

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

Cancérologie

---

**Présentée et soutenue par :**

Emilie-Fleur GAUTIER

**le :** mardi 29 novembre 2011

**Titre :**

Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène  
JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives

---

**Ecole doctorale :**

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

**Unité de recherche :**

INSERM UMR1037 - CRCT

**Directeur(s) de Thèse :**

Dr Véronique DE MAS

**Rapporteurs :**

Dr Françoise PORTEU  
Dr Paulo DE SEPULVEDA

**Membre(s) du jury :**

Dr Françoise PORTEU  
Dr Paulo DE SEPULVEDA  
Dr Claude PRIGENT  
Pr Guy LAURENT  
Dr Véronique DE MAS



## REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes sincères remerciements :

*Au professeur Guy Laurent* d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Vous avez été là dans tous les moments clés de ma formation, votre présence lors de ma soutenance était donc pour moi indispensable. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour tout le temps que vous m'avez consacré durant ma formation lors de laquelle j'ai pu avoir l'honneur d'admirer votre culture scientifique et vos talents d'orateur.

*Au docteur Françoise Porteu* d'avoir accepté de juger mon travail de thèse avec beaucoup d'attention malgré le peu de temps que vous avez eu pour le faire. Je vous remercie pour vos suggestions qui ont permis d'améliorer mon manuscrit. J'ai été très honorée de faire votre connaissance et de vous compter parmi les membres de mon jury.

*Au docteur Paulo De Sepulveda* d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer et d'y avoir apporté votre expertise dans le domaine de la signalisation. J'ai été très touchée par la rapidité et l'enthousiasme avec lesquelles vous avez répondu à ma demande.

*Au docteur Claude Prigent* d'avoir accepté de faire partie des membres de mon jury et pour l'attention que vous avez portée à la lecture de mon manuscrit. Je vous remercie également pour vos conseils quant à la réflexion sur le choix des sujets de postdoctorat.

*Au docteur Véronique De Mas* pour ton encadrement, tout ce que tu m'as appris, la confiance que tu m'as accordée, tous tes encouragements, ton soutien et ta gentillesse y compris dans les moments difficiles. Merci également pour tous les congrès auxquels tu m'as fait participer qui ont également été pour moi très formateurs.

*Au docteur Stéphane Manenti*, tout d'abord pour tes qualités humaines et ton esprit d'équipe. Merci de m'avoir épaulé tout au long de ma thèse, merci également pour tout ce que tu m'as appris et pour tous tes conseils.

*Au docteur Christian Récher*, d'abord co-encadrant de stage de maîtrise, j'ai eu le plaisir de te retrouver comme chef d'équipe lors de ma dernière année de thèse. Merci pour tous les conseils que tu m'as donné.

Je remercie également l'ensemble de mes collaborateurs, *Muriel Picard, les docteurs Camille Laurent, Caroline Marty, François Delhommeau, Cécile Demur, Jean-Luc Villeval, Elizabeth Hexner, Stéphane Giraudier, Nicolas Bonneville* et le *Professeur Bernard Ducommun* pour leur précieuse et indispensable implication dans ces travaux.

Un grand merci à ceux qui m'ont généreusement apporté leur aide dans mes travaux, **Anne Quillet-Mary** pour ses conseils multiples et variés et sa disponibilité, **Anne Fernandez Vidal** pour son aide pour la mise au point des expériences de QPCR, **Michel March** pour les expériences d'immunohistochimie.

Un merci chaleureux à l'ensemble des donateurs et au personnel de la Ligue National Contre le Cancer qui a financé ma thèse,

**Merci à l'ensemble de l'équipe S. Manenti/ C. Récher,**

**Christine Didier**, merci beaucoup pour ton enthousiasme et la souplesse de ton caractère, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi, quel bel esprit d'équipe,

**Fanny**, son travail toujours bien fait et sa patience, merci pour tous les conseils que tu m'as donnés, ton expertise que tu m'as faite partager, et les lourds recomptages de clono que tu as gentiment accepté de faire pour me rassurer,

**Christine Dozier**, merci pour ta gentillesse, toutes les discussions qu'on a eues et ton aide,

**Gwenaëlle et Nicolas**, pour ce magnifique 8 mains que nous avons fait avec Christine dont je garde un très bon souvenir,

**Jean-Emmanuel, Odile, Hélène, Clément, François, Cindy, Lingli, Camille, les Sarah et Estelle**, merci pour toutes les discussions que nous avons eu toujours dans la bonne humeur,

Un grand merci à **l'équipe J.J. Fournié/ Guy Laurent, Jean-Jacques Fournié, Guy Laurent, Anne, les Christine, les Emilie, Amandine, Pauline, Samar, Séverine, Loïc, Mary, Rémy, Yovan, Nicolas, Aude-Hélène, Marie, Catherine, Ludovic, Frédéric et Caroline** dans laquelle j'ai réalisé mon master recherche et mes trois premières années de thèse, pour tous les échanges scientifiques que nous avons eus et tout ce que j'ai appris à vos cotés et pour tous les bon moments que nous avons passés ensemble.

Je remercie aussi l'ensemble des équipes P. Brousset et B. Payrastra et tout particulièrement **le Professeur B. Payrastra** qui m'a transmis des bases solides lors de mon stage de maîtrise qui m'ont beaucoup servie par la suite. Je vous remercie également pour tous vos encouragements.

Je souhaite également remercier de manière plus personnelle les étudiants des bureaux dans lesquels j'ai travaillé:

**Emilie Laprevotte**, mon amie, ma compagne de galère et ma complémentaire de « taquet », toujours au coude à coude de la maîtrise à la thèse, nos chemins professionnels

se séparent mais j'espère avoir encore très longtemps affaire à toi et que nous partagerons encore beaucoup de bon moments, merci pour tout ce que nous avons partagé,

**Wilfried**, mon ami l'artiste à la mémoire d'éléphant, mais pas toujours réveillé quand il s'agit d'enfiler ses chaussures (ça c'est pour le n=2, à qui la suite ?), on se tient au jus...

**Amandine**, on en a passé des bons moments dans ce petit bureau/labo, entassées à longueur de journées et pourtant aucune dispute, que de bons souvenirs, j'espère avoir encore affaire longtemps à ton humour unique.

**Naïs**, ma grande sœur de pipette. Je reste toujours une admiratrice de ton sens de l'organisation et de ta patience. Je te remercie encore infiniment pour tout ton investissement pour me former à la paillasse.

**Muriel**, je suis heureuse que tu prennes la suite de mon sujet car je sais que tu es une personne rigoureuse et appliquée dans le travail. Je te souhaite bonne chance pour la suite, même si je ne me fais pas trop de soucis pour toi (à condition que tu n'oublies pas de dormir de temps en temps).

**Emilie Gross**, dans la famille galérienne j'appelle ma grande sœur, merci pour toutes les discussions scientifiques et tous les bons moments qu'on a eus ensemble dans la détente ou la galère,

**Samar**, la reine nature au 3<sup>ème</sup> œil, merci pour tout ce que nous avons partagé, que de bons souvenirs,

**Séverine et Alan**, merci pour tous vos encouragements et vos conseils et pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble,

**Emilie Dejean**, merci pour tes précieux conseils et ton enthousiasme concernant ma présentation qui m'ont beaucoup aidé à ce niveau de fatigue,

**Julie**, l'artiste aux tenues déséquilibrées, quand je pense à toi je ne peux pas m'empêcher de penser aux sessions polysomes à côté des « cul-cul » et « tête-tête » de Jean et Marie... les anémones ! Je te souhaite un excellent envol au Canada ! Tu as réfléchi à comment appeler tes droso au fait ?

**Pauline**, ma voisine et copine de paillasse, ça a été un plaisir de tenir mes pipettes à tes côtés et d'écouter toutes les aventures du petit Sacha,

**Cathy**, toujours prête à donner un coup de main et toujours dans la bonne humeur, merci pour ton aide et tes conseils concernant la biologie moléculaire,

**Etienne**, et son super esprit d'équipe et d'entraide toujours sur une touche d'humour, toujours présent et volontaire pour donner un coup de main en cas de crise auprès de tout le monde,

**Charlotte**, merci pour tous les bons moments que nous avons partagés et pour ton franc parlé, j'adore,

**Julien**, j'ai encore de temps en temps les magnifiques chansons que tu fredonnais qui me reviennent en tête,

Les étudiantes que j'ai eu le plaisir d'encadrer, **Sandra, Muriel, Gwenaëlle, Petra, Elisa et Magali**,

Sans oublier **Marie-Pierre, Laure, Marina, Céline, Cécile, Junior, Jessica, Cédric, Cédric, Chantal** et **Charlotte** avec qui j'ai également eu le plaisir de discuter,

Un grand merci également à:

**Gaëtan**, merci pour ton aide et conseils techniques,

**Jeannine**, pour ses conseils et son aide,

**Anne-Marie Bénot** pour tout le travail, souvent en urgence, que vous avez fait pour moi,

aux techniciens des services d'hématologie et de biologie moléculaire, **Monique, Nicole, Aurore, Claudie, Marie, Cynthia, Sébastien, Sabrina, Virginie et Magali** pour leur accueil, leur aide, et tous leurs précieux conseils.

Merci également à la **cytothèque HIMIP**, au **plateau de cytométrie**, au **magasin** et au **personnel du service technique**,

Pour finir, je voudrais remercier mon plus grand soutien qui est **ma famille, David et mes amis**, merci pour votre soutien tant moral que financier, votre patience et votre compréhension vis-à-vis de mon investissement.

# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>PARTIE 1: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>I. LA MYELOPOÏESE PHYSIOLOGIQUE.....</b>	<b>11</b>
A. Généralités .....	11
B. Les différentes étapes de la myélopoïèse .....	11
1. La CSH et les progéniteurs myéloïdes communs .....	11
2. La différenciation érythroïde .....	13
3. La différenciation mégacaryocytaire.....	13
4. La différenciation granulo-monocytaire .....	14
C. Cytokines et facteurs de croissance .....	15
D. Marqueurs.....	17
1. Les marqueurs d'immaturité .....	17
2. Les marqueurs de différenciation érythroïde .....	17
3. Les marqueurs de différenciation granulo-monocytaire .....	18
4. Les marqueurs de différenciation mégacaryocytaire .....	19
E. Perturbations de la myélopoïèse .....	20
<b>II. LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES PHILADELPHIE NEGATIVES DITES « CLASSIQUES ».....</b>	<b>21</b>
A. La maladie de Vaquez.....	21
B. La thrombocythémie essentielle .....	22
C. La myélofibrose primitive .....	22
D. Le statut mutationnel des NMP .....	23
<b>III. LA MUTATION JAK2<sup>V617F</sup> .....</b>	<b>24</b>
A. Modèles murins – lien causal entre la mutation et les NMP .....	25
B. JAK2.....	27
1. Structure .....	27
2. Fonctions de JAK2 .....	28
a. Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines .....	28
(1) La voie JAK/STAT canonique.....	31
(2) La voie PI3K/Akt .....	31
(3) La voie des MAPKs .....	32
(4) Les régulateurs négatifs .....	33
b. Fonctions de JAK2 dans la régulation épigénétique .....	34
C. La mutation JAK2 <sup>V617F</sup> .....	35
1. Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines .	36

a. Activation constitutive des voies de signalisation canoniques.....	36
b. Dérégulation de la transcription et de la traduction protéique.....	37
c. Altération du rétrocontrôle négatif.....	38
d. Régulation croisée du récepteur à l'IGF.....	39
2. Impact de JAK2 <sup>V617F</sup> dans la régulation épigénétique.....	39
3. Impact de la mutation sur la localisation de JAK2.....	41
4. Impact cellulaire de la mutation.....	41
a. Avantage de survie.....	41
b. Avantage prolifératif.....	42
5. JAK2 <sup>V617F</sup> et dommages à l'ADN.....	43
6. JAK2 <sup>V617F</sup> et microenvironnement.....	43
D. Inhibiteurs de JAK2.....	44
<b>IV. CYCLE CELLULAIRE.....</b>	<b>45</b>
A. Les différentes phases du cycle cellulaire.....	45
B. Les points de contrôle du cycle cellulaire.....	46
C. Les complexes CDK/cycline.....	46
D. CDC25A.....	48
1. Structure.....	49
2. Fonctions.....	49
a. Fonction de CDC25A dans la progression du cycle cellulaire.....	49
b. Fonction de CDC25A dans l'apoptose.....	50
3. Régulation de l'expression de CDC25A.....	51
a. Régulation transcriptionnelle.....	52
b. Régulation post-transcriptionnelle et traductionnelle.....	52
c. Régulation de la stabilité de la protéine.....	53
4. Dérégulation de CDC25A et cancers.....	53
5. Inhibiteurs des CDC25.....	55
E. Cycle cellulaire et différenciations érythroïde et granulo-monocytaire.....	56
1. Répartition des cellules dans le cycle.....	56
2. Statut des régulateurs du cycle cellulaire au cours des différenciations...	57
3. Implication des acteurs du cycle cellulaire dans la myélopoïèse – modèles murins.....	59
<b>V. LA REGULATION TRADUCTIONNELLE IMPLIQUANT LA PHOSPHORYLATION SUR SERINE 51 DU FACTEUR EIF-2<math>\alpha</math>.....</b>	<b>60</b>
A. Généralités sur la traduction.....	60
B. Initiation de la traduction cap-dépendante.....	61
C. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'initiation de la traduction cap-dépendante.....	63
D. Le facteur eIF-2 $\alpha$ et sa phosphorylation sur sérine 51.....	65
<b>PARTIE 2 : RESULTATS.....</b>	<b>67</b>



<b>I. OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>69</b>
<b>II. RESULTAT 1 : IMPLICATION ET REGULATION DE LA PHOSPHATASE CDC25A EN AVAL DE L'ONCOGENE JAK2<sup>V617F</sup> DANS LES NMP .....</b>	<b>71</b>
A. Introduction .....	71
B. Hypothèses de travail .....	73
C. Résultats .....	73
D. Conclusion, discussion et perspectives .....	86
<b>III. RESULTAT 2 : STATUT DE CDC25A ET ANALYSE DE SON INHIBITION DANS LA MYELOPOIESE PHYSIOLOGIQUE ET EN AVAL DE JAK2<sup>V617F</sup> .....</b>	<b>95</b>
A. Introduction .....	95
B. Hypothèse de travail.....	96
C. Résultats .....	97
1. Statut de CDC25A dans les différenciations érythroïdes et granulo- monocytaires .....	97
2. Effet d'un inhibiteur des CDC25 sur la différenciation érythroïde de progéniteurs sains ou possédant JAK2 <sup>V617F</sup> .....	105
D. Conclusion, discussion et perspectives .....	108
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>117</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>123</b>
<b>ANNEXE.....</b>	<b>139</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>141</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique du modèle classique de l'hématopoïèse.....	12
Figure 2 : Représentation schématique de la différenciation érythrocytaire.....	13
Figure 3 : Représentation schématique de la différenciation mégacaryocytaire.....	14
Figure 4 : Représentation schématique de la différenciation monocytaire .....	15
Figure 5 : Représentation schématique de la différenciation granulocytaire neutrophile.....	15
Figure 6 : Représentation schématique des principales cytokines des différenciations myéloïdes .....	16
Figure 7 : Représentation schématique des principaux marqueurs de différenciation érythrocytaire .....	18
Figure 8 : Représentation schématique des principaux marqueurs de différenciation granulo- monocytaire.....	19
Figure 9 : Représentation schématique des principaux marqueurs de différenciation mégacaryocytaire .....	20
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des mutations présentes dans les NMP .....	24
Figure 10 : Structure de la protéine JAK2.....	27
Figure 11 : L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines.....	29
Figure 12 : Principales voies de signalisation activées par le complexe JAK2/récepteur aux cytokines.....	30
Figure 13 : Schématisation des trois groupes majeurs de MAPKs et de leur signalisation .....	32
Figure 14 : Voie de signalisation JAK/STAT non canonique.....	35
Figure 15 : structure de JAK2 <sup>V617F</sup> .....	35
Figure 16 : Implication de JAK2 <sup>V617F</sup> dans la régulation épigénétique.....	40
Figure 17 : Les différentes phases du cycle cellulaire .....	45
Figure 18 : Répartition des complexes CDK/cycline au cours du cycle cellulaire .....	47
Figure 19 : Activation des complexes CDK/cycline, exemple du complexe CDK1/cycline B48	
Figure 20 : Schématisation de la structure de CDC25A .....	49
Figure 21 : Schématisation de la répartition des phosphatase CDC25 au cours du cycle cellulaire.....	50
Figure 22 : Surexpression des CDC25 dans les cancers humains et valeur pronostique.....	55
Figure 23 : Structure chimique de l'IRC-083864.....	56

Figure 24 : Schématisation de l'expression protéique des acteurs principaux du cycle cellulaire au cours de la différenciation érythroïde .....	58
Figure 25 : Schématisation de l'expression protéique des acteurs principaux du cycle cellulaire au cours de la différenciation granulocytaire neutrophile .....	58
Figure 26 : Initiation de la traduction cap-dépendante .....	62
Figure 27 : Principales voies de signalisation impliquées dans l'initiation de la traduction cap-dépendante .....	64
Figure 28 : Intégration de la réponse au stress <i>via</i> la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$ .....	66

## ABBREVIATIONS

BFU-E: Burst Forming Unit - Erythroid

CDC25A: Cell Division Cycle Homolog A

CDK: Cyclin-Dependant Kinase

CDKI: Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor

CEE: Colonie Erythroïde Endogène

CFU-E: Colony Forming Unit - Erythroid

CFU-GEMM: Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Megacaryocyte/ Macrophage

CFU-GM: Colony Forming Unit – Granulocyte/ Macrophage

CFU-MK: Colony Forming Unit - MegaKaryocyte

CMP: Common Myeloid Progenitor

CSH: Cellule Souche Hématopoïétique

eIF-2: eucaryotic Initiation Factor - 2

EPO: érythropoïétine

GCN2: General Control Non-Derepressible-2

G-CSF: Granulocyte – Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor

GPA: Glycophorine A

HRI: Haem – Regulated Inhibitor

JAK2: Janus Kinase 2

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LMC : Leucémies Myéloïde Chronique

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

M-CSF: Macrophage – Colony Stimulating Factor

MEP: Megakaryocytic Erythroid Progenitor

MFP: MyéloFibrose Primitive

MPP: MultiPotent Progenitor

MV: Maladie de Vaquez

NMP : Néoplasie MyéloProliférative

PERK: PKR-like endoplamic reticulum (ER) Kinase

PH : Plextrin Homology

PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

PKR: Protein Kinase activated by double stranded RNA

PP1: Protein Phosphatase 1

PP2A: Protein Phosphatase 2A

SCF: Stem Cell Factor

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TE: Thrombocythémie Essentielle

TPO : Thrombopoïétine



# **PARTIE 1: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**





# **I. LA MYELOPOÏÈSE PHYSIOLOGIQUE**

## **A. Généralités**

Le sang est composé de différents types cellulaires : les leucocytes, les érythrocytes et les plaquettes. Le terme leucocytes regroupe les lymphocytes B et T, les Natural Killers, les granulocytes et les monocytes. On les appelle également les globules blancs. Les leucocytes assurent la défense de l'organisme. Les érythrocytes, appelés aussi globules rouges ou hématies, ont pour fonction principale le transport de l'oxygène et les plaquettes permettent la coagulation.

Les cellules du sang ont une durée de vie limitée. De plus, en cas de stress (altitude, exercice, saignement, infection...), les besoins cellulaires du corps peuvent augmenter. L'organisme doit par conséquent assurer le renouvellement continu des cellules sanguines et s'adapter à ses besoins. Chaque jour, l'organisme d'un adulte produit environ  $2 \cdot 10^{11}$  érythrocytes,  $1 \cdot 10^{11}$  leucocytes et  $1 \cdot 10^{11}$  plaquettes, et leur taux de production peut augmenter de plus de dix fois en cas de nécessité. L'hématopoïèse est le processus qui permet, par différentes étapes de différenciation et d'expansion, la production de l'ensemble des cellules du sang. Chez les mammifères, ce processus se déroule dans le foie et la rate pour le fœtus, et dans la moelle osseuse des os plats et l'épiphyse des os longs pour l'adulte. Selon le modèle classique, l'hématopoïèse peut être compartimentée en deux branches, d'une part la lignée lymphoïde, aboutissant à la formation des lymphocytes et Natural Killers, et d'autre part la lignée myéloïde (au sens large) permettant la formation des granulocytes, monocytes, érythrocytes et plaquettes. La formation des cellules de la lignée myéloïde est nommée la myélopoïèse.

