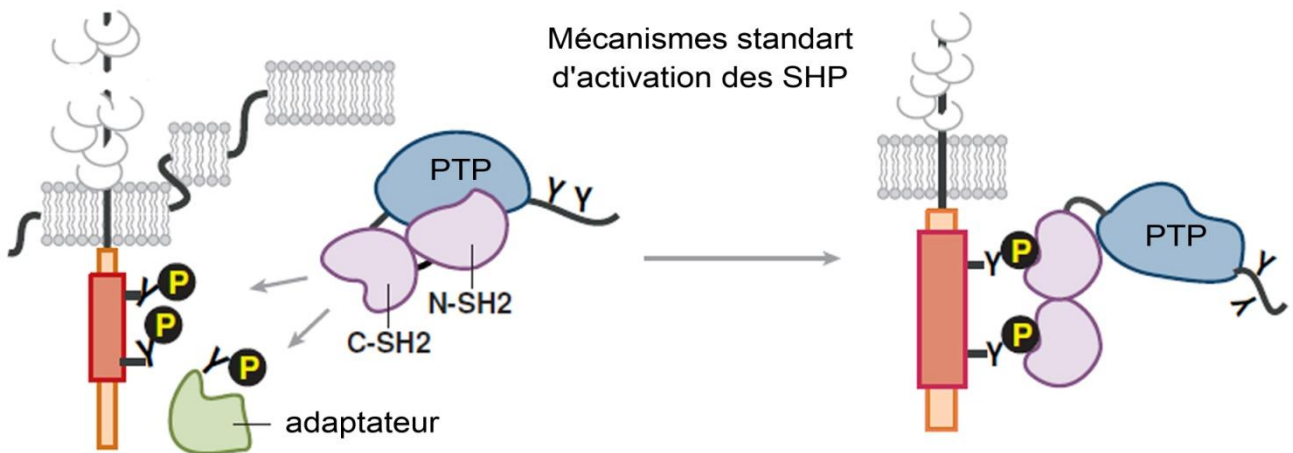
Les PTP comptent parmi les cibles les mieux caractérisées de l' $H_2O_2$ . Cette famille d'enzymes capable de déphosphoryler des tyrosines comprend plus d'une centaine de membres, classés selon leur spécificité (PTP classiques) ou non (« dual specificity phosphatases », actives sur des résidus tyrosines mais aussi sérines ou thréonines) pour les tyrosines [280, 281]. Ces enzymes ont évidemment un rôle majeur dans la régulation de la cascade de phosphorylation, notamment lors de l'activation de RTK. Nous illustrons ici leurs fonctionnalités par l'exemple des SHP (SHP-1 et SHP-2). Après liaison sur des sites de recrutement du récepteur (domaines SH2), elles peuvent déphosphoryler les résidus tyrosines du RTK activé, limitant alors la propagation du signal (figure 14). Grâce à des résidus tyrosines phosphorylables dans leur région C terminale, elles peuvent aussi lier des protéines effectrices contenant un domaine SH2 ou PTB qu'elles déphosphoryleront, où même lier des protéines adaptatrices dont elles déphosphoryleront le substrat. Ainsi, les PTP peuvent avoir un rôle freinateur ou activateur de la signalisation selon la PTP impliquée et sa cible [281]. Ainsi, la SHP-2 a longtemps été considérée comme une PTP amplifiant le signal des RTK, alors que SHP-1 aurait un rôle inhibiteur [281].

Figure 14: Schéma d'activation des phosphotyrosines phosphatases de la famille SHP  
 Adapté de Pao LI, Ann Rev Immunol; 2007

**a** Au repos



**b** Après activation d'un RTK



La fixation des domaines SH2 libère et active la sous-unité catalytique phosphotyrosine phosphatase (PTP) des SHP, permettant ensuite la déphosphorylation des résidus tyrosines du récepteur ou d'autres protéines.

Comme dans le cas des peroxiredoxines, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut oxyder le résidu catalytique cystéine de ces enzymes, et ainsi inhiber leur activité. L'oxydation d'un résidu cystéine par un atome d'oxygène en acide sulfénique (-SOH) est réversible (sous l'action de réducteurs comme la thioredoxine), alors que les oxydations par 2 ou 3 atomes d'oxygène (-SO<sub>2</sub>H et -SO<sub>3</sub>H, respectivement acide sulfinique et sulfonique) entraînent des changements de structure irréversibles aboutissant à une inactivation permanente de la PTP [282].

Cette cascade d'évènement induite par un facteur de croissance a été identifiée pour la première fois avec le RTK à l'EGF, capable après stimulation de produire des ROS et d'inactiver, en l'oxydant, la PTP-1B [283].

Ce mécanisme d'inactivation de PTP a été, par la suite, confirmé lors d'une stimulation des PDGFRs. Dans des cellules Rat-1, le PDGF-BB induit, par l'intermédiaire de l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'oxydation et l'inactivation de nombreuses PTPs, parmi lesquelles était identifiée la SHP-2 [258]. Cette oxydation de la SHP-2, apparaissant après 5mn d'exposition au PDGF-BB, était spontanément réversible, avec un retour au taux basal en 20mn, et disparaissait avec un prétraitement par la NAC. Dans ce modèle cellulaire, la SHP-2, dans sa forme active, semblait avoir un rôle négatif sur la signalisation PDGF.

Lors d'une stimulation par le PDGF-BB de cellules NIH 3T3 sur-exprimant la NADPH oxydase, les auteurs ont identifié une production accrue de PIP<sub>3</sub>, indépendante de l'activation de la PI3-K. Cette accumulation résultait d'une inactivation de la Phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN), enzyme fonctionnant comme une PIP<sub>3</sub> 3-phosphatase [284]. Cette inactivation, liée à une oxydation des résidus cystéines, était accrue dans les cellules PRX-2<sup>-/-</sup> et diminuée dans la lignée sur-exprimant la PRX-2, établissant le rôle de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans l'inactivation de cette PTP [284].

Si les SHP peuvent avoir pour cibles directes les résidus tyrosines des RTK activés, elles peuvent aussi moduler la signalisation en interagissant avec des nombreuses autres voies d'aval, dont certaines sont mises en jeu après activation du PDGFR. On citera les voie PI3-Akt, STATs, JAK2, MAPK, ERK, ou JNK [285]. Plus particulièrement, dans des cellules endothéliales de type HUVECs, SHP-1 régule négativement la PI3-K, permettant d'inhiber l'activation de la NADPH oxydase et la synthèse d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ , en dehors de toute stimulation dépendante de PDGF [286].

Si les fonctions de SHP-2 sont beaucoup mieux connues, c'est principalement en raison de son expression ubiquitaire, notamment dans la plupart des lignées cellulaires fibroblastiques. En revanche, l'expression de SHP-1 est restreinte aux cellules hématopoïétiques [287-289], et à un moindre degré dans la prostate, le tissu cérébral, les cellules endothéliales et certains

épithéliums [281]. SHP-1 joue un rôle important dans la transduction du signal de nombreux récepteurs, dont les récepteurs TCR et BCR des cellules T et B [281], mais aussi de KIT, récepteur du Stem-Cell Factor [290]. Cette expression limitée aux cellules hématopoïétiques explique en partie que SHP-1 n'ait jamais été identifiée dans les modèles d'activation PDGF-dépendant, qui ont principalement utilisé des cellules mésenchymateuses. C'est probablement pour cette même raison qu'il n'a pas été identifié comme un partenaire naturel de PDGFR $\alpha$ , ce dernier étant physiologiquement peu ou pas exprimé dans les cellules hématopoïétiques.

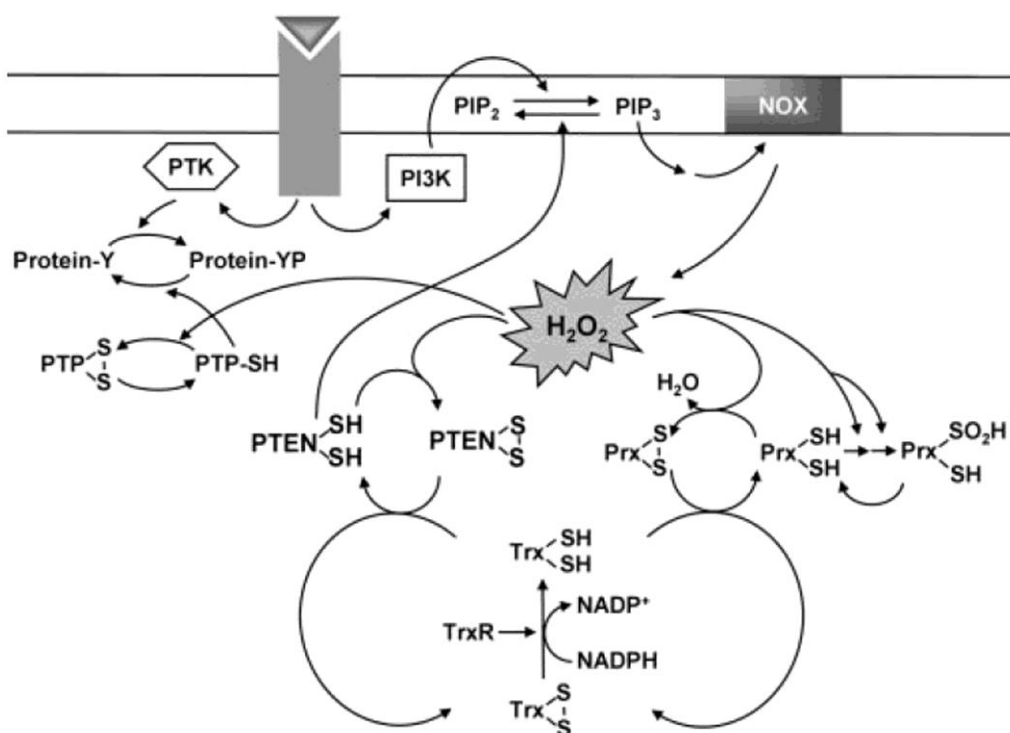
#### *Schéma de production et d'action des ROS produits par stimulation de PDGFR $\alpha$*

Dans des cellules non phagocytaires, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apparaît comme un second messenger indispensable à la transduction du signal de nombreux RTK, dont les PDGFRs (figure 15). Sa production met en jeu l'activation de la PI3-K, de Rac-1 et de la NADPH oxydase. Il amplifie le signal de phosphorylation en inactivant temporairement des PTP, et bloque sa propre dégradation en oxydant la PRX-2. Après réduction, la PRX-2 peut alors métaboliser l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire, autorisant alors la réduction des PTP et le blocage de la cascade de phosphorylation. Pour exercer ses fonctions de signalisation, la concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doit pouvoir s'élever rapidement au dessus d'un certain seuil (10 à 100 $\mu$ M) et pendant une certaine durée afin d'oxyder les molécules effectrices. Elle doit être rapidement et localement réduite afin de maintenir une concentration cellulaire non toxique (<0,1 $\mu$ M) [291]. Des travaux récents suggèrent que ces phénomènes de dégradation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont localisés dans des micro-domaines cellulaires proches des lieux de synthèse, évitant ainsi les possibilités de diffusion cytoplasmique des ROS et limitant leurs capacités toxiques [277, 292]. Un élément essentiel pour conforter le rôle de second messenger de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était donc de s'assurer d'une synthèse intra-cytoplasmique extrêmement localisée, toujours dans l'optique de limiter les phénomènes toxiques. Ce facteur apparaît pourtant en contradiction avec le fait que la NADPH oxydase soit habituellement assemblée sur la membrane plasmique et qu'elle produise l'anion superoxyde dans le compartiment extracellulaire. Il apparaissait dans ce contexte difficile d'imaginer une régulation fine d'un processus intracellulaire par simple diffusion passive de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du milieu extra vers l'intracellulaire. C'est finalement l'identification récente de complexes fonctionnels de la NADPH oxydase dans divers compartiments cellulaires (endosomes surtout, mais aussi noyau, radeaux lipidiques) [293, 294], ainsi que le développement de nouvelles techniques d'imagerie subcellulaire capables de localiser la production spécifiquement d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui ont permis d'asseoir ce rôle modulateur intracellulaire de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [295]. Toutefois, l'ensemble de ces phénomènes ont initialement été

**Figure 15: Mécanismes de production et de dégradation de l' $H_2O_2$  après stimulation d'un récepteur tyrosine kinase**

La stimulation du PDGFR provoque l'activation de la PI3-K, qui catalyse la conversion de PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>. Le PIP<sub>3</sub> permet l'assemblage de la NADPH oxydase (NOX) et la production d' $H_2O_2$ . L' $H_2O_2$  ainsi généré inactive transitoirement la peroxyredoxine-2 (Prx), favorisant ainsi l'accumulation locale d' $H_2O_2$ , à l'origine de l'inactivation (par oxydation) des PTEN et d'autres phosphotyrosines phosphatases (PTP) dont les SHP. Cette dernière, inactivée, autorise la propagation du signal induit par la tyrosine kinase. Enfin, la réduction des peroxyredoxines oxydées par une thioréductase permettra leur ré-activation et donc l'élimination de l' $H_2O_2$ , la réactivation des PTPs, et la fin de la signalisation.

Adapté de Kwon J, Proc Natl Acad Sci U S A; 2004.



mis en évidence dans des lignées cellulaires mésenchymateuses, et leur rôle dans des cellules hématopoïétiques restait à démontrer.

## IV Relation PDGFRs, ROS et hématopoïèse

### IV.A PDGFRs et hématopoïèse

Les travaux les plus nombreux ont concerné le PDGFR $\beta$ , dont la présence au niveau protéique a été constaté dans les mégacaryocytes, les plasmocytes, les précurseurs érythrocytaires et myéloïdes [296]. En revanche, les CSH CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> n'expriment aucun PDGFRs, mais la culture en présence de PDGF-BB peut induire l'expression de PDGFR $\beta$  dans des cellules plus engagées [297]. Dans des co-cultures de cellules stromales et de cellules hématopoïétiques, le PDGF-BB, ligand du PDGFR $\beta$  semble capable de stimuler la croissance de progéniteurs hématopoïétiques [298], de précurseurs érythrocytaires [299, 300] et mégacaryocytaires [301-303] ainsi que d'induire une différenciation monocytaire/macrophage [297, 304, 305]. Dans les modèles murins d'inactivation du PDGF-B [306] ou du PDGFR $\beta$  [307], une altération notable de l'hématopoïèse était constatée, incluant anémie et thrombopénie notamment. Cette action sur la mégacaryopoïèse est corroborée par la correction d'une thrombopénie post-radique chez la souris grâce au PDGF-BB, dans les mêmes proportions que la thrombopoïétine, et inhibée par l'imatinib [308]. Toutefois, l'existence d'une hématopoïèse strictement normale dans un modèle de transplantation de progéniteurs médullaires invalidés pour *PDGFRB* ou *PDGFB* permet d'évoquer un mécanisme d'action impliquant principalement les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire, qui expriment naturellement les PDGFRs [309], plus qu'une action directe du système PDGF-B/PDGFR $\beta$  sur les cellules hématopoïétiques.

L'étude de l'expression du PDGFR $\alpha$  dans les cellules hématopoïétiques a fait l'objet d'un faible nombre de travaux. Il n'apparaît pas exprimé dans les cellules CD34<sup>+</sup> [297] mais a été identifié dans des cellules blastiques de LAM chez 9/20 patients (45%), contre 90% pour le PDGFR $\beta$  [310]. Les mégacaryocytes expriment de manière fonctionnelle le PDGFR $\alpha$  et le PDGFR $\beta$  [302]. Dans un modèle KO pour le PDGF-AA, l'hématopoïèse est normale (les souris développent un emphysème sévère) [311], tandis que les souris *Ph* homozygotes meurent au stade embryonnaire, avec des phénomènes hémorragiques et d'importantes anomalies neurologiques et osseuses, mais sans anomalie sanguine décrite [208].

Deux équipes ont recherché l'expression des PDGFRs sur les éosinophiles circulants humains. L'une d'entre elle a pu identifier en RT-PCR le PDGFR $\beta$  (4 patients/8) et le PDGFR $\alpha$  (1/8), alors que l'analyse en cytométrie en flux (critiquable car réalisée sur sang total) montrait une expression plus importante du PDGFR $\beta$  vs PDGFR $\alpha$  [312]. Chez les 4

patients exprimant PDGFR $\beta$ , l'AG1295, inhibiteur sélectif des PDGFRs, semblait capable d'inhiber le chimiotactisme induit par l'éotaxine, suggérant une coopération entre CCR3 et PDGFR $\beta$ . Une deuxième équipe a pu démontrer des propriétés activatrices du PDGF sur les éosinophiles sanguins, tant sur la sécrétion d'EDN, d'EPO, que sur la production de ROS extracellulaires. Toutefois, cet effet n'était pas obtenu avec le PDGF-AA, et les auteurs ne purent démontrer l'expression d'un PDGFR sur les éosinophiles [313].

Si l'expression et le rôle de PDGFR $\alpha$  reste pour l'instant discutable dans les cellules hématopoïétiques à l'état physiologique, son expression semble surtout importante dans les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire, où il pourrait jouer par exemple un rôle paracrine important dans l'entretien de la leucémie lymphoïde chronique [314].

## **IV.B ROS et hématopoïèse**

Si le rôle de messenger intracellulaire des ROS a été initialement établi dans des cellules non hématopoïétiques, leur importance dans l'hématopoïèse physiologique et pathologique a fait l'objet de nombreuses publications depuis 10 ans, permettant d'établir de manière formelle leur implication aussi bien dans l'homéostasie des CSH que dans la prolifération cellulaire au cours de leucémies chroniques ou aiguës.

### **IV.B.1 ROS et CSH**

#### **IV.B.1.a Influence des ROS dans l'engagement des CSH**

Comme nous l'avons précédemment vu, la caractéristique principale des CSH réside dans leur quiescence et leur capacité d'auto-renouvellement. Si de nombreux facteurs de transcriptions, de chimiokines, d'intégrines sont impliqués dans le maintien de ces propriétés [61, 315, 316], les ROS sont récemment apparus comme des acteurs déterminants de la régulation du pool de CSH.

Les premières constatations ayant suggéré la capacité des ROS à limiter les capacités d'auto-renouvellement des CSH sont issues des modèles murins d'ataxie-télangiectasie, où la mutation du gène *ATM* induit une diminution du pool de CSH associé à une augmentation du niveau de ROS intracellulaires dans ces CSH. L'utilisation d'antioxydant (catalase ou NAC) permettait de restaurer la capacité d'auto-renouvellement des CSH [317]. Cette altération de fonction résulterait d'une activation de la p38 MAPK par l'élévation des ROS [318].

Cette importance des ROS dans l'homéostasie des CSH a été aussi illustrée par les modèles murins d'invalidation des FT de la famille Forkhead O (FoxO1, FoxO3 et FoxO4). Ces facteurs FoxO, physiologiquement inhibés par l'activation PI3-K/AKT, régulent le niveau de

ROS en induisant l'expression de la catalase, de la PRX-2 et de la SOD [319, 320]. Leur inactivation conditionnelle réduit le nombre de CSH, tout en augmentant les ROS, et là encore de manière réversible par la NAC [321]. De même, l'invalidation du gène PTEN, codant pour une phosphatase régulant négativement la voie PI3-K/AKT et les facteurs FoxO, conduit aussi à une déplétion des CSH [322].

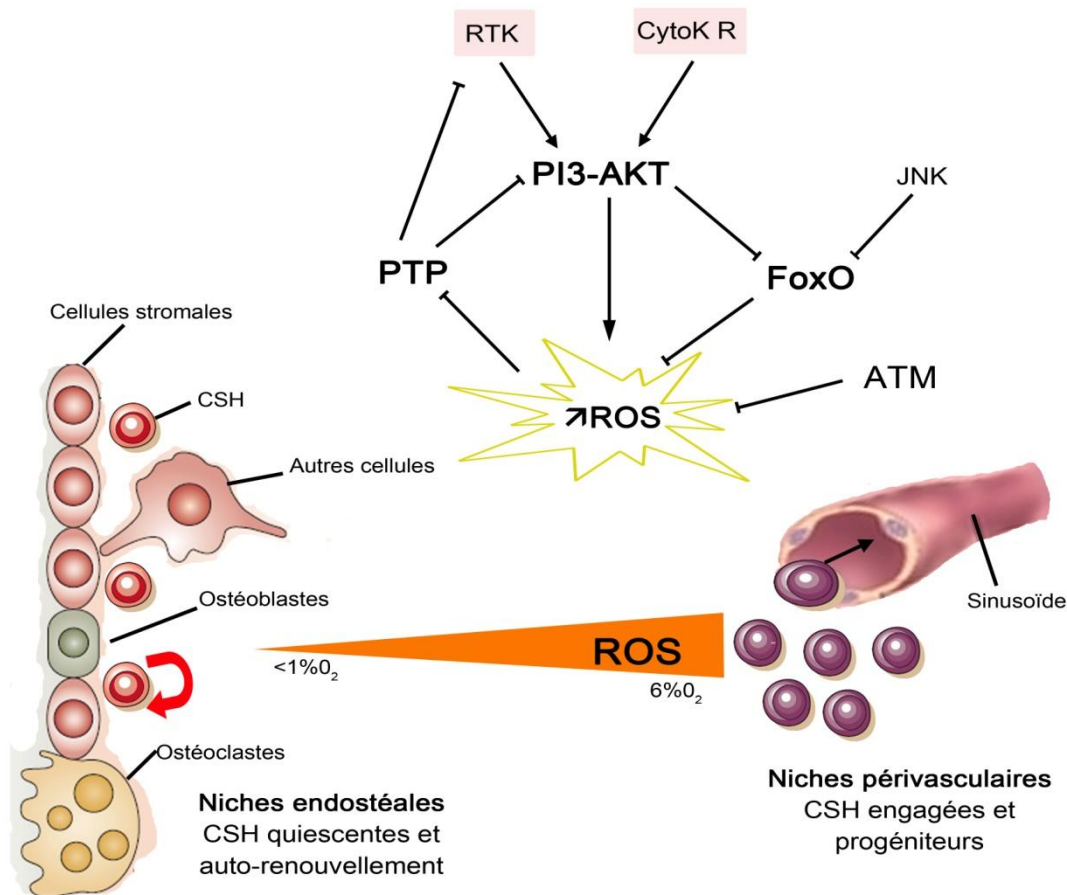
Ces données ont pu être confirmées de manière convaincante par l'analyse des fonctionnalités des CSH selon le niveau des ROS intracellulaires [323]. Les CSH à faible niveau de ROS intracellulaires avaient une capacité d'auto-renouvellement accrue *in vivo* et *in vitro* comparativement aux CSH à haut niveau de ROS (figure 16). Les capacités d'auto-renouvellement de ces dernières étaient restaurées par le NAC et un inhibiteur de p38MAPK. Dans le modèle d'invalidation de FoxO, un autre impact notable et inattendu de cette élévation de ROS était l'existence d'une différenciation myéloïde accrue [324]. Cet effet des ROS sur l'engagement et la différenciation myéloïde était aussi retrouvé *in vivo* lors de greffe de CSH à haut niveau de ROS endogènes, qui entraînait la reconstitution de 52% de cellules myéloïdes, contre 22% lors de transplantation avec des CSH à faible niveau de ROS [323]. Ces données ont ensuite été confirmées chez la drosophile [325]. Alors que leurs CSH ont un faible niveau de ROS, leur engagement en progéniteurs s'associe à une augmentation transitoire d'expression des ROS. L'augmentation sélective des ROS induite par l'invalidation de la SOD dans les progéniteurs favorisait leur différenciation, tandis que la diminution des ROS (par l'expression de la catalase, la SOD ou la glutathion peroxidase) freinait leur différenciation myéloïde. Cette élévation du taux de ROS dans les progéniteurs CMP, comparativement au CSH, était aussi identifiée chez la souris [321]. En revanche, il n'est pas encore démontré, chez l'homme, que cette variation du taux de ROS soit un pré-requis nécessaire à l'engagement dans la différenciation cellulaire.

Toutefois, des arguments indirects plaident pour cette hypothèse. Par exemple, les ROS jouent un rôle dans la signalisation de différents facteurs de croissance hématopoïétiques, dont l'IL-3, le G-CSF et le GM-CSF, en induisant l'activation de STAT5, PI3K/Akt, et Ras/MEK/ERK, et la progression du cycle cellulaire des CSH en phase S [262, 326, 327]. Le TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate), un agent de différenciation macrophagique, semble exercer son effet en augmentant la production de ROS suite à une diminution d'expression de la catalase [328]. Enfin, une équipe française a récemment évalué les effets d'une privation en fer sur des lignées cellulaires blastiques, des cellules leucémiques humaines et des CSH de sang de cordon. Elle a ainsi pu montrer que les chélateurs du fer pouvaient induire une différenciation monocyttaire dépendante de la production de ROS. La encore, les molécules



### Figure 16: Influence des ROS sur les cellules souches hématopoïétiques

De nombreux facteurs influencent les capacités de quiescence et d'auto-renouvellement des CSH (liste non exhaustive en bas de figure). Les ROS, et plus particulièrement le niveau d'oxygénation au sein des niches endostéales, semblent être des éléments déterminants du maintien des capacités d'auto-renouvellement des CSH. Dans les CSH, le niveau de ROS est sous la dépendance des facteurs FoxO, ATM, mais aussi de l'activation de récepteurs kinases et de la voie PI3-K-AKT.



#### Facteurs impliqués dans l'homéostasie des CSH dans les niches endostéales (liste non exhaustive)

- CXCL12/CXCR4
- Ostéopontine, parathormone
- Molécules d'adhésion : Selectines, Intégrines  $\alpha 4$ , VCAM-1, N-cadhérines
- Angiopoïétine-1/ Tie2 (CD202)
- Thrombopoïétine/MPL, GCS-F, KIT/SCF
- Annexine-II
- Récepteur au calcium
- Voies Notch, Wnt
- Gradient de ROS
- Hypoxia inducible Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )
- Système nerveux sympathique
- Cellules souches mésenchymateuses, macrophages, ostéoclastes, ostéoblastes

clés de la signalisation identifiées étaient JNK et p38MAPK [329]. Ces données étaient confortées par l'amélioration de la survie dans un modèle murin de xélogreffe de cellules leucémiques, et surtout par l'efficacité clinique (correction des cytopénies et différenciation des blastes) chez un patient traité par chélateur du fer.

#### IV.B.1.b Niches hématopoïétiques et gradient de ROS

Il est maintenant bien établi que les CSH sont localisées dans des niches hématopoïétiques dont la constitution cellulaire et le microenvironnement jouent un rôle déterminant dans le maintien du pool de CSH ou dans leur engagement dans la différenciation en MPP [316]. Les CSH résident principalement dans les régions médullaires hypoxiques [330]. Ces faibles taux d'oxygène offrent ainsi une protection des CSH contre un niveau élevé, toxiques, de ROS. Schématiquement, on distingue actuellement des niches endostéales, au contact des ostéoclastes et des cellules mésenchymateuses, et des niches périvasculaires, au contact des vaisseaux médullaires, avec des différences significatives en concentration en oxygène (figure 16). Ces dernières, proches des vaisseaux, ont en effet un niveau d'oxygénation plus élevé (6% *versus* 1%) [331]. Des CSH ont été identifiées dans ces 2 compartiments anatomiquement distincts [332], mais leur capacité d'auto-renouvellement et de quiescence semblent différer selon leur localisation. Dans les niches endostéales, à faible niveau d'oxygénation, les CSH resteraient quiescentes [333] et conserveraient de plus grandes capacités de reconstitution hématopoïétiques lors de transplantations successives, alors que leurs capacités de prolifération et de différenciation seraient accrues dans les régions périvasculaires [315, 316, 334].

#### IV.B.2 Propriétés oncogènes des ROS dans les leucémies

La constatation d'une induction possible de ROS par des tyrosines kinases, de leur possible effet prolifératif et de la démonstration de leur implication dans l'hématopoïèse a naturellement conduit à investiguer cette voie de signalisation dans la LMC, modèle emblématique d'une pathologie induite par l'activation d'une TK. Sattler *et coll* ont ainsi pu observer une production de ROS induite par l'expression de BCR-ABL dans différentes lignées hématopoïétiques, à l'origine d'une inhibition des PTP [335]. Cette production de ROS, inhibée par l'imatinib [335], apparaît dépendante de l'activation par BCR-ABL de la voie PI3-K/AKT [336], molécules effectrices par ailleurs connues dans cette leucémie. Dans la lignée cellulaire BaF3, l'origine des ROS semble être la sous-unité Nox 4 (homologue de la sous-unité catalytique gp91<sup>phox</sup> phagocytaire) [337]. Enfin, l'inhibition de la production de

ROS induite par BCR-ABL permet de bloquer la croissance cellulaire [336], démontrant l'effet prolifératif d'un excès de ROS dans les lignées BCR-ABL+ [338].

Une des problématiques majeures dans la prise en charge thérapeutique de la LMC est la survenue de mutations dans le domaine kinase d'ABL, induisant une résistance à l'imatinib. Les ROS, à un haut niveau, sont de puissants agents mutagènes. Cette toxicité des ROS a pu être démontrée dans des modèles murins de LMC. En effet, la survenue de mutations du domaine kinase de BCR-ABL (dont la mutation T315I) était directement corrélée au niveau de ROS [339]. Des cellules exprimant BCR-ABL et chez lesquelles la production de ROS étaient inhibée (soit par des antioxydants, soit par un mutant de BCR-ABL n'induisant pas la production de ROS), développaient moins de mutations du gène BCR-ABL, *in vitro* et *in vivo* [339, 340]. En outre, lors de cultures de cellules humaines BCR-ABL de patients ayant une LMC en phase blastique, les antioxydants apparaissaient capable de prévenir l'apparition de mutations induisant une résistance à l'imatinib [339].

Le rôle oncogène des ROS a aussi été démontré dans les leucémies aigües. Des mutations de RAS sont observées dans 15 à 20% des leucémies aigües myéloblastiques [341]. Exprimé dans des CSH CD34<sup>+</sup> humaines de sang de cordon, RAS muté induit la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> par l'activation de la NADPH oxydase. Cette production des ROS favorise la prolifération (mais pas la différenciation) des cellules transfectées, mais réduit au contraire la survie de CSH sauvages lors de co-cultures [342].

Un dernier exemple d'implication des ROS dans les LAM provient de l'identification de mutations des isoformes 1 ou 2 de l'isocitrate deshydrogénase *IDH* [343, 344]. Présente dans près de 10% des LAM, ces mutations, de mauvais pronostic [345], exerceraient leur effet leucémogène par la production exagérée de ROS et de HIF-1 $\alpha$  qui affecterait la quiescence, la différenciation des CSH et induirait leur prolifération [346, 347].

### **IV.B.3 ROS et éosinophiles**

De très nombreux travaux ont étudié la production de ROS par les éosinophiles. Il s'agissait presque exclusivement d'études sur le pouvoir cytotoxiques des PNE, mesurant les ROS sécrétés dans le milieu de culture par chimioluminescence (avec le luminol), dans l'asthme, la défense antiparasitaire ou plus récemment dans la défense anti-mycobactérienne [348].

La capacité des PNE à produire des ROS intracellulaires a été démontré récemment, en utilisant les mêmes agents stimulants que pour l'étude des ROS exogènes [349] : le formyl-méthionine-leucine-phénylalanine (fMLP) provoquait, en plus de la sécrétion de ROS et de protéines cationiques, un doublement de la quantité de ROS intracellulaires. La NAC inhibait

cette production, mais surtout inhibait la translocation membranaire des sous-unités p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase, suggérant indirectement que le niveau de ROS intracellulaires pourrait contrôler l'activation de la NADPH oxydase [349]. Surtout, comme dans les neutrophiles, la présence respective des 2 sous-unités gp91<sup>phox</sup> [350] et gp22<sup>phox</sup> [351] a pu être identifiée dans les granules des PNE, suggérant la possibilité théorique d'une production endogène plutôt qu'une diffusion passive à partir du milieu extracellulaire. Il n'existe à ce jour que des données parcellaires sur la fonctionnalité de ces ROS endogènes dans les PNE. Comme nous l'avons vu, les ROS seraient indispensables à la libération des traps [191]. Ils joueraient un rôle effecteur dans l'apoptose des éosinophiles induite par le récepteur inhibiteur Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglec)-8. Enfin, il semble que la viabilité de PNE humains sanguins ou tissulaires pourrait être influencée par les conditions d'oxygénation de l'environnement, avec notamment une viabilité accrue en conditions hypoxiques (O<sub>2</sub><3%) [352]

En conclusion, l'ensemble de ces travaux, réalisés dans des modèles murins, suggèrent fortement un rôle important des ROS endogènes dans l'homéostasie des cellules hématopoïétiques, en physiologie et dans certaines hémopathies myéloïdes. A des concentrations extrêmes (hautes ou basses), ils agissent comme suppresseurs de tumeurs en induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [338]. En revanche, dans des variations proches de la situation physiologique et selon un niveau d'expression très finement régulée par des molécules antioxydantes comme les peroxiredoxines ou la catalase, ils moduleraient le maintien de la quiescence et des capacités d'auto-renouvellement, ou au contraire l'engagement vers la différenciation, notamment myéloïde. La LCE F/P+ représente en ce sens un modèle exemplaire de dérégulation des voies de signalisation dépendantes de tyrosines kinases, dans une cellule, le PNE, à fortes potentialité oxydative, dans laquelle il paraissait donc légitime de rechercher des perturbations du métabolisme oxydatif.

## OBJECTIFS

Si le mécanisme initiateur de la leucémie F/P est parfaitement identifié (le gène de fusion *FIP1L1-PDGFR $\alpha$* ), la cytogénétique hématologique et l'analyse des voies de transduction n'ont pas apporté d'explication sur la singularité de la prolifération éosinophile presque exclusive ainsi que sur le profil de cytotoxicité particulier à cette forme de SHE. L'ensemble des données actuellement disponibles n'a envisagé cette problématique que par l'intermédiaire de modèles murins, de lignées cellulaires exprimant constitutivement F/P (EOL-1) ou transformées par l'expression de F/P. De plus, la plupart de ces travaux ont systématiquement orienté leur recherche vers les voies de signalisation déjà identifiées dans la LMC, modèle pathologique proche de la LCE. Seul le travail sur les CSH murines où l'expression de F/P permettait l'induction de GATA-1, et donc la différenciation en éosinophiles, ont apporté un élément de réponse convaincant. Par ailleurs, il n'existe à ce jour aucune donnée dans la littérature sur une éventuelle expression physiologique constitutive (ou inductible) du PDGFR $\alpha$  sur des PNE humains (en dehors de la LCE F/P+) et sur ses fonctions éventuelles, notamment dans la production de ROS.

Dans un premier temps, nous avons choisi de comparer sans *a priori* les protéomes de PNE sanguins de patients ayant une LCE F/P+ à ceux de sujets contrôles par une analyse en électrophorèse bi-dimensionnelle en fluorescence (2 Dimension-Differential In Gel Electrophoresis, ou 2D-DIGE). L'analyse des protéines différentiellement exprimées dans ces 2 groupes a permis d'identifier une modification d'expression de 41 protéines cytosoliques. Près de 20% d'entre elles étaient impliqués dans le métabolisme oxydatif endogène, dont la SHP-1 et la PRX-2, connues par ailleurs pour jouer un rôle dans la signalisation du PDGFR $\alpha$ . Nous avons pu conforter la singularité de ces modifications en comparant le niveau d'expression de ces protéines dans des PNE de patients F/P+ à ceux de patients ayant un SHE idiopathique. Enfin, la signification de ces modifications était vérifiée à la suite d'un traitement par imatinib de la lignée cellulaire EOL-1 F/P+ (Article).

Dans un deuxième temps, nous avons confirmé à la fois, la capacité de production de ROS intracellulaires par des PNE F/P+ et la lignée EOL-1, et l'inhibition de cette production par l'imatinib. Nous nous sommes ensuite interrogés sur les modalités d'expression physiologique du PDGFR $\alpha$  sur des PNE non clonaux. Ces premiers résultats, très

préliminaires en raison d'un nombre insuffisant de patients recrutés, sont néanmoins présentés en annexe, car ils constituent un prolongement instructif aux précédents travaux. En utilisant plusieurs approches expérimentales (cytométrie en flux, immunofluorescence), nous avons pu mettre en évidence l'expression membranaire et cytoplasmique du PDGFR $\alpha$  chez des sujets atteints de parasitoses, de SHE mais aussi chez un sujet sain. Nous avons abordé ensuite l'approche fonctionnelle du PDGFR $\alpha$  en analysant les effets du PDGF-AA sur des PNE circulants. Nous avons ainsi mis en évidence une augmentation des ROS endogènes, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'ECP et d'EDN, mais pas d'EPO. Ces premiers résultats encourageants ouvrent d'intéressantes perspectives sur les liens qu'entretiennent signaux de transduction et métabolisme cellulaire et peuvent contribuer au futur développement de nouvelles approches fécondes sur la biologie des éosinophiles.

## PRESENTATION DE L'ARTICLE

*« Comparative Proteomic Analysis of Blood Eosinophils Reveals Redox Signaling Modifications in Patients with FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -Associated Chronic Eosinophilic Leukemia »*

L'objectif de cet article a été d'identifier un large éventail de protéines, notamment impliquées dans le métabolisme oxydatif, dont l'expression pouvait être modifiée par l'expression non contrôlée de F/P dans des PNE circulants de patients ayant une leucémie F/P+, et qui seraient susceptibles de jouer un rôle physiopathologique dans cette maladie

Nous avons délibérément choisi comme premier élément de référence les éosinophiles circulants de patients ayant une LCE F/P+. Ce choix nous apparaissait comme le plus judicieux dans l'optique d'une analyse de leur profil cytotoxique singulier, ces cellules circulantes étant les plus proches des PNE tissulaires cytotoxiques. L'obtention de CSH humaines F/P+ de patients étant par ailleurs impossible, il a été convenu d'approcher les mécanismes de transformation cellulaire sur les PNE circulantes de patients, en ayant conscience d'être très en aval des mécanismes primaires, mais en partant du principe que l'activité kinase de F/P était permanente et que les modifications initiales pouvaient être retrouvées à un stade ultime de différenciation.

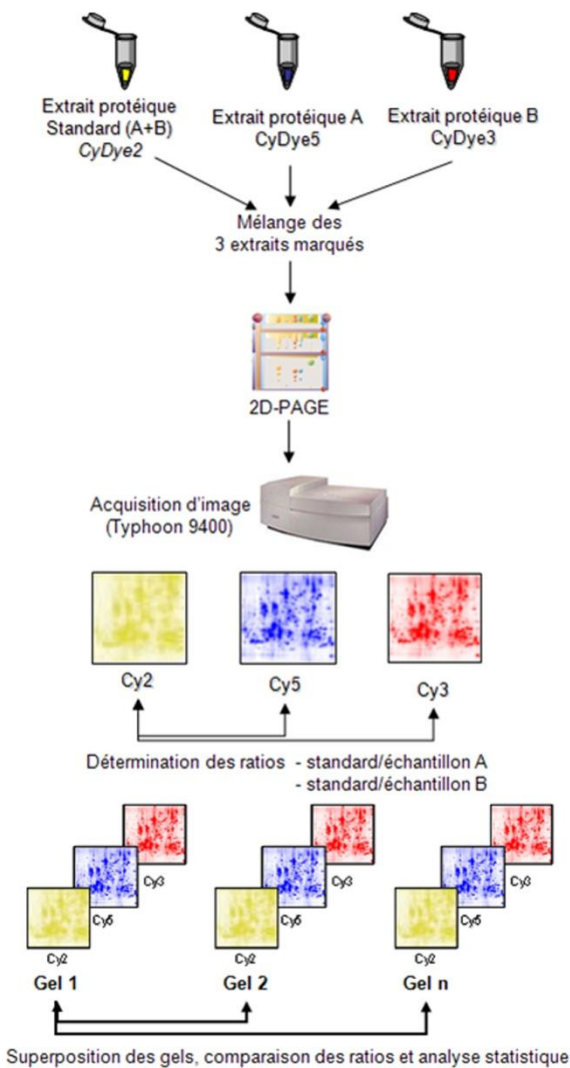
Nous avons donc décidé d'appliquer initialement une démarche protéomique comparative d'identification de protéines différenciellement exprimées entre des PNE F/P+ et des PNE contrôles de sujets sains, en utilisant la technique actuellement la plus sensible, discriminante et reproductible d'électrophorèse sur gel, la 2D-DIGE (figure 17). Cette approche, sans *a priori* mais critiquable en raison de son caractère descriptif, offre toutefois la possibilité d'analyse d'une très large gamme de protéines, dont l'expression est susceptible d'être modifiée par F/P+ et qui pourrait être impliquées dans la prolifération, la différenciation ou la toxicité cellulaire.

### **Résultats :**

La comparaison des protéomes des PNE F/P+ versus des PNE de sujets contrôles sains non atopiques a permis d'observer une modification d'expression significative (définie par un



Figure 17: Principe de l'analyse en 2D-DIGE



Gel	Cy2	Cy3	Cy5
1	SI	C 1	F/P 4
2	SI	F/P 3	C 2
3	SI	C 3	F/P 2
4	SI	F/P 1	C 4

C: extraits protéiques des PNE de sujets contrôles  
 F/P: extraits protéiques de PNE de sujets F/P+  
 SI (Standat Interne) = quantités équivalentes de C1+C2+C3+C4+F/P1+F/P2+F/P3+F/P4

**Etape 1:** Une extraction protéique est réalisée à partir des PNE des patients F/P+ et des sujets contrôles. Un standart interne (SI), utilisé pour la comparaison inter-gels, est réalisé en poolant chacun des 8 extraits obtenus

**Etape 2:** Chacun des échantillons est incubé avec un marqueur fluorescent différent (CyDye2, 3 ou 5) qui se lie aux résidus lysines

**Etape 3:** Les échantillons sont mélangés tel que représentés sur le tableau ci dessus, et une migration par électrophorèse 2D est réalisée sur 4 gels différents

**Etape 4:** Chaque gel, comprenant donc le SI (identique dans les 4 gels) et un échantillon différent des groupes C et F/P, est analysé au lecteur Typhoon

**Etape 5:** Le logiciel DeCyder permet une superposition puis une comparaison de chacun des spots des 8 conditions, repérant ainsi les protéines sur- ou sous-exprimées entre les 2 groupes.

**Etape 6:** Ces protéines seront par la suite excisées d'un gel et identifiées en spectrométrie de masse

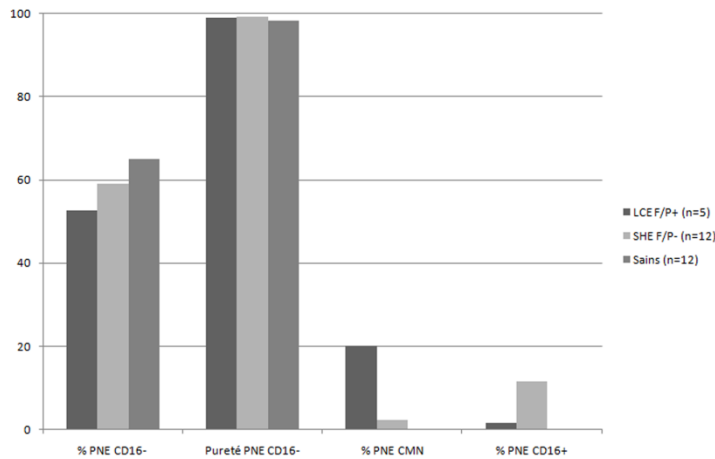


ratio d'expression  $>$  ou  $<$  à 1.5) de 113 protéines cytoplasmiques. Parmi les 41 protéines identifiées en spectrométrie de masse, 18% apparaissaient impliquées dans la signalisation redox et le métabolisme oxydatif. Parmi elles, la PRX-2, connue pour réguler la signalisation d'aval de PDGFR $\alpha$  dans des cellules non phagocytaires, la catalase et la 15LOX-1 étaient sous-exprimées dans les PNE F/P+. SHP-1, PTP considérée comme inhibitrice des RTK, était en revanche surexprimé chez les dans les PNE F/P+. Les modifications d'expression de PRX-2 et de SHP-1, confirmées en immunoblot, étaient spécifiques aux PNE F/P+, après étude comparative des extraits protéiques issus de PNE contrôles et de PNE des patients ayant un SHE idiopathique. Enfin, ces modifications singulières étaient corrigées par l'imatinib dans la lignée EOL-1 (issue d'un patient ayant une LCE F/P+ et exprimant naturellement la protéine de fusion F/P). Ces résultats confortent l'hypothèse d'un lien direct entre la protéine F/P+ et les modifications observées de PRX-2 et SHP-1. L'interrelation, par ailleurs démontrée dans d'autres systèmes, de ces protéines avec le métabolisme oxydatif, la différenciation hématopoïétique et la prolifération cellulaire dépendante de PDGFR $\alpha$  nous ont fait envisager la possibilité du rôle potentiel de F/P dans la production induite de ROS endogène. Ces derniers ne pourraient être catabolisés en raison de la diminution observée du taux de PRX-2. Cette persistance de ROS cytoplasmiques entraînerait donc une inactivation de SHP-1 par oxydation, autorisant la poursuite de la cascade de phosphorylation, et ainsi la prolifération. La survenue de ces événements dans un précurseur éosinophile, à forte capacité potentielle de production de ROS comparativement aux autres cellules hématopoïétiques, pourrait ainsi favoriser ou maintenir son engagement vers ce lignage. C'est cette hypothèse qui fait l'objet de notre discussion de cet article.

## RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE

### Rendement et pureté après purification des PNE sanguins

- %PNE CD16<sup>-</sup>: rendement de purification par rapport au nombre théorique attendu de PNE (en tenant compte du volume de sang prélevé et du résultat de la formule leucocytaire).
- Pureté PNE CD16<sup>-</sup>: Pureté en PNE de la fraction CD16<sup>-</sup>
- %PNE CMN: % de PNE contenu dans la fraction des cellules mononuclées
- %PNE CD16<sup>+</sup>: % de PNE contenu dans la fraction des neutrophiles CD16<sup>+</sup>

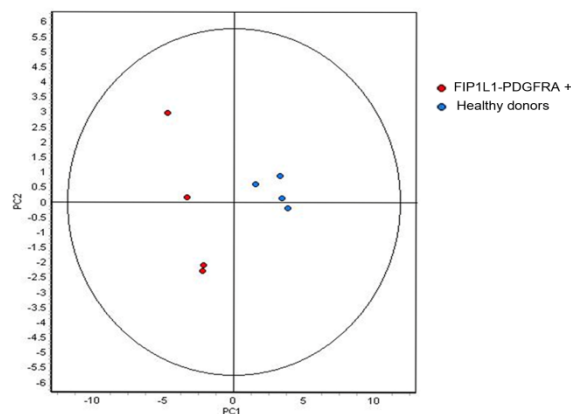


Cette figure illustre la pureté en PNE, toujours supérieure à 95%, de la fraction CD16<sup>-</sup> utilisée pour l'analyse en 2D-DIGE. Le rendement de purification (= nombre de PNE obtenus dans la fraction CD16<sup>-</sup> / (nombre de PNE/ml x volume de sang analysé)) étaient en revanche variable de 53 à 66%, plus faible chez les patients F/P+. Ceci est en partie expliqué par une quantité plus importante de PNE présents dans la fraction des cellules mononuclées, et correspondant le plus souvent à des PNE dégranulés (données non chiffrées)

### Résultats de l'analyse en composant principal (ACP) de l'expérience 2D-DIGE

(= figure 1D de l'article, non publiée par erreur)

Cette figure illustre que les 4 patients F/P+ et les 4 sujets contrôles peuvent être correctement identifiés par l'ACP en F/P+ et sains, uniquement sur la base de l'analyse globale de leur protéome. Ce résultat prouve ainsi la capacité de la 2D-DIGE à discriminer différentes populations cellulaires, sur la base de l'étude quantitative et qualitative de leur protéome.



## DISCUSSION

Dans les hémopathies impliquant une activation constitutionnelle d'une TK, les processus moléculaires identifiés comme leucémogènes (activation des voies PI3-K, MAPK, STAT par exemple) sont souvent communs à différentes anomalies génétiques (*BCR-ABL*, *V617F JAK2*, *TEL-PDGFRB*) et ne suffisent pas, à eux seuls, à expliquer les différents phénotypes clinico-biologique observés, notamment en ce qui concerne le lignage hématopoïétique amené à proliférer.

Dans notre travail de thèse, nous avons comme objectif premier d'identifier de nouvelles voies de signalisation mises en jeu par F/P et susceptibles d'être impliquées dans la différenciation, la survie, la prolifération ou la cytotoxicité des PNE observées dans la LCE F/P+. L'utilisation de l'approche 2D-DIGE sur des PNE F/P+ humains a permis de mettre surtout en exergue des anomalies du métabolisme oxydatif comparativement à des PNE de sujets contrôles, et donc susceptibles d'être directement induites par la protéine de fusion.

Quatre éléments seront plus particulièrement discutés ici :

- la valeur mais aussi les limites de l'approche méthodologique retenue
- l'analyse critique des liens entre les données de l'analyse protéomique et l'action cytotoxique des PNE F/P+
- l'analyse critique des liens entre les données de l'analyse protéomique et la prolifération élective des PNE dans les SHE F/P+
- l'offre de nouvelles perspectives thérapeutiques

**Dans un premier temps, nous allons donc évoquer la valeur et des limites de notre choix méthodologique en discutant de la validation technique et de la pertinence scientifique de notre approche protéomique en 2D-DIGE.**

Une « carte protéomique » donne une information « figée » qui nécessite que les événements moléculaires à apprécier ne soient pas fugaces. L'étude de cellules clonales avec événements oncogènes entretenus, apparaît, en ce sens, appropriée à ce mode d'analyse. Des travaux ont, par le passé, tenté d'identifier des différences entre les protéomes de PNE provenant de sujets allergiques et de sujets sains [353-355]. Ces travaux protéomiques utilisaient une électrophorèse bi-dimensionnelle conventionnelle, moins reproductible et moins résolutive car réalisée sans standard interne et sans marqueur fluorescent, éléments qui offrent à la fois la

possibilité de détection de faible quantité de protéines, et la comparaison quantitative directe de leur expression. Dans la LCE F/P+, pathologie plus « caricaturale », notre analyse 2D-DIGE a permis la détection de plus de 1000 spots protéiques par gel, contre seulement près de 500 spots dans ces précédentes études protéomiques, confirmant la haute résolution qu'autorisent ces marqueurs fluorescents.

L'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des éosinophiles a été depuis longtemps établie [356, 357]. Cet élément pouvait nous faire douter du bien fondé du choix du substrat d'étude (les PNE) et de cette approche méthodologique. Pourtant, l'analyse en composant principal (résultats complémentaires de l'article), réalisée à partir de notre analyse 2D-DIGE, permet clairement de reclasser correctement, en fonction de leurs protéomes, les différents patients (non préalablement renseignés) en patients F/P+ ou en sujets sains, nous confortant dans la capacité de la technique à identifier de manière pertinente des protéine différentiellement exprimées dans chacun des groupes de sujets testés.

Parmi les critiques régulièrement faites à l'approche protéomique, on retiendra aussi le caractère parfois redondant des protéines identifiées comme discriminantes dans des pathologies extrêmement diverses [358]. Pourtant, là encore, la liste des protéines identifiées comme discriminantes entre PNE F/P+ et PNE sains dans notre travail n'est en rien redondante avec les protéines identifiées dans les approches protéomiques antérieures sur les PNE dans l'atopie [353-355], confortant ainsi la relation potentielle entre ces protéines et l'expression entretenue de F/P. Enfin, on retiendra que cette technique, ayant comme support d'analyse les produits terminaux et effecteurs que sont les protéines, évite les écueils classiques de l'analyse transcriptomique (labilité d'expression des transcrits, par exemple). Cette dernière, souvent considérée, à tort, comme capable d'établir une signature fonctionnelle de la cellule, ne permet pas d'évaluer les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles, qui jouent un rôle déterminant dans la production de protéines fonctionnelles. A titre d'illustration, on notera que 54% des protéines différentiellement exprimées entre des CSH murines analysées à différent stades de maturation, sont indétectables par une analyse transcriptomique [359].

Un facteur limitant de notre étude est lié à l'impossibilité d'identification des protéines membranaires et des protéines contenues dans les granules spécifiques du PNE. En effet, ces protéines présentes dans des fractions non solubles, ne peuvent être testées dans notre protocole d'électrophorèse. De plus, la plupart des protéines basiques des granules, ont, comme l'indique leur nom, un pI très basique (>13). Or, les bandelettes d'iso-électrofocalisation utilisées (bandelettes permettant de séparer, dans une première dimension,

les différentes protéines selon leur pI) couvraient une gamme de pH de 3 à 11, n'autorisant donc pas l'individualisation de ces protéines.

L'analyse en 2D-DIGE, couplée à la caractérisation moléculaire en spectrométrie de masse des protéines différentiellement exprimées, a permis d'identifier une dérégulation affectant au moins 41 protéines différentes entre des PNE F/P et des PNE contrôles. Comme lors de toute approche protéomique, nous avons délibérément choisi d'explorer plus spécifiquement certaines protéines dont les modifications d'expression nous semblaient les plus pertinentes à la lumière des données de la littérature. Nous nous sommes donc intéressés à certaines protéines impliquées dans la signalisation redox et susceptibles de jouer un rôle dans la signalisation d'aval de F/P (PRX-2, SHP-1), ainsi qu'à certaines protéines plus spécifiques de l'éosinophile et potentiellement impliquées dans ses propriétés cytotoxiques (15-LOX-1 et PRG2, codant pour le précurseur de la MBP).

**Après cette première évaluation critique du choix de notre approche, nous discuterons des liens entre les données acquises de l'analyse protéomique et les enseignements que l'on peut en tirer sur les potentialités fonctionnelles délétères des PNE F/P+.**

Les diminutions d'expression de PRG2 et de la 15LOX-1 dans des PNE F/P+, observées en 2D-DIGE, nous ont semblé d'autant plus pertinentes qu'elles avaient déjà été constatées dans une analyse comparative d'expression d'ARN et de protéines dans une lignée BaF3 exprimant ou non diverses tyrosines kinases activées [360]. Dans ce travail, l'expression transcriptomique de PRG2 et de la 15-LOX-1 apparaissait, à l'instar de nos résultats, réduite dans la lignée exprimant F/P comparativement à la lignée exprimant le vecteur contrôle. Toutefois, cet effet n'était pas spécifique de F/P puisque ces modifications étaient observées qu'elle que soit la TK exprimée (BCR-ABL, TEL-PDGFRB, D816V-KIT, V617F-JAK2). La diminution d'expression du gène PRG2 était associée à une diminution d'expression protéique (cellules BaF3-F/P+ *versus* BaF3-contrôles, ratio de 0,23). La baisse de la PRG2 observée en 2D-DIGE ne permet pas d'apprécier si elle témoigne d'une réelle diminution de synthèse ou d'une sécrétion accrue de MBP stockées dans les granules. En revanche, la constatation simultanée d'une diminution d'expression du gène et d'une baisse du taux de la protéine après expression de F/P dans la lignée BaF3 soutient plutôt l'hypothèse d'une répression de synthèse de cette protéine cationique induite par F/P. Nous avons constaté, lors des purifications des PNE sur gradient de densité, une augmentation du nombre et du pourcentage de PNE dans la fraction de cellules mononuclées, correspondant le plus souvent à des PNE ayant une moindre quantité de granules cytoplasmiques (PNE qualifiés d'hypodenses). Là

encore, nos résultats ne permettent pas à eux seuls de conclure sur l'implication d'une réelle diminution de production de MBP ou d'une sécrétion accrue de cette protéine cytotoxique dans les PNE F/P+. A l'échelon protéique était aussi constatée, dans les cellules BaF3 exprimant F/P, une forte diminution d'expression des Eosinophil Associated Ribonucléases, ribonucléases murines, correspondant à l'ECP et EDN humaines (ratio de 0,32), ainsi que de l'EPO (ratio de 0,41). Toutefois, l'augmentation de la sécrétion d'ECP et d'EDN induite par le PDGF-AA, constatée chez 2 sujets sains (cf. annexe), pourrait laisser supposer une sécrétion entretenue de ces mêmes protéines dans la situation d'une activation constitutive de F/P. Les conséquences de l'expression de F/P sur le métabolisme et la sécrétion des protéines cationiques restent donc à ce stade très incertaines, et mériteraient d'être étudiées dans des progéniteurs humains F/P+ différenciés en éosinophiles, et stimulés par divers agents activateurs. L'incertitude concernant le rôle des protéines cationiques dans la cytotoxicité des PNE F/P+ nous a fait poser la question d'un mécanisme alternatif. Dans cette perspective, nous nous sommes particulièrement interrogé sur le rôle potentiel de la 15LOX-1 et des ROS extracellulaires.