## **B. Les différentes étapes de la myélopoïèse**

### **1. La CSH et les progéniteurs myéloïdes communs**

La myélopoïèse est assurée par un petit contingent de cellules pluripotentes, capables de générer l'ensemble du tissu hématopoïétique, à longue durée de vie et ayant des capacités d'auto-renouvellement, les cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Le compartiment des CSH peut être séparé en deux sous-populations distinguées selon leur capacité de reconstitution de l'hématopoïèse ; les LT-HSC (« Long Term-Hematopoietic Stem Cell »), dont la fréquence est très faible, qui ont une capacité d'auto-renouvellement long et reconstituent de façon définitive l'hématopoïèse, sont considérées comme les véritables HSC ; les ST-HSC (« Short-Term HSC ») qui ont une capacité de reconstitution rapide mais inférieure à 6 mois, donnent naissance à des progéniteurs multipotents ; et les MPP (« multipotent progenitor »). Ces derniers ne possèdent plus de capacité d'auto-renouvellement mais sont capables de reconstituer tous les tissus hématopoïétiques (Morrison et al., 1997), (Kondo, 2010).

La MPP se différencie pour donner naissance à des progéniteurs aux capacités de différenciation un peu plus restreintes, engagés dans la lignée myéloïde, le progéniteur myéloïde commun ou CMP (« Common Myeloid progenitor ») nommé aussi CFU-GEMM (« Colony Forming Unit Granulocyte/ Erythrocyte/ Megakaryocyte/ Macrophage »), ou dans la voie lymphoïde, le progéniteur lymphoïde commun ou CLP (« Common Lymphoid Progenitor »). Cependant, ce modèle dit « classique » est controversé. Certains travaux conduisent à penser que les progéniteurs de la lignée lymphoïde conservent un potentiel myéloïde (Kawamoto et al., 2010).

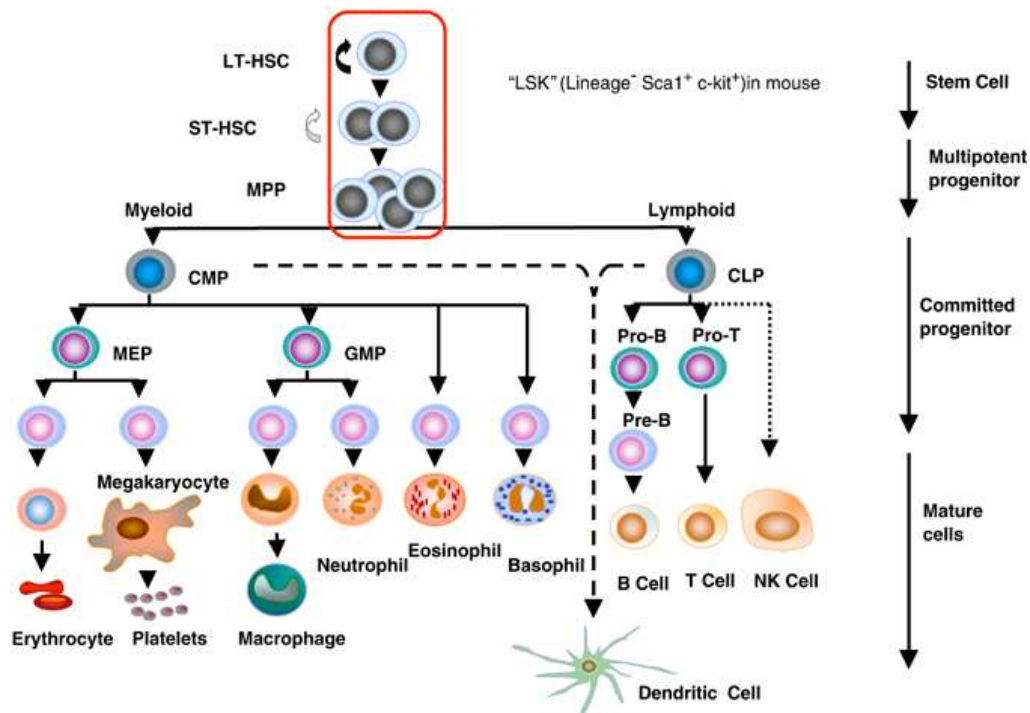


Figure 1 : Représentation schématique du modèle classique de l'hématopoïèse

D'après Jonas Larsson and Stefan Karlsson, 2005 (Larsson and Karlsson, 2005)

## 2. La différenciation érythroïde

Selon le schéma classique de l'érythropoïèse, le progéniteur myéloïde commun CFU-GEMM se différencie, tout d'abord, en un progéniteur bipotent érythro-mégacaryocytaire, le MEP (« Megakaryocytic Erythroid Progenitor »).

L'engagement dans la voie de différenciation érythroïde se fait lors de la différenciation du MEP en un progéniteur restreint, le burst-forming unit-erythroid (BFU-E). Le BFU-E se différencie ensuite en progéniteur tardif nommé colony-forming unit-erythroid (CFU-E).

La différenciation érythroïde terminale nécessite la formation d'îlots érythroblastiques composés de macrophages entourés d'érythroblastes à différents stades de différenciation. Les érythroblastes nécessitent la participation du macrophage afin d'assurer leur différenciation terminale et devenir globule rouges. Lors de la différenciation érythroïde terminale, se succèdent différentes étapes donnant naissance à différents stades de précurseurs reconnaissables par leur caractéristiques morphologiques : le proérythroblaste, l'érythroblaste basophile, l'érythroblaste polychromatophile et l'érythroblaste acidophile. Ce dernier, avec l'aide des macrophages, procède à l'énucléation de son noyau pour devenir réticulocyte, passe dans le sang et finit sa maturation pour donner l'érythrocyte fonctionnel assurant le transport d'oxygène dans le sang.

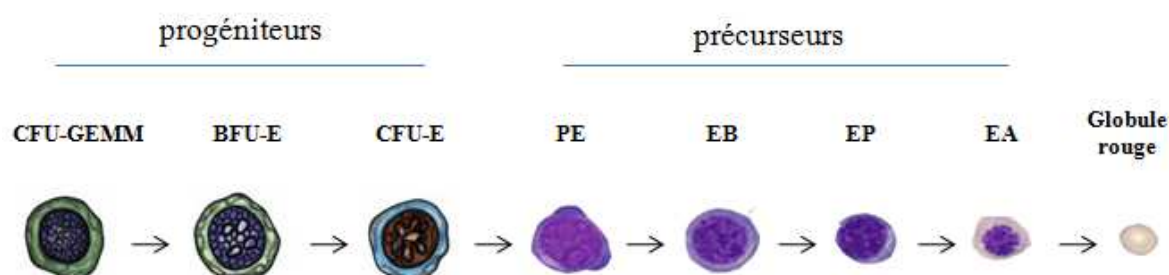


Figure 2 : Représentation schématique de la différenciation érythrocytaire

PE : Proérythroblaste, EB : Erythroblaste Basophile, EP : Erythroblaste Polychromatophile, EA : Erythroblaste Acidophile.

## 3. La différenciation mégacaryocytaire

La mégacaryopoïèse est le processus permettant la production de plaquettes. L'engagement dans la voie mégacaryocytaire se fait par la différenciation du MEP en BFU-

MK (« Burst Forming Unit – Megakaryocyte »), progéniteur unipotent. S’en suit le stade de progéniteur CFU-MK (« Colony Forming Unit – Megakaryocyte ») qui se différencie en promégacaryoblastes, puis en mégacaryoblaste, première cellule identifiable morphologiquement. Par la suite, se produit le phénomène d’endomitose, division nucléaire sans division du cytoplasme conduisant à des cellules polyploïdes.

Les mégacaryoblastes se différencient successivement en mégacaryocytes basophiles, en mégacaryocytes granuleux puis en mégacaryocytes thrombocytogènes. Au cours de ces différents stades, une maturation cytoplasmique est observée. De fins prolongements cytoplasmiques appelés proplaquettes apparaissent. Le mégacaryocyte thrombocytogène présente alors un aspect en “pieuvre”. Les proplaquettes se fragmentent pour libérer les plaquettes.

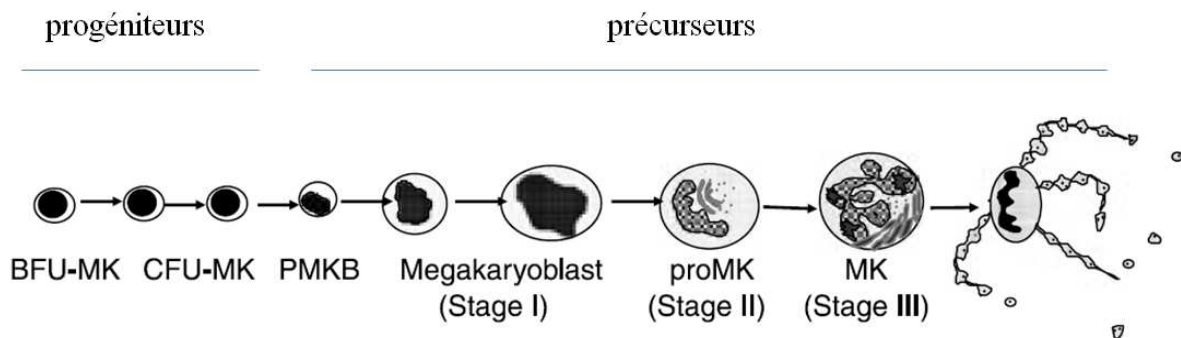


Figure 3 : Représentation schématique de la différenciation mégacaryocytaire

(adapté de (Chang et al., 2007))

#### 4. La différenciation granulo-monocytaire

La granulo-monopoïèse est la production de granulocytes (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles) et de monocytes.

Le polynucléaire neutrophile et le monocyte sont issus d’un même progéniteur commun, le CFU-GM (« Colony Forming Unit – Granulocyte Macrophage »).

L’engagement dans la différenciation monocyttaire passe par la maturation du CFU-GM en un progéniteur unipotent, le CFU-M (« Colony Forming Unit – Macrophage »), qui se différencie en différents stades de précurseurs reconnaissables par leur morphologie, les monoblastes, les promonocytes et enfin en monocytes.

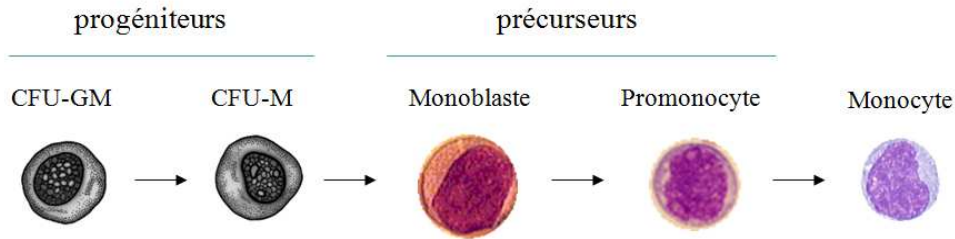


Figure 4 : Représentation schématique de la différenciation monocyttaire

La différenciation granulocytaire neutrophile, nécessite la différenciation du CFU-GM en CFU-G (« Colony Forming Unit - Granulocyte »). Le premier stade de précurseur est le myéloblaste qui se différencie en promyélocyte, puis myélocyte et enfin en métamyélocyte afin de devenir polynucléaire neutrophile.

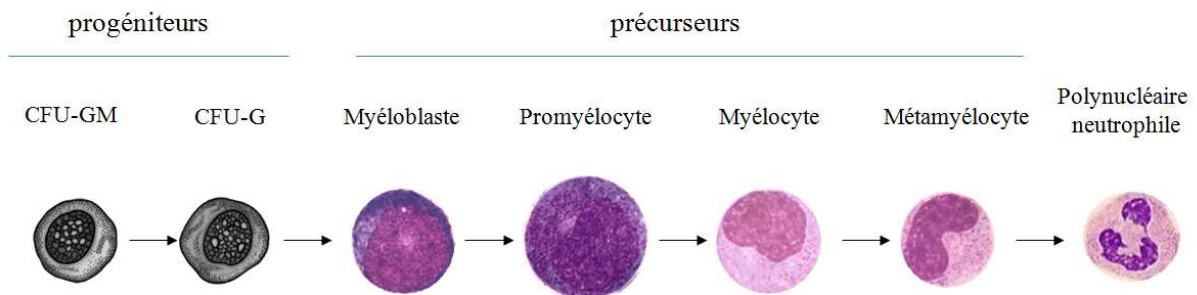


Figure 5 : Représentation schématique de la différenciation granulocytaire neutrophile

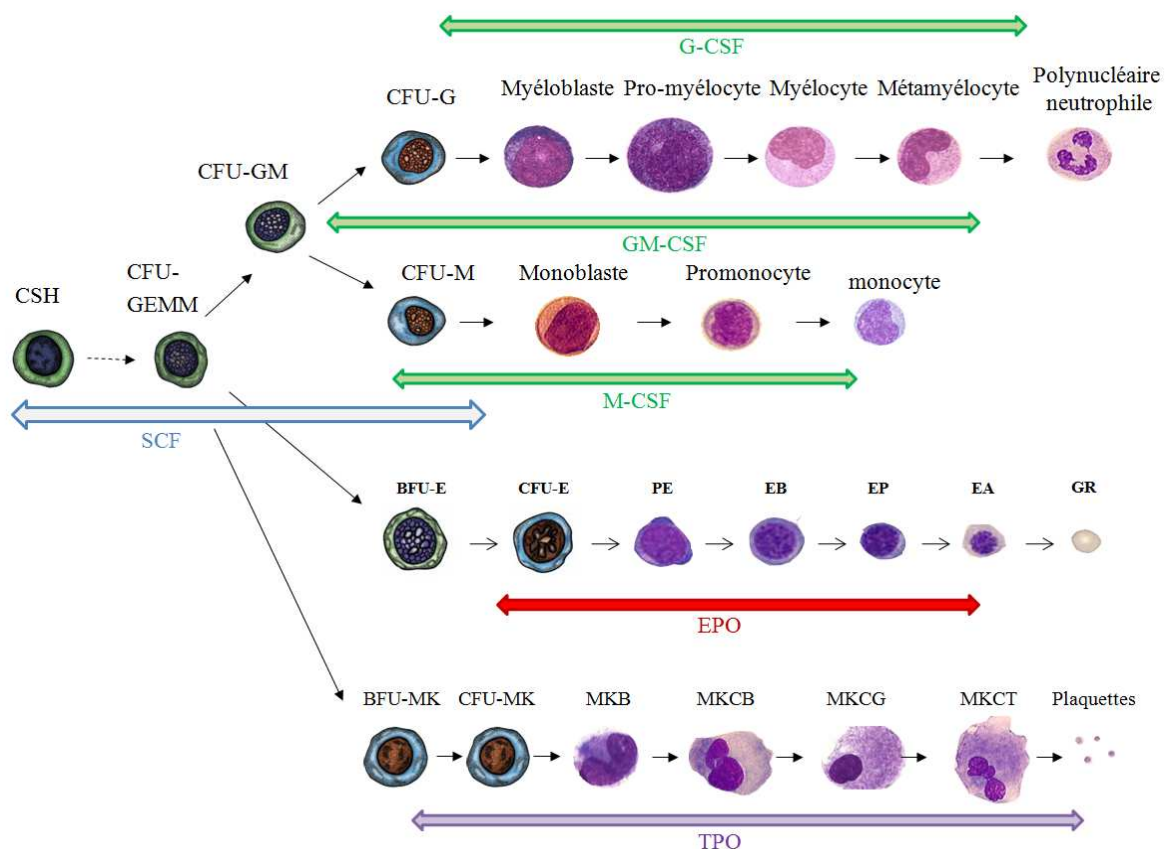
Selon le schéma classique, les polynucléaires éosinophiles et basophiles sont eux issus de la différenciation de la CFU-GEMM directement en progéniteur unipotent, le CFU-Eo (« Colony Forming Unit – Eosinophile ») et le CFU-B (« Colony Forming Unit – Basophile ») respectivement.

### **C. Cytokines et facteurs de croissance**

L'ensemble des étapes de différenciation est régulée sous l'influence du microenvironnement, de facteurs de transcription spécifiques et de cytokines. Les cytokines sont des groupes de glycoprotéines acides qui se fixent à des récepteurs situés à la surface des cellules et agissent de façon endocrine ou paracrine afin d'influencer la prolifération, la survie, l'engagement dans un lignée cellulaire et la différenciation des cellules.

Certaines cytokines sont spécifiques d'une lignée. Ainsi, l'érythropoïétine (EPO), le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), le monocyte colony-stimulating factor (M-CSF) et la thrombopoïétine (TPO) sont les principaux régulateurs de la production d'érythrocytes, de granulocytes, de monocytes et de plaquettes respectivement (voir figure 6). Ceci est dû à la présence des récepteurs uniquement sur la surface des cellules concernées. Par exemple, on note une dépendance vis-à-vis de l'EPO apparaissant entre les stades BFU-E et CFU-E et qui perdure jusqu'au stade erythroblaste acidophile. Or, le récepteur à l'EPO est exprimé à la surface des cellules appartenant aux mêmes stades de différenciation. En revanche, les autres cellules hématopoïétiques ne sont pas dépendantes de l'EPO et n'expriment pas son récepteur.

D'autres cytokines peuvent agir sur différentes lignées. C'est le cas par exemple du GM-CSF qui agit à la fois sur la lignée granulocytaire et la lignée monocyttaire (pour revue (Metcalf, 2008)).



**Figure 6 : Représentation schématique des principales cytokines des différenciations myéloïdes**

PE : Proérythroblaste, EB : Erythroblaste Basophile, EP : Erythroblaste Polychromatophile, EA : Erythroblaste Acidophile, GR : Globule Rouge MKB: Mégacaryoblaste, MKCB: Mégacaryocyte Basophile, MKCG : Mégacaryocyte Granuleux, MKCT : Mégacaryocyte Thrombocytoène.

*In vitro*, il est possible d'orienter la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques vers une lignée particulière grâce à un cocktail de cytokines. Par exemple, un milieu complémenté de SCF, d'IL-3 et d'EPO permettra la différenciation des cellules dans la voie érythrocytaire, alors qu'un milieu additionné de SCF, GM-CSF, FLT-3 ligand et d'IL-3 permettra la différenciation dans la voie granulo-monocytaire.

## **D. Marqueurs**

A chaque étape de la différenciation, les cellules expriment à leur surface des antigènes plus ou moins spécifiques. La présence et surtout la combinaison de ces antigènes nous permet ainsi de repérer le stade de différenciation auquel une cellule se trouve par immunophénotypage.

### **1. Les marqueurs d'immaturité**

La CSH est caractérisée par la présence, à sa surface, des antigènes CD34 (« Cluster de Différentiation 34 »), CD133 (connue aussi sous le nom de Prominin 1), Thy1 et c-kit (récepteur du SCF), et l'absence de l'antigène CD38 et de lin (« lineage negative »). Au cours de sa différenciation, la CSH va perdre ces marqueurs de surface et acquérir d'autres marqueurs spécifiques des différentes lignées.

L'antigène CD34, qui est une glycoprotéine impliquée dans l'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice, est souvent utilisé pour sélectionner les cellules immatures. Elle est également exprimée par les MPP et les progéniteurs précoces (Krause et al., 1996).

### **2. Les marqueurs de différenciation érythroïde**

Au cours de la différenciation érythroïde, le marqueur d'immaturité CD34 cesse de s'exprimer à partir du stade BFU-E. Le récepteur membranaire CD36, souvent utilisé pour visualiser les stades précoces de l'érythropoïèse, est présent sur la surface de tous les progéniteurs et les précurseurs érythroïdes. Cependant, cet antigène n'est pas spécifique de la lignée érythroïde puisqu'il est également présent à la surface des mégacaryocytes. A un stade progéniteur tardif (CFU-E), les cellules commencent à exprimer à leur surface la Glycophorin A (GPA ou CD235a). La GPA est un marqueur spécifique de la lignée érythrocytaire car elle

est exprimée uniquement par le CFU-E, les précurseurs érythroïdes et les globules rouges. De plus, bien que l'antigène CD71 (récepteur à la transferrine 1) soit utilisé comme marqueur de prolifération, une forte expression de cet antigène est spécifique des érythroblastes et peut donc être également utilisée comme marqueur spécifique de la différenciation érythroïde terminale (Dong et al., 2011). Les principaux marqueurs caractéristiques de la différenciation érythroïde sont résumés dans la figure 7.

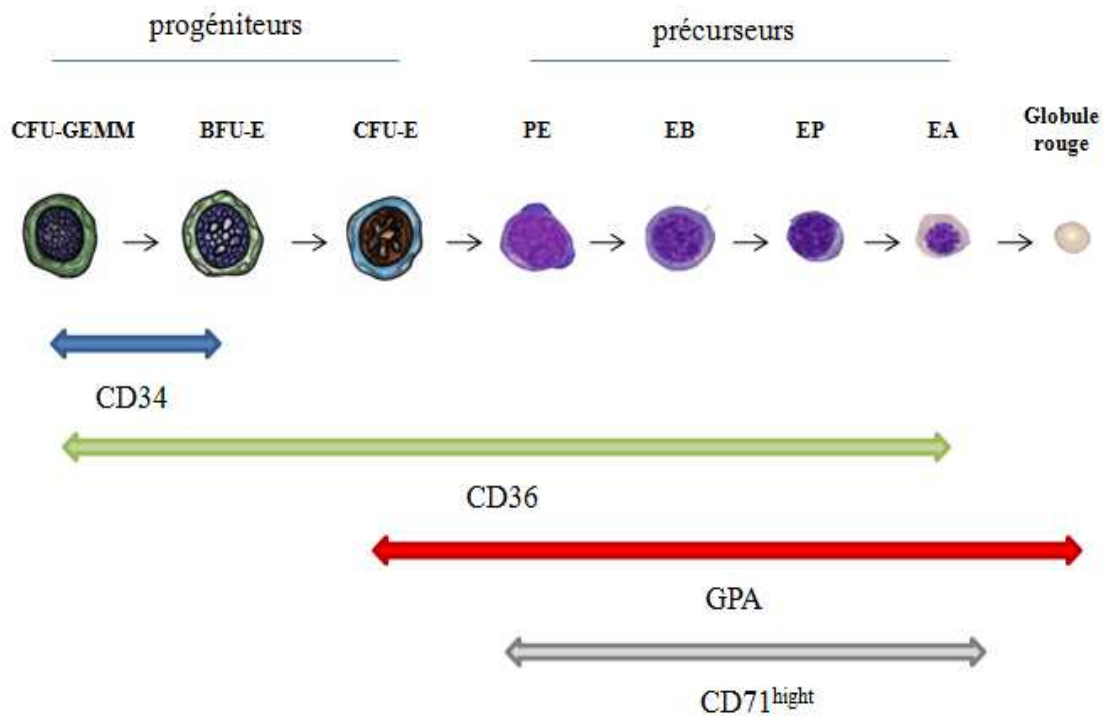


Figure 7 : Représentation schématique des principaux marqueurs de différenciation érythrocytaire

### 3. Les marqueurs de différenciation granulo-monocytaire

La différenciation granulo-monocytaire est caractérisée par la perte du marqueur CD34 et l'apparition du marqueur CD11b, qui correspond à l'intégrine  $\alpha$  M, une molécule d'adhésion, présent à la fois dans la lignée granulocytaire et monocytaire. On note également l'apparition du marqueur CD14 (récepteur des lipopolysaccharides) à la surface des cellules engagées dans la voie monocytaire et du marqueur CD15 (une molécule d'adhésion) caractéristique de la différenciation granulocytaire terminale. Les principaux marqueurs des différenciations granulocytaire neutrophile et monocytaire sont résumés dans la figure 8.



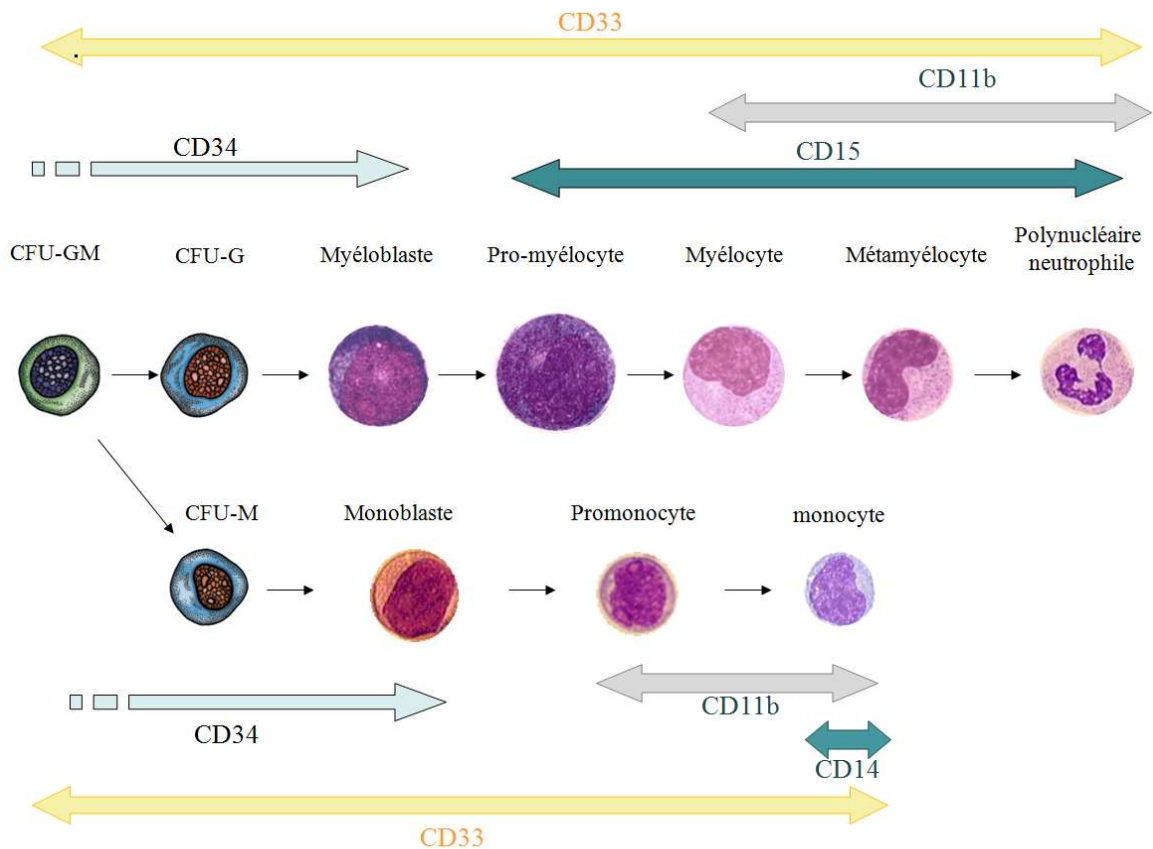


Figure 8 : Représentation schématique des principaux marqueurs de différenciation granulomonocytaire

#### 4. Les marqueurs de différenciation mégacaryocytaire

Comme tous les autres progéniteurs hématopoïétiques, les progéniteurs mégacaryocytaires expriment à leur surface les marqueurs CD34 et CD133. Lors de la progression de la différenciation, on voit disparaître ces marqueurs d’immaturité et apparaître l’antigène CD41 (la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa impliquée dans l’adhésion des cellules) et les antigènes CD42a et CD42b (les glycoprotéines IX et Ib) exprimés à la surface des précurseurs mégacaryocytaires et qui sont des marqueurs relativement spécifiques de la lignée mégacaryocytaire. Tout comme les progéniteurs et précurseurs érythrocytaires, les mégacaryocytes et les plaquettes expriment également l’antigène CD36. En revanche, la tubuline  $\beta 1$ , exprimée au cours des dernières étapes de différenciation, est spécifique de la lignée mégacaryocytaire. Les principaux marqueurs de la différenciation mégacaryocytaire sont résumés dans la figure 9.

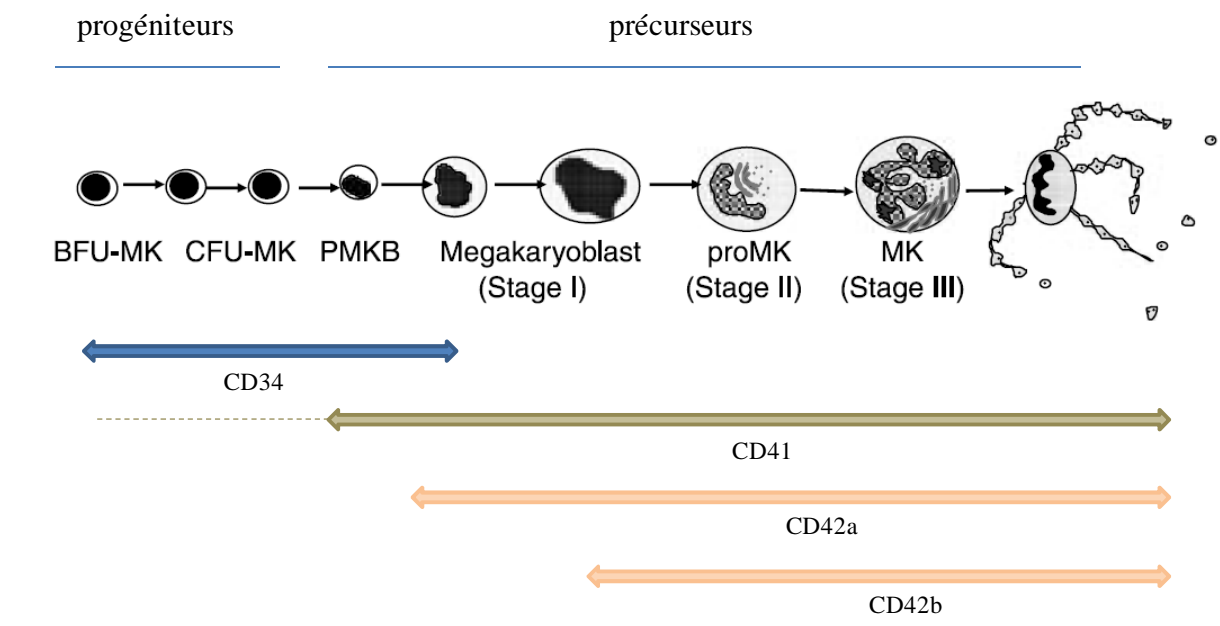


Figure 9 : Représentation schématique des principaux marqueurs de différenciation mégaérythrocytaire

(adapté de (Chang et al., 2007) )

## E. Perturbations de la myélopoïèse

Une dérégulation de la myélopoïèse, que la source soit intrinsèque ou extrinsèque aux cellules, peut avoir pour conséquence une cytopénie, c'est-à-dire un manque de cellules ou au contraire un excès de production cellulaire. Par exemple, une dérégulation de la production d'EPO dans le sens de l'excès peut engendrer une production excessive d'érythrocytes (ou polyglobulie) ou, au contraire, une trop faible production d'EPO peut entraîner un manque de production d'érythrocytes (anémie). Certaines mutations peuvent avoir les mêmes conséquences. C'est par exemple le cas dans les néoplasies myéloprolifératives où on observe une production excessive de cellules de la lignée myéloïde indépendamment du taux de cytokines présentes dans le milieu. On peut également observer, dans le cas de mutations, des blocages de différenciation avec accumulation de cellules immatures (ou blastes) qui envahissent la moelle osseuse et passent dans le sang. C'est le cas dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).

## **II. LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES PHILADELPHIE NEGATIVES DITES « CLASSIQUES »**

Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des hémopathies malignes acquises caractérisées par une expansion clonale de la lignée myéloïde prenant naissance à partir d'une CSH ou d'un progéniteur hématopoïétique. La classification WHO (« World Health Organization ») des NMP distingue : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la maladie de Vaquez (MV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MFP), la leucémie myéloïde neutrophile, la leucémie chronique éosinophile, la mastocytose et les NMP non classables (Klco et al., 2010).

La LMC est liée à la présence de la translocation t(9 ; 22), à l'origine du chromosome de Philadelphie. Cette anomalie chromosomique entraîne la présence dans la cellule d'une protéine de fusion, la protéine BCR-ABL responsable de la maladie. Les autres NMP sont dites « NMP Philadelphie négatives » car elles ne sont pas liées à la présence du chromosome Philadelphie. Parmi les NMP Philadelphie négatives, on distingue les NMP dites « classiques », qui sont la MV, la TE et la MFP des autres NMP dites « atypiques » qui sont plus rares.

### **A. La maladie de Vaquez**

La maladie de Vaquez (MV), connue aussi sous le nom de polyglobulie primitive, est caractérisée par une expansion excessive de la lignée myéloïde avec une prédominance sur la lignée érythrocytaire. Elle se manifeste par une augmentation de la masse globulaire, une splénomégalie et des signes cliniques liés à l'hyperviscosité et à l'hypervolémie sanguine. L'incidence de la MV est de 1 à 3/100 000 habitants par an. L'âge médian au diagnostic est proche de 60 ans avec une légère prédominance masculine. Le risque majeur de la maladie est la thrombose ou la transformation en myélofibrose primitive ou en leucémie aiguë myéloïde (LAM).

Contrairement aux polyglobulies dites « secondaires », cette pathologie est liée à un défaut intrinsèque aux cellules et non à une stimulation excessive des progéniteurs érythroïdes par des facteurs extrinsèques comme une production excessive d'EPO.

Les progéniteurs érythroïdes de patients atteints de MV sont hypersensibles voire indépendants vis-à-vis de cytokines (EPO, SCF, GM-CSF, l'IL-3, IGF-1 (« Insulin-like

Growth- Factor-1 »)). Ainsi, les progéniteurs sont capables de pousser en milieu semi-solide, en absence d'EPO. On appelle les colonies érythroïdes formées en l'absence d'EPO des colonies érythroïdes endogènes (CEE). La capacité des progéniteurs à former des CEE était jusqu'en 2006 un critère diagnostique de la MV car cela les distinguait des polyglobulies secondaires.

## **B. La thrombocythémie essentielle**

La thrombocytémie essentielle (TE) est caractérisée par une expansion excessive de la lignée myéloïde avec une prédominance sur la lignée mégacaryocytaire. La TE se manifeste par un taux plaquettaire élevé, elle peut être asymptomatique ou entraîner une splénomégalie, une hépatomégalie et des hémorragies. Elle touche 2,6/100 000 habitants par an. Contrairement à la MV, la TE possède une légère prédominance féminine. Elle survient le plus souvent après l'âge de 50 ans mais on observe toutefois un pic d'apparition vers l'âge de 30 ans. Comme pour la MV, le risque majeur de la maladie est la thrombose ou les hémorragies. Les risques de transformation en myélofibrose primitive ou en LAM existent, mais ils sont ici très faibles. Dans 50% des TE, les progéniteurs érythroïdes sont capables de former des CEE. La pousse spontanée des progéniteurs mégacaryocytaires a également été mise en évidence dans la TE (Adams et al., 1988).

## **C. La myélofibrose primitive**

La myélofibrose primitive (MFP) appelée aussi myélofibrose idiopathique est caractérisée par une prolifération excessive de la lignée myéloïde associée à un envahissement progressif de la moelle osseuse par du tissu fibreux avec apparition d'une hématopoïèse extra-médullaire, d'une splénomégalie et d'une anémie. Son incidence est de 0,5 à 1,3/100 000 habitants par an. L'âge moyen au moment du diagnostic se situe entre 60 et 65 ans. La MFP peut être la conséquence de l'évolution d'une MV ou d'une TE. Les risques majeurs de la maladie sont l'évolution en LAM et l'insuffisance médullaire. Dans la MFP, les progéniteurs érythroïdes sont également capables de former des CEE. La pousse spontanée des CFU-MK a également été mise en évidence dans cette pathologie (Adams et al., 1988).

## D. Le statut mutationnel des NMP

La physiopathologie des NMP est longtemps restée inexplicée. Des travaux anciens avaient documenté que les progéniteurs présentaient une hypersensibilité aux cytokines. Cette observation suggérait une anomalie dans la transduction du signal dans le contexte de la réponse aux cytokines. Cependant, aucune anomalie récurrente n'avait été mise en évidence tant au niveau de la structure des récepteurs, de sa signalisation, que de la régulation négative du signal (phosphatases). Ce n'est qu'en 2005 que quatre équipes ont simultanément identifié une première anomalie moléculaire caractéristique de ces maladies, une mutation de la tyrosine kinase JAK2, la mutation JAK2<sup>V617F</sup> (James et al., 2005), (Kralovics et al., 2005), (Levine et al., 2005), (Baxter et al., 2005). Cette anomalie est présente dans plus de 95% des cas de MV et dans environ 50% des cas de TE et de MFP. Etant donné qu'une faible proportion de patients atteints de MV et qu'une proportion significative de patients atteints de TE et MFP n'étaient pas concernés par la mutation, d'autres gènes candidats ont également été séquencés dans des échantillons de NMP. C'est ainsi qu'ont été découvertes des mutations au niveau du gène de MPL (« myeloproliferative leukemia virus oncogene »), le récepteur de la TPO ; de LNK, un adaptateur régulant négativement la transduction du signal de récepteurs aux cytokines ; ainsi que des mutations au niveau de l'exon 12 de JAK2 (Abdel-Wahab, 2011).

D'autres mutations non spécifiques des NMP entraînant une altération de la signalisation des récepteurs aux cytokines ont également été découvertes comme la mutation des E3 ubiquitine ligases telles que SOCS3 (« Suppressor Of Cytokine Signaling 3 ») et CBL (« Casitas B-lineage Lymphoma »). On note également la présence dans les NMP de mutations situées sur des gènes agissant sur la régulation épigénétique telles que la mutation de TET-2 (« tet oncogene family member 2 »), EZH2 (« Enhancer of Zeste Homologue 2 »), et ASXL1 (« additional sex combs like 1 ») ou sur le métabolisme comme IDH1/2 (« Isocitrate Dehydrogenase 1/2 »). Encore très récemment ont été découvertes de nouvelles mutations présentes dans les NMP : la mutation de DNMT3 (« DNA methyl transferase 3 ») et IKZF1 (« IKAROS family zinc finger 1 ») (Tefferi, 2011). Le tableau 1 résume les différentes mutations retrouvées dans les NMP.

MUTATIONS	FREQUENCE	FONCTION DE LA PROTEINE	CONSEQUENCES DE LA MUTATION SUR LA PROTEINE	PHYSIOPATHOLOGIE
JAK2 <sup>V617F</sup>	MV (95-99%), TE (50-70%), MFP (40-50%)	Tyrosine kinase, signalisation	Gain de fonction	Altération de la signalisation Modifications épigénétiques
JAK2 exon 12	MV~3%,	Tyrosine kinase, signalisation	Gain de fonction	Altération de la signalisation
MPL	TE (4%), MFP (11%)	Récepteur, signalisation	Gain de fonction	Altération de la signalisation
CBL	MFP(6%)	Adaptateur, E3 ubiquitine ligase, régulation négative de la signalisation	Dominant négatif	Altération de la signalisation
LNK	TE (<5%), MFP (<5%), AML post-NMP (13%)	Adaptateur, régulation négative de la signalisation	Perte de fonction	Altération de la signalisation
SOCS3	MV: rare	E3 ubiquitine ligase, régulation négative de la signalisation	Perte de fonction	Altération de la signalisation
NF1	MFP (<6%), MV et TE: rare	Régulation de la voie des MAPK	Délétion	Altération de la signalisation
ASXL1	MV et TE (<7%), MFP (19-40%), AML post-NMP (19%)	Modifications de la chromatine	Perte de fonction	Modifications épigénétiques
EZH2	MV~3%, MFP~7%	Méthylation de la chromatine	Perte de fonction	Modifications épigénétiques
IKZF1	MV, TE, MFP: rare	Facteur de transcription	Délétion	Modifications épigénétiques
TET2	MV~16%, TE~5%, MFP~17%	Hydroxyméthylation de l'ADN	Perte de fonction	Modifications épigénétiques
DNMT3	MV~7%, MFP~7%	Méthylation de l'ADN	Indéterminé	Modifications épigénétiques
IDH1/2	MV~2%, TE~1%, MFP~4%	Isocitrate deshydrogénase	Néomorphisme	Métabolisme

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des mutations présentes dans les NMP

(adapté de (Vainchenker et al., 2011) et (Tefferi, 2011))

Malgré la diversité des mutations retrouvées au sein de ces pathologies, la mutation JAK2<sup>V617F</sup> reste la mutation la plus fréquemment retrouvée. De plus, les autres mutations paraissent être indépendantes de la présence de JAK2<sup>V617F</sup>. Un patient peut posséder deux mutations sur le même clone tout comme sur deux clones différents.

### III. LA MUTATION JAK2<sup>V617F</sup>

La mutation JAK2<sup>V617F</sup> est une mutation ponctuelle touchant la tyrosine kinase JAK2. Il s'agit d'une mutation acquise touchant une CSH ou un progéniteur. Elle est homozygote

chez 30% des patients. Cependant, il peut exister chez un même patient une proportion variable de cellules hématopoïétiques mutées (homozygotes et/ou hétérozygotes) et de cellules hématopoïétiques normales. Ceci explique que l'expression de JAK2 mutée varie d'un malade à l'autre et, avec le temps, chez un même malade (Scott et al., 2006).

L'introduction de la mutation entraîne, chez la souris, une pathologie semblable à une NMP suggérant un lien causal entre la mutation et ces pathologies. L'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> a également été retrouvée dans de rares cas de myélodysplasies, de LAM et de LMC. Cependant, bien qu'elle soit présente dans les cellules de la lignée lymphoïde (Delhommeau et al., 2007), cette mutation est spécifique des néoplasies myéloïdes et n'a été retrouvée ni dans des néoplasies lymphoïdes ni chez les donneurs sains.

La découverte de la mutation représente une grande avancée dans la compréhension de ces pathologies et a permis un progrès considérable dans le diagnostic des NMP, la recherche de JAK2<sup>V617F</sup> dans le sang représentant une technique à la fois plus précise et moins invasive que les techniques conventionnelles (biopsie ostéo-médullaire) ou la culture de progéniteurs érythroïdes à partir de moelle osseuse.

## **A. Modèles murins – lien causal entre la mutation et les NMP**

Afin de comprendre l'impact de la mutation sur la physiologie et la diversité des NMP, de nombreux modèles murins ont été réalisés (pour revue (Van Etten et al., 2011)).