Nous avons observé une diminution d'expression de la 15LOX-1 dans les PNE F/P+. La 15LOX-1 est une lipoxygénase utilisant comme substrat principal l'acide arachidonique. Elle est capable d'induire la synthèse de médiateurs aux propriétés pro-inflammatoires puissantes (éoxines, dérivés hydroperoxy- ou hydroxy- de l'acide arachidonique), mais aussi de ROS et de molécules aux propriétés anti-inflammatoires (lipoxines) [361]. La baisse d'expression de la 15LOX-1, observée spontanément dans les PNE F/P+, est reproduite par l'expression de différentes TK (BCR-ABL, TEL-PDGFRB, D816VKIT) dans une lignée cellulaire hématopoïétique murine [360], confortant ainsi nos résultats. Toutefois, cette baisse d'expression n'apparaît pas propre à l'induction d'une activité TK spécifique, puisque elle était aussi constatée dans les PNE de nos patients SHE-I. Si l'on retient comme principales fonctions de la 15LOX-1 ses propriétés pro-inflammatoires, nos résultats vont donc à l'encontre de son implication dans les phénomènes cytotoxiques induits par les PNE. D'autres fonctions, plus surprenantes, ont récemment été attribuées à cette enzyme : des propriétés anti-carcinogènes, dans les cancers digestifs [362-364] mais aussi des propriétés de modulation des capacités prolifératives des cellules hématopoïétiques. En effet, l'inactivation du gène codant pour la 12/15-LOX chez la souris provoque un SMP proche de la LMC [365], en altérant la capacité d'auto-renouvellement des CSH et en augmentant la myélopoïèse via une signalisation impliquant les ROS et le FT IRF8 [366, 367]. Si la baisse d'expression de la 15LOX-1 observée chez les patients F/P+ pourrait avoir des effets sur les capacités de

proliférations de précurseurs myéloïdes, elle ne peut être retenue comme une conséquence directe de l'expression de F/P+ puisqu'elle est aussi retrouvée avec les PNE issus du groupe SHE-I. A la lecture de l'ensemble de ces données, il apparaît aujourd'hui difficile d'intégrer cette diminution d'expression de la 15LOX-1 dans un schéma physiopathologique propre à la LCE F/P+.

Les ROS produits dans le milieu extracellulaire par les PNE sont reconnus comme des molécules hautement toxiques. La dérégulation de protéines impliquées dans leur catabolisme dans les PNE F/P+ (PRX-2, catalase notamment), évoque la possibilité d'une production de ROS accrue dans cette situation. En raison de difficultés méthodologiques, nous n'avons pu analyser la production de ROS extracellulaires que chez un seul patient ayant une LCE associée à V617F JAK-2 (cf. annexe). Dans ce dernier cas, cette production était activable par le PDGF-AA, et inhibée à la fois par l'imatinib et le DPI, suggérant tout au moins l'existence d'un PDGFR $\alpha$  fonctionnel sur des PNE JAK et dont l'activation pourrait induire une sécrétion accrue de ROS au potentiel cytotoxique.

**Outre le caractère délétère des PNE, l'un des aspects les plus singuliers de la LCE F/P+ concerne le caractère sélectif de la prolifération qui affecte spécifiquement la lignée éosinophile. Nous discuterons ici des liens que l'on peut établir entre les modifications d'expression de protéines impliquées dans le métabolisme oxydatif identifiées dans notre analyse protéomique et cette singularité.**

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction de la thèse, PRX-2 et les PTPs sont reconnues comme des médiateurs importants de la signalisation d'aval de PDGFR $\alpha$ . Leurs fonctions régulent et sont régulées par les ROS intracellulaires. Nous avons observé dans notre travail une modification d'expression de la PRX-2 (diminution) et de SHP-1 (augmentation) dans les PNE F/P+. Le lien de causalité évoqué entre la présence de F/P et ces modifications est étayé par un niveau d'expression de ces 2 protéines comparable dans les PNE de sujets contrôles et les PNE de patients ayant un SHE-I (significativement différents pour les PNE F/P+), mais aussi par la réversibilité de ces modifications après exposition de la lignée EOL-1 à l'imatinib. La PRX-2 est une enzyme cytosolique capable de réduire en eau l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire produite par le PDGFR $\alpha$ . SHP-1 est une PTP capable de déphosphoryler les RTK activées ou leurs cibles d'aval. L'oxydation des résidus cystéines du site catalytique de PRX-2 et SHP-1 par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne leur inactivation, potentiellement irréversible. Nos résultats suggèrent donc que la baisse d'expression de la PRX-2 (dont la cause reste à déterminer), couplée à la baisse d'expression de la catalase, pourrait majorer le niveau de

ROS intracellulaires initialement produit par le PDGFR $\alpha$  muté et activé. Cette augmentation des ROS entrainerait une oxydation de la SHP-1, l'empêchant ainsi de réguler négativement la cascade de phosphorylation induite par F/P, et ce malgré un niveau d'expression élevé. Ainsi, la persistance de la phosphorylation des cibles d'aval identifiées de F/P (STAT5, RAS/MEK/ERK1/2, p38MAPK et PI3-K/AKT) pourrait expliquer la prolifération cellulaire. La SHP-1 est principalement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, et semble jouer un rôle à de nombreuses étapes de l'hématopoïèse [368]. La compréhension des rôles biologiques de SHP-1 provient principalement de l'observations d'altérations de l'hématopoïèse (expansion de la lignée myéloïde notamment) et immunologiques (auto-immunité) chez les souris *motheaten* (*me/me*), non viables, ou *viable motheaten* (*me<sup>v</sup>/me<sup>v</sup>*), porteuses de mutations récessives « perte de fonction » du gène PTPN-6 (codant pour SHP-1) [369, 370]. Ces souris n'expriment pas SHP-1 (*me/me*) ou expriment une forme de SHP-1 partiellement fonctionnelle (*me<sup>v</sup>/me<sup>v</sup>*) [371]. Le parenchyme pulmonaire des souris *me<sup>v</sup>* est infiltré par des macrophages, des neutrophiles et de nombreux PNE, et comporte des remaniements comparables à ceux observés dans l'asthme (fibrose, production exagérée de mucus, et hyperréactivité bronchique) [372]. Cette inflammation s'associe à une expression accrue de cytokines inflammatoires pro-Th2, comme l'IL-4, l'IL-13, et l'IL-5, mais aussi de chimiokines comme l'éotaxine [372]. Ce phénotype n'est pas modifié lors de croisement avec des souris déficientes en lymphocytes T et B [373], suggérant un rôle primordial de la myélopoïèse, et plus particulièrement des mastocytes dans l'initiation des phénomènes inflammatoires [374]. La baisse d'activité de SHP-1 entraîne notamment une différenciation mastocytaire des cellules médullaires, une survie accrue des mastocytes, et augmente leur capacité à sécréter des cytokines pro-Th2 [374]. Si de tels évènements n'ont jamais été étudiés sur les PNE de ces souris, le rôle influent de SHP-1 dans la myélopoïèse en général, et dans la différenciation et l'activation mastocytaire en particulier conforte notre hypothèse qu'une modification d'activité de SHP-1 dans un précurseur éosinophile pourrait avoir un rôle dans la pathogénèse de la LCE F/P+. Notre hypothèse, non vérifiée dans ce travail, est donc celle d'un niveau d'expression élevé, mais sous forme oxydée et donc inactive, de SHP-1 dans les cellules F/P+. La démonstration de cette modification fonctionnelle (baisse de l'activité PTP) aurait nécessité une méthodologie complexe (et non maîtrisée) de préservation de la fonction PTP, comprenant notamment une étape d'extraction cellulaire anaérobie [258, 375], alors même que nous ne connaissons pas les résultats de l'analyse protéomique. On notera tout de même que cette expression accrue de SHP-1, qu'elle que soient ses capacités fonctionnelles, était aussi retrouvée en analyse transcriptomique dans les lignée BaF3 exprimant F/P [360].



Nous n'avons pas non plus observé de différence d'expression des protéines pourtant reconnues comme relayant le signal de prolifération induit par F/P (PI3-K, AKT, MAPK, STATs...). Ceci s'explique là encore par une limite méthodologique de notre approche. En effet, les différences attendues concernant ces protéines d'intérêt se situent au niveau de leur état de phosphorylation plus qu'en terme de quantité. L'absence de traitement préalable de nos extraits protéiques par des inhibiteurs de phosphatases a ainsi restreint nos capacités à identifier ces éventuelles différences, ce qu'autorise au moins théoriquement la 2D-DIGE.

Le schéma suggéré d'une production accrue de ROS intracellulaires directement lié à l'activation constitutive de PDGFR $\alpha$  n'exclut en rien l'implication potentielle d'autres mécanismes leucémogènes préalablement identifiés dans cette leucémie. Néanmoins cette voie singulière pourrait concourir à les amplifier. Bien que soutenue par de multiples données de la littérature, notre interprétation repose sur des hypothèses successives qui mériteraient d'être étayées par des approches complémentaires. Ainsi, notre interprétation de phénomènes pouvant survenir dans la CSL proviennent, en fait, de l'analyse d'une cellule leucémique au stade finale de maturation et n'ayant plus de capacité de prolifération. Le modèle d'étude théorique le plus pertinent serait l'emploi de progéniteurs médullaires humains de patient F/P+, impossibles à obtenir dans cette maladie très rare.

Nos résultats et les hypothèses qui en découlent ont surtout mis en exergue l'implication de la production de ROS endogènes. Le système redox a des potentialités cytotoxiques démontrées dans les lignées phagocytaires. En revanche, dans les cellules mésenchymateuses, il possède des fonctions activatrices de la différenciation ou de la prolifération cellulaire dans des circonstances impliquant une activation de PDGFR $\alpha$ . L'hypothèse suggérée par nos résultats est qu'une dérégulation de cette homéostasie redox, impliquant une augmentation des ROS intracellulaires, pourrait constituer une des voies de signalisation mises en jeu par F/P dans la prolifération éosinophile. L'importance de la production de ROS dans la genèse des PNE a été récemment soulignée dans un modèle animal de rats consanguins Matsumoto Eosinophilic Shinshu (MES). Ces rats développent une HE sanguine ( $1,5$  à  $2 \times 10^9/L$ ) et tissulaire notable dont le mécanisme a été récemment explicité. Ces rats sont porteurs d'une mutation de la sous-unité gp22<sup>phox</sup> (responsable chez l'homme de la granulomatose septique chronique familiale). Cette mutation est responsable d'une inactivation de la NADPH oxydase leucocytaire et donc d'une diminution de la production de ROS [376]. Chez ces rats, l'HE est corrigée par la réintroduction du gène codant pour gp22<sup>phox</sup> dans un œuf fécondé, confirmant bien le lien entre les 2 phénomènes. De plus, le transfert du gène muté sur un autre fond génétique reproduit une HE médullaire et hépatique (sans HE sanguine) [377]. Toutefois, le

caractère germinal de cette mutation peut faire évoquer soit des mécanismes d'action directe sur la cellule hématopoïétique (impact intracrine de la diminution de la production de ROS par la cellule hématopoïétique atteinte), soit des mécanismes indirects plus difficiles à définir. L'argument majeur en faveur de la 1<sup>ère</sup> hypothèse est l'existence, chez ces rat MES, d'une augmentation significative des neutrophiles et des lymphocytes, suggérant un impact global sur l'hématopoïèse, mais dont on ne peut exclure qu'il soit lié à l'environnement hématopoïétique, et notamment à une modification du niveau d'oxygénation des niches hématopoïétiques. *A contrario*, cette même équipe japonaise a constaté, dans les ganglions mésentériques de ces rats, une augmentation de lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> et de leur production d'IL-5, suggérant un mécanisme proche des SHE-L où l'HE serait consécutive à une production accrue d'éosinophilopoïétines d'origine lymphocytaire [378]. Si ces données de l'expérimentation animale confortent l'existence d'un lien étroit entre métabolisme oxydatif et éosinophilopoïèse, cette diminution de synthèse de ROS chez les RAS MES va toutefois à l'encontre de notre hypothèse d'une production accrue de ROS dans le modèle de PNE F/P+. Nous ne disposons pas, à ce jour, d'éléments permettant d'expliquer ces données contradictoires. Nous rappellerons toutefois une observation très surprenante d'un lien entre HE et niveau d'oxygénation tissulaire élevé. Six patients traitées par oxygénothérapie intraveineuse [379] développent tous une HE, avec une médiane à  $2,2 \times 10^9/L$  (+/- 0,65) après 4 semaines de traitement, ( $0,32 \times 10^9/L$  +/- 0,76 en début de traitement). Une normalisation complète de l'HE est obtenue en 10 jours. Le caractère exceptionnel de ce traitement n'a pas permis de fournir des explications solides sur les modalités précises de survenue de cette HE, mais soulève tout de même l'hypothèse qu'une modification de la concentration tissulaire (médullaire) en O<sub>2</sub> (et éventuellement en ROS) pourrait promouvoir, chez l'homme, l'éosinophilopoïèse. Nos résultats préliminaires (cf. annexe) obtenus sur les PNE d'un patient F/P+ et sur la lignée EOL-1 apportent des arguments supplémentaires en faveur de l'hypothèse d'un lien entre la production accrue de ROS et l'expression non contrôlée de F/P. En effet, l'imatinib permet de diminuer le niveau de ROS intracellulaires dans la lignée EOL-1, qui exprime de manière entretenue la protéine F/P. De plus, l'imatinib, ainsi que des inhibiteurs de la PI3-K et de la NADPH oxydase, permettent de manière significative la production de ROS induite par l'IL-5 dans des PNE F/P+ humains.

Cette relation entre production de ROS et PNE est par ailleurs soutenue par le lien établi entre GATA-1, FT essentiel de l'éosinophilopoïèse, et la NADPH oxydase. Outre ses capacités à promouvoir la transcription de gènes spécifiques du PNE, GATA-1, dont l'expression est induite par F/P dans des CSH murines [118], semble être essentiel à l'expression de la sous-

unité catalytique gp91<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase dans un lignée HL-60 différenciée en éosinophile [75]. Cet effet n'était pas retrouvé dans la lignée HL-60 lorsque celle-ci était différenciée en monocytes ou en neutrophiles, suggérant la spécificité de lignage de l'action de GATA-1 sur la NADPH oxydase.

On rappellera enfin que si les modifications moléculaires de la cellule, directement liées à l'évènement oncogène sont primordiales dans le processus leucémogène, d'autres facteurs, notamment exogènes, souvent sous-estimés car complexes à analyser, ne doivent pas être négligés. Le stade de différenciation hématopoïétique auquel survient l'évènement oncogène, ainsi que les interrelations entre la cellule souche leucémique et son environnement (niches et cellules stromales) sont probablement des facteurs déterminants de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

Enfin, à partir de ce modèle pathologique si particulier qu'est la LCE F/P+, nous avons pu démontrer pour la première fois que des PNE non leucémiques (issus de patients ayant un SHE-I, une parasitose, un DRESS) sont aussi capables d'exprimer le PDGFR $\alpha$  natif à l'échelon protéique, aussi bien en immunofluorescence indirecte qu'en cytométrie en flux (cf. annexe). Une étude de l'expression en ARNm est prévue dans le laboratoire pour conforter cette observation (matériel biologique collecté pour RT-PCR). Nous avons de plus constaté, chez des sujets sains, que l'activation par un ligand spécifique du PDGFR $\alpha$  induisait une production accrue de ROS intracellulaires par les PNE, confortant la encore l'hypothèse émise qu'un PDGFR $\alpha$  constitutionnellement activé par la mutation F/P pourrait avoir de telles propriétés. L'expression de ce récepteur semble être variable selon les situations pathologiques étudiées (plus importante chez un sujet présentant une double infection helminthique), suggérant la possibilité d'une expression inductible lors de l'activation du PNE. L'activation spécifique du PDGFR $\alpha$  dans des PNE de sujets sains semble pouvoir induire la sécrétion de certaines protéines cationiques (ECP et EDN), établissant là encore un lien potentiel, à confirmer, entre l'expression de F/P et les dommages tissulaires observés chez les patients.

**Dans cette dernière partie, nous évoquerons les nouvelles perspectives thérapeutiques qu'offrent ces liens entre ROS et processus leucémogènes.**

Le rôle délétère du métabolisme oxydatif est souligné dans un très large éventail de pathologies, notamment dans les pathologies cardiaques, l'athérosclérose, ou dans les maladies neurologiques dégénératives. Ces constatations ont donné lieu à l'évaluation de nombreuses molécules antioxydantes dans l'espoir de prévenir l'apparition de ces maladies,

avec des résultats souvent décevants dans les études prospectives randomisées. Une des molécules les plus représentatives est le resveratrol (3,4', 5-trihydroxystilbene), polyphénol non flavonoïdes retrouvé dans le raisin rouge, les mûres et les cacahuètes. Le resveratrol est suspecté être à l'origine du « French Paradoxe ». Il a des fonctionnalités multiples, dont la capacité à réduire les radicaux  $O_2^-$  [380, 381]. Sa capacité à diminuer la production des ROS par les leucocytes a été identifiée sur les neutrophiles et les monocytes [382]. Il exerce *in vitro* une action pro-apoptotique sur la lignée EOL-1 et réduit sa prolifération à la dose de 50 $\mu$ M [383]. Le resveratrol, sur des PNE de sujets sains, diminue la réponse chimiotactique induite par l'éotaxine, l'activité peroxydase induite par l'IL-5 ainsi que l'expression de l'intégrine CD11b [384]. L'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), polyphénol flavonoïde issue du thé vert et des pommes, et la curcumine (safran des Indes), polyphénol non flavonoïde, possèdent aussi une activité anti oxydante largement évaluée dans les maladies neurologiques, cardiovasculaires ou tumorales. Comme le resveratrol, l'EGCG et la curcumine réduisent la prolifération de la lignée EOL-1 [383, 385]. Si l'intérêt de ces molécules antioxydantes en pathologie humaine reste à démontrer, ainsi que la possibilité d'obtenir *in vivo* les concentrations efficaces *in vitro*, leur efficacité anti-tumorale sur une lignée cellulaire F/P souligne une fois de plus le rôle probable du métabolisme oxydatif dans la prolifération éosinophile induite par F/P.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail, nous avons pu identifier de manière directe et indirecte une perturbation du métabolisme oxydatif intracellulaire au cours de la leucémie à éosinophiles associée à *FIP1L1-PDGFR $\alpha$* . Un travail complémentaire a permis, par ailleurs, de montrer que les PNE non leucémiques avaient aussi la capacité d'exprimer le PDGFR $\alpha$ , et que son activation conduisait à une production de ROS intracellulaires. L'importance d'une régulation extrêmement fine du niveau de ROS intracellulaires a été clairement établie dans l'homéostasie hématopoïétique, et l'augmentation des ROS semble associée à de nombreux processus leucémogènes. La capacité des ROS à promouvoir la différenciation éosinophile et/ou la prolifération de précurseurs d'éosinophiles n'a pas été confirmée dans notre travail. La confirmation d'un tel rôle nécessiterait de disposer de précurseurs hématopoïétiques humains issus de sang de cordon dans lesquels on induirait l'expression de F/P. L'étude de ces cellules transfectées permettrait de confirmer la production de ROS induite par F/P. Surtout, la modulation de la production de ROS pourrait également fournir des données contributives sur l'impact éventuel des ROS sur la différenciation éosinophile et/ou la prolifération cellulaire. Son inhibition pourrait se faire de manière directe (NAC, DPI) ou en bloquant spécifiquement la catalase (3-amino 1,2,4 triazol), la PRX-2 (siRNA), ainsi qu'en évaluant l'effet d'antioxydants potentiellement utilisables chez l'homme (resveratrol, curcumine, EGCG). Cette étude de l'expression de F/P dans un précurseur hématopoïétique permettrait par la même de savoir si les modifications d'expression de la PRX-2 dans les PNE F/P+ sont directement liées à une répression transcriptionnelle ou traductionnelle, ou plus simplement à un phénomène de consommation excessive par le « burst oxydatif ». Surtout, cette approche devrait permettre d'évaluer plus directement l'impact de l'expression de F/P sur la production de protéines cationiques et sur la constitution des granules primaires et secondaires du PNE. Enfin, la mise en évidence, pour la première fois, de la présence du PDGFR $\alpha$  sur dans des PNE sains ou réactionnels à un processus pathologiques pose des questions sur la fonctionnalité de ce récepteur dans la lignée éosinophile. Est-il uniquement impliqué dans la production de ROS, ou exerce-t-il un effet chimiotactique et prolifératif comme dans la plupart des cellules mésenchymateuses où il est classiquement exprimé ?

## **ANNEXE 1 : EXPRESSION DU PDGFR $\alpha$ SUR LES PNE ET CONSEQUENCES FONCTIONNELLES (travaux complémentaires non publiés)**

L'objectif de ces travaux complémentaires, encore préliminaires, a été d'objectiver la capacité des PNE à exprimer PDGFR $\alpha$ , ainsi qu'à produire, après stimulation sélective, des ROS intracellulaires ou des protéines cationiques.

**Ces travaux ont été réalisés grâce à l'aide du Dr Fanny LEGRAND, de Marie DELBEKE, de Sylvie LOISEAU, de Solène GATAULT (Unité INSERM U995 - Equipe 3, Professeur Monique CAPRON).**

### 1- Rationnel et objectifs

Il n'existe à ce jour aucune donnée fiable concernant l'expression du PDGFR $\alpha$  dans les PNE. L'implication d'une forme mutée, activée de ce récepteur dans une leucémie à PNE nous a interrogé sur les modalités de son expression, physiologique ou inductible, dans des PNE en dehors de la LCE F/P+. Nous avons ainsi évalué, sur des PNE humains sanguins n'exprimant pas F/P, l'expression de PDGFR $\alpha$  dans différentes situations (sujet sain, SHE F/P-, HE réactionnelles) et par différentes approches méthodologiques. Par la suite, nous avons étudié certaines potentialités fonctionnelles de ce récepteur, après stimulation par un ligand spécifique (le PDGF-AA), en centrant notre approche sur la production de ROS intracellulaires, mais aussi sur la sécrétion de médiateurs cytotoxiques. Par ailleurs, nos précédents résultats ont fait émettre l'hypothèse d'une production de ROS accrue dans les PNE de patients F/P+. Nous avons, chez un patient F/P+ et sur la lignée EOL-1, voulu confirmer cette hypothèse en évaluant l'effet de l'imatinib sur le niveau de ROS intracellulaires. Nous présentons ici les résultats préliminaires des ces travaux, qui seront poursuivis dans les mois à venir par l'incrémentation des données.

## 2- Matériels et Méthodes

### - *Patients*

Les PNE ont été obtenus chez des patients présentant une HE et des sujets contrôles, inclus dans le protocole « SHE » soutenu à la fois par le Réseau Eosinophile et par un PHRC National 2008. Ce protocole a reçu l'aval du Comité de Protection des Personnes Nord Ouest. Le prélèvement sanguin (50 ml chez les patients présentant une HE, 100 ml chez les sujets contrôles) était réalisé après signature d'un consentement éclairé.

### - *Purification des éosinophiles*

Schématiquement, la réalisation d'un gradient de densité sur Percoll (densité 1,082 g/l, Pharmacia, Uppsala, Suède) permet la séparation des granulocytes. Les PNE sont ensuite purifiés par sélection négative, à l'aide de billes magnétiques couplées à un anticorps humain anti-CD16 qui permettent d'isoler la fraction des neutrophiles (CD16+) des PNE (CD16-). La pureté en PNE est toujours supérieure à 95%.

### - *Culture cellulaire et réactifs*

Les éosinophiles sont mis en culture pendant 1 à 18 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>, à une concentration de 2x10<sup>6</sup>/ml dans du RPMI 1640, sans rouge de phénol, contenant de la glutamine, pénicilline, streptomycine et du sérum de veau foetal (Gibco Invitrogen, Paisley, UK), en présence d'une sous dose d'IL-5 recombinante (Peptotech) (1 ng/ml). La culture cellulaire de la lignée EOL-1 a été décrite dans l'article précédent. Les agents stimulants rajoutés dans le milieu de culture étaient l'IL-5 (10 ng/ml), ou le PDGF-AA (Peptotech) à des concentrations variables spécifiées (10, 25, 50 ou 100 ng/ml). Les agents inhibiteurs utilisés étaient la NAC (1 mM), l'inhibiteur de la PI3-K LY294002 (10 µM) (Sigma St Louis, MO), et l'inhibiteur de la NADPH oxydase DPI (10 µM) (Sigma St Louis, MO), ce dernier étant reconstitué dans le DMSO. Pour les mesures de ROS, les agents stimulants ou inhibiteurs sont dilués dans un milieu d'incubation contenant du RPMI sans rouge de phénol, de l'HEPES, de la Sérum Albumine Bovine (BSA) 0,05%, mais pas de sérum de veau (qui contient de la catalase).

### - *Cytométrie en flux (CMF)*

Pour le marquage membranaire, les éosinophiles sont utilisés à la concentration de 4x10<sup>6</sup>/ml. Ils sont maintenus pendant toute la durée du marquage dans du tampon phosphate salin (PBS) et BSA 1% à 4°C. Les cellules sont incubées 30 minutes en présence de l'anticorps primaire polyclonal de chèvre non conjugué anti-PDGFRalpha (Santa Cruz, V-17) puis 20 minutes en présence d'IgG de poulet anti-chèvre couplé à l'Alexa 488 (Molecular Probes). Entre chaque

étape, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1% BSA. Une étape de blocage des sites aspécifiques est réalisée par une incubation avec du sérum de poulet (1/10) 10 min avant l'ajout de l'anticorps secondaire. L'expression du Very Late Antigen (VLA)-4 a été réalisée avec un anticorps monoclonal de souris anti-VLA-4 directement couplé au FITC (Pharmingen, 9F10) après blocage préalable des sites aspécifiques avec une incubation de 10 min avec sérum de souris. A la fin du marquage, les cellules sont mises en suspension dans du PBS 0,5% BSA et analysées par CMF.

Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont fixées à  $4 \times 10^6$ /ml avec du paraformaldéhyde (Sigma St Louis, MO) à 2% final durant 10 minutes à température ambiante, puis lavées avec du PBS. Elles sont ensuite perméabilisées avec de la saponine (Sigma St Louis, MO) 0,1% dans du PBS 1% BSA pendant 10 minutes (tampon de perméabilisation, ou tampon IC). Elles sont alors mises en contact avec l'anticorps primaire 30 minutes dans du tampon IC, puis lavées deux fois dans le même tampon. Elles sont ensuite incubées 10 minutes avec 5  $\mu$ l de sérum de la même espèce que l'anticorps secondaire (ceci afin d'éviter toute fixation non spécifique de l'anticorps secondaire), étape suivie par 20 minutes d'incubation avec des anticorps de poulet anti-chèvre couplés à l'Alexa 488. Après deux lavages en tampon IC, les cellules sont mises en suspension dans du PBS 0,5% BSA avant l'analyse en CMF.

Après le marquage membranaire et intracellulaire, les éosinophiles sont analysés à l'aide d'un cytomètre de flux (CyAn™ ADP LX, 9 Color, Beckman Coulter). L'acquisition se fait pour chaque échantillon sur un nombre total de 10 000 cellules. L'analyse des résultats obtenus a été effectuée avec le logiciel Summit.

#### - ***Immunofluorescence (IF)***

Les marquages d'IF sont réalisés sur cytopspin (cyto centrifugation des lames 2 min à 300 tr/min) avec des PNE fraîchement isolés. Après cerclage du spot avec un Dako pen (Dakocytomation), les lames sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 10 min à température ambiante. Des lavages en PBS sont réalisés entre chaque incubation. La fluorescence endogène des éosinophiles est diminuée par une incubation avec de la glycine (0,1 M) 4 minutes et avec une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 mM pH 7,4) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution PBS-1%BSA-0,2% Triton X-100 pendant 5 minutes sur la glace. Après une incubation de 30 min avec du PBS-3%BSA pour prévenir une fixation aspécifique, les lames sont incubées 18h à 4°C avec l'anticorps primaire non conjugué à 2  $\mu$ g/ml (anticorps anti-PDGFR $\alpha$ ). Après lavage dans du PBS-0,1% BSA, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire couplée à l'Alexa 488 (Invitrogen) (1/200)



pendant 2H. Deux lavages de 10 min en PBS-0,1%BSA-0,02% Tween et un lavage en PBS sont ensuite réalisés. Les cytopins sont finalement colorés avec une solution de Hoescht 33342 (Invitrogen) (1:1000) permettant la coloration des noyaux, juste avant le montage sous lamelle avec du Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates). Les lames ont été examinées en utilisant un microscope Zeiss AxioImager Z1 et le logiciel d'analyse AxioVision (Zeiss). L'édition des images et des overlay a été réalisé sur Adobe Photoshop version 7.0 (Adobe).

#### - *Dosage des ROS intracellulaires*

La mesure de ROS intracellulaires repose sur l'excitation d'une sonde fluorimétrique et a été évaluée à l'aide d'un cytomètre en flux et d'un fluorimètre (pour la cinétique). Les PNE (ou la lignée EOL-1) sont tout d'abord incubés en présence de H<sub>2</sub>DCF-DA (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichloro-dihydro-fluorescéine diacétate, Molecular Probes) à 1 µM pendant 15 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. Une incubation préalable de 30 minutes à 37°C avec des inhibiteurs (imatinib, DPI, NAC, LY294002) à pu être effectuée. Les agents stimulants (IL-5, PDGF-AA) sont rajoutés pendant 15mn dans le milieu DCF après incubation avec la sonde H<sub>2</sub>DCF-DA (figure I). Pour l'analyse en CMF, l'expérience est réalisée en tube polypropylène à l'abri de la lumière; la réaction est finalement bloquée par du PBS à 4°C, et la fluorescence intracellulaire (FL1-H) quantifiée après acquisition au CyAn™ ADP LX, 9 Color (Beckman Coulter). Pour l'analyse cinétique de la production de ROS, l'expérience est réalisée dans une plaque noire de 96 puits, fond plat (Nunc). Une lecture d'1H à 37°C est réalisée en fin d'incubation, sans étape de blocage de la réaction, par un fluorimètre (Mithras LB940, Berthold, lecteur de microplaques en fluorescence et luminescence France), ( $\lambda$  excitation : 490nm,  $\lambda$  émission : 535nm).

#### - *Dosage d'ECP et EDN dans le surnageant de culture*

Après 18H d'incubation en milieu de culture en présence ou non d'agent stimulateur, l'ECP et l'EDN sont mesurées dans les surnageants par kits ELISA (Medical & Biological Laboratories CO., LTD Nagoya, Japon). Les sensibilités des kits sont respectivement 0,125ng/ml et 0,62ng/ml.

#### - *Dosage des ROS extracellulaires par chimioluminescence*

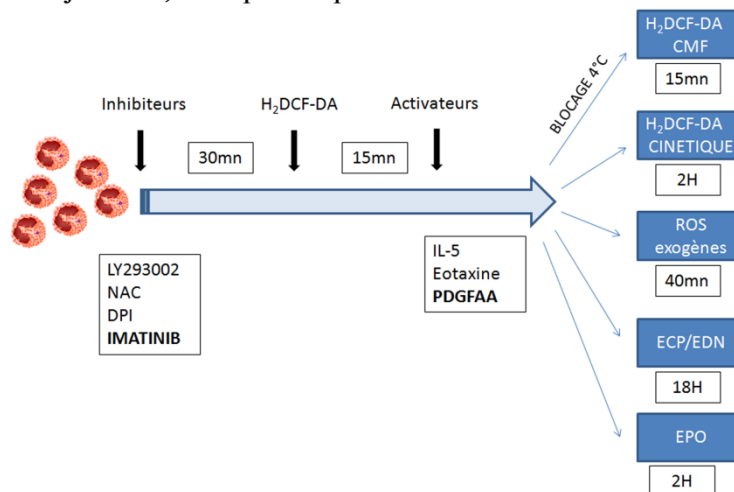
Le dosage des ROS libérés par les PNE est réalisé par une technique de chimioluminescence (CL) dépendante du luminol. Les PNE sont suspendus dans du RPMI sans rouge de phénol à une concentration de  $12 \times 10^6$  / ml et 300 000 cellules par puits sont réparties dans une plaque blanche 96 puits fond plat. Juste avant la mesure de CL, les cellules sont activées par un stimulus et 50 µl de luminol (25 µg/ml dans du Tris HCl 0,01M pH 7,4) sont injectés. Le

chimioluminomètre Mithras mesure instantanément l'excitation du luminol par les radicaux libres produits par les cellules. La cinétique est réalisée à 37°C sur une période allant généralement jusqu'à 40 minutes et pour chaque mesure, la CL est comptée sur 5 secondes. Les résultats représentent la valeur au pic de sécrétion.

### - Dosage de l'EPO libérée

La méthode de dosage utilisée est adaptée d'un protocole précédemment décrit [386]. Les PNE purifiés sont suspendus dans du tampon EPO (RPMI-0,1%HSA, 25mM Hepes) à une concentration de  $0,5 \times 10^6$ /ml. La stimulation des cellules se fait dans des tubes de culture polypropylène pré-coatés avec une solution HSA 2,5% (2h, 37°C). Après un lavage des tubes en PBS, 500 µl de la suspension d'éosinophiles à 0,5M/ml (0,25M/tube) sont ajoutés. Les tubes sont incubés pendant 2H à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Sont ensuite ajoutés par tube 500 µl d'une solution d'OPD (1 cp d'OPD (Sigma) dissous dans 500 µl d'eau distillée puis ajout de 4,5 ml de tampon citrate (0,1 M pH 5,5) et 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)). La réaction est arrêtée après 5 min de révélation à température ambiante à l'abri de la lumière par l'ajout d'une solution acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M, 1 ml). Après homogénéisation des tubes, les suspensions cellulaires sont déposées dans la microplaque 96 puits et la quantité d'EPO est doser par spectrophotométrie (lecture à 490 nm).

Figure I : Schéma général d'analyse de la production de ROS et de protéines cationiques dans des PNE de sujets sains, ou de patients présentant une HE réactionnelle ou un SHE



### 3- Résultats

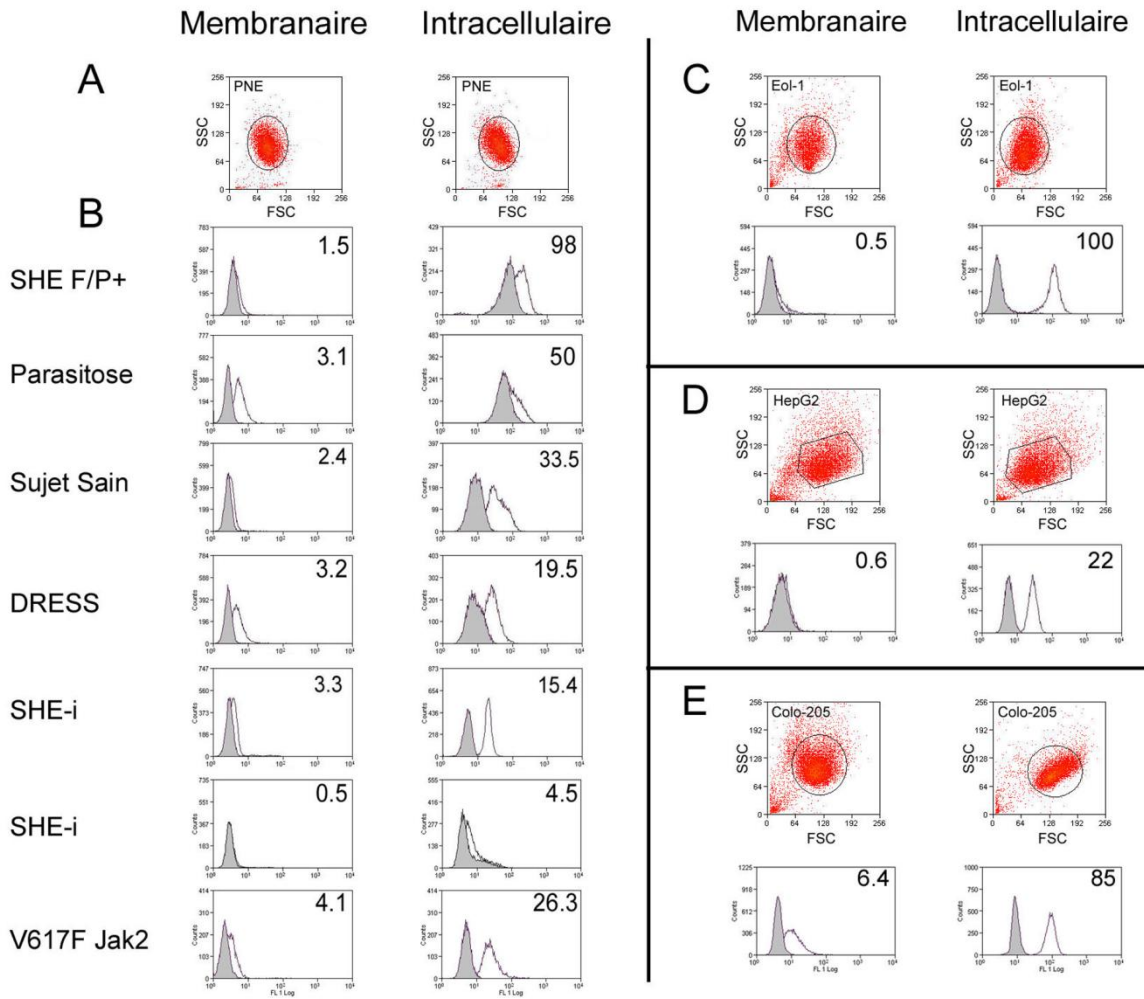
#### a) *Les PNE expriment le PDGFR $\alpha$ au niveau protéique*

Nous avons étudié l'expression du PDGFR $\alpha$  en CMF (figure II) et en IF (figure III) dans les PNE de 6 patients présentant une hyperéosinophilie et chez un sujet contrôle. Les lignées EOL-1, HepG2 (lignée d'hépatoblastome) et Colo-205 (carcinome colique) exprime, de manière connue le PDGFR $\alpha$  en cytométrie. Le PDGFR $\alpha$  est aussi exprimé de manière intense en intracellulaire dans les PNE F/P+, mais, de manière prévisible, n'est pas exprimé à la membrane (due à la délétion de la partie transmembranaire) (figure II). Cette expression est aussi identifiée dans les PNE des patients SHE-I, ainsi que dans les PNE d'un sujet ayant une bilharziose associée à une anguillulose, d'un sujet ayant un DRESS et d'un patient ayant une HE éosinophilie associée à la mutation V617F de *JAK2*. Dans tous ces cas, PDGFR $\alpha$  est retrouvé à la membrane (sauf chez un patient avec SHE-I), mais semble toujours plus fortement exprimé en intracellulaire qu'au niveau membranaire. Enfin, PDGFR $\alpha$  est exprimé dans les PNE d'un sujet sain, aussi bien au niveau membranaire que cytosolique (figure II). Comme attendu, le PDGFR $\alpha$  est exprimé de manière intense dans la lignée EOL-1 en IF, avec une fluorescence cytoplasmique granuleuse, alors qu'elle apparaît plus diffuse, en nappe, dans les cellules HepG2 dérivées d'hépatocarcinome humain (figure III). Les PNE F/P+ expriment bien PDGFR $\alpha$ , de manière intense et granuleuse, comme les EOL-1. Une fluorescence du même type est retrouvée dans les PNE d'un sujet présentant une helminthiase. Chez le seul sujet sain évalué, l'expression du PDGFR $\alpha$  est plus faible et ne s'observe que sur quelques PNE (figure III).

**Figure II : Expression en cytométrie en flux du PDGFR $\alpha$  dans les PNE.**

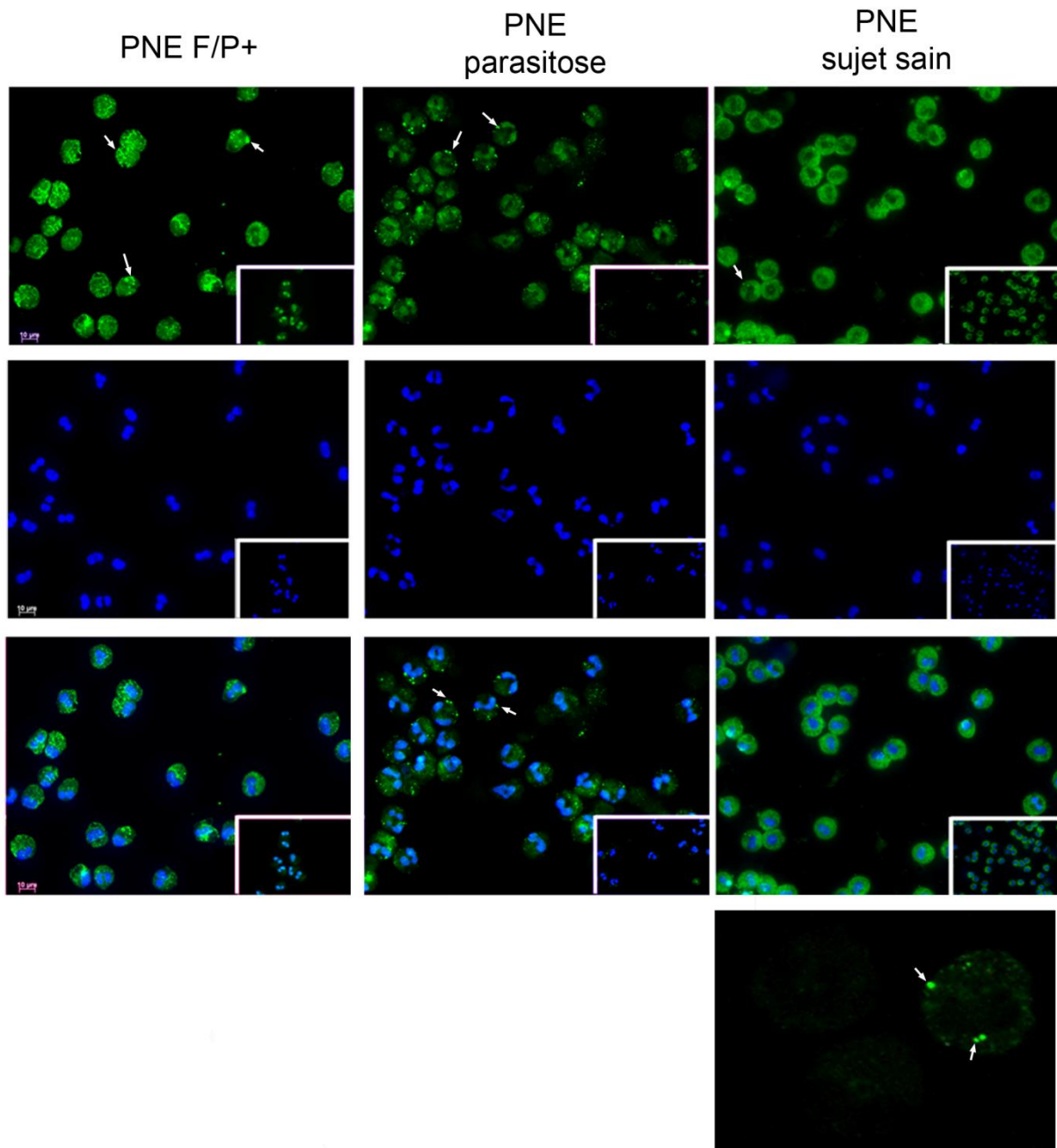
A: Les PNE sont ciblés grâce à des critères de taille et structure, après purification.

Analyse de l'expression du PDGFR $\alpha$  au niveau membranaire et intracellulaire (après fixation/perméabilisation cellulaire) dans des PNE humains circulants (b), la lignée EOL-1 (C), la lignée HepG2 (D), et la lignée Colo-205 (E). Les différences d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) sont indiqués en haut à droite des histogrammes



**Figure III B : Expression du PDGFR $\alpha$  en IF sur PNE circulants.**

Les PNE F/P+ et les PNE d'un patient ayant une parasitose expriment PDGFR $\alpha$ , de façon beaucoup intense dans les PNE F/P+. Enfin, PDGFR $\alpha$  est exprimé, très faiblement en IHC, sur les PNE d'un sujet sain. Les immunofluorescences obtenues avec l'isotype contrôle sont représentées dans le cadre de chaque image.



***b) Production de ROS intracellulaires par les PNE F/P+***

Nous avons pu analyser chez un patient F/P+, ainsi que dans la lignée EOL-1, la production de ROS intracellulaires et son inhibition par l'imatinib, la DPI (inhibiteur de la NADPH oxydase), le LY294002 (inhibiteur de la PI3-K) ou la NAC (antioxydant). L'imatinib semble inhiber de manière dose-dépendante la production de ROS intracellulaires dans la lignée EOL-1 (figure IV-A). Ces résultats sont à interpréter avec précaution car issue d'une expérience unique réalisée sur un cytomètre permettant une acquisition de chaque puits après une homogénéisation individuelle de la suspension cellulaire et une lecture à l'obscurité (Guava PCA-96, Millipore, USA). Chez un patient F/P+, l'analyse en CMF a permis de mettre en évidence un effet inducteur de l'IL-5 sur la production de ROS intracellulaires dans les PNE (augmentation de près de 50%), mais aussi un effet inhibiteur probable de l'imatinib sur cette production de ROS induite par l'IL-5 (figure IV-B). Chez ce même patient F/P+, l'analyse cinétique sur 1H confirme cet effet promoteur de l'IL-5 sur la genèse de ROS, avec un plateau observé vers 1H30 (résultats personnels). Là encore, l'imatinib permet d'inhiber cette synthèse de ROS IL-5-dépendante (figure IV-C). Enfin, la NAC, le DPI et le LY294002 induisent une inhibition profonde de la synthèse de ROS, inférieure à la production basale de ces PNE F/P+ (figure IV-D), démontrant l'implication de la NADPH oxydase et de la PI3Kinase dans la production de ROS dans les PNE F/P+.

***c) Production de ROS intracellulaires induite par le PDGF-AA dans les PNE de sujets contrôles***

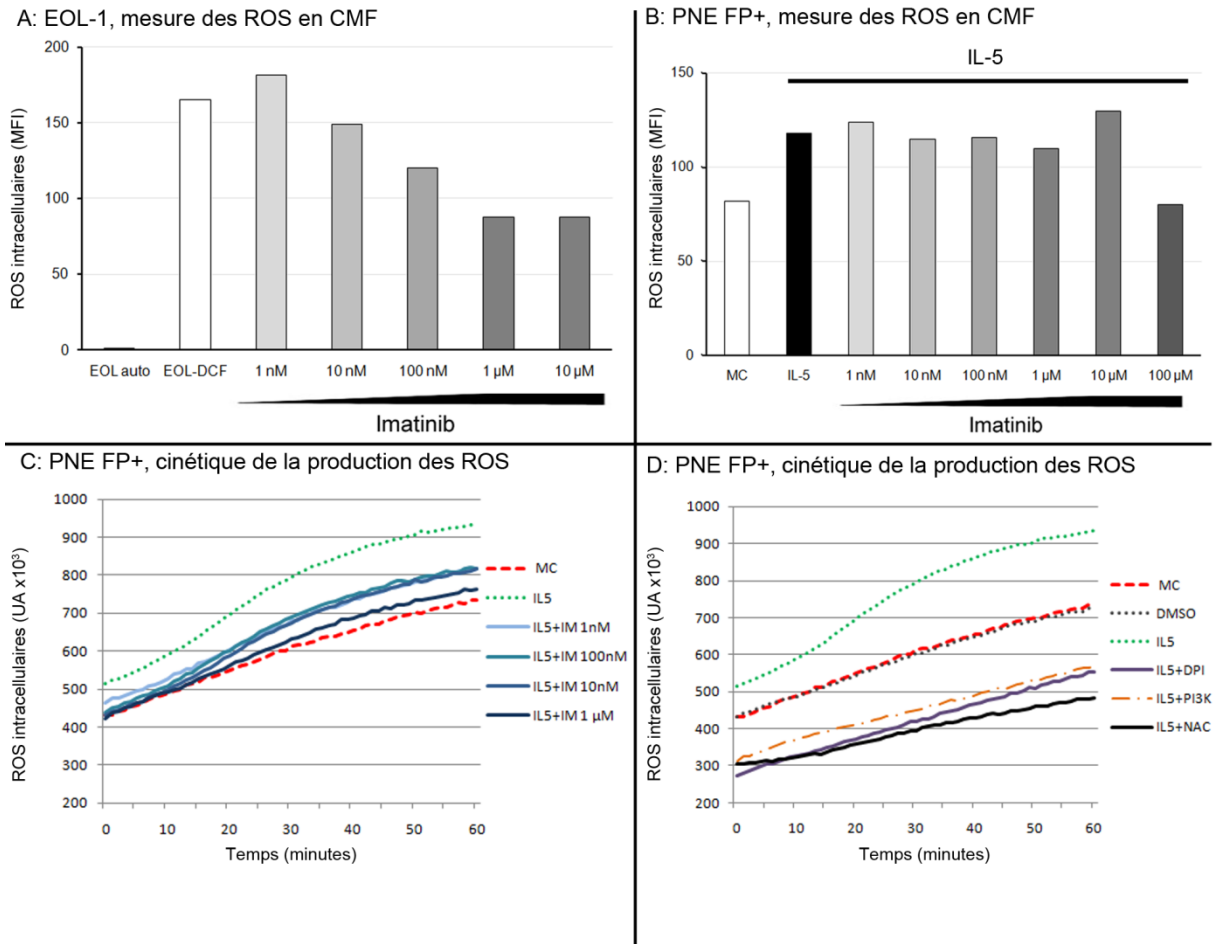
Nous avons étudié, sur des PNE de sujets sains, l'effet du ligand naturel et sélectif du PDGFR $\alpha$ , le PDGF-AA. Sur une série d'expériences en CMF, encore préliminaires et insuffisantes en nombre, le PDGF-AA induit une augmentation de la production de ROS intracellulaires de 27% à 32% selon la dose utilisée, de manière équivalente et non synergique à l'IL-5 (figure V-A). Cette synthèse de ROS induite par le PDGF-AA est en partie inhibée par l'imatinib, de 9 à 37% selon les sujets et la dose utilisée (figure V-B).

## Figure IV : Production de ROS intracellulaires dans la lignée EOL-1 et dans des PNE F/P+ humains.

A : Production de ROS (analysée en CMF) par la lignée EOL-1 en présence d'imatinib. Analyse en CMF. Expérience unique.

B : Production de ROS par des PNE F/P+, pré-incubés avec de l'imatinib, puis stimulés par l'IL-5 (10ng/ml). Analyse en CMF. Expérience unique.

C et D: Cinétique de production de ROS par des PNE F/P+ pré-incubés avec de l'imatinib (C) ou des inhibiteurs (D), puis stimulés par l'IL-5 (10ng/ml). Lecture sur fluorimètre. Expérience unique.

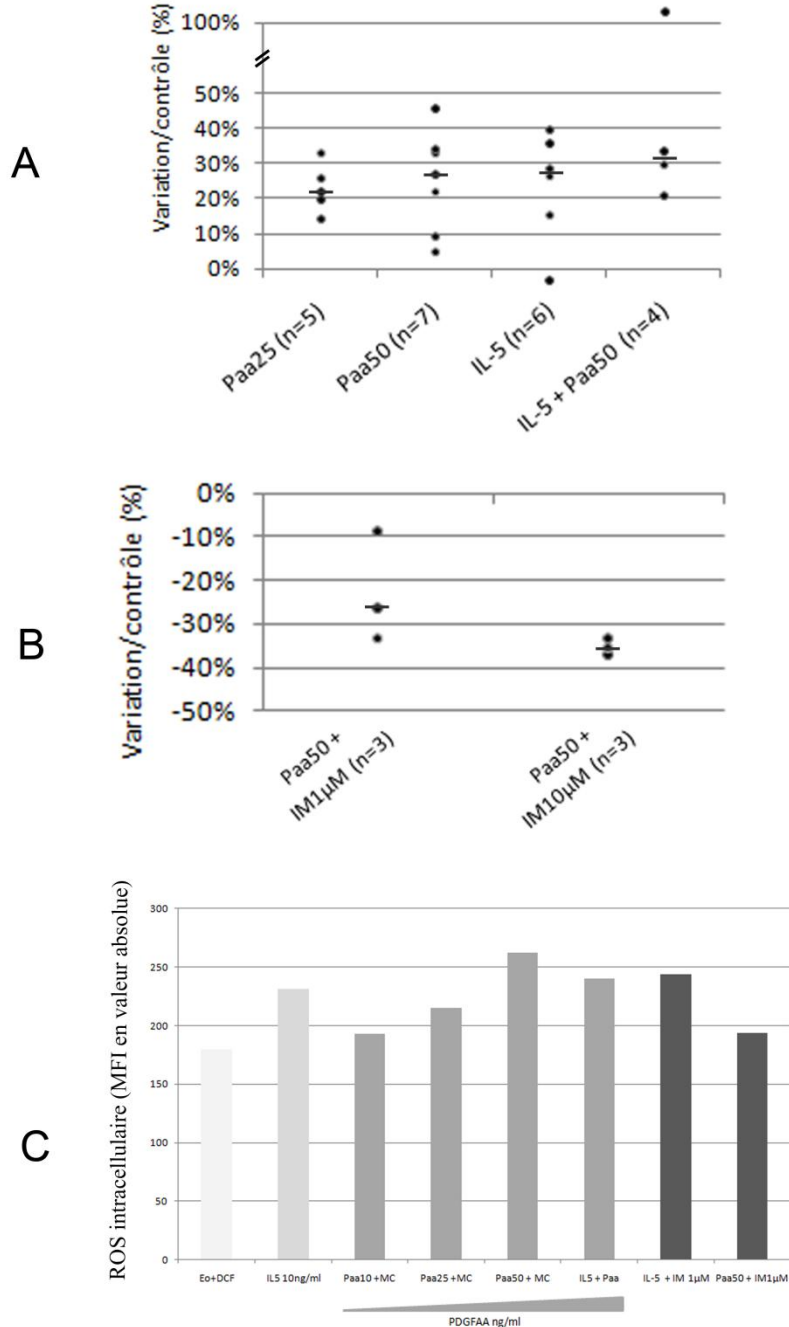


**Figure V : Production de ROS intracellulaires dans des PNE de sujets sains.**

**A :** Production de ROS (CMF) avec stimulation par le PDGF-AA (Paa, 25 ou 50 ng/ml), l'IL-5 (10ng/ml), et l'association IL-5-PDGF-AA (respectivement 10 et 50ng/ml). Les résultats sont exprimés en % de variation de MFI par rapport au contrôle (PNE + H2DCF-DA seul).