Les premiers ont été mis en place par stratégie rétrovirale (Lacout et al., 2006), (Wernig et al., 2006), (Zaleskas et al., 2006), (Bumm et al., 2006). Dans ces modèles, il existe une corrélation entre le niveau d'expression de JAK2<sup>V617F</sup> et le phénotype observé. En effet, lorsque le niveau d'expression de l'oncogène est élevé, les souris développent une pathologie semblable à la MV et lorsque le niveau de JAK2 muté est plus faible, les souris ont un phénotype similaire à celui observé lors d'une TE. Ces résultats suggéraient donc que la diversité phénotypique liée à la mutation était due à une différence de niveau d'expression de l'oncogène. Cependant, les transgènes utilisés avaient différents sites d'insertion, pouvant également avoir une conséquence sur la diversité phénotypique observée. Quatre modèles plus récents ont utilisé l'approche « knock in » permettant l'introduction de la mutation au niveau du locus de JAK2 et par conséquent un niveau d'expression de JAK2<sup>V617F</sup> plus proche du niveau physiologique (Akada et al., 2010), (Marty et al., 2010), (Mullally et al., 2010), (Li

et al., 2010). Dans ce cas, les souris développent un phénotype similaire au NMP mais plus marqué lorsque les souris sont homozygotes. En revanche, le lien entre le niveau de JAK2 muté et le phénotype observé y est moins clair. Le modèle développé par Jean-Luc Villeval et ses collègues exprime l'allèle de JAK2<sup>V617F</sup> de manière constitutive et hétérozygote (Marty et al., 2010). Les souris développent un phénotype de NMP sévère avec TE, MV, splénomégalie et MFP. Les modèles d'expression constitutive créés par Ebert et ses collègues développent également une NMP (Mullally et al., 2010). En revanche, ils observent un phénotype similaire à la MV avec splénomégalie, mais pas de TE ni de MFP.

La forte prévalence de NMP dans tous ces modèles suggère fortement que l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> initie un NMP, du moins chez la souris. Cependant, on note, chez la souris comme chez les patients, une forte diversité phénotypique. Cette diversité pourrait s'expliquer par un fond génétique différent. Cette hypothèse est confortée par la présence, chez l'humain, de l'haplotype 46/1 prédisposant au développement d'un NMP (Jones et al., 2009). Cette diversité pourrait également s'expliquer par la présence d'une autre mutation associée ou non à JAK2<sup>V617F</sup> ou du type cellulaire ciblé par la mutation. De plus, la présence de la mutation ne donne pas le taux d'activité kinase du mutant qui pourrait également être impliqué dans cette variation phénotypique. Il en est de même de l'activité de la forme sauvage de JAK2 qui agit comme dominant négatif (James et al., 2005). De plus, certains travaux visant à étudier l'impact de JAK2<sup>V617F</sup> sur la signalisation intra-cellulaire ont révélé l'influence d'une activité différentielle des STATs sur l'orientation de la maladie. En effet, une étude réalisée par Chen *et al.* sur des cellules mononucléées de sang de patients suggère qu'une forte activité de STAT1 serait responsable d'un phénotype TE alors qu'une activité faible de STAT1 mènerait à une MV. Les auteurs l'expliquent par une activation de STAT1 favorisant la différenciation mégacaryocytaire et inhibant la différenciation érythrocytaire des cellules (Chen et al., 2010). Les travaux de Teofili *et al.*, suggèrent quant à eux, que la balance de niveau de phosphorylation entre STAT3 et STAT5 participe à cette discrimination (Teofili et al., 2007).

Les facteurs pouvant influencer sur la diversité phénotypique observée en présence de la mutation sont, par conséquent, nombreux, et les causes de cette diversité ne sont, à l'heure actuelle, pas totalement élucidées.



## B. JAK2

Afin de comprendre l'impact que peut avoir la mutation JAK2<sup>V617F</sup>, il est important de connaître la structure et les fonctions de la forme sauvage de JAK2.

JAK2 est une protéine appartenant à une famille de 4 kinases, JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2, dont la fonction est d'activer des protéines en les phosphorylant sur des résidus tyrosines. JAK1, JAK2 et TYK2 sont ubiquitaires et JAK3 est uniquement exprimée dans les tissus hématopoïétiques.

### 1. Structure

Les kinases JAKs sont des protéines d'un poids moléculaire situé autour de 130 kDa, constituées de 7 domaines, nommés JAK homology domains (JH domains). La partie N-terminale de JAK2, composée des domaines JH7 à JH3 contient le domaine FERM (band 4.1 erzin, radixin and moesin) ainsi qu'un domaine SH2 (Src-homology-2 domain)-like permettant l'association de la kinase à la région sub-membranaire des récepteurs aux cytokines. La partie carboxy-terminale de JAK2 contient les domaines kinase et pseudokinase nommés respectivement JH1 et JH2. Le domaine JH1 est responsable de l'activité catalytique de la kinase. Le domaine JH2 a longtemps été considéré comme un domaine dépourvu d'activité catalytique en raison de sa forte homologie avec le domaine kinase JH1 et de l'absence d'acides aminés essentiels présents normalement au niveau du motif catalytique de JH1 (Sanz et al., 2011). Cependant, il a récemment été montré que ce domaine JH2 possède un potentiel sérine/tyrosine kinase et qu'il est capable de phosphoryler JAK2 sur sérine 523 et tyrosine 570 et, ainsi, de réguler négativement la signalisation des récepteurs aux cytokines (Ungureanu et al., 2011).

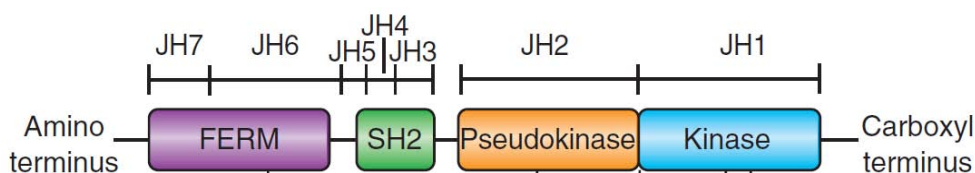


Figure 10 : Structure de la protéine JAK2

La kinase JAK2 est composée des domaines FERM, SH2-like, pseudokinase et kinase. Les domaines FERM et SH2-like permettent à JAK2 de se fixer aux récepteurs de certaines cytokines. Le domaine kinase JH1 porte l'activité de la protéine. Le domaine pseudokinase JH2 est responsable de l'inhibition du domaine kinase et donc de l'auto-inhibition de la protéine. Adapté de Yamaoka *et al.*, Genome Biology, 2004(Yamaoka et al., 2004).

## 2. Fonctions de JAK2

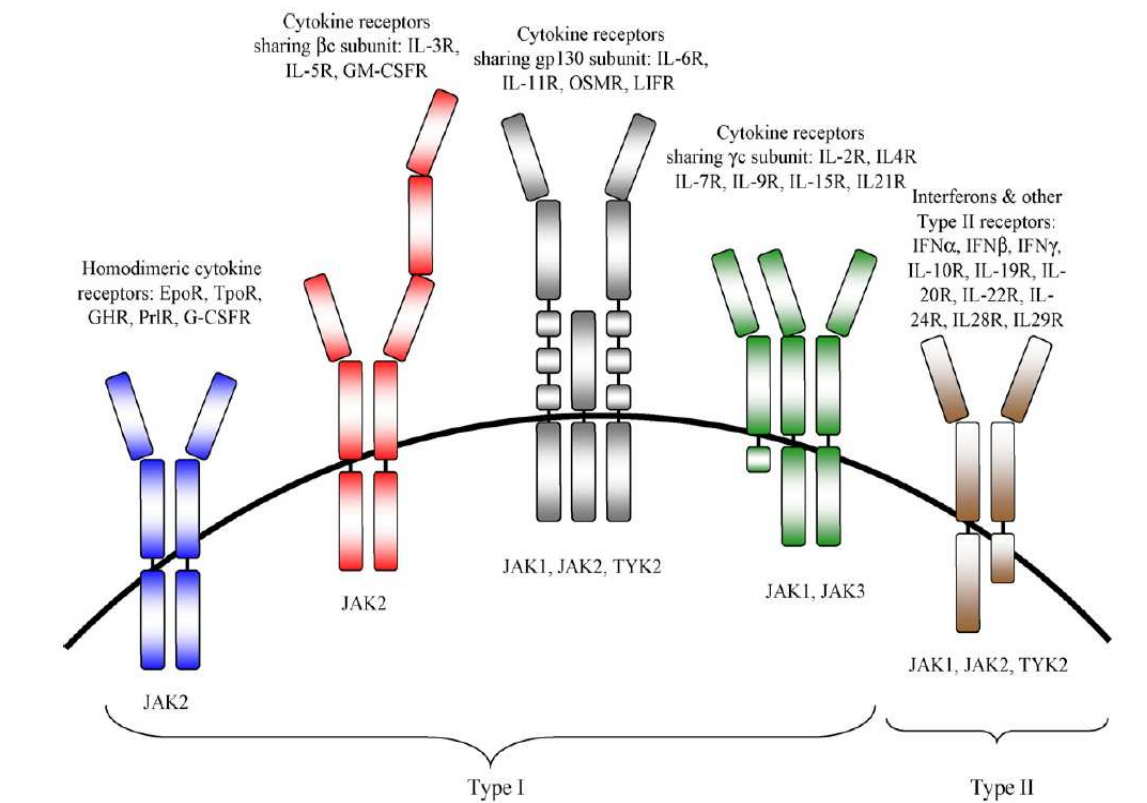
La déplétion de JAK2 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire. L'impact le plus important de la déplétion de JAK2 est une anémie sévère en raison d'une érythropoïèse inefficace montrant le rôle majeur de cette kinase dans l'érythropoïèse. De plus, les progéniteurs myéloïdes ne répondent plus à l'EPO, à la TPO, à l'IL-3, ni au GM-CSF suggérant un rôle clé de JAK2 dans la réponse à ces facteurs de croissance nécessaires à la myélopoïèse. En revanche, JAK2 n'apparaît pas requis dans la formation des progéniteurs lymphoïdes, ni dans leur amplification et leur différenciation (Parganas et al., 1998). Les souris hétérozygotes apparaissent, quant à elles, normales, viables, fertiles (Neubauer et al., 1998).

### *a. Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines*

Comme nous l'avons vu précédemment, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire des lignées hématopoïétiques sont finement régulées par les cytokines. La première étape de transduction du signal des cytokines est la fixation de celles-ci sur leur récepteur. Cependant, contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, les récepteurs des cytokines ne possèdent pas de domaine kinase cytoplasmique et nécessitent par conséquent la participation de protéines à activité kinase afin d'amorcer la cascade de signalisation induite par l'interaction cytokine/récepteur.

La fonction la plus connue des JAKs est la transduction du signal de récepteurs aux cytokines de type I et II (classés en fonction de leur structure tridimensionnelle). On note une différence d'activation des JAKs en fonction des cytokines concernées (Vainchenker et al., 2008). Ainsi, JAK2 va être activée par l'EPO, la TPO, le GM-CSF ou encore l'IL-3 alors que JAK1 va être activée par l'IL-2 ou l'IL-15, bien qu'ils transduisent tous deux la signalisation d'autres cytokines comme l'IFN $\alpha$  ou l'IFN $\beta$ . La figure 11 résume l'implication de chaque JAK dans la transduction du signal des récepteurs aux cytokines.

JAK2 se fixe à une région intra-cytoplasmique riche en proline des récepteurs aux cytokines par son domaine SH2-like (« Src Homology 2 – like »). La fixation du substrat sur son récepteur entraîne un changement conformationnel du récepteur qui passe à un état dimérisée/oligomérisée actif avec un rapprochement des JAK2. Ceci permet aux protéines JAK2 de se transphosphoryler et s'autophosphoryler. Les JAK2 ainsi activées phosphorylent le récepteur auquel elles sont associées (Li, 2008).



**Figure 11 : L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines.**

Les récepteurs aux cytokines ont des préférences propres pour les kinases JAK. Les récepteurs homodimériques utilisent presque exclusivement JAK2. Il en est même des récepteurs possédant la sous-unité  $\beta c$ . JAK3 est activé uniquement par les récepteurs possédant la sous-unité  $\gamma c$ . Les récepteurs possédant la sous-unité gp130, et les récepteurs aux cytokines de type II utilisent JAK1, JAK2 et Tyk2 dans des combinaisons variées. D'après (Vainchenker et al., 2008).

Ces phosphorylations vont être un signal de recrutement de protéines possédant un domaine SH2. Parmi ces protéines, on trouve les facteurs de transcription STAT (« Signal Transducer and Activator of Transcription »), la sous-unité p85 de la PI3K, la tyrosine kinase Lyn, ou encore des protéines adaptatrices comme Cis (« Cytokine inducible SH2-containing protein ») et Grb2. D'autres protéines jouant un rôle négatif sur la transduction du signal sont également recrutées suite à ces phosphorylations, comme les protéines de la famille SOCS (pour revue voir (Richmond et al., 2005)). Le recrutement de l'ensemble de ces protéines entraîne une cascade de signalisation menant à la survie, la différenciation et la prolifération des cellules. Les voies de signalisation principales activées par JAK2 sont les voies JAK2/STAT5,3 et 1, PI3K/Akt et MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinase ») (Figure 12).

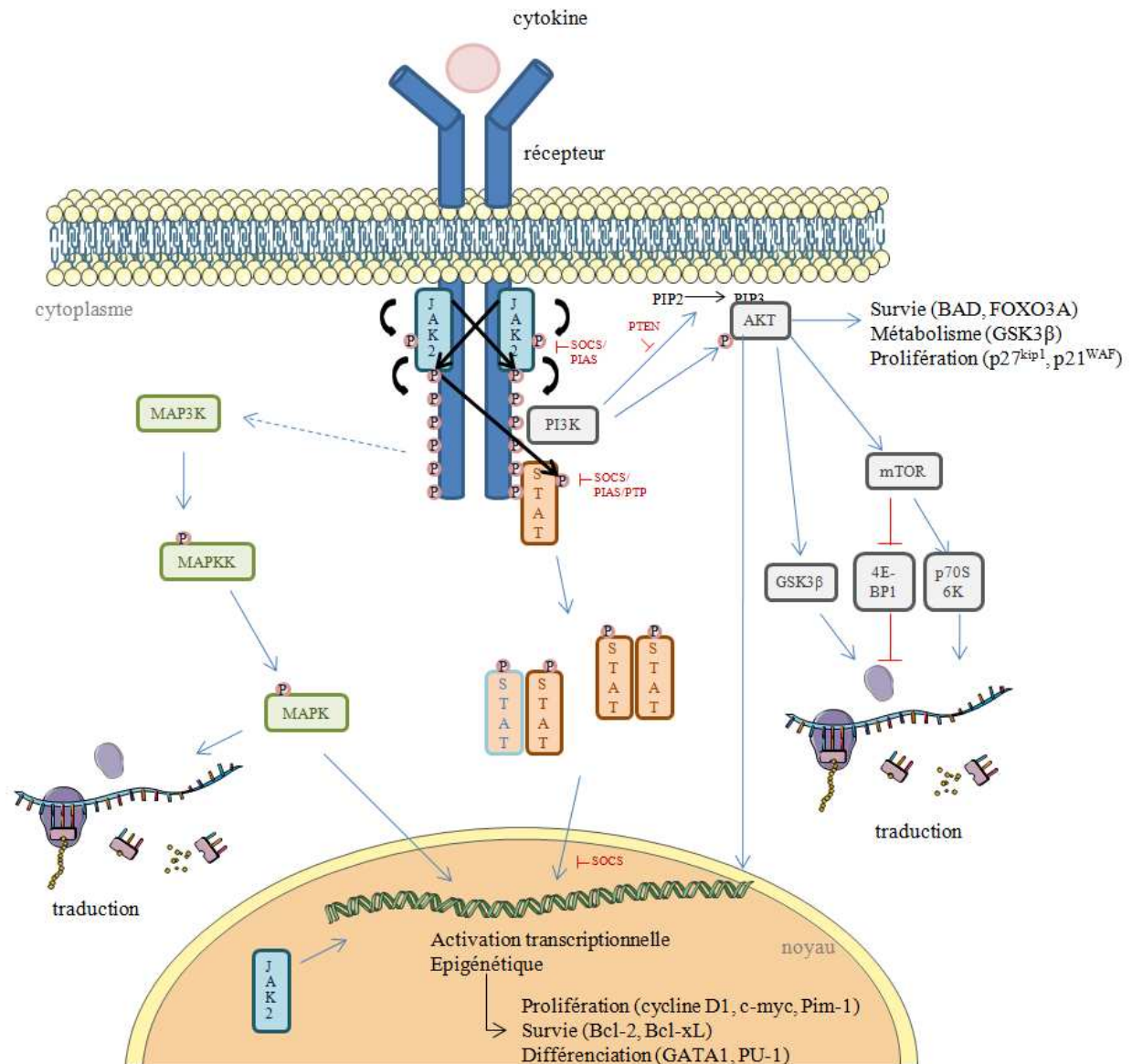


Figure 12 : Principales voies de signalisation activées par le complexe JAK2/récepteur aux cytokines

La fixation de la cytokine sur son récepteur engendre un changement conformationnel ou une dimérisation du récepteur rapprochant les JAK2. Ce rapprochement permet aux JAK2 de se transphosphoryler, puis de s'autophosphoryler et ainsi de s'activer. Les JAK2 une fois activés phosphorylent le récepteur. Cette phosphorylation est un signal de recrutement des STAT1, 3 et 5, de la PI3K et de protéines adaptatrices permettant l'activation des voies JAK2/STAT, PI3K/Akt et MAPK. L'activation de ces voies de signalisation aboutit, par la transcription, la traduction ou la phosphorylation de cibles, à la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. JAK2 peut également agir sur la régulation épigénétique via la voie JAK2/STAT ou directement via la phosphorylation de cibles situées sur la chromatine.

## (1) La voie JAK/STAT canonique

Les protéines STATs sont des facteurs de transcription. Chez les mammifères il existe sept gènes différents qui sont à l'origine des sept membres de la famille STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. En aval de JAK2 sont activés les STAT 1, 3 et 5. Les STATs possèdent tous un résidu tyrosine conservé. La phosphorylation de ce résidu par les JAKs activés conduit à l'homo- ou à l'hétérodimérisation des STATs via leur domaine SH2. Les STATs dimérisés sont alors rapidement transloqués au noyau où ils peuvent se lier à des régions promotrices des gènes cibles et favoriser leur transcription (Li, 2008). On compte, dans les cibles de STATs, des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (comme la cycline D1, c-myc ou encore pim-1), la survie (comme Bcl-2 ou bcl-xL), ou encore l'angiogenèse ou les métastases (comme le VEGF). Cependant, bien que STAT5 et STAT3 aient un effet pro-prolifératif et anti-apoptotique, STAT1 aurait un rôle plutôt antagoniste, anti-prolifératif et pro-apoptotique (Stephanou and Latchman, 2005).

## (2) La voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est activée par la fixation sur des tyrosines du récepteur phosphorylées par JAK2, soit de la sous-unité p85 de la PI3K elle-même, ou de protéines adaptatrices telle Gab1, Gab2, Cbl, Vav ou IRS-2 (Richmond et al., 2005).

La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI3,4,5P3). Ce composé permet le recrutement de protéines possédant un domaine PH (« Plestrin Homology ») au niveau de la membrane plasmique, dont Akt. Akt est ensuite phosphorylée et activée par la PDK1 (« phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1 ») et par le complexe mTORC2 (« mTOR complex 2 »). AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles impliquées dans la traduction protéique (comme mTOR qui cible 4E-BP1 et S6K), dans la survie cellulaire (comme BAD ou FOXO3A), dans la prolifération (comme p27<sup>kip1</sup> ou p21<sup>WAF</sup>) ou encore le métabolisme (GSK3).

### (3) La voie des MAPKs

Les MAPKs sont des serine/thréonine kinases ubiquitaires dont la superfamille possède 11 membres : ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3, p38MAPKs (p38 $\alpha/\beta/\gamma$ ), ERK5, ERK3 et ERK7. Trois groupes majeurs de MAPKs activées en aval de JAK2 ont été caractérisés chez les mammifères : ERK1/2, JNKs et p38MAPK. Chaque groupe de MAPK est activé par des cascades de kinases distinctes dans lesquelles une MAP3K (ou MEKK) phosphoryle et active une MAP2K (ou MEK) qui, à son tour, stimule l'activité de la MAPK. Une fois activée, la MAPK phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie (figure 13).