**B :** Inhibition de la production de ROS induite par le PDGF-AA (50ng/ml) grâce à une pré-incubation avec l'imatinib (1 ou 10  $\mu$ M). Les résultats sont exprimés en % de variation de MFI par rapport au contrôle (PNE + PDGF-AA 50ng/ml).

**C :** Exprérence représentative chez 1 sujet sain





**d) Production de métabolites cytotoxiques par les PNE après stimulation par le PDGF-AA**

Nous avons analysé, chez un faible nombre de sujets sains, les capacités d'activation des PNE par le PDGF-AA. Ces dernières ont été évaluées par la sécrétion des protéines cationiques ECP et EDN dans le milieu de culture, l'activité peroxydase de l'EPO sécrétée ainsi que par la sécrétion de ROS extracellulaires. Chez 2 sujets sains, le PDGF-AA, à la dose de 50ng/ml, semble induire la production d'ECP et d'EDN (figure VI-A et VI-B). L'IL-5 exerce un effet plus modeste, et il n'y a pas d'action synergique entre ces 2 médiateurs sur la libération de l'ECP et l'EDN. Nous n'avons malheureusement pas pu corrélérer nos résultats à l'expression ou non du PDGFR $\alpha$  chez ces patients.

L'activité peroxydase de l'EPO n'apparaît pas inductible par la stimulation PDGF-AA chez la plupart des patients testés (HE parasitaires, DRESS, sujet atopique, patient F/P+, ou SHE-I) (figure VI-B). Toutefois, chez les 2 sujets sains testés (sujets S1 et S3), la sécrétion d'EPO semble en partie accrue par la stimulation par le PDGF-AA à la dose de 50 ou 100ng/ml.

Chez un seul patient, présentant une HE liée à une mutation V617F de JAK2 (insensible à l'imatinib), le PDGF-AA augmente la production de ROS sécrétés dans le milieu de culture, et l'imatinib, à fortes doses, inhibe cet effet (figure VI-B). Cette inhibition n'est pas liée à des phénomènes d'apoptose ou de nécrose induites par l'imatinib, en l'absence de modification des marquages en annexine-V et 7AAD après exposition à de fortes doses d'imatinib, jusqu'à 100 $\mu$ M pendant 12H (données personnelles).

**e) Expression du marqueur d'adhésion VLA4 sur les PNE F/P+**

Le VLA4 est une intégrine hétérodimérique  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 (ou CD49d/CD29), impliquée dans le ralentissement et l'adhésion des PNE sur l'endothélium grâce à sa liaison avec VCAM-1 et qui participe donc à la migration tissulaire des PNE. L'expression du VLA4 a été évaluée en CMF sur des PNE circulants. Le VLA4 est mis en évidence aussi bien au niveau cytoplasmique que membranaire, dans les PNE d'un patient F/P+, d'un sujet atteint de parasitose, de DRESS ou d'un sujet sain (figure VII). Si l'expression membranaire n'apparaît pas différente dans ces 4 conditions, l'expression cytoplasmique est en revanche beaucoup plus élevée dans les PNE issus d'un patient atteint de parasitose et dans les PNE-F/P+ que dans les PNE-sains.

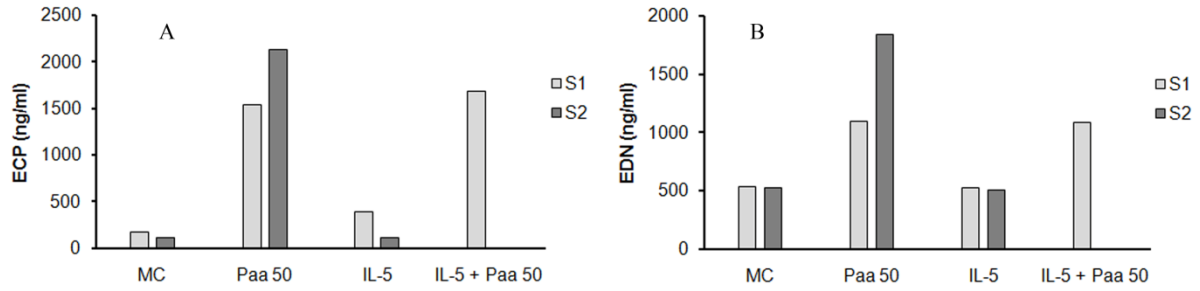
**Figure VI: Sécrétion de métabolites cytotoxiques des PNE après stimulation par le PDGF-AA.**

**A et B:** Sécrétion d'EDN et d'ECP par des PNE de sujets sains après stimulation par l'IL-5 (10ng/ml) ou le PDGF-AA (50ng/ml).

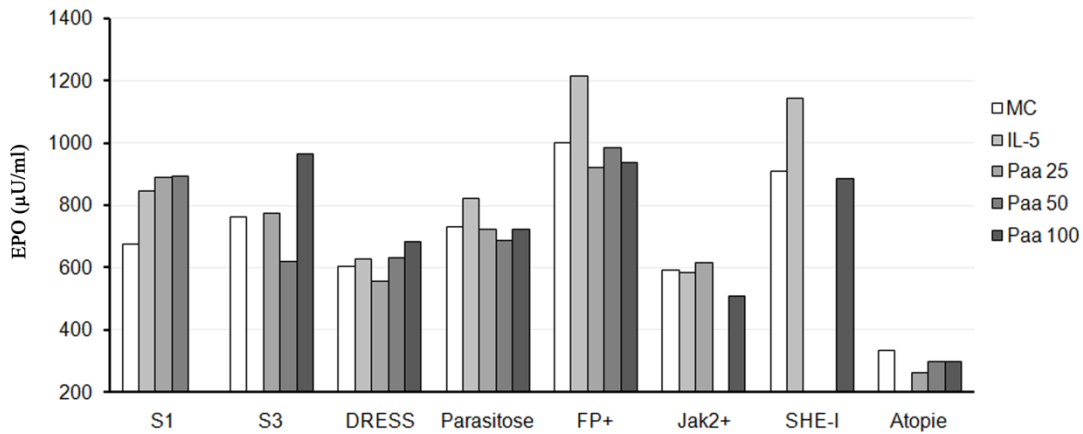
**C:** Sécrétion d'EPO après stimulation par le PDGF-AA ou l'IL-5 (10ng/ml).

**D:** Production de ROS extracellulaires par les PNE d'un patient ayant une HE associée à une mutation V617F JAK2. A gauche: stimulation par le PDGF-AA (1, 10 et 100ng/ml); A droite, inhibition par l'imatinib et le DPI (10µM) de la production de ROS induite par le PDGF-AA (100 ng/ml).

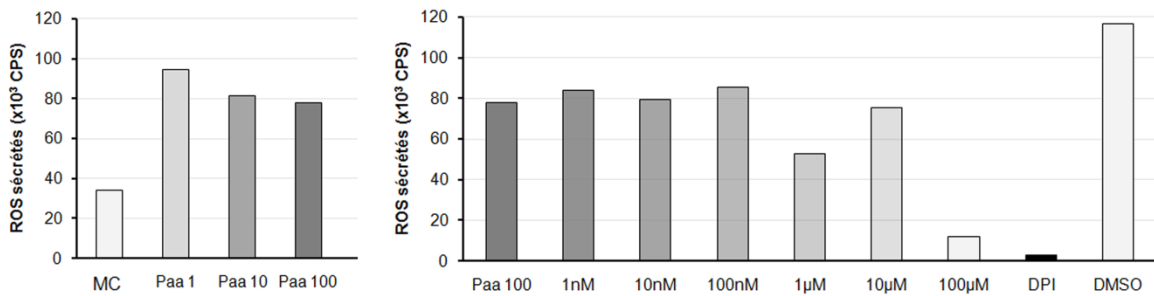
Sécrétion d'ECP (A) et d'EDN (B) par des PNE de sujets sains (S1 et S2)



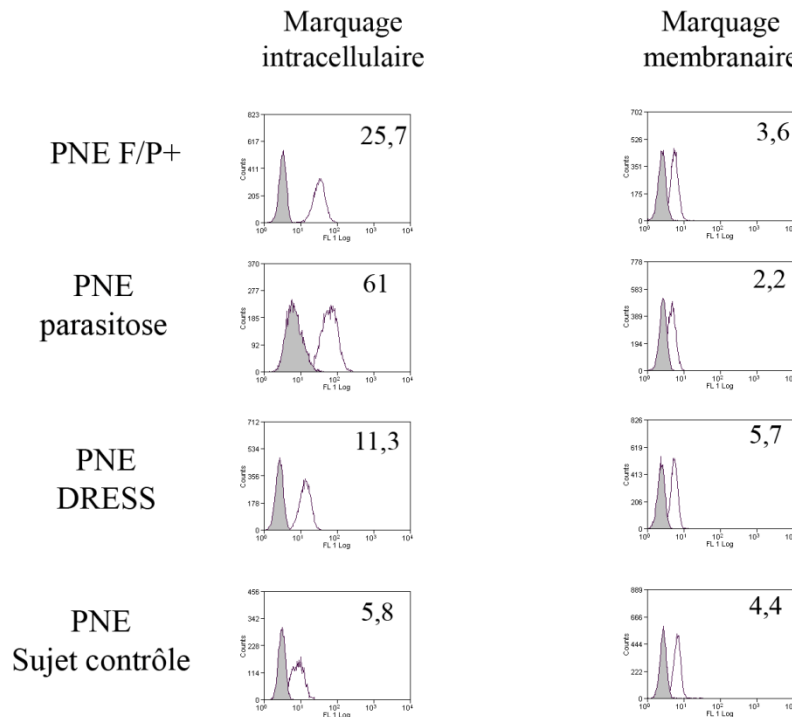
C: Sécrétion d'EPO par des PNE de sujets sains (S1 et S3), et de patients ayant une HE



D: Sécrétion de ROS par des PNE humains d'un patient V617F JAK2



**Figure VII: Etude de l'expression de VLA4 en CMF sur des PNE humains**  
 A gauche, marquage membranaire, à droite, marquage intracellulaire après perméabilisation. Les résultats sont exprimés en différence de MFI par rapport à l'isotype contrôle.



#### 4- Discussion

Dans un premier temps, nous avons, et ce pour la première fois, pu démontrer l'expression du PDGFR $\alpha$  dans des PNE circulants de sujets n'ayant pas le réarrangement F/P+, aussi bien en IF qu'en CMF. Surtout, cette expression pourrait aussi exister, à un niveau probablement plus faible, dans les PNE de sujets sains non atopiques. Ces résultats sont en cours de confirmation chez de nouveaux sujets sains et de patients présentant un SHE F/P-. Nous nous sommes par ailleurs attachés à démontrer le caractère fonctionnel de ce récepteur. Nos résultats préliminaires suggèrent que la stimulation par le PDGF-AA, considéré comme un ligand sélectif du PDGFR $\alpha$ , pourrait induire, sur des PNE de sujets sains, une production accrue de ROS intracellulaires. Cette production est inhibée par l'imatinib, inhibiteur non sélectif du PDGFR $\alpha$ . De plus, sur un faible nombre de patients (n= 2), le PDGF-AA induit la sécrétion d'ECP, d'EDN et d'EPO. La grande variabilité fonctionnelle observée dans les PNE nécessite bien entendu que ces données soient confirmées sur un plus large échantillon de patients. Par ailleurs, dans la LCE F/P+, l'hypothèse suggérée par les résultats 2D-DIGE d'une production accrue de ROS liée à l'activation de PDGFR $\alpha$  est en partie corroborée par une

diminution d'environ 30% du niveau de ROS intracellulaires dans des PNE F/P+ pré-incubés avec de l'imatinib. Enfin, chez un patient F/P+, nous avons pu observer une expression importante du VLA4, qui pourrait, si elle est confirmée, être une piste expliquant la migration tissulaire et le retentissement viscéral plus fréquemment observés chez les patients F/P+. Encore une fois, ces résultats encourageants ne sont encore que préliminaires, et sont en cours de confirmation dans le laboratoire.

## ANNEXE 2: ARTICLES COMPLÉMENTAIRES

- 1- J.-E. Kahn, F. Legrand, M. Capron, L. Prin. Hyperéosinophilies et syndromes hyperéosinophiliques. EMC (Elsevier Masson SAS), Hématologie, 13-009-A-10, 2011.
  
- 2- ME Rothenberg, AD Klion, FE Roufousse, JE Kahn, PF. Weller, HU Simon, LB Schwartz, LJ Rosenwasser, J Ring, EF. Griffin, AE. Haig, PIH Frewer, JM. Parkin, and GJ Gleich, for the Mepolizumab HES Study Group. Treatment of Patients with the Hypereosinophilic Syndrome with Mepolizumab, N Eng J Med 2008 vol. 358 ; 12: 1215-28.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Fauci, A. S., J. B. Harley, W. C. Roberts, V. J. Ferrans, H. R. Gralnick, and B. H. Bjornson. 1982. NIH conference. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. Clinical, pathophysiologic, and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* 97:78-92.
2. Spry, C. J., J. Davies, P. C. Tai, E. G. Olsen, C. M. Oakley, and J. F. Goodwin. 1983. Clinical features of fifteen patients with the hypereosinophilic syndrome. *Q J Med* 52:1-22.
3. Lefebvre, C., O. Bletry, P. Degoulet, L. Guillevin, M. Bentata-Pessayre, D. Le Thi Huong, and P. Godeau. 1989. [Prognostic factors of hypereosinophilic syndrome. Study of 40 cases]. *Ann Med Interne (Paris)* 140:253-257.
4. Weller, P. F., and G. J. Bubley. 1994. The idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Blood* 83:2759-2779.
5. Ogbogu, P. U., B. S. Bochner, J. H. Butterfield, G. J. Gleich, J. Huss-Marp, J. E. Kahn, K. M. Leiferman, T. B. Nutman, F. Pfab, J. Ring, M. E. Rothenberg, F. Roufosse, M. H. Sajous, J. Sheikh, D. Simon, H. U. Simon, M. L. Stein, A. Wardlaw, P. F. Weller, and A. D. Klion. 2009. Hypereosinophilic syndrome: a multicenter, retrospective analysis of clinical characteristics and response to therapy. *J Allergy Clin Immunol* 124:1319-1325 e1313.
6. Klion, A. D., P. Noel, C. Akin, M. A. Law, D. G. Gilliland, J. Cools, D. D. Metcalfe, and T. B. Nutman. 2003. Elevated serum tryptase levels identify a subset of patients with a myeloproliferative variant of idiopathic hypereosinophilic syndrome associated with tissue fibrosis, poor prognosis, and imatinib responsiveness. *Blood* 101:4660-4666.
7. Chusid, M. J., D. C. Dale, B. C. West, and S. M. Wolff. 1975. The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 54:1-27.
8. Ackermann, F., P. Charles, C. Grandpeix-Guyodo, I. Marroun, A. M. Piette, O. Bletry, and J. E. Kahn. 2009. Hypereosinophilic syndromes: prognosis improvement in a new therapeutic area - Poster. In *6th Biennial Symposium of the International Eosinophil Society* Bruges, Belgium.
9. Hardy, W. R., and R. E. Anderson. 1968. The hypereosinophilic syndromes. *Ann Intern Med* 68:1220-1229.
10. Roufosse, F., L. Schandene, C. Sibille, K. Willard-Gallo, B. Kennes, A. Efir, M. Goldman, and E. Cogan. 2000. Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 109:540-548.
11. Simon, H. U., S. G. Plotz, R. Dummer, and K. Blaser. 1999. Abnormal clones of T cells producing interleukin-5 in idiopathic eosinophilia. *N Engl J Med* 341:1112-1120.
12. Willard-Gallo, K. E., B. M. Badran, M. Ravoet, A. Zerghe, A. Burny, P. Martiat, M. Goldman, F. Roufosse, and C. Sibille. 2005. Defective CD3gamma gene transcription is associated with NFATc2 overexpression in the lymphocytic variant of hypereosinophilic syndrome. *Exp Hematol* 33:1147-1159.
13. de Lavareille, A., F. Roufosse, P. Schmid-Grendelmeier, A. S. Roumier, L. Schandene, E. Cogan, H. U. Simon, and M. Goldman. 2002. High serum thymus and activation-regulated chemokine levels in the lymphocytic variant of the hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 110:476-479.
14. Roufosse, F., E. Cogan, and M. Goldman. 2003. The hypereosinophilic syndrome revisited. *Annu Rev Med* 54:169-184.

15. Ravoet, M., C. Sibille, F. Roufosse, H. Duvillier, C. Sotiriou, L. Schandene, P. Martiat, M. Goldman, and K. E. Willard-Gallo. 2005. 6q- is an early and persistent chromosomal aberration in CD3-CD4+ T-cell clones associated with the lymphocytic variant of hypereosinophilic syndrome. *Haematologica* 90:753-765.
16. Vaklavas, C., A. Tefferi, J. Butterfield, R. Ketterling, S. Verstovsek, H. Kantarjian, and A. Pardanani. 2007. 'Idiopathic' eosinophilia with an Occult T-cell clone: prevalence and clinical course. *Leuk Res* 31:691-694.
17. Roche-Lestienne, C., S. Lepers, V. Soenen-Cornu, J. E. Kahn, J. L. Lai, E. Hachulla, F. Drupt, A. L. Demarty, A. S. Roumier, M. Gardembas, M. Dib, N. Philippe, N. Cambier, S. Barete, C. Libersa, O. Bletry, P. Y. Hatron, B. Quesnel, C. Rose, K. Maloum, O. Blanchet, P. Fenaux, L. Prin, and C. Preudhomme. 2005. Molecular characterization of the idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES) in 35 French patients with normal conventional cytogenetics. *Leukemia* 19:792-798.
18. Golub, T. R., G. F. Barker, M. Lovett, and D. G. Gilliland. 1994. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77:307-316.
19. Hirota, S., K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. Muhammad Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, and Y. Kitamura. 1998. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279:577-580.
20. Cools, J., D. J. DeAngelo, J. Gotlib, E. H. Stover, R. D. Legare, J. Cortes, J. Kutok, J. Clark, I. Galinsky, J. D. Griffin, N. C. Cross, A. Tefferi, J. Malone, R. Alam, S. L. Schrier, J. Schmid, M. Rose, P. Vandenberghe, G. Verhoef, M. Boogaerts, I. Wlodarska, H. Kantarjian, P. Marynen, S. E. Coutre, R. Stone, and D. G. Gilliland. 2003. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348:1201-1214.
21. Griffin, J. H., J. Leung, R. J. Bruner, M. A. Caligiuri, and R. Briesewitz. 2003. Discovery of a fusion kinase in EOL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7830-7835.
22. Pardanani, A., R. P. Ketterling, C. Y. Li, M. M. Patnaik, A. P. Wolanskyj, M. A. Elliott, J. K. Camoriano, J. H. Butterfield, G. W. Dewald, and A. Tefferi. 2006. FIP1L1-PDGFR $\alpha$  in eosinophilic disorders: prevalence in routine clinical practice, long-term experience with imatinib therapy, and a critical review of the literature. *Leuk Res* 30:965-970.
23. Jovanovic, J. V., J. Score, K. Waghorn, D. Cilloni, E. Gottardi, G. Metzgeroth, P. Erben, H. Popp, C. Walz, A. Hochhaus, C. Roche-Lestienne, C. Preudhomme, E. Solomon, J. Apperley, M. Rondoni, E. Ottaviani, G. Martinelli, F. Brito-Babapulle, G. Saglio, R. Hehlmann, N. C. Cross, A. Reiter, and D. Grimwade. 2007. Low-dose imatinib mesylate leads to rapid induction of major molecular responses and achievement of complete molecular remission in FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 109:4635-4640.
24. Kahn, J. E., F. Legrand, L. Fofana, A. Reneville, C. Preudhomme, and L. Prin. 2010. Fréquence des anomalies moléculaires dans une série de 544 patients présentant une hyperéosinophilie chronique inexpliquée. *Rev Med Int (61ème Congrès de la Société Nationale Française de Médecine Interne, Abstracts)* 31 S41 (CO 015).
25. Rohrbacher, M., and J. Hasford. 2009. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol* 22:295-302.
26. Vandenberghe, P., I. Wlodarska, L. Michaux, P. Zachee, M. Boogaerts, D. Vanstraelen, M. C. Herregods, A. Van Hoof, D. Selleslag, F. Roufosse, M. Maerevoet,

- G. Verhoef, J. Cools, D. G. Gilliland, A. Hagemeijer, and P. Marynen. 2004. Clinical and molecular features of FIP1L1-PDFGRA (+) chronic eosinophilic leukemias. *Leukemia* 18:734-742.
27. Intermesoli, T., F. Delaini, S. Acerboni, S. Salmoiraghi, O. Spinelli, V. Guerini, A. M. Vannucchi, S. Mappa, G. Rossi, V. Rossi, E. Di Bona, S. Paratore, A. Carobbio, A. Rambaldi, T. Barbui, and R. Bassan. 2009. A short low-dose imatinib trial allows rapid identification of responsive patients in hypereosinophilic syndromes. *Br J Haematol* 147:681-685.
  28. Legrand, F. 2009. Imatinib mésylate dans les syndromes hyperéosinophiliques associés ou non à FIP1L1-PDGFR $\alpha$ . In *Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille*. Université Lille 2 Droit et Santé, Lille.
  29. Jain, N., J. Cortes, A. Quintas-Cardama, T. Manshour, R. Luthra, G. Garcia-Manero, H. Kantarjian, and S. Verstovsek. 2009. Imatinib has limited therapeutic activity for hypereosinophilic syndrome patients with unknown or negative PDGFR $\alpha$  mutation status. *Leuk Res* 33:837-839.
  30. Metzgeroth, G., C. Walz, P. Erben, H. Popp, A. Schmitt-Graeff, C. Haferlach, A. Fabarius, S. Schnittger, D. Grimwade, N. C. Cross, R. Hehlmann, A. Hochhaus, and A. Reiter. 2008. Safety and efficacy of imatinib in chronic eosinophilic leukaemia and hypereosinophilic syndrome: a phase-II study. *Br J Haematol* 143:707-715.
  31. Verstovsek, S., A. Tefferi, J. Cortes, S. O'Brien, G. Garcia-Manero, A. Pardanani, C. Akin, S. Faderl, T. Manshour, D. Thomas, and H. Kantarjian. 2008. Phase II Study of Dasatinib in Philadelphia Chromosome-Negative Acute and Chronic Myeloid Diseases, Including Systemic Mastocytosis. *Clin Cancer Res* 14:3906-3915.
  32. Score, J., C. Curtis, K. Waghorn, M. Stalder, M. Jotterand, F. H. Grand, and N. C. Cross. 2006. Identification of a novel imatinib responsive KIF5B-PDGFR $\alpha$  fusion gene following screening for PDGFR $\alpha$  overexpression in patients with hypereosinophilia. *Leukemia* 20:827-832.
  33. Walz, C., C. Curtis, S. Schnittger, B. Schultheis, G. Metzgeroth, C. Schoch, E. Lengfelder, P. Erben, M. C. Muller, T. Haferlach, A. Hochhaus, R. Hehlmann, N. C. Cross, and A. Reiter. 2006. Transient response to imatinib in a chronic eosinophilic leukemia associated with ins(9;4)(q33;q12q25) and a CDK5RAP2-PDGFR $\alpha$  fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer* 45:950-956.
  34. Curtis, C. E., F. H. Grand, P. Musto, A. Clark, J. Murphy, G. Perla, M. M. Minervini, J. Stewart, A. Reiter, and N. C. Cross. 2007. Two novel imatinib-responsive PDGFR $\alpha$  fusion genes in chronic eosinophilic leukaemia. *Br J Haematol* 138:77-81.
  35. Baxter, E. J., A. Hochhaus, P. Bolufer, A. Reiter, J. M. Fernandez, L. Senent, J. Cervera, F. Moscardo, M. A. Sanz, and N. C. Cross. 2002. The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFR $\alpha$ . *Hum Mol Genet* 11:1391-1397.
  36. Erquiaga, I., C. Ormazabal, C. Hurtado, P. Aranaz, M. J. Calasanz, M. Garcia-Delgado, F. J. Novo, and J. L. Vizmanos. Quantification of PDGFR $\alpha$  alternative transcripts improves the screening for X-PDGFR $\alpha$  fusions by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Leuk Lymphoma* 51:1720-1726.
  37. Hiwatari, M., R. Ono, T. Taki, A. Hishiya, E. Ishii, T. Kitamura, Y. Hayashi, and T. Nosaka. 2008. Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFR $\alpha$  gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia* 22:2279-2280.
  38. Elling, C., P. Erben, C. Walz, M. Frickenhaus, M. Schemionek, M. Stehling, H. Serve, N. C. Cross, A. Hochhaus, W. K. Hofmann, W. E. Berdel, C. Muller-Tidow, A. Reiter, and S. Koschmieder. 2011. Novel imatinib-sensitive PDGFR $\alpha$ -activating point



- mutations in hypereosinophilic syndrome induce growth factor independence and leukemia-like disease. *Blood* 117:2935-2943.
39. Klion, A. D., B. S. Bochner, G. J. Gleich, T. B. Nutman, M. E. Rothenberg, H. U. Simon, M. E. Wechsler, P. F. Weller, and G. The Hypereosinophilic Syndromes Working. 2006. Approaches to the treatment of hypereosinophilic syndromes: a workshop summary report. *J Allergy Clin Immunol* 117:1292-1302.
  40. Simon, H. U., M. E. Rothenberg, B. S. Bochner, P. F. Weller, A. J. Wardlaw, M. E. Wechsler, L. J. Rosenwasser, F. Roufosse, G. J. Gleich, and A. D. Klion. 2010. Refining the definition of hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 126:45-49.
  41. Miyazaki, E., S. Nureki, T. Fukami, T. Shigenaga, M. Ando, K. Ito, H. Ando, K. Sugisaki, T. Kumamoto, and T. Tsuda. 2002. Elevated levels of thymus- and activation-regulated chemokine in bronchoalveolar lavage fluid from patients with eosinophilic pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1125-1131.
  42. Dallos, T., G. R. Heiland, J. Strehl, T. Karonitsch, W. L. Gross, F. Moosig, C. Holl-Ulrich, J. H. Distler, B. Manger, G. Schett, and J. Zwerina. 2010. CCL17/thymus and activation-related chemokine in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum* 62:3496-3503.
  43. Rothenberg, M. E., A. D. Klion, F. E. Roufosse, J. E. Kahn, P. F. Weller, H. U. Simon, L. B. Schwartz, L. J. Rosenwasser, J. Ring, E. F. Griffin, A. E. Haig, P. I. Frewer, J. M. Parkin, and G. J. Gleich. 2008. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. *N Engl J Med* 358:1215-1228.
  44. Kahn, J. E., C. Grandpeix-Guyodo, I. Marroun, E. Catherinot, F. Mellot, F. Roufosse, and O. Bletry. 2010. Sustained response to mepolizumab in refractory Churg-Strauss syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 125:267-270.
  45. Kim, S., G. Marigowda, E. Oren, E. Israel, and M. E. Wechsler. 2010. Mepolizumab as a steroid-sparing treatment option in patients with Churg-Strauss syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 125:1336-1343.
  46. Straumann, A., S. Conus, P. Grzonka, H. Kita, G. Kephart, C. Bussmann, C. Beglinger, D. A. Smith, J. Patel, M. Byrne, and H. U. Simon. 2010. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut* 59:21-30.
  47. Gevaert, P., D. Lang-Loidolt, A. Lackner, H. Stammberger, H. Staudinger, T. Van Zele, G. Holtappels, J. Tavernier, P. van Cauwenberge, and C. Bachert. 2006. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *J Allergy Clin Immunol* 118:1133-1141.
  48. Swerdlow, S., E. Campo, N. L. Harris, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, and J. W. Wardiman. 2008. *World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th Edition*. IARC Pres, Lyon, France.
  49. Vardiman, J. W., J. Thiele, D. A. Arber, R. D. Brunning, M. J. Borowitz, A. Porwit, N. L. Harris, M. M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi, and C. D. Bloomfield. 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114:937-951.
  50. Coutant, G., O. Bletry, L. Prin, D. Hauteville, O. de Puyfontaine, J. F. Abgrall, and P. Godeau. 1993. [Treatment of hypereosinophilic syndromes of myeloproliferative expression with the combination of hydroxyurea and interferon alpha. Apropos of 7 cases]. *Ann Med Interne (Paris)* 144:243-250.
  51. Pardanani, A., R. P. Ketterling, S. R. Brockman, H. C. Flynn, S. F. Paternoster, B. M. Shearer, T. L. Reeder, C. Y. Li, N. C. Cross, J. Cools, D. G. Gilliland, G. W. Dewald,