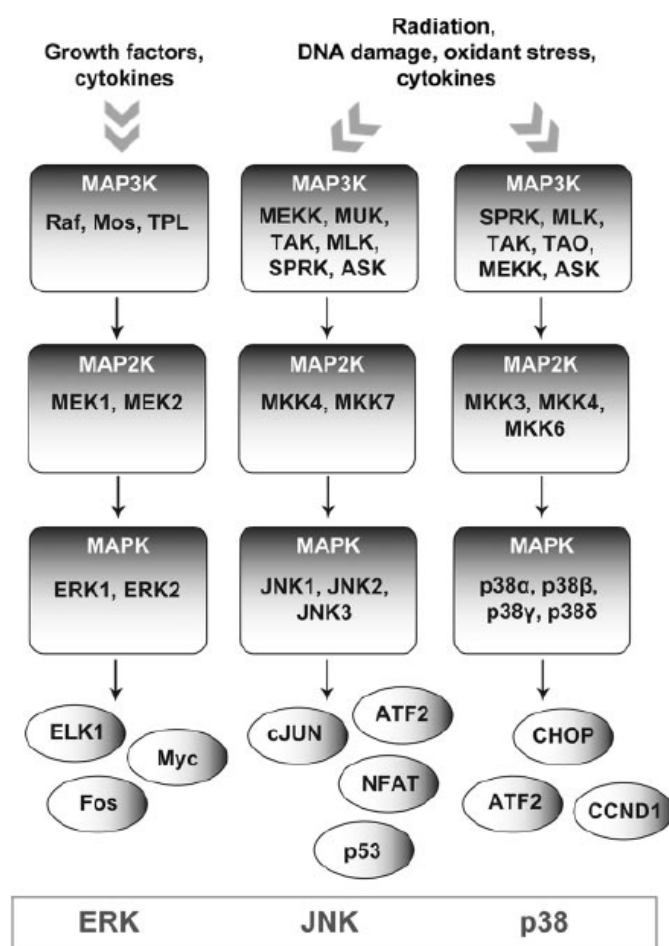


Figure 13 : Schématisation des trois groupes majeurs de MAPKs et de leur signalisation

La présence de cytokines permet l'activation, via JAK2, de MAP3K, qui phosphorylent et activent des MAP2K. Les MAP2K phosphorylent et activent à leur tour les MAPKs. Les 3 groupes de MAPK connues pour être activées en aval de JAK2 sont les kinases Erk 1 et 2, JNK et p38. Une fois activées, les MAPK peuvent elles-mêmes phosphoryler des protéines sur résidu sérine et thréonine. D'après (Geest and Coffey, 2009).

Les MAPKs Erk1 et Erk2, aussi connues sous le nom de p44MAPK et p42MAPK respectivement, ont été initialement identifiées comme des protéines stimulées par des facteurs de croissance, alors que les MAPKs des deux autres groupes (JNK1/2/3 et p38MAPK), ont été identifiées comme des kinases activées par divers stress comme le stress oxydatif ou les dommages à l'ADN. Cependant, les trois différentes cascades sont activées par les cytokines (Geest and Coffey, 2009). Les MAPKs possèdent de nombreuses cibles telles que des facteurs de transcription (comme c-myc, STAT3 ou c-fos), des régulateurs de la traduction (comme RSK), des protéines du cytosquelette (telles que la paxillin) et favorisent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (pour revue Cargnello *et al.*, 2011 (Cargnello and Roux, 2011)).

#### (4) Les régulateurs négatifs

La signalisation des récepteurs aux cytokines médiée par JAK2 possède également des protéines inhibitrices exerçant un rétrocontrôle négatif.

Les trois classes de régulateurs négatifs les plus connues en aval de JAK2 sont : les protéines SOCS, PIAS (« Protein Inhibitor of Activated STAT ») et PTP (« Protein Tyrosine Phosphatases »).

Les PTP peuvent, grâce à leur domaine SH2, se fixer directement sur JAK2 ou sur les récepteurs aux cytokines lorsqu'ils sont phosphorylés. Une fois recrutées, elles déphosphorylent JAK2 et ses substrats réduisant ainsi leur activité. Certaines PTP sont nucléaires et peuvent directement désactiver les STATs (Valentino and Pierre, 2006).

Les mécanismes de rétrocontrôle négatif observés dans le cas des SOCS sont multiples. Il s'agit d'ubiquitine ligases, cibles transcriptionnelles des STATs, qui peuvent se fixer directement sur la tyrosine 1007 phosphorylée de JAK2 et entraîner son ubiquitination, ce qui constitue un signal d'adressage au protéasome où elle est dégradée. Certaines protéines SOCS peuvent également se fixer sur le domaine kinase de JAK2 et inhiber son activité catalytique. C'est le cas de SOCS1 et de SOCS3 (Ward *et al.*, 2000). SOCS1 et SOCS3 peuvent également inhiber l'activité de JAK2 en agissant comme pseudo-substrat. De plus, les protéines SOCS se fixent au niveau du récepteur activé et agissent comme compétiteurs pour les sites phosphorylés avec les cibles en aval (Piessevaux *et al.*, 2008).

Les protéines PIAS agissent plus en aval dans la voie JAK2/STAT en se fixant sur les STAT activés et en empêchant leur liaison à l'ADN (Shuai, 2006).

On compte également d'autres régulateurs négatifs comme l'adaptateur LNK qui se fixe sur JAK2 (Bersenev et al., 2008) ou encore PTEN (« Phosphatase and TENSin homolog »), qui est un antagoniste de la PI3K et déphosphoryle le PI3,4,5P3.

#### *b. Fonctions de JAK2 dans la régulation épigénétique*

Outre la voie canonique classique décrite ci-dessus, la voie JAK/STAT peut également agir de manière totalement différente, sans faire intervenir l'activité transcriptionnelle des STATs. En effet, des travaux réalisés chez la drosophile ont permis de mettre en évidence un autre mode d'action de la voie JAK/STAT. Une partie des protéines STATs non phosphorylées sont localisées dans le noyau, sur l'hétérochromatine, associées à la protéine HP1 (« Heterochromatin protein 1 »), une protéine majeure de l'hétérochromatine. La présence des STATs au niveau de l'hétérochromatine est essentielle pour le maintien de la localisation de HP1 et la stabilité de l'hétérochromatine. L'activation des STATs par phosphorylation induit un décrochage des STATs, ce qui entraîne un déplacement de HP1 et une déstabilisation de l'hétérochromatine (Shi et al., 2008) (figure 14).

Chez les mammifères, dans la lignée humaine WISH, il a été montré qu'une partie des STATs non phosphorylés est associé à l'histone H3 à l'état basal et qu'un traitement des cellules à l'IFN $\gamma$  entraîne sa dissociation et ensuite sa réassociation à l'état phosphorylé (Noon-Song et al., 2011). De plus, les protéines STAT3 et STAT5A non phosphorylées ont été localisées de manière majoritaire dans le noyau (Li, 2008).

Des travaux récents révèlent que JAK2, longtemps considéré comme constitutivement associé au récepteur et adressé au niveau de la membrane plasmique, peut également être localisé dans le cytoplasme et le noyau des cellules et avoir ainsi d'autres fonctions que la transduction du signal des récepteurs des cytokines. En effet, dans le noyau, JAK2 est capable de phosphoryler l'histone H3 sur tyrosine 41 induisant ainsi l'exclusion de la protéine HP1 $\alpha$  du promoteur de gènes tels que *lmo2* rendant possible leur transcription indépendamment de STAT5 (Dawson et al., 2009), (Noon-Song et al., 2011). Cette localisation nucléaire et cytoplasmique de JAK2 est cependant controversée par une étude réalisée par François Girodon et ses collègues qui suggère que la visualisation de cette kinase au niveau du noyau et du cytoplasme des cellules serait en partie due à un manque de spécificité d'un anticorps commercial (Girodon et al., 2011).



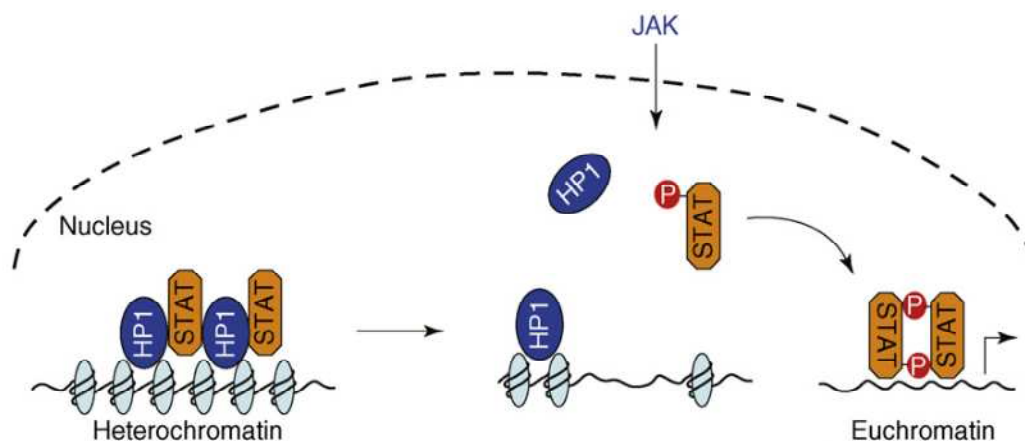


Figure 14 : Voie de signalisation JAK/STAT non canonique

Dans le mode non-canonique de la voie JAK/STAT, les STATs non phosphorylés sont localisés dans le noyau, associés à HP1 au niveau de l'hétérochromatine. La phosphorylation de STATs par JAK entraîne une diminution de la quantité de STATs localisés sur l'hétérochromatine. Ceci mène au déplacement de HP1 et à une instabilité de l'hétérochromatine. Les STATs phosphorylés se fixent ensuite sur l'euchromatine afin d'activer la transcription de gènes cibles. Les STATs et autres facteurs de transcription ne peuvent pas accéder aux gènes localisés au niveau de l'hétérochromatine (d'après (Li, 2008)).

### C. La mutation JAK2<sup>V617F</sup>

La mutation JAK2<sup>V617F</sup> est une substitution de la guanine 1849 en thymidine au niveau de l'exon 14 du gène de JAK2. Cette mutation ponctuelle entraîne, au niveau protéique, la substitution de la valine 617 en phénylalanine à l'intérieur du domaine pseudokinase de JAK2. Cette substitution empêche le domaine pseudokinase de JAK2 d'inhiber son domaine kinase. Au niveau fonctionnel, cette mutation confère à JAK2 une activation constitutive.

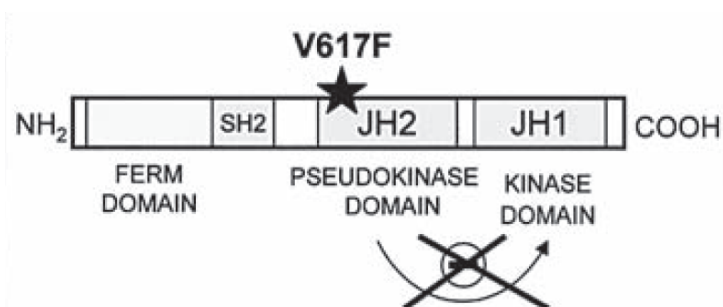


Figure 15 : structure de JAK2<sup>V617F</sup>

La mutation JAK2<sup>V617F</sup> est une substitution de la valine 617 en phénylalanine au niveau du domaine pseudokinase JH2 de JAK2. Le domaine pseudokinase muté ne peut plus exercer son rôle d'inhibition du domaine kinase JH1 et donc d'autoinhibition de la protéine JAK2 (d'après (Delhommeau et al., 2006)).

## 1. Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines

### *a. Activation constitutive des voies de signalisation canoniques*

Dans les lignées cellulaires, l'introduction de la mutation entraîne une activation constitutive des voies de signalisation normalement activées en présence de cytokines en aval de JAK2 sauvage, notamment des voies JAK2/ STAT1,3 et 5, MAPK et PI3K/Akt (James et al., 2005). Chez les patients, les données bibliographiques montrent une phosphorylation anormalement élevée de STAT5, STAT3, Erk 1/2 et Akt dans les mégacaryocytes et les érythroblastes de patients possédant l'oncogène (Grimwade et al., 2009), (Aboudola et al., 2007), (Risum et al., 2011), (Laubach et al., 2009).

La voie JAK2/STAT étant la voie la plus directe et la plus connue en aval de JAK2, c'est celle qui a été la plus étudiée. Plusieurs travaux suggèrent un rôle majeur de STAT5 dans le caractère oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup>. Tout d'abord, l'introduction d'une forme constitutivement active de STAT5 dans la lignée UT7 (lignée possédant des propriétés érythroïdes), ou dans des progéniteurs CD34<sup>+</sup>, induit une différenciation érythroïde spontanée des cellules en absence d'EPO. De plus, la déplétion de STAT5 dans des progéniteurs érythroïdes CD36<sup>+</sup> diminue leur capacité à former des colonies érythroïdes, et l'expression de sa forme constitutivement active augmente la capacité des progéniteurs érythroïdes à former des BFU-E et des CEE (Garcon et al., 2006). De plus, lorsque le récepteur à l'EPO est muté sur son site d'interaction avec STAT5, empêchant ainsi l'activation de STAT5, ou lorsque STAT5 est délété à l'aide d'un shRNA, l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> perd ses capacités de transformation (Funakoshi-Tago et al., 2010).

Peu de données ont été publiées sur l'implication de STAT1 et STAT3. Contrairement à STAT5, STAT3 n'apparaît pas être impliqué dans l'excès de prolifération induit par la présence de la mutation. En revanche, il est nécessaire à l'activation excessive des neutrophiles entraînée par JAK2 muté (Oku et al., 2010). Quant à STAT1, il interviendrait plutôt dans l'aiguillage de l'effet oncogénique sur la lignée mégacaryocytaire au détriment de la lignée érythrocytaire, favorisant un caractère TE plutôt que MV (Chen et al., 2010).

Concernant la voie PI3K/Akt, des travaux récents montrent que des inhibiteurs de cette voie induisent une mort par apoptose de lignées possédant l'oncogène, suggérant qu'elle est importante dans la survie des cellules mutées. Ceci est appuyé par le fait qu'une mutation du récepteur de l'EPO empêchant l'activation de cette voie de signalisation en aval de l'oncogène diminue ses capacités anti-apoptotiques (Kamishimoto et al., 2011).

L'implication de Erk1 et Erk2 n'a que très peu été étudiée et les données ne soulèvent pas, pour l'instant, de rôle majeur de ces kinases en aval de JAK2 muté. En effet, leur inhibition pharmacologique n'a pas de conséquence majeure sur la différenciation érythroïde spontanée de progéniteurs de patients atteints de MV (Ugo et al., 2004) et elle diminue la croissance des érythroblastes de patients de MV avec une sensibilité moins importante que des érythroblastes de donneurs sains (Laubach et al., 2009). Quant au rôle des autres MAPKs, il reste à être évalué.

La nécessité de la présence d'un récepteur aux cytokines homodimérique dans l'indépendance aux cytokines est discutée. Il semblerait que lorsque l'expression de JAK2<sup>V617F</sup> est faible, le récepteur homodimérique soit nécessaire à l'autonomie de croissance, en revanche, lorsque le niveau de JAK2<sup>V617F</sup> est élevé, il est capable de promouvoir l'autonomie de croissance seul (Lu et al., 2005). Dans ce sens, des récepteurs hétérodimériques sont aussi capables d'activer JAK2<sup>V617F</sup>. C'est le cas du récepteur à l'IL27 (Pradhan et al., 2007).

#### *b. Dérégulation de la transcription et de la traduction protéique*

L'ensemble des voies activées en aval de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> entraîne la dérégulation transcriptionnelle de nombreux gènes. En effet, les protéines STATs étant des facteurs de transcription, leur activation en aval de l'oncogène entraîne une augmentation de la transcription de leurs gènes cibles. De plus, les voies des MAPKs et de la PI3K/Akt agissent sur des facteurs de transcription. On peut donc supposer que la dérégulation de ces deux voies de signalisation en aval de JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une augmentation de la transcription de gènes.

En plus d'une dérégulation transcriptionnelle, l'oncogène favorise la traduction d'ARNm en protéines.

Tout d'abord, on constate une expression altérée de divers microARN, or les microARN jouent sur la traduction des ARNm en se fixant sur leur 3' ou 5'UTR et en augmentant/diminuant leur stabilité ou directement leur traduction en protéine. En effet, une analyse de l'expression des microARN dans du sang de patients atteints de MV révèle une expression aberrante de huit microARN (let-7a, miR-182, miR-143, miR-145, miR-223, miR26b, miR-30b, miR-30c and miR-150) à la fois dans les granulocytes, les cellules mononucléées, les plaquettes ou encore les réticulocytes (Bruchova et al., 2008).

Des travaux récents montrent un autre mécanisme de dérégulation traductionnelle. Il s'agit d'une dérégulation *via* la protéine La qui se fixe sur les ARNm et qui favorise leur traduction. Elle est notamment responsable d'une surexpression de p53 en aval de la mutation (Nakatake et al., 2011).

Enfin, les voies PI3K/Akt et MAPK régulent la traduction, notamment par l'intermédiaire des protéines mTOR et RSK réciproquement. On peut par conséquent imaginer que l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> puisse jouer sur la traduction via la dérégulation de ces voies de signalisation.

Cette dérégulation des différents niveaux de synthèse protéique favorise la surexpression de proto-oncogènes (tels que c-myc, Bcl-2 ou les kinases pim) et la diminution du taux protéique de suppresseurs de tumeur (tels que p53, p27<sup>kip1</sup> ou Bim) pouvant participer aux mécanismes oncogéniques de JAK2<sup>V617F</sup>.

### *c. Altération du rétrocontrôle négatif*

Les voies classiques de signalisation étant activées constitutivement en aval de JAK2<sup>V617F</sup>, on aurait pu imaginer que les mécanismes de rétrocontrôle négatif seraient également amplifiés. Cependant, on note, en aval de JAK2<sup>V617F</sup>, une altération du rétrocontrôle négatif de la transduction du signal des récepteurs aux cytokines impliquant JAK2. En effet, la présence de la mutation entraîne une hyperphosphorylation de SOCS3. Cette hyperphosphorylation l'empêche d'agir comme régulateur négatif de la signalisation en aval de JAK2 muté, et même, au contraire, il favorise la croissance cellulaire (Hookham et al., 2007). Aussi, la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une surexpression de Lnk, une protéine adaptatrice régulant négativement la transduction du signal de récepteurs aux cytokines. Cependant, JAK2<sup>V617F</sup> interagit de manière plus forte avec la région N-terminale de

Lnk que JAK2<sup>WT</sup>, ce qui pourrait créer un déséquilibre d'inhibition entre les deux formes de JAK2 (Baran-Marszak et al., 2010). Ces résultats sont néanmoins controversés. En effet, certains travaux suggèrent que Lnk est capable d'inhiber JAK2<sup>V617F</sup> (Gery et al., 2009). Ces études ne sont cependant pas forcément contradictoires, l'action de Lnk pourrait dépendre du ratio JAK2<sup>V617F</sup>/Lnk (Baran-Marszak et al., 2010).

Cette altération du rétrocontrôle négatif amplifie d'autant plus la cascade de signalisation des récepteurs aux cytokines déclenchée par la présence de la mutation. De plus, ces résultats suggèrent que le mécanisme oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup> est plus complexe qu'il n'aurait pu le paraître, la mutation ne faisant pas qu'amplifier la signalisation activée en aval de la forme sauvage de JAK2 mais possédant également des modes de régulation qui lui sont propres.

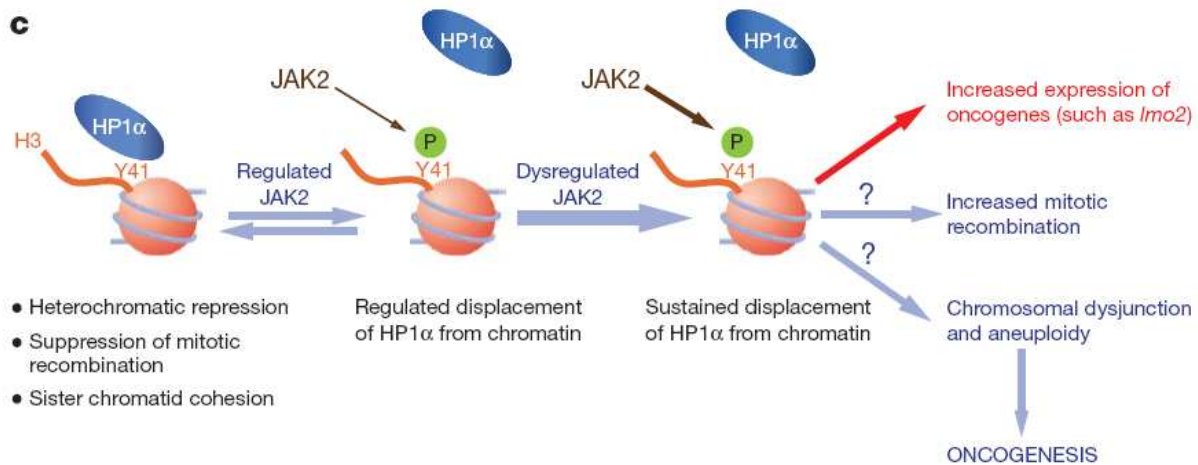
#### *d. Régulation croisée du récepteur à l'IGF*

En plus de mimer une activation de récepteurs aux cytokines de type I et II en l'absence de ligand, JAK2<sup>V617F</sup> peut aussi activer le récepteur à l'IGF1 (« Insuline Like Growth Factor 1») (Staerk et al., 2005). Notons que ce récepteur ne fait pas intervenir JAK2 lorsqu'il est sauvage. Des travaux antérieurs à cette découverte montraient une hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1 (Correa et al., 1994), (Mirza et al., 1995). Or la présence de la mutation entraîne une prolifération cellulaire dépendante de l'IGF1 dans la lignée BA/F3 transduite afin d'exprimer l'oncogène. L'hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1 pourrait par conséquent être liée à cette activation croisée du récepteur de l'IGF1 par JAK2<sup>V617F</sup> et pourrait participer au phénotype des NMP. Par contre, l'activation du récepteur à l'IGF par JAK2<sup>V617F</sup> ne paraît pas être directe mais pourrait faire intervenir l'expression d'adaptateurs induits par la signalisation de l'oncogène précédemment décrite.

## **2. Impact de JAK2<sup>V617F</sup> dans la régulation épigénétique**

Marc A. Dawson et ses collègues ont montré que, tout comme JAK2 sauvage, JAK2<sup>V617F</sup> est également capable de phosphoryler HP1 $\alpha$  et de lever ainsi sa répression sur l'expression des gènes cibles. Cependant, dans les NMP où l'on retrouve une activation constitutive de JAK2, la dérégulation de l'interaction de HP1 $\alpha$  à la chromatine pourrait lever son effet suppresseur de tumeur par une augmentation de l'expression de certains gènes,

constituant ainsi un autre mécanisme de dérégulation transcriptionnelle. De plus, cette dérégulation, qui touche la chromatine, pourrait favoriser les recombinaisons mitotiques et l'instabilité génomique (figure 16) (Dawson et al., 2009). Cette régulation est cependant sujette à controverse en raison du doute émis par les observations de François Girodon et ses collègues sur la localisation nucléaire et cytoplasmique de JAK2 et JAK2<sup>V617F</sup> (Girodon et al.,



2011).

### Figure 16 : Implication de JAK2<sup>V617F</sup> dans la régulation épigénétique

La phosphorylation de l'histone H3 sur tyrosine 41 par JAK2 entraîne le décrochage de HP1α de la chromatine. Lorsque JAK2 est dérégulé, la phosphorylation continue de l'histone H3 et le décrochage permanent de HP1α conduit à l'augmentation de l'expression de certains oncogènes comme *Imo2*. Ce phénomène pourrait également entraîner l'augmentation de recombinaison mitotiques et une instabilité chromosomique (d'après (Dawson et al., 2009)).

Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme de dérégulation épigénétique entraînée par la mutation. En effet, JAK2<sup>V617F</sup> phosphoryle également la méthyltransférase PRMT5. Cette phosphorylation induit une inhibition de l'activité de PRMT5 et la diminution de la méthylation de l'histone H2A/H4 R3 (Liu et al., 2011). Or cette histone est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes, soit en la favorisant, soit en l'inhibant. Ainsi, les auteurs dénombrent 90 gènes dont la transcription est altérée suite à la phosphorylation de PRMT5 par JAK2 muté. De plus, PRMT5 défavorise l'expansion des progéniteurs CD34<sup>+</sup> et la différenciation érythroïde, suggérant que la phosphorylation inhibitrice de PRMT5 pourrait être impliquée dans l'expansion érythrocytaire en aval de JAK2<sup>V617F</sup>.

L'ensemble de ces résultats suggère que JAK2<sup>V617F</sup> utilise, en plus des voies de signalisation canoniques, des mécanismes de méthylation afin d'influencer la transcription de ses cibles.

### **3. Impact de la mutation sur la localisation de JAK2**

Une étude de Ciro R. Rinaldi et ses collègues suggère que la présence de la mutation a un impact sur la localisation de JAK2 dans les cellules immatures. En effet, JAK2 serait localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules immatures CD34<sup>+</sup> de patients portant la mutation alors qu'elle est uniquement cytoplasmique dans les CD34<sup>+</sup> issus de donneurs sains. En revanche, la localisation de JAK2 dans les granulocytes, les mégacaryocytes et les érythroblastes est majoritairement cytoplasmique dans tous les cas (Rinaldi et al., 2010). Cependant, la localisation nucléaire de JAK2 étant controversée, ces données sont à confirmer. Cette différence de localisation pourrait entraîner des différences de fonctions et d'activité de JAK2 par des variations d'accessibilité vis-à-vis des cibles et des régulateurs.

### **4. Impact cellulaire de la mutation**

La présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une amplification de la myélopoïèse terminale (Dupont et al., 2007), (Anand et al., 2011), (Bruchova et al., 2009). Par contre, elle ne semble pas influencer sur la proportion de cellules souches ou progénitrices (Anand et al., 2011). Ce phénomène d'amplification est la résultante d'une augmentation de survie et de prolifération cellulaire.

#### *a. Avantage de survie*

Bien que certaines études ne montrent pas de différence significative de taux d'apoptose en aval de JAK2<sup>V617F</sup> (Bruchova et al., 2009), certaines données suggèrent fortement que la présence de l'oncogène confère aux cellules un avantage de survie. Ces contradictions sont probablement dues à des conditions différentes d'études.

En premier lieu, l'acquisition de l'hypersensibilité aux cytokines confère aux cellules mutées une résistance face à la mort induite par le sevrage en facteur de croissance favorisant ainsi l'expansion clonale observée dans les NMP (Laubach et al., 2009).

En deuxième lieu, en aval de l'oncogène, un défaut de réponse face à la stimulation de récepteurs de mort. En effet, dans des circonstances physiologiques, la stimulation du

récepteur CD95, un récepteur de mort exprimé par les érythroblastes, entraîne une activation des caspases et un clivage du facteur de transcription GATA-1 (De Maria et al., 1999). Ceci entraîne une inhibition irréversible de la prolifération cellulaire et une différenciation des érythroblastes ou, si la concentration en EPO est faible, leur mort. Ceci constitue un mécanisme de rétrocontrôle négatif visant à contrôler la production de globules rouges en fonction des changements de taux sériques d'EPO. Bien qu'ayant une expression normale des récepteurs de mort et de ses effecteurs, les érythroblastes portant la mutation JAK2<sup>V617F</sup> possèdent une résistance à l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de morts dont le CD95 (Zeuner et al., 2006). Il s'en suit un défaut d'activation des caspases et de clivage de GATA-1 favorisant l'expansion érythrocytaire. La protéine c-FLIPshort, un homologue catalytiquement inactif de la caspase 8 rendant les cellules résistantes à la voie d'apoptose extrinsèque, pourrait contribuer à ce phénomène. En effet, les érythroblastes portant la mutation ne présentent pas d'inhibition protéique de c-FLIPshort en réponse à une diminution de la concentration en EPO alors qu'ils le devraient.

Enfin, divers travaux montrant une dérégulation d'autres protéines impliquées dans la survie cellulaire ont été reportés. Notamment, *via* la dérégulation de la signalisation précédemment décrite, JAK2<sup>V617F</sup> entraîne la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Gozgit et al., 2008) et Bim (Rubert et al., 2011) et d'autres protéines impliquées de manière indirecte sur l'apoptose comme JunB (da Costa Reis Monte-Mor et al., 2009).

### *b. Avantage prolifératif*

De nombreux travaux suggèrent que l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> favorise la prolifération cellulaire et notamment la transition G1/S.

Tout d'abord, l'inhibition spécifique (shRNA) ou non spécifique (siRNA et inhibiteurs pharmacologiques) de JAK2<sup>V617F</sup> entraîne un arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire (Jedidi et al., 2009), (Walz et al., 2006). De plus, une étude d'Alessandra Balduini et ses collègues sur la différenciation mégacaryocytaire dans les NMP montre que les mégacaryocytes ont un fort potentiel prolifératif dans ces pathologies (Balduini et al., 2011).

Au niveau moléculaire, l'inhibition de p27<sup>kip1</sup> semble jouer un rôle dans l'excès de prolifération entraînée par la mutation, même si les conséquences fonctionnelles de cette inhibition n'ont pas été clairement définies. La protéine p27<sup>kip1</sup> est un régulateur négatif de la



transition G1/S du cycle cellulaire qui agit négativement sur les kinases CDK (kinases majeures du cycle cellulaire). Notons tout d'abord que cette protéine est un régulateur négatif de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. De plus, l'expression de p27<sup>kip1</sup> est plus faible en aval de l'oncogène qu'en aval de la forme sauvage de JAK2 et l'inhibition (pharmacologique ou par siRNA) de JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une augmentation de son expression suggérant qu'il s'agit d'une cible de l'oncogène (Bruchova et al., 2009), (Walz et al., 2006). Sa dérégulation en aval de la mutation passe par deux mécanismes distincts. D'une part, JAK2<sup>V617F</sup> phosphoryle p27<sup>kip1</sup> (Jakel et al., 2011). Cette phosphorylation entraîne sa dégradation par le système ubiquitine – protéasome. D'autre part, elle serait plus fortement dégradée par l'E3 ubiquitine ligase Skp2 qui est surexprimée, via les STATs, en aval de l'oncogène (Furuhata et al., 2009).

Une dérégulation d'autres protéines intervenant dans la prolifération cellulaire a été observée en aval de JAK2<sup>V617F</sup>, comme la dérégulation de c-myc, pim-1/2 (Wernig et al., 2008), p53 (Nakatake et al., 2011), Aurora A (Sumi et al., 2011) ou encore JunB (da Costa Reis Monte-Mor et al., 2009).

## 5. JAK2<sup>V617F</sup> et dommages à l'ADN

La mutation de JAK2 est associée à une augmentation de la fréquence de recombinaisons homologues et d'instabilité génétique (Plo et al., 2008). Ce phénomène pourrait être lié aux dérégulations épigénétiques présentes dans les NMP décrits plus haut. Cependant, l'augmentation de la prolifération cellulaire observée pourrait également participer à cette instabilité, d'autant plus que l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> empêche l'accumulation de p53 et, ainsi, affecte la réponse aux dommages à l'ADN (Nakatake et al., 2011).

## 6. JAK2<sup>V617F</sup> et microenvironnement

Des expériences de clonogénicité visant à évaluer l'action du TNF $\alpha$  sur les capacités clonales des progéniteurs possédant la mutation révèle que la mutation confère aux cellules une résistance à cette cytokine pro-inflammatoire alors qu'elle réduit la capacité clonale des progéniteurs sains. Ces résultats suggèrent qu'un microenvironnement riche en TNF $\alpha$  pourrait favoriser une sélection du clone muté (Fleischman et al., 2011). Or, le taux de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF $\alpha$ , est élevé dans les NMP.

Le microenvironnement agit également comme protecteur. En effet, les cellules stromales de moelle osseuse protègent les cellules portant la mutation contre des inhibiteurs de JAK2 par la sécrétion de cytokines (Manshouri et al., 2011).

#### **D. Inhibiteurs de JAK2**

Les traitements actuels des NMP sont symptomatiques et visent à réduire les risques thrombotiques et hémorragiques ainsi que le risque de transformation en LAM. Ils ne sont pas curatifs. Ces traitements consistent en de l'aspirine pour fluidifier le sang, des saignées et, pour les patients à haut risque, de la chimiothérapie (notamment l'hydroxyurée) (Quintas-Cardama and Verstovsek, 2011).

La découverte de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> et l'évidence du lien causal entre la mutation et les NMP ont conduit au développement d'inhibiteurs de JAK2, dont certains font l'objet de phases cliniques (pour revue, Quintas-Cardama *et al.*, 2011 (Quintas-Cardama and Verstovsek, 2011)). Les essais montrent une rapide inhibition de symptômes observés dans les NMP. En effet, la majorité des inhibiteurs de JAK2 testés en clinique ont un effet avéré sur la splénomégalie. De plus, la plupart de ces inhibiteurs agissent sur les symptômes constitutionnels tels que la fatigue, le prurit ou la perte de poids.

Cependant, ces inhibiteurs possèdent des inconvénients. Pour commencer, ils n'ont qu'un effet mineur sur le clone possédant JAK2<sup>V617F</sup>. Ceci pourrait être en partie dû à un effet protecteur du microenvironnement. En effet, *in vitro*, la présence, en co-culture, de lignées stromales humaines diminue l'action de l'atrapimod (un inhibiteur de JAK2) sur des lignées ou des cellules primaires possédant l'oncogène (Manshouri et al., 2011). L'absence d'éradication du clone muté suite au traitement avec les inhibiteurs de JAK2 mène à penser que ces molécules n'auront pas non plus d'action curatives sur ces pathologies. D'autre part, ces agents pharmaceutiques ne sont pas spécifiques de la mutation. En effet, ces molécules inhibent aussi la forme sauvage de JAK2 ainsi que d'autres membres de la famille des kinases JAK et d'autres kinases telles que FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3). Cette non spécificité conduit par conséquent à des effets secondaires importants comme des myélo-suppression et des troubles gastriques.

Ceci mène à continuer la recherche afin d'améliorer l'effet de ces inhibiteurs sur les NMP ou de tester des approches de combinaison d'inhibition comme l'association des inhibiteurs de JAK2 avec des agents hypométhylants ou de la thérapie ciblée.

## IV. CYCLE CELLULAIRE

En réponse à un ensemble de stimuli prolifératifs provenant de son environnement une cellule mère entre dans un enchaînement de mécanismes lui permettant de donner naissance à deux cellules filles. Il s'agit du cycle cellulaire. La progression dans le cycle cellulaire est un mécanisme très finement régulé et sa dérégulation est une des six signatures du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011).

### A. Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire eucaryote est composé de quatre phases : G1, S, G2 et M. Lors de la phase S (« Synthesis »), la cellule mère réplique son ADN et lors de la phase M (« Mitosis »), elle divise en deux son matériel génétique et se divise en deux cellules filles. Les phases G1 (« Gap1 ») et G2 (« Gap2 ») sont des phases de préparation à la phase S et M, respectivement.

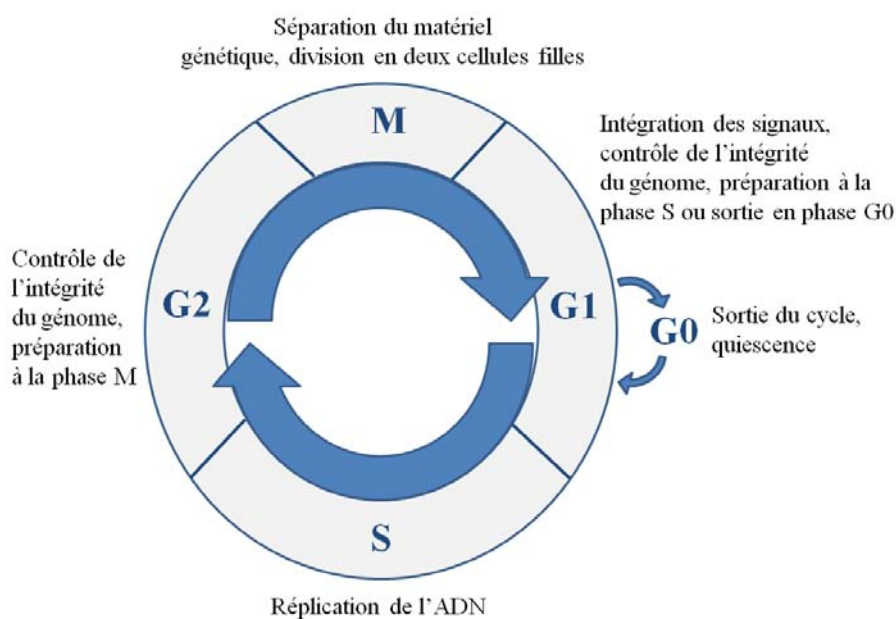


Figure 17 : Les différentes phases du cycle cellulaire

Au cours de la phase G1, la cellule intègre les signaux environnementaux, vérifie l'intégrité de son matériel génétique et décide de se diviser ou de rentrer en phase G0, phase de quiescence. Lors de la phase G2, la cellule contrôle de nouveau l'intégrité de son génome et se prépare à la division mitotique.

## **B. Les points de contrôle du cycle cellulaire**

Les points de contrôle du cycle cellulaire (ou « checkpoints » en anglais), vont identifier les dommages sur l'ADN et induire une réponse cellulaire en retardant la progression du cycle et en activant les voies de réparation des dommages. Lorsque les dommages sont trop importants, les acteurs des points de contrôle pourront participer à l'induction de la mort cellulaire.

Ces points de contrôles sont répartis tout au long du cycle, à la transition entre la phase G1 et la phase S (transition G1/S), en intra-S, à la transition G2/M et en mitose (pour revue Poehlmann et Roessner, 2010 (Poehlmann and Roessner, 2010)).

Au niveau moléculaire, la présence des dommages est tout d'abord reconnue par des protéines senseurs (telles que ATM, ATR ou DNA-PK) qui activent des médiateurs (tels que Chk1, Chk2 ou MAPKAP), qui vont agir sur des effecteurs (tels que CDC25, p53, WEE1 ou Plk1) entraînant ainsi la réponse cellulaire (arrêt du cycle, réparation, apoptose).

Une altération de la réponse aux dommages à l'ADN entraîne une instabilité génomique. Ces altérations mènent le plus souvent à la mort cellulaire. Cependant, si les cellules possèdent également une dérégulation de voies d'apoptose, ces altérations peuvent favoriser la formation ou l'aggravation d'un cancer (pour revue Kastan et Bartek, 2004 (Kastan and Bartek, 2004)).

## **C. Les complexes CDK/cycline**

Les complexes CDK/cycline jouent un rôle central dans la progression du cycle cellulaire, ce sont eux qui intègrent l'ensemble des signaux extra et intra-cellulaires visant à entraîner une progression ou un arrêt dans le cycle.

Les complexes CDK/cycline sont constitués d'une sérine/thréonine kinase (CDK) associée à une cycline. La kinase CDK nécessite la présence de la cycline pour être active.

Les cyclines sont des protéines qui ne possèdent pas d'activité enzymatique mais dont le taux, et donc la disponibilité varie fortement au cours du cycle.

Selon le schéma classique, les signaux mitogènes sont tout d'abord intégrés par les cyclines D (D1, D2 et D3) qui se complexent avec CDK4 et CDK6 pendant la phase G1. L'activation de ces complexes mène à l'inactivation partielle des protéines pRB, p107 et p130, permettant ainsi l'expression des cyclines de type E qui s'associent préférentiellement à CDK2. Le complexe CDK2/cycline E est nécessaire à l'entrée en phase S. La cycline A associée à CDK1 ou CDK2 permet la poursuite de la phase S et l'entrée en mitose et le complexe CDK1/cycline B catalyse l'entrée en mitose (Malumbres and Barbacid, 2009),(Hochegger et al., 2008) (voir figure 18).

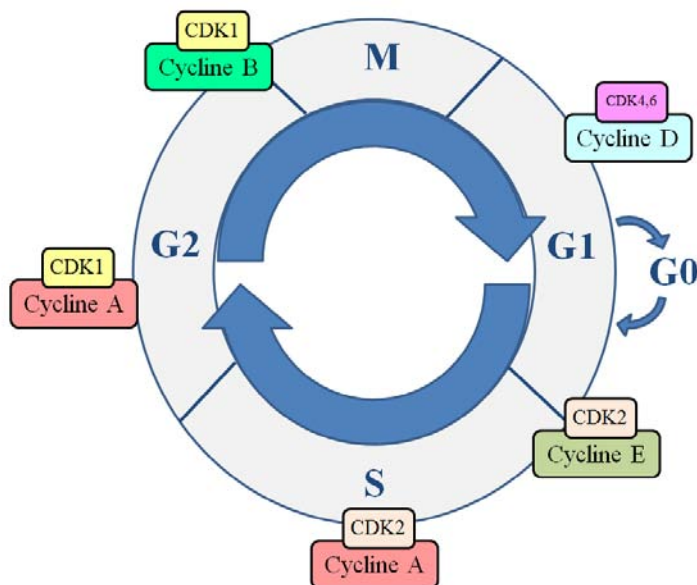
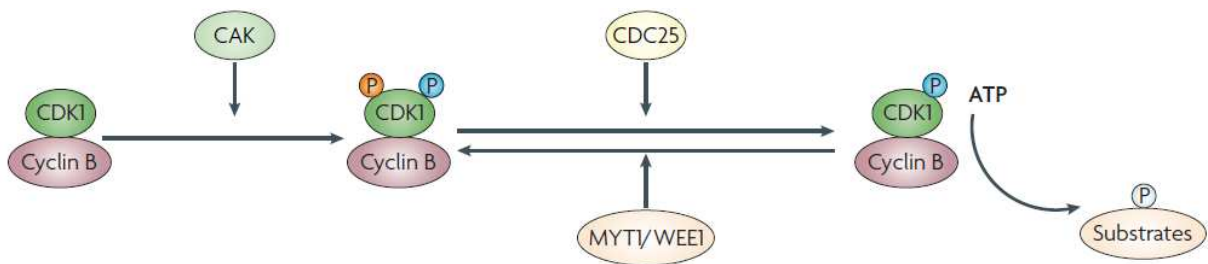


Figure 18 : Répartition des complexes CDK/cycline au cours du cycle cellulaire

Les complexes CDK/cycline sont finement régulés. La variation du taux d'expression des cyclines constitue un premier moyen de réguler l'activité des CDK et donc le cycle cellulaire. Bien qu'actifs à l'état basal, l'activation complète des complexes CDK/cycline nécessite une phosphorylation sur thréonine 161, 160 ou 176 sur CDK1, CDK2 ou CDK4 respectivement par CAK (« CDK-activatin kinase »), mais cette phosphorylation ne semble pas être régulée par la signalisation intra-cellulaire. La phosphorylation de la CDK sur thréonine 14 et tyrosine 15 par les kinases Wee1 et Myt1 inactive le complexe. Lorsque la progression dans le cycle cellulaire nécessite leur activation, ces deux sites sont déphosphorylés par les phosphatases « Cell-Division Cycle Homologue 25 » ou CDC25

(CDC25A, B et C) (Boutros et al., 2007) (figure 19). Des CKI (« Cyclin-dependent Kinase Inhibitors ») peuvent également s'associer aux CDK et les inhiber, constituant un autre mécanisme de régulation des couples CDK/cycline et de la progression dans le cycle cellulaire. Deux familles de CKI ont été identifiées. La famille INK4 (« Inhibitor of cyclin-dependent Kinase 4 »), composée des protéines p15, p16, p18 et p19 inactive CDK4 et CDK6 en empêchant leur liaison à la cycline D. La famille CIP/KIP (« Cdk Inhibiting Protein »), regroupant les protéines p21, p27 et p57, se fixe à la fois sur les CDK et les cyclines et modifie la structure des CDK, empêchant ainsi la liaison de l'ATP (Besson et al., 2008).