- and A. Tefferi. 2003. CHIC2 deletion, a surrogate for FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* 102:3093-3096.
52. Baccharani, M., D. Cilloni, M. Rondoni, E. Ottaviani, F. Messa, S. Merante, M. Tiribelli, F. Buccisano, N. Testoni, E. Gottardi, A. de Vivo, E. Giugliano, I. Iacobucci, S. Paolini, S. Soverini, G. Rosti, F. Rancati, C. Astolfi, F. Pane, G. Saglio, and G. Martinelli. 2007. The efficacy of imatinib mesylate in patients with FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive hypereosinophilic syndrome. Results of a multicenter prospective study. *Haematologica* 92:1173-1179.
  53. Apperley, J. F., M. Gardembas, J. V. Melo, R. Russell-Jones, B. J. Bain, E. J. Baxter, A. Chase, J. M. Chessells, M. Colombat, C. E. Dearden, S. Dimitrijevic, F. X. Mahon, D. Marin, Z. Nikolova, E. Olavarria, S. Silberman, B. Schultheis, N. C. Cross, and J. M. Goldman. 2002. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 347:481-487.
  54. Plotz, S. G., H. U. Simon, U. Darsow, D. Simon, E. Vassina, S. Yousefi, R. Hein, T. Smith, H. Behrendt, and J. Ring. 2003. Use of an anti-interleukin-5 antibody in the hypereosinophilic syndrome with eosinophilic dermatitis. *N Engl J Med* 349:2334-2339.
  55. Roufosse, F., A. de Lavareille, L. Schandene, E. Cogan, A. Georgelas, L. Wagner, L. Xi, M. Raffeld, M. Goldman, G. J. Gleich, and A. Klion. 2010. Mepolizumab as a corticosteroid-sparing agent in lymphocytic variant hypereosinophilic syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 126:828-835 e823.
  56. Buitenhuis, M., L. P. Verhagen, J. Cools, and P. J. Coffey. 2007. Molecular mechanisms underlying FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -mediated myeloproliferation. *Cancer Res* 67:3759-3766.
  57. Kondo, M., A. J. Wagers, M. G. Manz, S. S. Prohaska, D. C. Scherer, G. F. Beilhack, J. A. Shizuru, and I. L. Weissman. 2003. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 21:759-806.
  58. Rosenbauer, F., and D. G. Tenen. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* 7:105-117.
  59. Papathanasiou, P., J. L. Attema, H. Karsunky, J. Xu, S. T. Smale, and I. L. Weissman. 2009. Evaluation of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells with CD150. *Stem Cells* 27:2498-2508.
  60. Morita, Y., H. Ema, and H. Nakauchi. 2010. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med* 207:1173-1182.
  61. Trumpp, A., M. Essers, and A. Wilson. 2010. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 10:201-209.
  62. Lane, S. W., D. T. Scadden, and D. G. Gilliland. 2009. The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 114:1150-1157.
  63. Kondo, M., I. L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-672.
  64. Akashi, K., D. Traver, T. Miyamoto, and I. L. Weissman. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197.
  65. Reyes, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman. 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111.
  66. Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C. T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O. J. Borge, L. A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, and S. E. Jacobsen. 2005. Identification of Flt3<sup>+</sup> lympho-myeloid stem

- cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121:295-306.
67. Doulatov, S., F. Notta, K. Eppert, L. T. Nguyen, P. S. Ohashi, and J. E. Dick. 2010. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol* 11:585-593.
  68. Kawamoto, H. 2006. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol* 27:169-175.
  69. Iwasaki, H., and K. Akashi. 2007. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 26:726-740.
  70. Blanchard, C., and M. E. Rothenberg. 2009. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol* 101:81-121.
  71. Nerlov, C., K. M. McNagny, G. Doderlein, E. Kowenz-Leutz, and T. Graf. 1998. Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. *Genes Dev* 12:2413-2423.
  72. Zhang, D. E., P. Zhang, N. D. Wang, C. J. Hetherington, G. J. Darlington, and D. G. Tenen. 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:569-574.
  73. Iwasaki, H., S. Mizuno, R. Mayfield, H. Shigematsu, Y. Arinobu, B. Seed, M. F. Gurish, K. Takatsu, and K. Akashi. 2005. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med* 201:1891-1897.
  74. Mori, Y., H. Iwasaki, K. Kohno, G. Yoshimoto, Y. Kikushige, A. Okeda, N. Uike, H. Niino, K. Takenaka, K. Nagafuji, T. Miyamoto, M. Harada, K. Takatsu, and K. Akashi. 2009. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* 206:183-193.
  75. Yang, D., S. Suzuki, L. J. Hao, Y. Fujii, A. Yamauchi, M. Yamamoto, M. Nakamura, and A. Kumatori. 2000. Eosinophil-specific regulation of gp91(phox) gene expression by transcription factors GATA-1 and GATA-2. *J Biol Chem* 275:9425-9432.
  76. Yu, C., A. B. Cantor, H. Yang, C. Browne, R. A. Wells, Y. Fujiwara, and S. H. Orkin. 2002. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* 195:1387-1395.
  77. Humbles, A. A., C. M. Lloyd, S. J. McMillan, D. S. Friend, G. Xanthou, E. E. McKenna, S. Ghiran, N. P. Gerard, C. Yu, S. H. Orkin, and C. Gerard. 2004. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305:1776-1779.
  78. Dyer, K. D., M. Czapiga, B. Foster, P. S. Foster, E. M. Kang, C. M. Lappas, J. M. Moser, N. Naumann, C. M. Percopo, S. J. Siegel, J. M. Swartz, S. Ting-De Ravin, and H. F. Rosenberg. 2007. Eosinophils from lineage-ablated Delta dblGATA bone marrow progenitors: the dblGATA enhancer in the promoter of GATA-1 is not essential for differentiation ex vivo. *J Immunol* 179:1693-1699.
  79. Hirasawa, R., R. Shimizu, S. Takahashi, M. Osawa, S. Takayanagi, Y. Kato, M. Onodera, N. Minegishi, M. Yamamoto, K. Fukao, H. Taniguchi, H. Nakauchi, and A. Iwama. 2002. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med* 195:1379-1386.
  80. McNagny, K. M., M. H. Sieweke, G. Doderlein, T. Graf, and C. Nerlov. 1998. Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *Embo J* 17:3669-3680.
  81. Du, J., M. J. Stankiewicz, Y. Liu, Q. Xi, J. E. Schmitz, J. A. Lekstrom-Himes, and S. J. Ackerman. 2002. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and

- C/EBPepsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem* 277:43481-43494.
82. Bedi, R., J. Du, A. K. Sharma, I. Gomes, and S. J. Ackerman. 2009. Human C/EBP-epsilon activator and repressor isoforms differentially reprogram myeloid lineage commitment and differentiation. *Blood* 113:317-327.
  83. Milanovic, M., G. Terszowski, D. Struck, O. Liesenfeld, and D. Carstanjen. 2008. IFN consensus sequence binding protein (Icsbp) is critical for eosinophil development. *J Immunol* 181:5045-5053.
  84. de Bruin, A. M., M. Buitenhuis, K. F. van der Sluijs, K. P. van Gisbergen, L. Boon, and M. A. Nolte. 2010. Eosinophil differentiation in the bone marrow is inhibited by T cell-derived IFN-gamma. *Blood* 116:2559-2569.
  85. Iwasaki, H., S. Mizuno, Y. Arinobu, H. Ozawa, Y. Mori, H. Shigematsu, K. Takatsu, D. G. Tenen, and K. Akashi. 2006. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev* 20:3010-3021.
  86. Yamaguchi, Y., S. J. Ackerman, N. Minegishi, M. Takiguchi, M. Yamamoto, and T. Suda. 1998. Mechanisms of transcription in eosinophils: GATA-1, but not GATA-2, transactivates the promoter of the eosinophil granule major basic protein gene. *Blood* 91:3447-3458.
  87. Lee, J. J., D. Dimina, M. P. Macias, S. I. Ochkur, M. P. McGarry, K. R. O'Neill, C. Protheroe, R. Pero, T. Nguyen, S. A. Cormier, E. Lenkiewicz, D. Colbert, L. Rinaldi, S. J. Ackerman, C. G. Irvin, and N. A. Lee. 2004. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305:1773-1776.
  88. Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Matthaei, and I. G. Young. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183:195-201.
  89. Rothenberg ME, G. G., Roufosse FE, Rosenwasser LJ, Weller PF. 2006. Steroid-sparing effects of anti-IL-5 monoclonal antibody (mepolizumab) therapy in patients with HES: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [ASH Annual Meeting Abstracts]. *Blood* 108:Abstract 373.
  90. Leckie, M. J., A. ten Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B. J. O'Connor, C. M. Walls, A. K. Mathur, H. C. Cowley, K. F. Chung, R. Djukanovic, T. T. Hansel, S. T. Holgate, P. J. Sterk, and P. J. Barnes. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-2148.
  91. Flood-Page, P. T., A. N. Menzies-Gow, A. B. Kay, and D. S. Robinson. 2003. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 167:199-204.
  92. Dent, L. A., M. Strath, A. L. Mellor, and C. J. Sanderson. 1990. Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med* 172:1425-1431.
  93. Lee, N. A., M. P. McGarry, K. A. Larson, M. A. Horton, A. B. Kristensen, and J. J. Lee. 1997. Expression of IL-5 in thymocytes/T cells leads to the development of a massive eosinophilia, extramedullary eosinophilopoiesis, and unique histopathologies. *J Immunol* 158:1332-1344.
  94. Martinez-Moczygemba, M., and D. P. Huston. 2003. Biology of common beta receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 112:653-665; quiz 666.
  95. Beekman, J. M., L. P. Verhagen, N. Geijsen, and P. J. Coffey. 2009. Regulation of myelopoiesis through syntenin-mediated modulation of IL-5 receptor output. *Blood* 114:3917-3927.

96. Buitenhuis, M., B. Baltus, J. W. Lammers, P. J. Coffey, and L. Koenderman. 2003. Signal transducer and activator of transcription 5a (STAT5a) is required for eosinophil differentiation of human cord blood-derived CD34+ cells. *Blood* 101:134-142.
97. Radinger, M., A. Bossios, M. Sjostrand, Y. Lu, C. Malmhall, A. K. Dahlborn, J. J. Lee, and J. Lotvall. 2011. Local proliferation and mobilization of CCR3(+) CD34(+) eosinophil-lineage-committed cells in the lung. *Immunology* 132:144-154.
98. Toffalini, F., and J. B. Demoulin. 2010. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases. *Blood* 116:2429-2437.
99. Hubbard, S. R. 2004. Juxtamembrane autoinhibition in receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:464-471.
100. Furitsu, T., T. Tsujimura, T. Tono, H. Ikeda, H. Kitayama, U. Koshimizu, H. Sugahara, J. H. Butterfield, L. K. Ashman, Y. Kanayama, and et al. 1993. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest* 92:1736-1744.
101. Heinrich, M. C., C. L. Corless, A. Duensing, L. McGreevey, C. J. Chen, N. Joseph, S. Singer, D. J. Griffith, A. Haley, A. Town, G. D. Demetri, C. D. Fletcher, and J. A. Fletcher. 2003. PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299:708-710.
102. Griffith, J., J. Black, C. Faerman, L. Swenson, M. Wynn, F. Lu, J. Lippke, and K. Saxena. 2004. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 13:169-178.
103. Chan, P. M., S. Ilangumaran, J. La Rose, A. Chakrabarty, and R. Rottapel. 2003. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol* 23:3067-3078.
104. Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, and S. Misawa. 1996. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10:1911-1918.
105. Reindl, C., K. Bagrintseva, S. Vempati, S. Schnittger, J. W. Ellwart, K. Wenig, K. P. Hopfner, W. Hiddemann, and K. Spiekermann. 2006. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 107:3700-3707.
106. Irusta, P. M., and D. DiMaio. 1998. A single amino acid substitution in a WW-like domain of diverse members of the PDGF receptor subfamily of tyrosine kinases causes constitutive receptor activation. *Embo J* 17:6912-6923.
107. Lahortiga, I., C. Akin, J. Cools, T. M. Wilson, N. Mentens, D. C. Arthur, I. Maric, P. Noel, C. Kocabas, P. Marynen, L. S. Lessin, I. Wlodarska, J. Robyn, and D. D. Metcalfe. 2008. Activity of imatinib in systemic mastocytosis with chronic basophilic leukemia and a PRKG2-PDGFRB fusion. *Haematologica* 93:49-56.
108. Krause, D. S., and R. A. Van Etten. 2005. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 353:172-187.
109. McWhirter, J. R., D. L. Galasso, and J. Y. Wang. 1993. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13:7587-7595.
110. He, Y., J. A. Wertheim, L. Xu, J. P. Miller, F. G. Karnell, J. K. Choi, R. Ren, and W. S. Pear. 2002. The coiled-coil domain and Tyr177 of bcr are required to induce a murine chronic myelogenous leukemia-like disease by bcr/abl. *Blood* 99:2957-2968.
111. Carroll, M., M. H. Tomasson, G. F. Barker, T. R. Golub, and D. G. Gilliland. 1996. The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic

- myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14845-14850.
112. Xiao, S., J. G. McCarthy, J. C. Aster, and J. A. Fletcher. 2000. ZNF198-FGFR1 transforming activity depends on a novel proline-rich ZNF198 oligomerization domain. *Blood* 96:699-704.
  113. De Keersmaecker, K., J. L. Rocnik, R. Bernad, B. H. Lee, D. Leeman, O. Gielen, H. Verachtert, C. Folens, S. Munck, P. Marynen, M. Fornerod, D. G. Gilliland, and J. Cools. 2008. Kinase activation and transformation by NUP214-ABL1 is dependent on the context of the nuclear pore. *Mol Cell* 31:134-142.
  114. Gotlib, J., and J. Cools. 2008. Five years since the discovery of FIP1L1-PDGFRalpha: what we have learned about the fusion and other molecularly defined eosinophilias. *Leukemia* 22:1999-2010.
  115. Walz, C., J. Score, J. Mix, D. Cilloni, C. Roche-Lestienne, R. F. Yeh, J. L. Wiemels, E. Ottaviani, P. Erben, A. Hochhaus, M. Baccarani, D. Grimwade, C. Preudhomme, J. Apperley, G. Martinelli, G. Saglio, N. C. Cross, and A. Reiter. 2009. The molecular anatomy of the FIP1L1-PDGFRalpha fusion gene. *Leukemia* 23:271-278.
  116. Stover, E. H., J. Chen, C. Folens, B. H. Lee, N. Mentens, P. Marynen, I. R. Williams, D. G. Gilliland, and J. Cools. 2006. Activation of FIP1L1-PDGFRalpha requires disruption of the juxtamembrane domain of PDGFRalpha and is FIP1L1-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8078-8083.
  117. Heldin, C. H., and B. Westermark. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283-1316.
  118. Fukushima, K., I. Matsumura, S. Ezoe, M. Tokunaga, M. Yasumi, Y. Satoh, H. Shibayama, H. Tanaka, A. Iwama, and Y. Kanakura. 2009. FIP1L1-PDGFRalpha imposes eosinophil lineage commitment on hematopoietic stem/progenitor cells. *J Biol Chem* 284:7719-7732.
  119. Miyake, S., M. L. Lupper, Jr., B. Druker, and H. Band. 1998. The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7927-7932.
  120. Miyake, S., K. P. Mullane-Robinson, N. L. Lill, P. Douillard, and H. Band. 1999. Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain. *J Biol Chem* 274:16619-16628.
  121. Toffalini, F., A. Kallin, P. Vandenberghe, P. Pierre, L. Michaux, J. Cools, and J. B. Demoulin. 2009. The fusion proteins TEL-PDGFRbeta and FIP1L1-PDGFRalpha escape ubiquitination and degradation. *Haematologica* 94:1085-1093.
  122. Quintas-Cardama, A., and J. Cortes. 2009. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113:1619-1630.
  123. Cools, J., H. Quentmeier, B. J. Huntly, P. Marynen, J. D. Griffin, H. G. Drexler, and D. G. Gilliland. 2004. The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFRalpha-positive chronic eosinophilic leukemia. *Blood* 103:2802-2805.
  124. Lee, J. T., Jr., and J. A. McCubrey. 2002. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 16:486-507.
  125. Chui, C. M., K. Li, M. Yang, C. K. Chuen, T. F. Fok, C. K. Li, and P. M. Yuen. 2003. Platelet-derived growth factor up-regulates the expression of transcription factors NF-E2, GATA-1 and c-Fos in megakaryocytic cell lines. *Cytokine* 21:51-64.
  126. Cools, J., E. H. Stover, C. L. Boulton, J. Gotlib, R. D. Legare, S. M. Amaral, D. P. Curley, N. Duclos, R. Rowan, J. L. Kutok, B. H. Lee, I. R. Williams, S. E. Coutre, R.

- M. Stone, D. J. DeAngelo, P. Marynen, P. W. Manley, T. Meyer, D. Fabbro, D. Neuberg, E. Weisberg, J. D. Griffin, and D. G. Gilliland. 2003. PKC412 overcomes resistance to imatinib in a murine model of FIP1L1-PDGFRalpha-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell* 3:459-469.
127. Yamada, Y., M. E. Rothenberg, A. W. Lee, H. S. Akei, E. B. Brandt, D. A. Williams, and J. A. Cancelas. 2006. The FIP1L1-PDGFR fusion gene cooperates with IL-5 to induce murine hypereosinophilic syndrome (HES)/chronic eosinophilic leukemia (CEL)-like disease. *Blood* 107:4071-4079.
128. Burgstaller, S., S. Kreil, K. Waghorn, G. Metzgeroth, C. Preudhomme, K. Zoi, H. White, D. Cilloni, C. Zoi, F. Brito-Babapulle, C. Walz, A. Reiter, and N. C. Cross. 2007. The severity of FIP1L1-PDGFR-positive chronic eosinophilic leukaemia is associated with polymorphic variation at the IL5RA locus. *Leukemia* 21:2428-2432.
129. Graw, R. G., Jr., C. D. Buckner, J. Whang-Peng, B. G. Leventhal, G. Kruger, C. Berard, and E. S. Henderson. 1970. Complication of bone-marrow transplantation. Graft-versus-host disease resulting from chronic-myelogenous-leukaemia leucocyte transfusions. *Lancet* 2:338-341.
130. Levin, R. H., J. Whang, J. H. Tjio, P. P. Carbone, E. Frei, 3rd, and E. J. Freireich. 1963. Persistent Mitosis of Transfused Homologous Leukocytes in Children Receiving Antileukemic Therapy. *Science* 142:1305-1311.
131. Bonnet, D., and J. E. Dick. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3:730-737.
132. Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, and J. E. Dick. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645-648.
133. Jordan, C. T., M. L. Guzman, and M. Noble. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355:1253-1261.
134. Lane, S. W., and D. G. Gilliland. 2010. Leukemia stem cells. *Semin Cancer Biol* 20:71-76.
135. Graham, S. M., H. G. Jorgensen, E. Allan, C. Pearson, M. J. Alcorn, L. Richmond, and T. L. Holyoake. 2002. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99:319-325.
136. Jiang, X., Y. Zhao, C. Smith, M. Gasparetto, A. Turhan, A. Eaves, and C. Eaves. 2007. Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 21:926-935.
137. Copland, M., A. Hamilton, L. J. Elrick, J. W. Baird, E. K. Allan, N. Jordanides, M. Barow, J. C. Mountford, and T. L. Holyoake. 2006. Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107:4532-4539.
138. Mahon, F. X., D. Rea, J. Guilhot, F. Guilhot, F. Huguet, F. Nicolini, L. Legros, A. Charbonnier, A. Guerci, B. Varet, G. Etienne, J. Reiffers, and P. Rousselot. 2010. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* 11:1029-1035.
139. Ross, D. M., S. Branford, J. F. Seymour, A. P. Schwarer, C. Arthur, P. A. Bartley, C. Slader, C. Field, P. Dang, R. J. Filshie, A. K. Mills, A. P. Grigg, J. V. Melo, and T. P. Hughes. 2010. Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia* 24:1719-1724.

140. Corbin, A. S., A. Agarwal, M. Loriaux, J. Cortes, M. W. Deininger, and B. J. Druker. 2011. Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest* 121:396-409.
141. Krivtsov, A. V., D. Twomey, Z. Feng, M. C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J. E. Levine, J. Wang, W. C. Hahn, D. G. Gilliland, T. R. Golub, and S. A. Armstrong. 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442:818-822.
142. Huntly, B. J., H. Shigematsu, K. Deguchi, B. H. Lee, S. Mizuno, N. Duclos, R. Rowan, S. Amaral, D. Curley, I. R. Williams, K. Akashi, and D. G. Gilliland. 2004. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 6:587-596.
143. Cozzio, A., E. Passegue, P. M. Ayton, H. Karsunky, M. L. Cleary, and I. L. Weissman. 2003. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 17:3029-3035.
144. Wojiski, S., F. C. Guibal, T. Kindler, B. H. Lee, J. L. Jesneck, A. Fabian, D. G. Tenen, and D. G. Gilliland. 2009. PML-RARalpha initiates leukemia by conferring properties of self-renewal to committed promyelocytic progenitors. *Leukemia* 23:1462-1471.
145. Sarry, J. E., K. Murphy, R. Perry, P. V. Sanchez, A. Secreto, C. Keefer, C. R. Swider, A. C. Strzelecki, C. Cavelier, C. Recher, V. Mansat-De Mas, E. Delabesse, G. Danet-Desnoyers, and M. Carroll. 2011. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rgamma-deficient mice. *J Clin Invest* 121:384-395.
146. Sloma, I., X. Jiang, A. C. Eaves, and C. J. Eaves. 2010. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24:1823-1833.
147. Jamieson, C. H., L. E. Ailles, S. J. Dylla, M. Muijtjens, C. Jones, J. L. Zehnder, J. Gotlib, K. Li, M. G. Manz, A. Keating, C. L. Sawyers, and I. L. Weissman. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351:657-667.
148. Abrahamsson, A. E., I. Geron, J. Gotlib, K. H. Dao, C. F. Barroga, I. G. Newton, F. J. Giles, J. Durocher, R. S. Creusot, M. Karimi, C. Jones, J. L. Zehnder, A. Keating, R. S. Negrin, I. L. Weissman, and C. H. Jamieson. 2009. Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3925-3929.
149. Notta, F., C. G. Mullighan, J. C. Wang, A. Poepl, S. Doulatov, L. A. Phillips, J. Ma, M. D. Minden, J. R. Downing, and J. E. Dick. 2011. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature* 469:362-367.
150. Dick, J. E. 2008. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112:4793-4807.
151. Visvader, J. E., and G. J. Lindeman. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8:755-768.
152. Lemoli, R. M., V. Salvestrini, E. Bianchi, F. Bertolini, M. Fogli, M. Amabile, A. Tafuri, S. Salati, R. Zini, N. Testoni, C. Rabascio, L. Rossi, I. Martin-Padura, F. Castagnetti, P. Marighetti, G. Martinelli, M. Baccarani, S. Ferrari, and R. Manfredini. 2009. Molecular and functional analysis of the stem cell compartment of chronic myelogenous leukemia reveals the presence of a CD34- cell population with intrinsic resistance to imatinib. *Blood* 114:5191-5200.
153. Quintana, E., M. Shackleton, M. S. Sabel, D. R. Fullen, T. M. Johnson, and S. J. Morrison. 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456:593-598.



154. Sanchez, P. V., R. L. Perry, J. E. Sarry, A. E. Perl, K. Murphy, C. R. Swider, A. Bagg, J. K. Choi, J. A. Biegel, G. Danet-Desnoyers, and M. Carroll. 2009. A robust xenotransplantation model for acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23:2109-2117.
155. Tefferi, A., T. L. Lasho, S. R. Brockman, M. A. Elliott, A. Dispenzieri, and A. Pardanani. 2004. FIP1L1-PDGFR $\alpha$  and c-kit D816V mutation-based clonality studies in systemic mast cell disease associated with eosinophilia. *Haematologica* 89:871-873.
156. Robyn, J., S. Lemery, J. P. McCoy, J. Kubofcik, Y. J. Kim, S. Pack, T. B. Nutman, C. Dunbar, and A. D. Klion. 2006. Multilineage involvement of the fusion gene in patients with FIP1L1/PDGFR $\alpha$ -positive hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol* 132:286-292.
157. Capovilla, M., J. M. Cayuela, C. Bilhou-Nabera, C. Gardin, R. Letestu, F. Baran-Marzak, P. Fenaux, and A. Martin. 2008. Synchronous FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive chronic eosinophilic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma: a bilineal clonal malignancy. *Eur J Haematol* 80:81-86.
158. Metzgeroth, G., C. Walz, J. Score, R. Siebert, S. Schnittger, C. Haferlach, H. Popp, T. Haferlach, P. Erben, J. Mix, M. C. Muller, H. Beneke, L. Muller, F. Del Valle, W. E. Aulitzky, G. Wittkowsky, N. Schmitz, C. Schulte, K. Muller-Hermelink, E. Hodges, S. J. Whittaker, F. Diecker, H. Dohner, P. Schuld, R. Hehlmann, A. Hochhaus, N. C. Cross, and A. Reiter. 2007. Recurrent finding of the FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fusion gene in eosinophilia-associated acute myeloid leukemia and lymphoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia* 21:1183-1188.
159. McPherson, T., E. W. Cowen, E. McBurney, and A. D. Klion. 2006. Platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ -associated hypereosinophilic syndrome and lymphomatoid papulosis. *Br J Dermatol* 155:824-826.
160. Galimberti, S., E. Ciabatti, F. Ottimo, A. Rossi, L. Trombi, G. Carulli, G. Cervetti, L. Matti, G. Bianchi, and M. Petrini. 2007. Cell clonality in hypereosinophilic syndrome: what pathogenetic role? *Clin Exp Rheumatol* 25:17-22.
161. Helbig, G., A. Wiczorkiewicz, J. Dziaczkowska-Suszek, M. Majewski, and S. Kyrzcz-Krzemien. 2009. T-cell abnormalities are present at high frequencies in patients with hypereosinophilic syndrome. *Haematologica* 94:1236-1241.
162. Crescenzi, B., A. Chase, R. L. Starza, D. Beacci, V. Rosti, A. Galli, G. Specchia, M. F. Martelli, P. Vandenberghe, J. Cools, A. V. Jones, N. C. Cross, P. Marynen, and C. Mecucci. 2007. FIP1L1-PDGFR $\alpha$  in chronic eosinophilic leukemia and BCR-ABL1 in chronic myeloid leukemia affect different leukemic cells. *Leukemia* 21:397-402.
163. Gorre, M. E., M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, R. Paquette, P. N. Rao, and C. L. Sawyers. 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293:876-880.
164. von Bubnoff, N., M. Sandherr, G. Schlimok, R. Andreesen, C. Peschel, and J. Duyster. 2005. Myeloid blast crisis evolving during imatinib treatment of an FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive chronic myeloproliferative disease with prominent eosinophilia. *Leukemia* 19:286-287.
165. Ohnishi, H., K. Kandabashi, Y. Maeda, M. Kawamura, and T. Watanabe. 2006. Chronic eosinophilic leukaemia with FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fusion and T6741 mutation that evolved from Langerhans cell histiocytosis with eosinophilia after chemotherapy. *Br J Haematol* 134:547-549.
166. Stein, M. L., J. M. Villanueva, B. K. Buckmeier, Y. Yamada, A. H. Filipovich, A. H. Assa'ad, and M. E. Rothenberg. 2008. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy reduces eosinophil activation ex vivo and increases IL-5 and IL-5 receptor levels. *J Allergy Clin Immunol* 121:1473-1483, 1483 e1471-1474.