**Figure 19 : Activation des complexes CDK/cycline, exemple du complexe CDK1/cycline B**

Les phosphatases CDC25 déphosphorylent et activent le complexe CDK1/cycline B sur thr14 et tyr15. Au contraire, les kinases WEE1 et MYT1 phosphorylent et inactivent ce complexe sur les mêmes sites. La phosphorylation par CAK est requise pour une activation complète du complexe. Le P bleu représente la phosphorylation sur tyr161 par CAK et le P orange représente les phosphorylations sur thr14 et tyr15. D'après (Boutros et al., 2007).

## D. CDC25A

CDC25A est une protéine appartenant à la famille des phosphatases CDC25. Cette famille, qui comprend trois isoformes (CDC25A, B et C), est exprimée chez tous les eucaryotes hormis les plantes. Leur séquence est hautement conservée entre les différentes espèces. Comme nous l'avons vu précédemment, ces phosphatases ont un rôle majeur dans la progression dans le cycle cellulaire par l'activation des couples CDK/cyclines. Il s'agit également de cibles majeures des points de contrôle, leur inhibition suite à l'activation des voies de contrôle entraînant un arrêt dans le cycle.

Contrairement à la déplétion de CDC25B et C qui est viable, la déplétion de CDC25A chez la souris est létale à un stade embryonnaire précoce, suggérant que CDC25A ne peut pas être compensée par les autres membres de la famille des CDC25 (Ray et al., 2007b).

## 1. Structure

CDC25A (ou CDC25A1) est une protéine d'un poids moléculaire de 67 kDa. Un variant d'épissage (CDC25A2) d'environ 50 kDa possédant également le domaine catalytique a été décrit (figure 19). Cependant sa fonction n'a pas encore été définie (Wegener et al., 2000).

La partie N-terminale de CDC25A renferme un domaine régulateur impliqué dans la modulation de son activité, de sa dégradation et de sa localisation. La partie C-terminale renferme un domaine catalytique comprenant le motif HCX<sub>5</sub>R caractéristique de toutes les phosphatases à double spécificité (Contour-Galcerà et al., 2007). Ce motif possède une cystéine catalytique ayant une fonction thiol (SH) permettant, par réaction chimique, la déphosphorylation de son substrat (Rudolph, 2002).

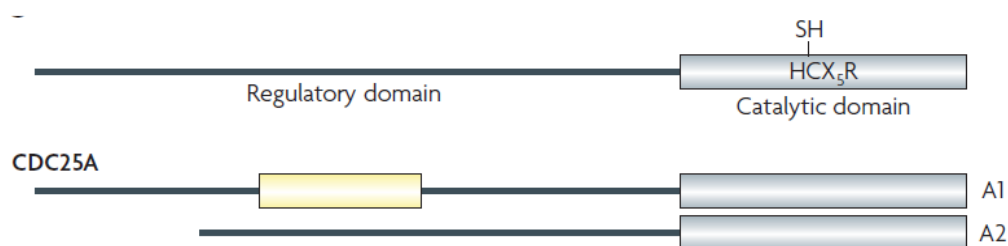


Figure 20 : Schématisation de la structure de CDC25A

CDC25A est composée d'un domaine catalytique (en gris) et un domaine régulateur. L'épissage d'un exon (en jaune) de CDC25A permet la formation d'un variant d'épissage, CDC25A2, dont la fonction est encore inconnue. D'après (Boutros et al., 2007).

## 2. Fonctions

La fonction de CDC25A dans la progression dans le cycle cellulaire est aujourd'hui bien établie. Cependant des travaux lui confèrent également d'autres fonctions notamment dans la régulation de l'apoptose et de la migration cellulaire.

### *a. Fonction de CDC25A dans la progression du cycle cellulaire*

Le rôle principal des phosphatases CDC25 est de déphosphoryler les CDK sur thréonine 14 et tyrosine 15, permettant d'activer les couples CDK/cycline et favorisant ainsi la progression dans le cycle cellulaire (Boutros et al., 2007).

CDC25A a une action spécifique d'activation du couple CDK2/cycline E et CDK2/cycline A à la transition G1/S. En effet, une micro-injection d'anticorps anti-CDC25A induit un arrêt des cellules en phase G1 (Jinno et al., 1994). *A contrario*, une surexpression de la protéine conduit à l'accélération de la transition G1/S, associée à une augmentation d'activité des complexes Cdk2/cycline E (Blomberg and Hoffmann, 1999). Cependant, CDC25A intervient également en phase G2/M, en association avec CDC25B et C, par activation du complexe CDK1/cycline B (Galaktionov and Beach, 1991) (Figure 21). Ce rôle d'activateur des complexes CDK/cycline fait de CDC25A une protéine clé de la progression dans le cycle cellulaire et notamment de la transition G1/S.

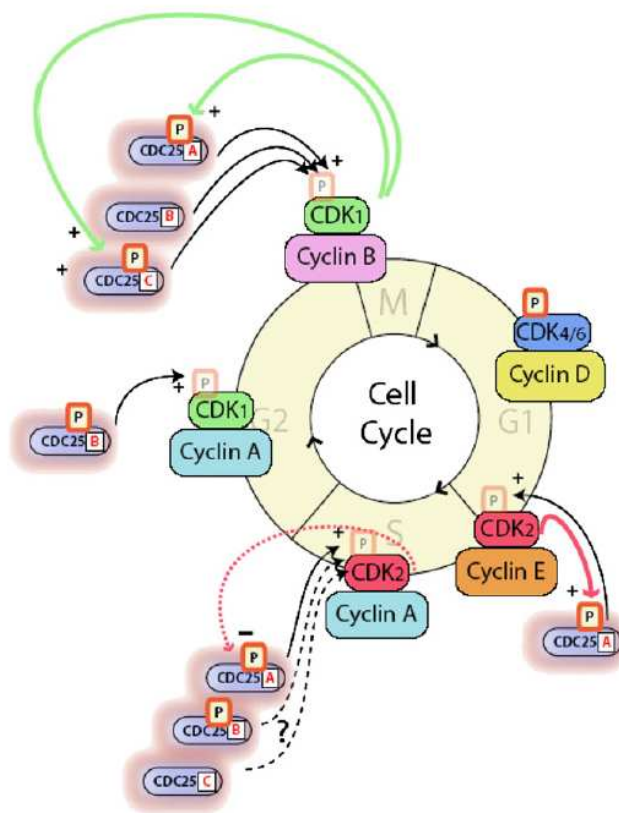


Figure 21 : Schématisation de la répartition des phosphatase CDC25 au cours du cycle cellulaire

D'après (Contour-Galcera et al., 2007)

### *b. Fonction de CDC25A dans l'apoptose*

Des données bibliographiques plus récentes montrent une implication de CDC25A dans l'apoptose. Cependant, son rôle peut être autant pro-apoptotique que anti-apoptotique selon les cas.



En réponse à des stress non génotoxiques, tels que le MG132, la staurosporine ou le TNF- $\alpha$ , CDC25A est clivée au niveau de son résidu D223 par les caspases. Ce clivage induit la production d'un fragment de 33 kDa correspondant à la partie carboxy-terminale de la protéine ayant conservé son activité catalytique. Ce fragment de CDC25A localisé dans le noyau entraîne une apoptose dépendante de son activité phosphatase (Mazars et al., 2009), (Chou et al., 2010).

De plus, dans un contexte d'apoptose induite par un sevrage en facteurs de croissance, c-myc, en complexe avec Max active la transcription de CDC25A entraînant une augmentation de son expression. Dans ces conditions, l'apoptose induite via c-myc dépend de CDC25A et la seule surexpression de CDC25A entraîne de l'apoptose.

En revanche, dans une lignée de carcinome humaine, le taux d'expression de CDC25A est diminué lors de l'apoptose induite par le TNF $\alpha$ , or cette apoptose est dépendante de c-myc. De plus, dans des lignées embryonnaires de rat, la surexpression de CDC25A protège les cellules contre l'apoptose induite par la privation en sérum. Aussi, la partie carboxy-terminale de CDC25A interagit avec un domaine adjacent au domaine kinase de la protéine pro-apoptotique ASK1 et inhibe son activité. Ceci entraîne une réduction de la sensibilité des cellules à la mort induite par le stress oxydatif (Zou et al., 2001). Des expériences de mutagenèse dirigée montrent que le motif DSG de CDC25A impliqué dans la dégradation de la phosphatase joue également un rôle dans l'inhibition de ASK1 (Bahassi el et al., 2011).

Leisser et son équipe explique l'effet tantôt pro-apoptotique, tantôt anti-apoptotique par la différence de localisation de CDC25A. En effet, leurs résultats suggèrent qu'une surexpression nucléaire de CDC25A est pro-apoptotique, faisant intervenir Akt et FKHRL1, tandis que la surexpression cytoplasmique de CDC25A favorise la survie des cellules. (Leisser et al., 2004). Par contre, bien que CDC25A possède une séquence d'adressage nucléaire (NLS) ainsi qu'une séquence d'export nucléaire (NES), la régulation de sa localisation n'a pas encore été établie (Kallstrom et al., 2005).

### **3. Régulation de l'expression de CDC25A**

CDC25A est une protéine active à l'état basal. Au cours du cycle cellulaire, l'activité de CDC25A suit son niveau d'expression protéique (Molinari et al., 2000). Une faible variation du taux d'expression de CDC25A suffit pour entraîner une variation de la

prolifération cellulaire (Blomberg and Hoffmann, 1999). Bien que certaines phosphorylations puissent entraîner une augmentation de son activité (comme celle de CDK2/cycline E formant une boucle d'auto-amplification (Hoffmann et al., 1994)) ou, au contraire la diminuer (comme sa phosphorylation par hCdc14B (Tumurbaatar et al., 2011)), la variation de son expression protéique reste le mode majeur de régulation de CDC25A.

Le taux d'expression de CDC25A est régulé à tous les niveaux, transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel et au niveau de sa stabilité.

#### *a. Régulation transcriptionnelle*

Au niveau transcriptionnel, CDC25A est régulée positivement par c-myc (Santoni-Rugiu et al., 2000), (Galaktionov et al., 1996) et E2F (Vigo et al., 1999), (Wu et al., 2000), (Iavarone and Massague, 1999). Des travaux montrent également une régulation transcriptionnelle de CDC25A par STAT3, de manière positive lorsque STAT3 est associé à c-myc et de manière négative lorsqu'il est associé à Rb (Barre et al., 2005). Le facteur de transcription Nanog peut également se fixer à la partie régulatrice de l'ARNm de CDC25A et son inhibition par siRNA entraîne une inhibition de l'expression de CDC25A suggérant que Nanog peut également réguler positivement l'expression de CDC25A en favorisant sa transcription.

#### *b. Régulation post-transcriptionnelle et traductionnelle*

Depuis peu émerge l'existence d'une régulation de l'ARNm de CDC25A par des microARN. Ces petits ARN se fixent sur le 3'UTR du transcrit de CDC25A et entraînent, soit une dégradation de son transcrit, soit directement une inhibition de sa traduction. Ainsi, on note parmi les microARN ayant pour cible directe et inhibant CDC25A : miR-322/424, miR-503 (Sarkar et al., 2010), miR-449a/b (Yang et al., 2009), miR-21 (Wang et al., 2009), miR-15a (Lee et al., 2008), let-7a/b (Johnson et al., 2007), (Huang et al., 2007) et miR 125b (Shi et al., 2010).

L'ARNm de CDC25A peut également être la cible de protéines se fixant sur son 5' et 3'UTR et qui, tout comme les microARN, favorisent ou inhibent sa traduction. C'est en effet le cas de la protéine BOLL dans les cellules germinales (Lin et al., 2009) et HOW (« Held Out Wing ») chez la drosophile (Nabel-Rosen et al., 2005).

D'autres travaux suggèrent que CDC25A est une cible traductionnelle du facteur d'initiation de la traduction eIF-2 $\alpha$  et que la phosphorylation inhibitrice de eIF-2 $\alpha$  induite par un stress oxydatif entraîne une diminution du taux protéique de CDC25A (Tomko and Lazo, 2008).

### *c. Régulation de la stabilité de la protéine*

CDC25A a une demi-vie courte (20-30 min) (Busino et al., 2004). Elle est constamment recyclée dans les cellules en cycle. Sa synthèse est contrebalancée par sa dégradation.

La dégradation de CDC25A implique le système ubiquitine-protéasome. La régulation de l'expression de CDC25A par sa dégradation à lieu suite à des dommages à l'ADN (Mailand et al., 2000), mais également au cours du cycle cellulaire en absence de perturbations particulières (Sorensen et al., 2004). Ce mécanisme de dégradation de la protéine fait intervenir deux E3 ubiquitines ligases : APC/C (Anaphase-Promoting Complex or Cyclosome) et SCF $\beta$ -TrCP (Skp1/Cullin/F-box), chacune intervenant à différentes phases du cycle cellulaire. SCF $\beta$ -TrCP intervient durant les phases G1, S et G2, alors que APC/C agit en fin de mitose. L'ubiquitination de CDC25A par ces deux E3 ubiquitine ligases constitue un signal de dégradation par le protéasome et nécessite, au préalable, la phosphorylation de la protéine sur les sites de reconnaissance de ces E3 ubiquitine ligases. Parmi les protéines qui phosphorylent CDC25A sur ces sites, on note Chk1 et Chk2, p38MAPK et GSK3 $\beta$  (Boutros et al., 2007), CK1 $\epsilon$  (Piao et al., 2011) et NEK11 (Melixetian et al., 2009). L'ubiquitination de CDC25A est réversible. En effet, la dé-ubiquitinase Dub3 peut dé-ubiquitiner CDC25A et ainsi stabiliser la protéine (Pereg et al., 2010).

## **4. Dérégulation de CDC25A et cancers**

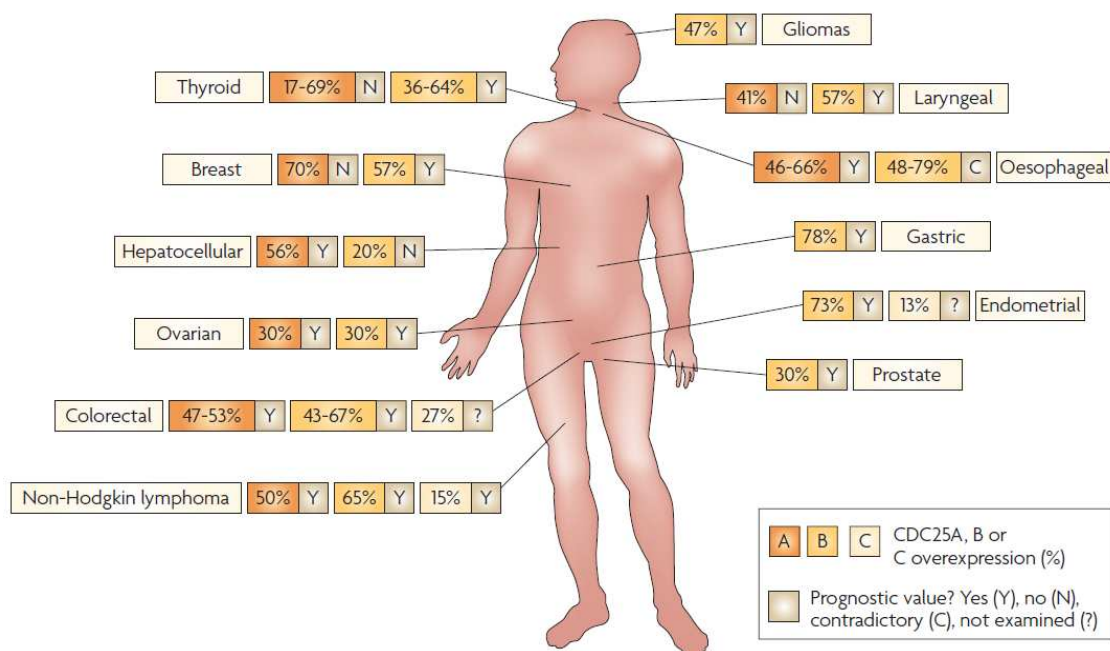
On peut supposer que la surexpression de CDC25A, qui est une cible clé des voies de contrôle du cycle cellulaire s'accompagne de l'augmentation de l'activation de ses CDK/cycline cibles et qu'elle entraîne un passage forcé des transitions du cycle cellulaire menant à une accumulation d'aberrations génétiques. Ceci est appuyé par des travaux montrant que la surexpression de CDC25A entraîne une accélération de l'entrée en phase S dans la lignée rat-1 (Blomberg and Hoffmann, 1999) et inhibe le point de contrôle G1/S dans la lignée U2OS (Falck et al., 2001). Cependant, les différentes études de transgénèse réalisées

sur CDC25A suggèrent que la surexpression de CDC25A seule n'est pas suffisante pour causer un cancer, par contre elle peut y participer. En effet, la surexpression de CDC25A dans les tissus mammaires de souris (sous le promoteur MMTV) induit une hyperplasie des glandes mammaires de ces souris mais ne suffit pas, à elle seule, à entraîner une tumeur. Par contre, cette même surexpression associée à l'expression des oncogènes ras et neu (aussi sous le promoteur mammaire MMTV) accélère la croissance tumorale et entraîne des tumeurs plus invasives et agressives avec une accumulation d'altérations génétiques associée à une instabilité chromosomique (Ray et al., 2007a). Le caractère invasif de la surexpression est appuyé par une étude récente montrant que la surexpression de CDC25A favorise les métastases de tumeurs mammaires et que son inhibition diminue la formation de métastases chez la souris (Feng et al., 2011). Inversement, l'hémi-déplétion de CDC25A chez la souris inhibe la transformation cellulaire et la tumorigénèse mammaire entraînée par la co-expression de l'oncogène H-ras et d'un dominant négatif de p53 (Ray et al., 2007b). Dans le même sens, la co-expression de CDC25A associée à l'expression de l'oncogène HRAS ou la perte du suppresseur de tumeur RB1 entraîne la transformation de fibroblastes qui sont ensuite capables de former des tumeurs de haut grade chez la souris (Galaktionov et al., 1995).

On retrouve une surexpression de CDC25A dans de nombreux cancers solides (Boutros et al., 2007) (cancer du sein, cancers hépatocellulaires, lymphomes non-Hodgkiniens, cancers œsophagiens, cancers du larynx, cancers colorectaux, cancers ovariens, cancers thyroïdiens (Boutros et al., 2007) et gliomes (Yamashita et al., 2010)) (figure 22). Notre équipe a également retrouvé une surexpression de la phosphatase en aval d'oncogènes tyrosines kinases : NPM-ALK (présent dans 70% des lymphomes anaplasiques à grandes cellules), FLT3-ITD (une forme mutée du récepteur au FLT3 présente dans 30% des LAM) et BCR-ABL (responsable des LMC) (Fernandez-Vidal et al., 2009). Il est intéressant de noter que la surexpression de CDC25A dans les cancers est souvent corrélée à un facteur de mauvais pronostic.

Au niveau moléculaire, la surexpression de CDC25A est souvent associée à une augmentation de sa stabilité, notamment via la dérégulation de GSK3 $\beta$  dans une large variété de carcinomes (Kang et al., 2008) et via la dérégulation de Dub3 dans des cancers du sein (Pereg et al., 2010). En aval de NPM-ALK, la surexpression de CDC25A implique une dérégulation transcriptionnelle de la phosphatase via la voie PI3K/Akt et pourrait également impliquer une augmentation de sa stabilité (Fernandez-Vidal et al., 2009). Dans certains

cancers du colon, la surexpression de la phosphatase est liée à une stabilisation de son transcrit via l'inhibition de l'expression du microARN miR-21 (Wang et al., 2009).