167. Simon, D., S. Salemi, S. Yousefi, and H. U. Simon. 2008. Primary resistance to imatinib in Fip1-like 1-platelet-derived growth factor receptor alpha-positive eosinophilic leukemia. *J Allergy Clin Immunol* 121:1054-1056.
168. Salemi, S., S. Yousefi, D. Simon, I. Schmid, L. Moretti, L. Scapozza, and H. U. Simon. 2009. A novel FIP1L1-PDGFR $\alpha$  mutant destabilizing the inactive conformation of the kinase domain in chronic eosinophilic leukemia/hypereosinophilic syndrome. *Allergy*.
169. Lierman, E., L. Michaux, E. Beullens, P. Pierre, P. Marynen, J. Cools, and P. Vandenberghe. 2009. FIP1L1-PDGFR $\alpha$  D842V, a novel panresistant mutant, emerging after treatment of FIP1L1-PDGFR $\alpha$  T674I eosinophilic leukemia with single agent sorafenib. *Leukemia*.
170. Sorour, Y., C. D. Dalley, J. A. Snowden, N. C. Cross, and J. T. Reilly. 2009. Acute myeloid leukaemia with associated eosinophilia: justification for FIP1L1-PDGFR $\alpha$  screening in cases lacking the CFBF-MYH11 fusion gene. *Br J Haematol* 146:225-227.
171. Score, J., C. Walz, J. V. Jovanovic, A. V. Jones, K. Waghorn, C. Hidalgo-Curtis, F. Lin, D. Grimwade, F. Grand, A. Reiter, and N. C. Cross. 2009. Detection and molecular monitoring of FIP1L1-PDGFR $\alpha$ -positive disease by analysis of patient-specific genomic DNA fusion junctions. *Leukemia* 23:332-339.
172. Ikezoe, T., K. Togitani, T. Tasaka, C. Nishioka, and A. Yokoyama. 2010. Successful treatment of imatinib-resistant hypereosinophilic syndrome with nilotinib. *Leuk Res* 34:e200-201.
173. Mocumbi, A. O., M. B. Ferreira, D. Sidi, and M. H. Yacoub. 2008. A population study of endomyocardial fibrosis in a rural area of Mozambique. *N Engl J Med* 359:43-49.
174. Bukhman, G., J. Ziegler, and E. Parry. 2008. Endomyocardial fibrosis: still a mystery after 60 years. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e97.
175. Yalonetsky, S., D. Mishaly, A. Ben-Barak, and A. Lorber. 2008. Mitral valve destruction by Hodgkin's lymphoma-associated Loeffler endocarditis. *Pediatr Cardiol* 29:983-985.
176. Eicher, J. C., B. Bonnotte, I. L'Huillier, Y. Cottin, D. Potard, J. Abou Taam, G. Muller, H. Guy, J. P. Tent, and J. E. Wolf. 2009. [Cardiovascular manifestations of eosinophilia: clinical and echocardiographic presentation]. *Rev Med Interne* 30:1011-1019.
177. Alter, P., and B. Maisch. 2006. Endomyocardial fibrosis in Churg-Strauss syndrome assessed by cardiac magnetic resonance imaging. *Int J Cardiol* 108:112-113.
178. 1993. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 47-1993. Presentation of case. A 28-year-old man with recurrent ventricular tachycardia and dysfunction of multiple organs. *N Engl J Med* 329:1639-1647.
179. Neves, J. S., S. A. Perez, L. A. Spencer, R. C. Melo, L. Reynolds, I. Ghiran, S. Mahmudi-Azer, S. O. Odemuyiwa, A. M. Dvorak, R. Moqbel, and P. F. Weller. 2008. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18478-18483.
180. Nutten, S., J. P. Papin, G. Woerly, D. W. Dunne, J. MacGregor, F. Trottein, and M. Capron. 1999. Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur J Immunol* 29:799-808.
181. Costello, R., T. O'Callaghan, and G. Sebahoun. 2005. [Eosinophils and antitumour response]. *Rev Med Interne* 26:479-484.

182. Lotfi, R., J. J. Lee, and M. T. Lotze. 2007. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother* 30:16-28.
183. Legrand, F., V. Driss, G. Woerly, S. Loiseau, E. Hermann, J. J. Fournie, L. Heliot, V. Mattot, F. Soncin, M. L. Gougeon, D. Dombrowicz, and M. Capron. 2009. A functional gammadeltaTCR/CD3 complex distinct from gammadeltaT cells is expressed by human eosinophils. *PLoS One* 4:e5926.
184. Hogan, S. P., H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, P. Lacy, A. B. Kay, and M. E. Rothenberg. 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38:709-750.
185. Lacy, P., D. Abdel-Latif, M. Steward, S. Musat-Marcu, S. F. Man, and R. Moqbel. 2003. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol* 170:2670-2679.
186. Ulrich, M., A. Petre, N. Youhnovski, F. Promm, M. Schirle, M. Schumm, R. S. Pero, A. Doyle, J. Checkel, H. Kita, N. Thiyagarajan, K. R. Acharya, P. Schmid-Grendelmeier, H. U. Simon, H. Schwarz, M. Tsutsui, H. Shimokawa, G. Bellon, J. J. Lee, M. Przybylski, and G. Doring. 2008. Post-translational tyrosine nitration of eosinophil granule toxins mediated by eosinophil peroxidase. *J Biol Chem* 283:28629-28640.
187. Bandeira-Melo, C., P. T. Bozza, and P. F. Weller. 2002. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 109:393-400.
188. Feltenmark, S., N. Gautam, A. Brunnstrom, W. Griffiths, L. Backman, C. Edenius, L. Lindbom, M. Bjorkholm, and H. E. Claesson. 2008. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:680-685.
189. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.
190. von Kockritz-Blickwede, M., O. Goldmann, P. Thulin, K. Heinemann, A. Norrby-Teglund, M. Rohde, and E. Medina. 2008. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* 111:3070-3080.
191. Yousefi, S., J. A. Gold, N. Andina, J. J. Lee, A. M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G. J. Gleich, and H. U. Simon. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14:949-953.
192. Dworski, R., H. U. Simon, A. Hoskins, and S. Yousefi. Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol*.
193. Simon, D., S. Hoesli, N. Roth, S. Staedler, S. Yousefi, and H. U. Simon. 2011. Eosinophil extracellular DNA traps in skin diseases. *J Allergy Clin Immunol* 127:194-199.
194. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176:231-241.
195. Lierman, E., E. H. Stover, N. Berghen, P. Bulens, and J. Cools. 2009. Downstream effectors of FIP1L1-PDGFR $\alpha$  as target for therapy in chronic eosinophilic leukemia-Oral Communication. In *6<sup>th</sup> Biennial Symposium of the International Eosinophil Society*, Bruges, Belgium.
196. Lee, J. S., E. J. Yang, and I. S. Kim. 2009. The roles of MCP-1 and protein kinase C delta activation in human eosinophilic leukemia EoL-1 cells. *Cytokine* 48:186-195.

197. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22:1276-1312.
198. Liao, C. H., H. Akazawa, M. Tamagawa, K. Ito, N. Yasuda, Y. Kudo, R. Yamamoto, Y. Ozasa, M. Fujimoto, P. Wang, H. Nakauchi, H. Nakaya, and I. Komuro. 2010. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest* 120:242-253.
199. Eitner, F., E. Bucher, C. van Roeyen, U. Kunter, S. Rong, C. Seikrit, L. Villa, P. Boor, L. Fredriksson, G. Backstrom, U. Eriksson, A. Ostman, J. Floege, and T. Ostendorf. 2008. PDGF-C is a proinflammatory cytokine that mediates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 19:281-289.
200. Svegliati, S., R. Cancelli, P. Sambo, M. Luchetti, P. Paroncini, G. Orlandini, G. Discepoli, R. Paterno, M. Santillo, C. Cuzzo, S. Cassano, E. V. Avvedimento, and A. Gabrielli. 2005. Platelet-derived growth factor and reactive oxygen species (ROS) regulate Ras protein levels in primary human fibroblasts via ERK1/2. Amplification of ROS and Ras in systemic sclerosis fibroblasts. *J Biol Chem* 280:36474-36482.
201. Svegliati, S., A. Olivieri, N. Campelli, M. Luchetti, A. Poloni, S. Trappolini, G. Moroncini, A. Bacigalupo, P. Leoni, E. V. Avvedimento, and A. Gabrielli. 2007. Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood* 110:237-241.
202. Baroni, S. S., M. Santillo, F. Bevilacqua, M. Luchetti, T. Spadoni, M. Mancini, P. Fraticelli, P. Sambo, A. Funaro, A. Kazlauskas, E. V. Avvedimento, and A. Gabrielli. 2006. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med* 354:2667-2676.
203. Classen, J. F., D. Henrohn, F. Rorsman, J. Lennartsson, B. R. Lauwerys, G. Wikstrom, C. Rorsman, S. Lenglez, K. Franck-Larsson, J. P. Tomasi, O. Kampe, M. Vanthuyne, F. A. Houssiau, and J. B. Demoulin. 2009. Lack of evidence of stimulatory autoantibodies to platelet-derived growth factor receptor in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 60:1137-1144.
204. Loizos, N., L. Lariccia, J. Weiner, H. Griffith, F. Boin, L. Hummers, F. Wigley, and P. Kussie. 2009. Lack of detection of agonist activity by antibodies to platelet-derived growth factor receptor alpha in a subset of normal and systemic sclerosis patient sera. *Arthritis Rheum* 60:1145-1151.
205. Matsui, T., M. Heidaran, T. Miki, N. Popescu, W. La Rochelle, M. Kraus, J. Pierce, and S. Aaronson. 1989. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* 243:800-804.
206. Lemmon, M. A., and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141:1117-1134.
207. Stephenson, D. A., M. Mercola, E. Anderson, C. Y. Wang, C. D. Stiles, D. F. Bowen-Pope, and V. M. Chapman. 1991. Platelet-derived growth factor receptor alpha-subunit gene (Pdgfra) is deleted in the mouse patch (Ph) mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6-10.
208. Soriano, P. 1997. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* 124:2691-2700.
209. Joosten, P. H., M. Toepoel, E. C. Mariman, and E. J. Van Zoelen. 2001. Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene predispose to human neural tube defects. *Nat Genet* 27:215-217.
210. Ostman, A., and C. H. Heldin. 2007. PDGF receptors as targets in tumor treatment. *Adv Cancer Res* 97:247-274.
211. Jones, A. V., and N. C. Cross. 2004. Oncogenic derivatives of platelet-derived growth factor receptors. *Cell Mol Life Sci* 61:2912-2923.

212. Fudge, K., C. Y. Wang, and M. E. Stearns. 1994. Immunohistochemistry analysis of platelet-derived growth factor A and B chains and platelet-derived growth factor alpha and beta receptor expression in benign prostatic hyperplasias and Gleason-graded human prostate adenocarcinomas. *Mod Pathol* 7:549-554.
213. Jechlinger, M., A. Sommer, R. Moriggl, P. Seither, N. Kraut, P. Capodiecci, M. Donovan, C. Cordon-Cardo, H. Beug, and S. Grunert. 2006. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* 116:1561-1570.
214. Skobe, M., and N. E. Fusenig. 1998. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1050-1055.
215. Moinfar, F., Y. G. Man, L. Arnould, G. L. Bratthauer, M. Ratschek, and F. A. Tavassoli. 2000. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 60:2562-2566.
216. Pietras, K., J. Pahler, G. Bergers, and D. Hanahan. 2008. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med* 5:e19.
217. Pietras, K., K. Rubin, T. Sjoblom, E. Buchdunger, M. Sjoquist, C. H. Heldin, and A. Ostman. 2002. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 62:5476-5484.
218. Russell, M. R., Q. Liu, and A. Fatatis. 2010. Targeting the {alpha} receptor for platelet-derived growth factor as a primary or combination therapy in a preclinical model of prostate cancer skeletal metastasis. *Clin Cancer Res* 16:5002-5010.
219. Russell, M. R., Q. Liu, H. Lei, A. Kazlauskas, and A. Fatatis. 2010. The alpha-receptor for platelet-derived growth factor confers bone-metastatic potential to prostate cancer cells by ligand- and dimerization-independent mechanisms. *Cancer Res* 70:4195-4203.
220. Hirota, S., A. Ohashi, T. Nishida, K. Isozaki, K. Kinoshita, Y. Shinomura, and Y. Kitamura. 2003. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 125:660-667.
221. Heinrich, M. C., C. L. Corless, G. D. Demetri, C. D. Blanke, M. von Mehren, H. Joensuu, L. S. McGreevey, C. J. Chen, A. D. Van den Abbeele, B. J. Druker, B. Kiese, B. Eisenberg, P. J. Roberts, S. Singer, C. D. Fletcher, S. Silberman, S. Dimitrijevic, and J. A. Fletcher. 2003. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 21:4342-4349.
222. Wardelmann, E., A. Hrychyk, S. Merkelbach-Bruse, K. Pauls, J. Goldstein, P. Hohenberger, I. Losen, C. Manegold, R. Buttner, and T. Pietsch. 2004. Association of platelet-derived growth factor receptor alpha mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J Mol Diagn* 6:197-204.
223. Corless, C. L., A. Schroeder, D. Griffith, A. Town, L. McGreevey, P. Harrell, S. Shiraga, T. Bainbridge, J. Morich, and M. C. Heinrich. 2005. PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: frequency, spectrum and in vitro sensitivity to imatinib. *J Clin Oncol* 23:5357-5364.
224. Schildhaus, H. U., T. Cavlar, E. Binot, R. Buttner, E. Wardelmann, and S. Merkelbach-Bruse. 2008. Inflammatory fibroid polyps harbour mutations in the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene. *J Pathol* 216:176-182.
225. Lasota, J., Z. F. Wang, L. H. Sobin, and M. Miettinen. 2009. Gain-of-function PDGFRA mutations, earlier reported in gastrointestinal stromal tumors, are common in small intestinal inflammatory fibroid polyps. A study of 60 cases. *Mod Pathol* 22:1049-1056.

226. Daum, O., J. Hatlova, V. Mandys, P. Grossmann, P. Mukensnabl, Z. Benes, and M. Michal. 2010. Comparison of morphological, immunohistochemical, and molecular genetic features of inflammatory fibroid polyps (Vanek's tumors). *Virchows Arch* 456:491-497.
227. Joensuu, H., M. Puputti, H. Sihto, O. Tynninen, and N. N. Nupponen. 2005. Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol* 207:224-231.
228. Ozawa, T., C. W. Brennan, L. Wang, M. Squatrito, T. Sasayama, M. Nakada, J. T. Huse, A. Pedraza, S. Utsuki, Y. Yasui, A. Tandon, E. I. Fomchenko, H. Oka, R. L. Levine, K. Fujii, M. Ladanyi, and E. C. Holland. 2010. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev* 24:2205-2218.
229. Rand, V., J. Huang, T. Stockwell, S. Ferriera, O. Buzko, S. Levy, D. Busam, K. Li, J. B. Edwards, C. Eberhart, K. M. Murphy, A. Tsiamouri, K. Beeson, A. J. Simpson, J. C. Venter, G. J. Riggins, and R. L. Strausberg. 2005. Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14344-14349.
230. Kumabe, T., Y. Sohma, T. Kayama, T. Yoshimoto, and T. Yamamoto. 1992. Amplification of alpha-platelet-derived growth factor receptor gene lacking an exon coding for a portion of the extracellular region in a primary brain tumor of glial origin. *Oncogene* 7:627-633.
231. Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, and D. N. Hayes. 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98-110.
232. Reardon, D. A., G. Dresemann, S. Taillibert, M. Campone, M. van den Bent, P. Clement, E. Blomquist, L. Gordower, H. Schultz, J. Raizer, P. Hau, J. Easaw, M. Gil, J. Tonn, A. Gijtenbeek, U. Schlegel, P. Bergstrom, S. Green, A. Weir, and Z. Nikolova. 2009. Multicentre phase II studies evaluating imatinib plus hydroxyurea in patients with progressive glioblastoma. *Br J Cancer* 101:1995-2004.
233. Razis, E., P. Selviaridis, S. Labropoulos, J. L. Norris, M. J. Zhu, D. D. Song, T. Kalebic, M. Torrens, A. Kalogera-Fountzila, G. Karkavelas, S. Karanastasi, J. A. Fletcher, and G. Fountzilas. 2009. Phase II study of neoadjuvant imatinib in glioblastoma: evaluation of clinical and molecular effects of the treatment. *Clin Cancer Res* 15:6258-6266.
234. Dresemann, G., M. Weller, M. A. Rosenthal, U. Wedding, W. Wagner, E. Engel, B. Heinrich, R. Mayer-Steinacker, A. Karup-Hansen, O. Fluge, A. Nowak, M. Mehdorn, E. Schleyer, D. Krex, I. N. Olver, J. P. Steinbach, C. Hosius, C. Sieder, G. Sorenson, R. Parker, and Z. Nikolova. 2010. Imatinib in combination with hydroxyurea versus hydroxyurea alone as oral therapy in patients with progressive pretreated glioblastoma resistant to standard dose temozolomide. *J Neurooncol* 96:393-402.
235. Hiwatari, M., T. Taki, M. Tsuchida, R. Hanada, T. Hongo, M. Sako, and Y. Hayashi. 2005. Novel missense mutations in the tyrosine kinase domain of the platelet-derived growth factor receptor alpha(PDGFRalpha) gene in childhood acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22) or inv(16)(p13q22). *Leukemia* 19:476-477.

236. Simon, M. P., F. Pedeutour, N. Sirvent, J. Grosgeorge, F. Minoletti, J. M. Coindre, M. J. Terrier-Lacombe, N. Mandahl, R. D. Craver, N. Blin, G. Sozzi, C. Turc-Carel, K. P. O'Brien, D. Kedra, I. Fransson, C. Guilbaud, and J. P. Dumanski. 1997. Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat Genet* 15:95-98.
237. Robson, M. C., L. G. Phillips, A. Thomason, L. E. Robson, and G. F. Pierce. 1992. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 339:23-25.
238. Smiell, J. M., T. J. Wieman, D. L. Steed, B. H. Perry, A. R. Sampson, and B. H. Schwab. 1999. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen* 7:335-346.
239. Distler, J. H., and O. Distler. 2010. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of fibrotic diseases such as systemic sclerosis: towards molecular targeted therapies. *Ann Rheum Dis* 69 Suppl 1:i48-51.
240. Abdollahi, A., M. Li, G. Ping, C. Plathow, S. Domhan, F. Kiessling, L. B. Lee, G. McMahon, H. J. Grone, K. E. Lipson, and P. E. Huber. 2005. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 201:925-935.
241. Yoshiji, H., R. Noguchi, S. Kuriyama, Y. Ikenaka, J. Yoshii, K. Yanase, T. Namisaki, M. Kitade, T. Masaki, and H. Fukui. 2005. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G907-913.
242. Akhmetshina, A., P. Venalis, C. Dees, N. Busch, J. Zwerina, G. Schett, O. Distler, and J. H. Distler. 2009. Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 60:219-224.
243. Kay, J., and W. A. High. 2008. Imatinib mesylate treatment of nephrogenic systemic fibrosis. *Arthritis Rheum* 58:2543-2548.
244. Magro, L., M. Mohty, B. Catteau, V. Coiteux, P. Chevallier, L. Terriou, J. P. Jouet, and I. Yakoub-Agha. 2009. Imatinib mesylate as salvage therapy for refractory sclerotic chronic graft-versus-host disease. *Blood* 114:719-722.
245. Olivieri, A., F. Locatelli, M. Zecca, A. Sanna, M. Cimminiello, R. Raimondi, G. Gini, N. Mordini, A. Balduzzi, P. Leoni, A. Gabrielli, and A. Bacigalupo. 2009. Imatinib for refractory chronic graft-versus-host disease with fibrotic features. *Blood* 114:709-718.
246. Heldin, C. H., A. Ostman, and L. Ronnstrand. 1998. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1378:F79-113.
247. Rosenkranz, S., K. A. DeMali, J. A. Gelderloos, C. Bazenet, and A. Kazlauskas. 1999. Identification of the receptor-associated signaling enzymes that are required for platelet-derived growth factor-AA-dependent chemotaxis and DNA synthesis. *J Biol Chem* 274:28335-28343.
248. Van Stry, M., A. Kazlauskas, S. L. Schreiber, and K. Symes. 2005. Distinct effectors of platelet-derived growth factor receptor-alpha signaling are required for cell survival during embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8233-8238.
249. DeMali, K. A., C. C. Whiteford, E. T. Ulug, and A. Kazlauskas. 1997. Platelet-derived growth factor-dependent cellular transformation requires either phospholipase Cgamma or phosphatidylinositol 3 kinase. *J Biol Chem* 272:9011-9018.

250. Vantler, M., M. Huntgeburth, E. Caglayan, H. Ten Freyhaus, P. Schnabel, and S. Rosenkranz. 2006. PI3-kinase/Akt-dependent antiapoptotic signaling by the PDGF alpha receptor is negatively regulated by Src family kinases. *FEBS Lett* 580:6769-6776.
251. Diliberto, P. A., G. W. Gordon, C. L. Yu, H. S. Earp, and B. Herman. 1992. Platelet-derived growth factor (PDGF) alpha receptor activation modulates the calcium mobilizing activity of the PDGF beta receptor in Balb/c3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 267:11888-11897.
252. Siegbahn, A., A. Hammacher, B. Westermark, and C. H. Heldin. 1990. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 85:916-920.
253. Yokote, K., S. Mori, A. Siegbahn, L. Ronnstrand, C. Wernstedt, C. H. Heldin, and L. Claesson-Welsh. 1996. Structural determinants in the platelet-derived growth factor alpha-receptor implicated in modulation of chemotaxis. *J Biol Chem* 271:5101-5111.
254. Chiarugi, P., P. Cirri, M. L. Taddei, D. Talini, L. Doria, T. Fiaschi, F. Buricchi, E. Giannoni, G. Camici, G. Raugei, and G. Ramponi. 2002. New perspectives in PDGF receptor downregulation: the main role of phosphotyrosine phosphatases. *J Cell Sci* 115:2219-2232.
255. Lechleider, R. J., S. Sugimoto, A. M. Bennett, A. S. Kashishian, J. A. Cooper, S. E. Shoelson, C. T. Walsh, and B. G. Neel. 1993. Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem* 268:21478-21481.
256. Lu, X., C. K. Qu, Z. Q. Shi, and G. S. Feng. 1998. Downregulation of platelet-derived growth factor receptor-beta in Shp-2 mutant fibroblast cell lines. *Oncogene* 17:441-448.
257. Bazenet, C. E., J. A. Gelderloos, and A. Kazlauskas. 1996. Phosphorylation of tyrosine 720 in the platelet-derived growth factor alpha receptor is required for binding of Grb2 and SHP-2 but not for activation of Ras or cell proliferation. *Mol Cell Biol* 16:6926-6936.
258. Meng, T. C., T. Fukada, and N. K. Tonks. 2002. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 9:387-399.
259. Yu, Z., L. Su, O. Hoglinger, M. L. Jaramillo, D. Banville, and S. H. Shen. 1998. SHP-1 associates with both platelet-derived growth factor receptor and the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 273:3687-3694.
260. Rhee, S. G., Y. S. Bae, S. R. Lee, and J. Kwon. 2000. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000:PE1.
261. Aslan, M., and T. Ozben. 2003. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Antioxid Redox Signal* 5:781-788.
262. Sattler, M., T. Winkler, S. Verma, C. H. Byrne, G. Shrikhande, R. Salgia, and J. D. Griffin. 1999. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. *Blood* 93:2928-2935.
263. DeYulia, G. J., Jr., J. M. Carcamo, O. Borquez-Ojeda, C. C. Shelton, and D. W. Golde. 2005. Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5044-5049.
264. Rhee, S. G., T. S. Chang, Y. S. Bae, S. R. Lee, and S. W. Kang. 2003. Cellular regulation by hydrogen peroxide. *J Am Soc Nephrol* 14:S211-215.
265. Lambeth, J. D. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181-189.



266. Wang, J. G., S. A. Mahmud, J. A. Thompson, J. G. Geng, N. S. Key, and A. Slungaard. 2006. The principal eosinophil peroxidase product, HOSCN, is a uniquely potent phagocyte oxidant inducer of endothelial cell tissue factor activity: a potential mechanism for thrombosis in eosinophilic inflammatory states. *Blood* 107:558-565.
267. Sundaresan, M., Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel. 1995. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270:296-299.
268. Rhee, S. G. 2007. Measuring H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced in response to cell surface receptor activation. *Nat Chem Biol* 3:244-246.
269. Suh, Y. A., R. S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A. B. Chung, K. K. Griendling, and J. D. Lambeth. 1999. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401:79-82.
270. Bae, Y. S., J. Y. Sung, O. S. Kim, Y. J. Kim, K. C. Hur, A. Kazlauskas, and S. G. Rhee. 2000. Platelet-derived growth factor-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:10527-10531.
271. Catarzi, S., C. Biagioni, E. Giannoni, F. Favilli, T. Marcucci, T. Iantomasi, and M. T. Vincenzini. 2005. Redox regulation of platelet-derived-growth-factor-receptor: role of NADPH-oxidase and c-Src tyrosine kinase. *Biochim Biophys Acta* 1745:166-175.
272. Baumer, A. T., H. Ten Freyhaus, H. Sauer, M. Wartenberg, K. Kappert, P. Schnabel, C. Konkol, J. Hescheler, M. Vantler, and S. Rosenkranz. 2008. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane recruitment of Rac-1 and p47phox is critical for alpha-platelet-derived growth factor receptor-induced production of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 283:7864-7876.
273. Lei, H., and A. Kazlauskas. 2009. Growth factors outside of the platelet-derived growth factor (PDGF) family employ reactive oxygen species/Src family kinases to activate PDGF receptor alpha and thereby promote proliferation and survival of cells. *J Biol Chem* 284:6329-6336.
274. Choi, M. H., I. K. Lee, G. W. Kim, B. U. Kim, Y. H. Han, D. Y. Yu, H. S. Park, K. Y. Kim, J. S. Lee, C. Choi, Y. S. Bae, B. I. Lee, S. G. Rhee, and S. W. Kang. 2005. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature* 435:347-353.
275. Chae, H. Z., S. W. Kang, and S. G. Rhee. 1999. Isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol* 300:219-226.
276. Chae, H. Z., H. J. Kim, S. W. Kang, and S. G. Rhee. 1999. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 45:101-112.
277. Woo, H. A., S. H. Yim, D. H. Shin, D. Kang, D. Y. Yu, and S. G. Rhee. 2010. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation for cell signaling. *Cell* 140:517-528.
278. Rhee, S. G., K. S. Yang, S. W. Kang, H. A. Woo, and T. S. Chang. 2005. Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal* 7:619-626.
279. Biteau, B., J. Labarre, and M. B. Toledano. 2003. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425:980-984.
280. Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117:699-711.
281. Pao, L. I., K. Badour, K. A. Siminovitch, and B. G. Neel. 2007. Nonreceptor protein-tyrosine phosphatases in immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 25:473-523.

282. Tonks, N. K. 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:833-846.
283. Lee, S. R., K. S. Kwon, S. R. Kim, and S. G. Rhee. 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273:15366-15372.
284. Kwon, J., S. R. Lee, K. S. Yang, Y. Ahn, Y. J. Kim, E. R. Stadtman, and S. G. Rhee. 2004. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16419-16424.
285. Chong, Z. Z., and K. Maiese. 2007. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol* 22:1251-1267.
286. Krotz, F., B. Engelbrecht, M. A. Buerkle, F. Bassermann, H. Bridell, T. Gloe, J. Duyster, U. Pohl, and H. Y. Sohn. 2005. The tyrosine phosphatase, SHP-1, is a negative regulator of endothelial superoxide formation. *J Am Coll Cardiol* 45:1700-1706.
287. Yi, T. L., J. L. Cleveland, and J. N. Ihle. 1992. Protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains: characterization, preferential expression in hematopoietic cells, and localization to human chromosome 12p12-p13. *Mol Cell Biol* 12:836-846.
288. Matthews, R. J., D. B. Bowne, E. Flores, and M. L. Thomas. 1992. Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol* 12:2396-2405.
289. Plutzky, J., B. G. Neel, and R. D. Rosenberg. 1992. Isolation of a src homology 2-containing tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1123-1127.
290. Paulson, R. F., S. Vesely, K. A. Siminovitch, and A. Bernstein. 1996. Signalling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1. *Nat Genet* 13:309-315.
291. Stone, J. R., and S. Yang. 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8:243-270.
292. Mishina, N. M., P. A. Tyurin-Kuzmin, K. N. Markvicheva, A. V. Vorotnikov, V. A. Tkachuk, V. Laketa, C. Schultz, S. Lukyanov, and V. V. Belousov. 2011. Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal* 14:1-7.
293. Ushio-Fukai, M. 2009. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 11:1289-1299.
294. Oakley, F. D., D. Abbott, Q. Li, and J. F. Engelhardt. 2009. Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. *Antioxid Redox Signal* 11:1313-1333.
295. Malinouski, M., Y. Zhou, V. V. Belousov, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS One* 6:e14564.
296. Yoon, S. Y., A. Tefferi, and C. Y. Li. 2000. Cellular distribution of platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in normal bone marrow. *Acta Haematol* 104:151-157.
297. Su, R. J., X. B. Zhang, K. Li, M. Yang, C. K. Li, T. F. Fok, A. E. James, H. Pong, and P. M. Yuen. 2002. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *Br J Haematol* 117:735-746.
298. Yan, X. Q., G. Brady, and N. N. Iscove. 1993. Platelet-derived growth factor (PDGF) activates primitive hematopoietic precursors (pre-CFCmulti) by up-regulating IL-1 in PDGF receptor-expressing macrophages. *J Immunol* 150:2440-2448.

299. Dainiak, N., G. Davies, M. Kalmanti, J. Lawler, and V. Kulkarni. 1983. Platelet-derived growth factor promotes proliferation of erythropoietic progenitor cells in vitro. *J Clin Invest* 71:1206-1214.
300. Delwiche, F., E. Raines, J. Powell, R. Ross, and J. Adamson. 1985. Platelet-derived growth factor enhances in vitro erythropoiesis via stimulation of mesenchymal cells. *J Clin Invest* 76:137-142.
301. Yang, M., C. N. Chesterman, and B. H. Chong. 1995. Recombinant PDGF enhances megakaryocytopoiesis in vitro. *Br J Haematol* 91:285-289.
302. Yang, M., L. M. Khachigian, C. Hicks, C. N. Chesterman, and B. H. Chong. 1997. Identification of PDGF receptors on human megakaryocytes and megakaryocytic cell lines. *Thromb Haemost* 78:892-896.
303. Su, R. J., K. Li, M. Yang, X. B. Zhang, K. S. Tsang, T. F. Fok, C. K. Li, and P. M. Yuen. 2001. Platelet-derived growth factor enhances ex vivo expansion of megakaryocytic progenitors from human cord blood. *Bone Marrow Transplant* 27:1075-1080.
304. Pantazis, P., S. Kharbanda, A. S. Goustin, T. Galanopoulos, and D. Kufe. 1991. Coexpression of the genes for platelet-derived growth factor B-chain receptor and macrophage colony-stimulating factor 1 receptor during monocytic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2481-2485.
305. Alimandi, M., M. A. Heidaran, J. S. Gutkind, J. Zhang, N. Ellmore, M. Valius, A. Kazlauskas, J. H. Pierce, and W. Li. 1997. PLC-gamma activation is required for PDGF-betaR-mediated mitogenesis and monocytic differentiation of myeloid progenitor cells. *Oncogene* 15:585-593.
306. Leveen, P., M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, and C. Betsholtz. 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8:1875-1887.
307. Soriano, P. 1994. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev* 8:1888-1896.
308. Ye, J. Y., G. C. Chan, L. Qiao, Q. Lian, F. Y. Meng, X. Q. Luo, L. M. Khachigian, M. Ma, R. Deng, J. L. Chen, B. H. Chong, and M. Yang. 2010. Platelet-derived growth factor enhances platelet recovery in a murine model of radiation-induced thrombocytopenia and reduces apoptosis in megakaryocytes via its receptors and the PI3-k/Akt pathway. *Haematologica* 95:1745-1753.
309. Kaminski, W. E., P. Lindahl, N. L. Lin, V. C. Broudy, J. R. Crosby, M. Hellstrom, B. Swolin, D. F. Bowen-Pope, P. J. Martin, R. Ross, C. Betsholtz, and E. W. Raines. 2001. Basis of hematopoietic defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF beta-receptor null mice. *Blood* 97:1990-1998.
310. Foss, B., E. Ulvestad, and O. Bruserud. 2001. Platelet-derived growth factor (PDGF) in human acute myelogenous leukemia: PDGF receptor expression, endogenous PDGF release and responsiveness to exogenous PDGF isoforms by in vitro cultured acute myelogenous leukemia blasts. *Eur J Haematol* 67:267-278.
311. Bostrom, H., K. Willetts, M. Pekny, P. Leveen, P. Lindahl, H. Hedstrand, M. Pekna, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, M. Schalling, M. Nilsson, S. Kurland, J. Tornell, J. K. Heath, and C. Betsholtz. 1996. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* 85:863-873.
312. Adachi, T., S. Hanaka, T. Yano, K. Yamamura, H. Yoshihara, H. Nagase, J. Chihara, and K. Ohta. 2006. The role of platelet-derived growth factor receptor in eotaxin signaling of eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 140 Suppl 1:28-34.

313. Bach, M. K., J. R. Brashler, B. K. Stout, H. G. Johnson, M. E. Sanders, A. H. Lin, R. R. Gorman, M. J. Bienkowski, and T. Ishizaka. 1992. Activation of human eosinophils by platelet-derived growth factor. *Int Arch Allergy Immunol* 97:121-129.
314. Ding, W., T. R. Knox, R. C. Tschumper, W. Wu, S. M. Schwager, J. C. Boysen, D. F. Jelinek, and N. E. Kay. Platelet-derived growth factor (PDGF)-PDGF receptor interaction activates bone marrow-derived mesenchymal stromal cells derived from chronic lymphocytic leukemia: implications for an angiogenic switch. *Blood* 116:2984-2993.
315. Levesque, J. P., F. M. Helwani, and I. G. Winkler. 2010. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 24:1979-1992.
316. Oh, I. H., and K. R. Kwon. 2010. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem Cells* 28:1243-1249.
317. Ito, K., A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T. W. Mak, and T. Suda. 2004. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431:997-1002.
318. Ito, K., A. Hirao, F. Arai, K. Takubo, S. Matsuoka, K. Miyamoto, M. Ohmura, K. Naka, K. Hosokawa, Y. Ikeda, and T. Suda. 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12:446-451.
319. Storz, P. 2011. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 14:593-605.
320. Kops, G. J., T. B. Dansen, P. E. Polderman, I. Saarloos, K. W. Wirtz, P. J. Coffey, T. T. Huang, J. L. Bos, R. H. Medema, and B. M. Burgering. 2002. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* 419:316-321.
321. Tothova, Z., R. Kollipara, B. J. Huntly, B. H. Lee, D. H. Castrillon, D. E. Cullen, E. P. McDowell, S. Lazo-Kallanian, I. R. Williams, C. Sears, S. A. Armstrong, E. Passegue, R. A. DePinho, and D. G. Gilliland. 2007. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 128:325-339.
322. Yilmaz, O. H., R. Valdez, B. K. Theisen, W. Guo, D. O. Ferguson, H. Wu, and S. J. Morrison. 2006. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 441:475-482.
323. Jang, Y. Y., and S. J. Sharkis. 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 110:3056-3063.
324. Tothova, Z., and D. G. Gilliland. 2007. FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. *Cell Stem Cell* 1:140-152.
325. Owusu-Ansah, E., and U. Banerjee. 2009. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461:537-541.
326. Iiyama, M., K. Kakihana, T. Kurosu, and O. Miura. 2006. Reactive oxygen species generated by hematopoietic cytokines play roles in activation of receptor-mediated signaling and in cell cycle progression. *Cell Signal* 18:174-182.
327. Zhu, Q. S., L. Xia, G. B. Mills, C. A. Lowell, I. P. Touw, and S. J. Corey. 2006. G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood* 107:1847-1856.
328. Yamamoto, T., N. Sakaguchi, M. Hachiya, F. Nakayama, M. Yamakawa, and M. Akashi. 2009. Role of catalase in monocytic differentiation of U937 cells by TPA: hydrogen peroxide as a second messenger. *Leukemia* 23:761-769.

329. Callens, C., S. Coulon, J. Naudin, I. Radford-Weiss, N. Boissel, E. Raffoux, P. H. Wang, S. Agarwal, H. Tamouza, E. Paubelle, V. Asnafi, J. A. Ribeil, P. Dessen, D. Canioni, O. Chandesris, M. T. Rubio, C. Beaumont, M. Benhamou, H. Dombret, E. Macintyre, R. C. Monteiro, I. C. Moura, and O. Hermine. 2010. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 207:731-750.
330. Parmar, K., P. Mauch, J. A. Vergilio, R. Sackstein, and J. D. Down. 2007. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5431-5436.
331. Eliasson, P., and J. I. Jonsson. 2010. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol* 222:17-22.
332. Lo Celso, C., H. E. Fleming, J. W. Wu, C. X. Zhao, S. Miake-Lye, J. Fujisaki, D. Cote, D. W. Rowe, C. P. Lin, and D. T. Scadden. 2009. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457:92-96.
333. Zhang, J., C. Niu, L. Ye, H. Huang, X. He, W. G. Tong, J. Ross, J. Haug, T. Johnson, J. Q. Feng, S. Harris, L. M. Wiedemann, Y. Mishina, and L. Li. 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425:836-841.
334. Winkler, I. G., V. Barbier, R. Wadley, A. C. Zannettino, S. Williams, and J. P. Levesque. 2010. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. *Blood* 116:375-385.
335. Sattler, M., S. Verma, G. Shrikhande, C. H. Byrne, Y. B. Pride, T. Winkler, E. A. Greenfield, R. Salgia, and J. D. Griffin. 2000. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 275:24273-24278.
336. Kim, J. H., S. C. Chu, J. L. Gramlich, Y. B. Pride, E. Babendreier, D. Chauhan, R. Salgia, K. Podar, J. D. Griffin, and M. Sattler. 2005. Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 105:1717-1723.
337. Naughton, R., C. Quiney, S. D. Turner, and T. G. Cotter. 2009. Bcr-Abl-mediated redox regulation of the PI3K/AKT pathway. *Leukemia* 23:1432-1440.
338. Rodrigues, M. S., M. M. Reddy, and M. Sattler. 2008. Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* 10:1813-1848.
339. Koptyra, M., R. Falinski, M. O. Nowicki, T. Stoklosa, I. Majsterek, M. Nieborowska-Skorska, J. Blasiak, and T. Skorski. 2006. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 108:319-327.
340. Koptyra, M., K. Cramer, A. Slupianek, C. Richardson, and T. Skorski. 2008. BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress. *Leukemia* 22:1969-1972.
341. Renneville, A., C. Roumier, V. Biggio, O. Nibourel, N. Boissel, P. Fenaux, and C. Preudhomme. 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22:915-931.
342. Hole, P. S., L. Pearn, A. J. Tonks, P. E. James, A. K. Burnett, R. L. Darley, and A. Tonks. 2010. Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 115:1238-1246.
343. Gross, S., R. A. Cairns, M. D. Minden, E. M. Driggers, M. A. Bittinger, H. G. Jang, M. Sasaki, S. Jin, D. P. Schenkein, S. M. Su, L. Dang, V. R. Fantin, and T. W. Mak. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207:339-344.

344. Mardis, E. R., L. Ding, D. J. Dooling, D. E. Larson, M. D. McLellan, K. Chen, D. C. Koboldt, R. S. Fulton, K. D. Delehaunty, S. D. McGrath, L. A. Fulton, D. P. Locke, V. J. Magrini, R. M. Abbott, T. L. Vickery, J. S. Reed, J. S. Robinson, T. Wylie, S. M. Smith, L. Carmichael, J. M. Eldred, C. C. Harris, J. Walker, J. B. Peck, F. Du, A. F. Dukes, G. E. Sanderson, A. M. Brummett, E. Clark, J. F. McMichael, R. J. Meyer, J. K. Schindler, C. S. Pohl, J. W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M. E. Wiechert, J. V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R. E. Ries, J. E. Payton, P. Westervelt, M. H. Tomasson, M. A. Watson, J. Baty, S. Heath, W. D. Shannon, R. Nagarajan, D. C. Link, M. J. Walter, T. A. Graubert, J. F. DiPersio, R. K. Wilson, and T. J. Ley. 2009. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 361:1058-1066.
345. Boissel, N., O. Nibourel, A. Renneville, C. Gardin, O. Reman, N. Contentin, D. Bordessoule, C. Pautas, T. de Revel, B. Quesnel, P. Huchette, N. Philippe, S. Geffroy, C. Terre, X. Thomas, S. Castaigne, H. Dombret, and C. Preudhomme. 2010. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group. *J Clin Oncol* 28:3717-3723.
346. Abdel-Wahab, O., and R. L. Levine. 2010. Metabolism and the leukemic stem cell. *J Exp Med* 207:677-680.
347. Gross, S., R. A. Cairns, M. D. Minden, E. M. Driggers, M. A. Bittinger, H. G. Jang, M. Sasaki, S. Jin, D. P. Schenkein, S. M. Su, L. Dang, V. R. Fantin, and T. W. Mak. 2010. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 207:339-344.
348. Driss, V., F. Legrand, E. Hermann, S. Loiseau, Y. Guerardel, L. Kremer, E. Adam, G. Woerly, D. Dombrowicz, and M. Capron. 2009. TLR2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of alpha-defensins. *Blood* 113:3235-3244.
349. Martinez-Losa, M., J. Cortijo, G. Juan, J. E. O'Connor, M. J. Sanz, F. Santangelo, and E. J. Morcillo. 2007. Inhibitory effects of N-acetylcysteine on the functional responses of human eosinophils in vitro. *Clin Exp Allergy* 37:714-722.
350. Petheo, G. L., A. Orient, M. Barath, I. Kovacs, B. Rethi, A. Lanyi, A. Rajki, E. Rajnavolgyi, and M. Geiszt. Molecular and functional characterization of Hv1 proton channel in human granulocytes. *PLoS One* 5:e14081.
351. Ginsel, L. A., J. J. Onderwater, J. A. Fransen, A. J. Verhoeven, and D. Roos. 1990. Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* 76:2105-2116.
352. Nissim Ben Efraim, A. H., R. Eliashar, and F. Levi-Schaffer. 2010. Hypoxia modulates human eosinophil function. *Clin Mol Allergy* 8:10.
353. Levi-Schaffer, F., V. Temkin, H. U. Simon, J. R. Kettman, J. R. Frey, and I. Lefkovits. 2002. Proteomic analysis of human eosinophil activation mediated by mast cells, granulocyte macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *Proteomics* 2:1616-1626.
354. Yoon, S. W., T. Y. Kim, M. H. Sung, C. J. Kim, and H. Poo. 2005. Comparative proteomic analysis of peripheral blood eosinophils from healthy donors and atopic dermatitis patients with eosinophilia. *Proteomics* 5:1987-1995.
355. Woschnagg, C., J. Forsberg, A. Engstrom, F. Odreman, P. Venge, and R. C. Garcia. 2009. The human eosinophil proteome. Changes induced by birch pollen allergy. *J Proteome Res* 8:2720-2732.
356. Prin, L., M. Capron, A. B. Tonnel, O. Bletry, and A. Capron. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in

- relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 72:336-346.
357. Prin, L., J. Charon, M. Capron, P. Gosset, H. Taelman, A. B. Tonnel, and A. Capron. 1984. Heterogeneity of human eosinophils. II. Variability of respiratory burst activity related to cell density. *Clin Exp Immunol* 57:735-742.
  358. Petrak, J., R. Ivanek, O. Toman, R. Cmejla, J. Cmejlova, D. Vyoral, J. Zivny, and C. D. Vulpe. 2008. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8:1744-1749.
  359. Unwin, R. D., D. L. Smith, D. Blinco, C. L. Wilson, C. J. Miller, C. A. Evans, E. Jaworska, S. A. Baldwin, K. Barnes, A. Pierce, E. Spooncer, and A. D. Whetton. 2006. Quantitative proteomics reveals posttranslational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells. *Blood* 107:4687-4694.
  360. Pierce, A., R. D. Unwin, C. A. Evans, S. Griffiths, L. Carney, L. Zhang, E. Jaworska, C. F. Lee, D. Blinco, M. J. Okoniewski, C. J. Miller, D. A. Bitton, E. Spooncer, and A. D. Whetton. 2008. Eight-channel iTRAQ enables comparison of the activity of six leukemogenic tyrosine kinases. *Mol Cell Proteomics* 7:853-863.
  361. Kuhn, H., and V. B. O'Donnell. 2006. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 45:334-356.
  362. Hennig, R., T. Kehl, S. Noor, X. Z. Ding, S. M. Rao, F. Bergmann, G. Furstenberger, M. W. Buchler, H. Friess, P. Krieg, and T. E. Adrian. 2007. 15-lipoxygenase-1 production is lost in pancreatic cancer and overexpression of the gene inhibits tumor cell growth. *Neoplasia* 9:917-926.
  363. Shureiqi, I., W. Jiang, X. Zuo, Y. Wu, J. B. Stimmel, L. M. Leesnitzer, J. S. Morris, H. Z. Fan, S. M. Fischer, and S. M. Lippman. 2003. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-delta to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9968-9973.
  364. Bhattacharya, S., G. Mathew, D. G. Jayne, S. Pelengaris, and M. Khan. 2009. 15-lipoxygenase-1 in colorectal cancer: a review. *Tumour Biol* 30:185-199.
  365. Middleton, M. K., A. M. Zukas, T. Rubinstein, M. Jacob, P. Zhu, L. Zhao, I. Blair, and E. Pure. 2006. Identification of 12/15-lipoxygenase as a suppressor of myeloproliferative disease. *J Exp Med* 203:2529-2540.
  366. Kinder, M., J. E. Thompson, C. Wei, S. G. Shelat, I. A. Blair, M. Carroll, and E. Pure. 2010. Interferon regulatory factor-8-driven myeloid differentiation is regulated by 12/15-lipoxygenase-mediated redox signaling. *Exp Hematol* 38:1036-1046 e1031-1034.
  367. Kinder, M., C. Wei, S. G. Shelat, M. Kundu, L. Zhao, I. A. Blair, and E. Pure. 2010. Hematopoietic stem cell function requires 12/15-lipoxygenase-dependent fatty acid metabolism. *Blood* 115:5012-5022.
  368. Paling, N. R., and M. J. Welham. 2005. Tyrosine phosphatase SHP-1 acts at different stages of development to regulate hematopoiesis. *Blood* 105:4290-4297.
  369. Tsui, H. W., K. A. Siminovitch, L. de Souza, and F. W. Tsui. 1993. Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 4:124-129.
  370. Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, T. V. Rajan, T. Yi, J. N. Ihle, R. J. Matthews, M. L. Thomas, and D. R. Beier. 1993. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell* 73:1445-1454.
  371. Kozlowski, M., I. Mlinaric-Rascan, G. S. Feng, R. Shen, T. Pawson, and K. A. Siminovitch. 1993. Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTPIC is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med* 178:2157-2163.

372. Oh, S. Y., T. Zheng, Y. K. Kim, L. Cohn, R. J. Homer, A. N. McKenzie, and Z. Zhu. 2009. A critical role of SHP-1 in regulation of type 2 inflammation in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:568-574.
373. Yu, C. C., H. W. Tsui, B. Y. Ngan, M. J. Shulman, G. E. Wu, and F. W. Tsui. 1996. B and T cells are not required for the viable motheaten phenotype. *J Exp Med* 183:371-380.
374. Zhang, L., S. Y. Oh, X. Wu, M. H. Oh, F. Wu, J. T. Schroeder, C. M. Takemoto, T. Zheng, and Z. Zhu. 2010. SHP-1 deficient mast cells are hyperresponsive to stimulation and critical in initiating allergic inflammation in the lung. *J Immunol* 184:1180-1190.
375. Weibrecht, I., S. A. Bohmer, M. Dagnell, K. Kappert, A. Ostman, and F. D. Bohmer. 2007. Oxidation sensitivity of the catalytic cysteine of the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Free Radic Biol Med* 43:100-110.
376. Mori, M., G. Li, M. Hashimoto, A. Nishio, H. Tomozawa, N. Suzuki, S. Usami, K. Higuchi, and K. Matsumoto. 2009. Pivotal Advance: Eosinophilia in the MES rat strain is caused by a loss-of-function mutation in the gene for cytochrome b(-245), alpha polypeptide (Cyba). *J Leukoc Biol* 86:473-478.
377. Tomozawa, H., A. Nishio, Y. Okuhara, K. Higuchi, K. Matsumoto, and M. Mori. BN.MES-Cyba(mes) congenic rats manifest focal necrosis with eosinophilic infiltration in the liver without blood eosinophilia. *Exp Anim* 59:469-478.
378. Muto, S., M. Monnai, Y. Okuhara, M. Murakami, J. Kuroda, T. Ono, and K. Matsumoto. 2005. Altered cytokine expression in mesenteric lymph nodes in a rat strain (Matsumoto Eosinophilic Shinshu) that spontaneously develops hypereosinophilia. *Immunology* 116:373-380.
379. Chaitidis, P., F. J. Kreutzer, C. Gerth, P. Janata, and H. Kuhn. 2004. Impact of intravenous oxygen therapy on the expression of reticulocyte-type 15-lipoxygenase in human volunteers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71:271-276.
380. Wood, L. G., P. A. Wark, and M. L. Garg. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory effects of resveratrol in airway disease. *Antioxid Redox Signal* 13:1535-1548.
381. Kelkel, M., C. Jacob, M. Dicato, and M. Diederich. 2010. Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. *Molecules* 15:7035-7074.
382. Cavallaro, A., T. Ainis, C. Bottari, and V. Fimiani. 2003. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. *Physiol Res* 52:555-562.
383. Baatout, S., H. Derradji, P. Jacquet, and M. Mergeay. 2005. Increased radiation sensitivity of an eosinophilic cell line following treatment with epigallocatechin-gallate, resveratrol and curcuma. *Int J Mol Med* 15:337-352.
384. Tan, Y., and L. H. Lim. 2008. trans-Resveratrol, an extract of red wine, inhibits human eosinophil activation and degranulation. *Br J Pharmacol* 155:995-1004.
385. Lung, H. L., W. K. Ip, C. K. Wong, N. K. Mak, Z. Y. Chen, and K. N. Leung. 2002. Anti-proliferative and differentiation-inducing activities of the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the human eosinophilic leukemia EoL-1 cell line. *Life Sci* 72:257-268.
386. Adamko, D. J., Y. Wu, F. Ajamian, R. Ilarraza, R. Moqbel, and G. J. Gleich. 2008. The effect of cationic charge on release of eosinophil mediators. *J Allergy Clin Immunol* 122:383-390, 390 e381-384.



## RESUME

---

Le réarrangement FIP1L1-PDGFR $\alpha$  (F/P), identifié de manière récurrente dans les leucémies chroniques à éosinophiles, est à l'origine d'une activation constitutive de l'activité tyrosine kinase de la chaîne  $\alpha$  du récepteur au PDGFR. Les mécanismes concourant à la prolifération éosinophile exclusive et au profil de cytotoxicité spécifique à cette leucémie sont encore mal élucidés. Ce récepteur PDGFR $\alpha$ , principalement exprimé dans les cellules mésenchymateuses, y exerce des effets prolifératifs et chimiotactiques, en partie induits par la production intracellulaire de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Ces constatations nous ont amené à étudier les perturbations du métabolisme oxydatif dans la leucémie F/P+, en utilisant une approche d'étude globale du protéome d'éosinophiles de sujets F/P+, comparé à des éosinophiles de sujets contrôles. Dans ce travail, nous avons démontré qu'il existe, dans les éosinophiles F/P+, une dérégulation de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation redox intracellulaire. De plus, les modifications d'expression de certaines d'entre elles (peroxiredoxine-2, src-homology-2 domain containing tyrosine phosphatase-1 ou SHP-1), non retrouvées dans les éosinophiles de patients ayant un syndrome hyperéosinophilique idiopathique, et identifiées dans une lignée cellulaire exprimant F/P, semblent spécifiquement induites par F/P. L'activation du PDGFR $\alpha$  dans les éosinophiles F/P+ est donc à l'origine d'un déséquilibre du métabolisme oxydatif dont les conséquences sur la différenciation vers le lignage éosinophile ou sur la cytotoxicité seront discutées.

**Mots-clés :** Eosinophiles, leucémie chronique à éosinophiles, FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , métabolisme oxydatif

## ABSTRACT

---

The FIP1L1-PDGFR $\alpha$  (F/P) fusion gene, identified as a recurrent molecular finding in chronic eosinophilic leukemia, induces a constitutive activation of the kinase domain of PDGFR $\alpha$ . However, the molecular events contributing to the predominant eosinophil lineage expansion and to the singular cytotoxicity profile of eosinophils in this leukemia remain unclear. PDGFR $\alpha$ , mainly expressed in mesenchymal cells, possesses proliferative and chemotactic properties, which are, in part, mediated by the intracellular production of reactive oxygen species (ROS). These observations prompted us to investigate the disturbances of the redox signaling in the F/P-associated leukemia, using a comparative study of the proteome of F/P+-eosinophils and eosinophils of healthy controls. Here, we report, in F/P+-eosinophils, the abnormal expression of numerous proteins implicated in oxidative metabolism. Furthermore, changes in expression of particular proteins (peroxiredoxine-2 and src-homology-2 domain containing tyrosine phosphatase-1) appears specific to F/P-Eos compared to patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome, and could be demonstrated in F/P-expressing cell line EOL-1. Thus, the activation of PDGFR $\alpha$  in F/P+-eosinophils leads to a global disturbance of the redox signaling, whose consequences on the differentiation toward eosinophil lineage and cytotoxicity will be discussed.

**Key words :** Eosinophils, chronic eosinophilic leukemia, FIP1L1-PDGFR $\alpha$ , oxidative stress

**Discipline – Spécialité :** Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie - Immunologie