**Figure 22 : Surexpression des CDC25 dans les cancers humains et valeur pronostique**

Le pourcentage de tumeurs possédant une surexpression de CDC25A, B ou C est représenté. Ne sont montrés que les types de cancers présentant une surexpression de CDC25 chez plus de 10% des patients. La présence ou non d'une corrélation entre la surexpression de CDC25 et une valeur pronostique est également indiquée (Y : présence d'une corrélation, N : absence de corrélation, C : données contradictoires, ? : non évalué). D'après (Boutros et al., 2007).

## 5. Inhibiteurs des CDC25

Etant donné la fréquence de la surexpression de CDC25A dans les cancers et l'influence de CDC25A dans le caractère oncogénique et l'agressivité tumorale, cette phosphatase apparaît être une cible intéressante dans la thérapie anti-tumorale.

Il n'existe actuellement pas d'inhibiteur spécifique de CDC25A en raison de sa forte homologie avec les autres membres de la famille des CDC25. Cependant, il existe de nombreux inhibiteurs des CDC25 en voie de développement dont certains font l'objet de phase clinique (Lavecchia et al., 2010). L'IRC-083864 est compté parmi les plus efficaces (Brezak et al., 2009) (la formule chimique de ce composé est représentée en figure 23). Il s'agit d'un composé para-quinoléine dérivé de la vitamine K qui agirait probablement en

oxydant de manière irréversible la cystéine catalytique des CDC25 (figure 19). L'IC50 de l'IRC-083864 est de l'ordre du sub-micromolaire. Au niveau cellulaire, il agit sur les cellules Hela en bloquant leur progression dans le cycle cellulaire, mais sans qu'il n'y ait d'accumulation de cellules dans une phase donnée, le cycle se retrouve comme figé. Ce composé a montré son efficacité chez la souris en diminuant la croissance tumorale induite par des xénogreffes de LNCaP, une lignée de tumeur de la prostate et MIA PaCa-2, une lignée de tumeur pancréatique. Il est actuellement testé en phase clinique de type II sous le nom de Debio 0931 (Lavecchia et al., 2010).

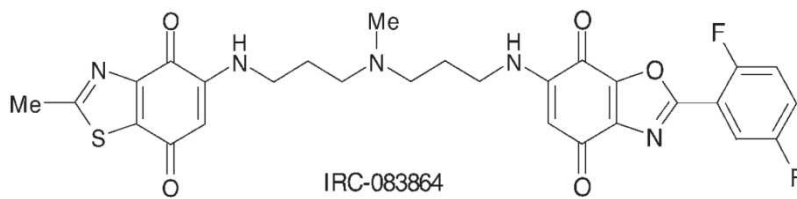


Figure 23 : Structure chimique de l'IRC-083864

(D'après (Brezak et al., 2009))

## **E. Cycle cellulaire et différenciations érythroïde et granulomonocytaire**

### **1. Répartition des cellules dans le cycle**

A l'état basal, les CSH sont relativement quiescentes (Passegue et al., 2005) et environ 99% des progéniteurs exprimant le marqueur CD34 fraîchement isolés de sang de cordon sont en phase G0/G1 (Dai et al., 2000), (Yaroslavskiy et al., 1999).

L'engagement dans la différenciation s'accompagne d'une augmentation progressive de la prolifération cellulaire qui décroît dans les phases terminales de la différenciation jusqu'à la sortie du cycle des cellules en fin de différenciation (Dai et al., 2000), (Yaroslavskiy et al., 1999), (Klausen et al., 2004).

Au cours de la différenciation érythroïde, les cellules au stade BFU-E sont majoritairement en phase G0/G1 du cycle cellulaire. En revanche, les proérythroblastes prolifèrent activement avec une majorité des cellules en phase S. En fin de différenciation terminale, lors des derniers stades d'érythroblastes, les cellules cessent de proliférer et

s'accumulent à nouveau en phase G0/G1 avant leur énucléation (Dai et al., 2000). Une étude de la répartition dans le cycle de précurseurs granulocytaires neutrophiles issus de moelle osseuse de donneurs sains réalisée par Klausen et ses collègues montre également une sortie du cycle cellulaire en fin de différenciation (Klausen et al., 2004). Les auteurs comptent 59% des cellules du compartiment myéloblastes/promyélocytes en phase G0/G1 contre 36% en phases S/G2/M. Le compartiment myélocytes/métamyélocytes en phases S/G2/M ne représente plus que 12% de la population contre 86% en phase G0/G1 et les polynucléaires neutrophiles sont, pour 99%, en phase G0/G1.

## **2. Statut des régulateurs du cycle cellulaire au cours des différenciations**

Les données bibliographiques concernant l'expression des acteurs du cycle cellulaire au cours des différenciations érythrocytaire et granulo-monocytaire présentent de nombreuses contradictions. Cependant celles-ci ne sont qu'apparentes et représentatives de la grande diversité des résultats que l'on peut obtenir en fonction de la variabilité biologique, du type cellulaire d'origine (CSH / CD34<sup>+</sup>, sang de cordon / moelle osseuse / lignées, cellules murines / humaines / de primates), des marqueurs utilisés, du matériel biologique analysé (ARNm/protéine) et des protocoles employés.

La tendance générale consiste en une expression faible de la majorité des cyclines et CDKs dans les CD34<sup>+</sup>. L'expression de certaines de ces cyclines et CDKs augmente en parallèle de la hausse de la prolifération cellulaire puis décroît en fin de différenciation terminale avec la sortie du cycle des cellules (Furukawa et al., 2000), (Dai et al., 2000), (Klausen et al., 2004). Cependant, certains auteurs suggèrent que la combinaison d'expression de certaines cyclines et CDKs serait spécifique de lignées cellulaires (Furukawa et al., 2000).

Si l'on se restreint aux analyses protéiques effectuées sur des cellules primaires, on note que les progéniteurs positifs pour l'antigène CD34 fraîchement isolés de sang de cordon expriment fortement la cycline D1. La kinase CDK2 et la cycline E y sont faiblement exprimées, et les cyclines D2 et D3 n'y sont pas détectées (Dai et al., 2000). Ces cellules expriment également le CDKI p27<sup>kip1</sup> (Yaroslavskiy et al., 1999). Lors de la différenciation érythroïde, l'augmentation de la prolifération s'accompagne d'une forte augmentation de l'expression protéique des cyclines D3 et E ainsi que de CDK2 (figure 24). L'expression de ces protéines, au cours de la différenciation, corrèle avec la proportion de cellules en phase S.

En fin de maturation terminale, leur taux décroît rapidement (Dai et al., 2000) alors que l'expression de p27<sup>kip1</sup> et p21<sup>cip1</sup> augmente (Panzenbock et al., 1998).

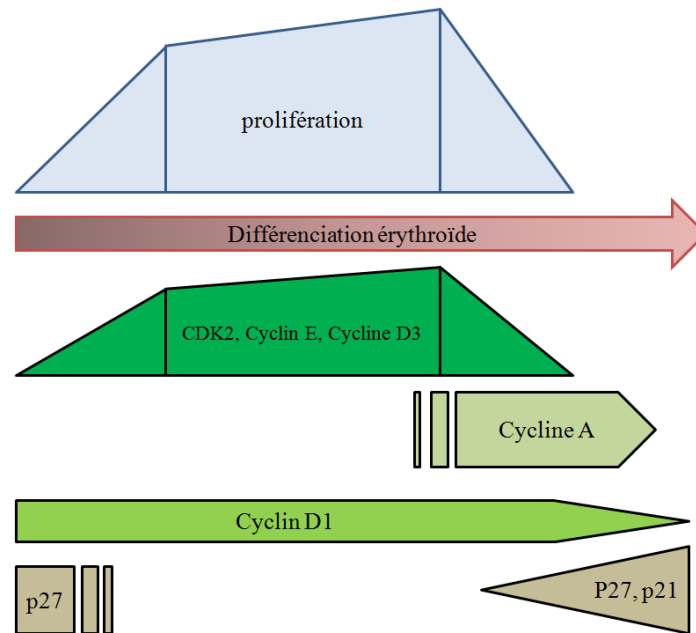


Figure 24 : Schématisation de l'expression protéique des acteurs principaux du cycle cellulaire au cours de la différenciation érythroïde

La différenciation granulocytaire terminale, quant à elle, s'accompagne d'une inhibition de l'expression des cyclines D et des CDK2,4 et 6 et, en parallèle, d'une augmentation de l'expression de la cycline E et de p27<sup>Kip1</sup> (Klausen et al., 2004).

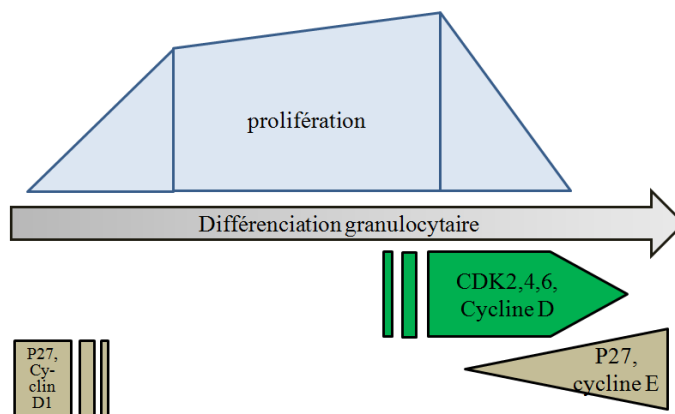


Figure 25 : Schématisation de l'expression protéique des acteurs principaux du cycle cellulaire au cours de la différenciation granulocytaire neutrophile

Le statut de CDC25A au cours de la différenciation myéloïde n'a été que très peu étudié. Des expériences réalisées sur des lignées cellulaires vont dans le sens d'une



décroissance de son expression lors de différenciations granulocytaire (Shimizu et al., 1999) et érythrocytaire (Tamir et al., 2000) terminales. Cependant, son expression n'a pas été étudiée au cours de la différenciation de cellules primaires.

### **3. Implication des acteurs du cycle cellulaire dans la myélopoïèse – modèles murins**

Divers modèles murins suggèrent une importance majeure de certaines protéines du cycle cellulaire dans la myélopoïèse, et notamment de protéines impliquées dans la transition G1/S.

Parmi les cyclines, des modèles ont mis en avant un rôle clé des cyclines D et E. En effet, l'ablation concomitante des trois types de cycline D (D1, D2 et D3) chez la souris entraîne une létalité embryonnaire à un stade tardif en raison d'une anémie sévère, avec un nombre de globules rouges diminué de presque huit fois, associée à des anomalies cardiaques. De plus, les progéniteurs hématopoïétiques issus du foie fœtal de ces embryons ont une capacité fortement réduite à former des colonies myéloïdes *in vitro* (Kozar et al., 2004). Concernant la cycline E, une construction de souris knock in possédant une double mutation, les mutations T74A et T393A, qui abolit la périodicité de son expression et entraîne donc une accumulation continue de la protéine, cause des anomalies prolifératives généralisées mais plus sévère concernant le compartiment hématopoïétique et notamment l'érythropoïèse (Minella et al., 2008). En effet, ces souris knock in ont une quantité de progéniteurs et de précurseurs érythroïdes Ter119 CD71 élevée. En revanche, le nombre de précurseurs Ter119 CD71<sup>-</sup> plus matures est diminué, suggérant un défaut de différenciation terminale.

Par ailleurs, diverses combinaisons de déplétion de CDK ont été réalisées chez la souris (pour revue Malumbres M. et Barbacid M, 2009 (Malumbres and Barbacid, 2009)). Ces modèles ont mis en évidence une importance particulière de CDK4 et CDK6 dans la myélopoïèse murine. En effet, les souris invalidées simultanément pour ces deux kinases meurent à un stade embryonnaire tardif, et ont un nombre de précurseurs hématopoïétiques et de cardiomyocytes diminué (Malumbres et al., 2004). De façon intéressante, les embryons meurent d'une anémie sévère et présentent une forte baisse de prolifération des érythroblastes (2% d'entre eux sont positifs pour le marqueur de prolifération Ki67, contre 20%-50% dans les souris sauvages ou présentant une simple délétion pour CDK4 ou CDK6), associée à une forte diminution de la quantité de globules rouges. Il est intéressant de noter que les souris CDK4<sup>n/n</sup> CDK6<sup>-/-</sup> ont un phénotype similaire à celui des souris knock out pour les trois types

de cycline D, or ces protéines s'associent et font partie des mêmes couples CDK/cycline (Kozar et al., 2004).

Les modèles murins suggèrent également une importance des régulateurs négatifs du cycle cellulaire, notamment des protéines p27<sup>kip1</sup> et Rb. En effet, la rate et la moelle osseuse des souris knock-out pour p27<sup>kip1</sup> présentent une augmentation du nombre de progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytaires, et granulo-monocytaires (Fero et al., 1996). D'autre part, le suppresseur de tumeur Rb, qui est un régulateur négatif de la transition G1-S, et dont la phosphorylation par les complexes CDK/Cyclines conduit à l'inactivation, semble également avoir une fonction majeure dans le processus d'érythropoïèse (pour revue, Walkley et al., 2008 (Walkley et al., 2008)). Le knock out de Rb est létal à un stade embryonnaire tardif (Clarke et al., 1992), (Lee et al., 1992), (Jacks et al., 1992), et les embryons de souris déficientes pour Rb développent une anémie sévère, suggérant une importance de cet acteur négatif du cycle cellulaire au cours de l'érythropoïèse. Des expériences de culture *in vitro* de progéniteurs de souris knock-out pour Rb suggèrent que la cause de l'anémie serait un défaut de sortie du cycle et d'énucléation en fin de différenciation érythroïde et un délai de différenciation terminale (Clark et al., 2004). Cependant, la cause de cette anémie est controversée et pourrait faire intervenir des facteurs intrinsèques et extrinsèques aux érythroblastes (Iavarone et al., 2004). De manière intéressante, une étude montre que l'inactivation concomitante de Rb dans les cellules myéloïdes et la niche hématopoïétique chez la souris entraîne une pathologie myéloproliférative (Walkley et al., 2007).

## **V. LA REGULATION TRADUCTIONNELLE IMPLIQUANT LA PHOSPHORYLATION SUR SERINE 51 DU FACTEUR EIF-2 $\alpha$**

### **A. Généralités sur la traduction**

Le niveau d'expression d'une protéine est la résultante d'un ensemble de mécanismes : la transcription du gène en ARNm, la stabilité de l'ARNm, la traduction de l'ARNm en protéine et la stabilité de la protéine. Au cours de chacune de ces étapes se trouvent des régulations impactant sur le taux de protéine.

La traduction, qui consiste en un décodage de la séquence des ARNm en une séquence d'acides aminés constituant la protéine est la dernière étape de la synthèse protéique. Sa

régulation a par conséquent un impact direct sur le niveau d'expression protéique. Ainsi, la rapidité de variation du niveau protéique via la régulation traductionnelle confère à la cellule une certaine plasticité qui lui est nécessaire pour répondre aux changements soudains de son environnement. Cette rapidité de régulation de l'expression protéique et d'autant plus importante dans certaines conditions comme en cas de stress ou lors de l'apoptose, car ces conditions demandent des changements immédiats du niveau d'expression de certaines protéines.

La traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines peut être divisée en trois phases : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

La phase d'initiation correspond à l'ensemble des processus mis en place afin d'assurer l'apport d'un ribosome et de la première méthionine de la séquence protéique au niveau d'un codon start de l'ARNm. La synthèse du polypeptide est réalisée pendant la phase d'élongation. Le codon stop constitue le signal de terminaison de la traduction consistant en la libération du polypeptide et du ribosome de l'ARNm.

L'initiation de la traduction la plus commune est l'initiation de la traduction cap-dépendante. Cependant, lorsqu'elle est compromise, par exemple en cas de stress, de mitose ou encore d'apoptose, l'initiation de la traduction de 10-15% des transcrits a lieu via un mécanisme d'initiation de la traduction cap-indépendante. C'est notamment le cas lorsque les ARNm possèdent une IRES (« Internal Ribosome Entry Site »), séquence particulière de reconnaissance de l'ARNm par le ribosome permettant une initiation alternative.

## **B. Initiation de la traduction cap-dépendante**

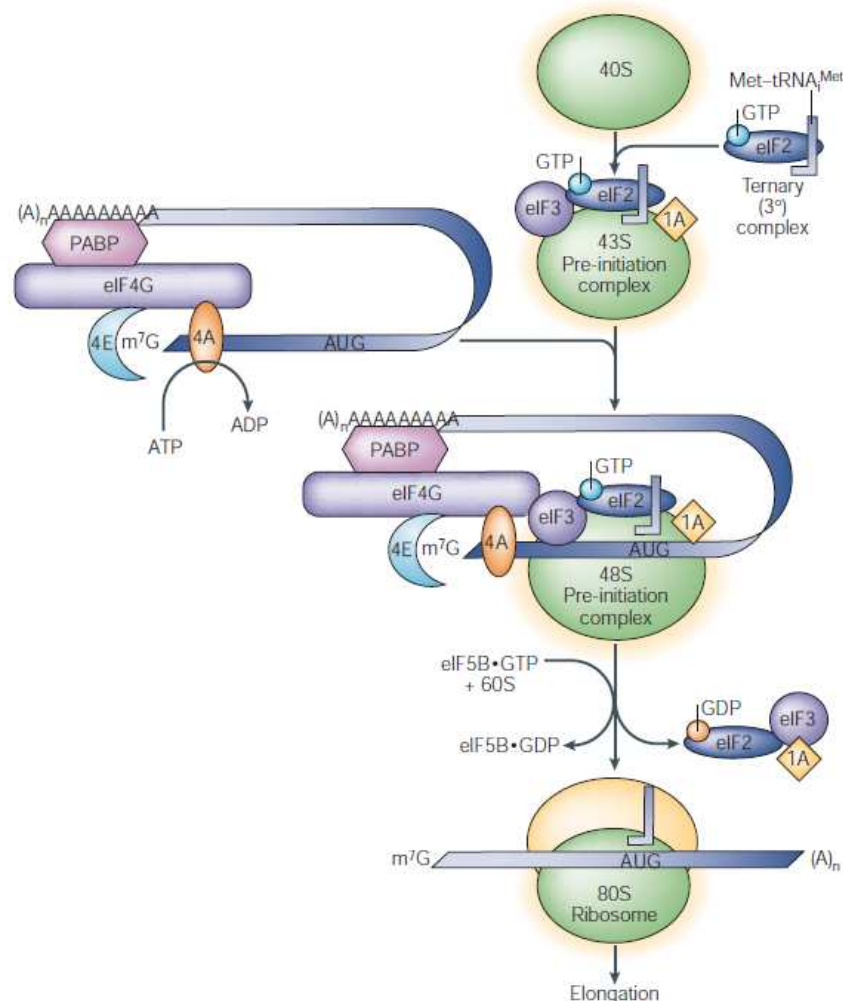
Les ARNm eucaryotes sont composés d'une séquence codante flanquée d'une région 5'UTR (« UnTranslated Region »), non traduite, avec à son extrémité une coiffe méthylée m<sup>7</sup>GTP ; et d'une région 3'UTR, non traduite, avec à son extrémité une queue poly(A).

L'initiation de la traduction cap-dépendante est un processus complexe lors duquel la petite sous-unité 40S du ribosome et un complexe Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> (c'est-à-dire un ARN de transfert couplé à une méthionine) sont recrutés au niveau de la coiffe des ARNm (figure 26). Cette sous-unité 40S scanne l'ARNm jusqu'à l'identification d'un codon start, signal de départ de traduction de l'ARNm en protéine. Le codon start correspondant à une séquence AUG sur l'ARNm située dans le cadre de lecture du ribosome. La sous-unité ribosomique 60S

se joint alors à la sous-unité 40S pour constituer la forme ribosomique 80S fonctionnelle. La phase d'élongation peut alors débuter.

Ce processus d'initiation de la traduction fait intervenir un ensemble de protéines connues sous le nom de facteurs d'initiation eucaryotes ou encore eIFs (« eukaryotic Initiation Factors »).

De manière plus détaillée (pour revue, Klann E. et Thomas E., 2004 (Klann and Dever, 2004)), le complexe ternaire, composé d'un Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> couplé au facteur eIF-2 lié au GTP, s'associe à la petite sous-unité ribosomale 40S ainsi qu'aux facteurs eIF-3, eIF-1, eIF1-A et eIF-5 pour former le complexe de pré-initiation 43S.



**Figure 26 : Initiation de la traduction cap-dépendante**

L'initiation de la traduction cap-dépendante débute par la formation du complexe de pré-initiation 43S et du complexe associé à la coiffe. Le complexe de pré-initiation est ensuite recruté au niveau de l'ARNm grâce au complexe associé à la coiffe et scanne l'ARNm jusqu'à l'identification d'un codon start AUG. Les facteurs se dissocient alors et la sous-unité 60S s'associe à la sous-unité 40S du ribosome. Le complexe final 80S ainsi formé est compétant pour la phase d'élongation de la traduction. (D'après (Klann and Dever, 2004))

En parallèle, la protéine d'échafaudage eIF4G s'associe au facteur eIF4A, qui permet de faire la jonction entre la coiffe côté 5', via le facteur eIF-4E lié directement à la coiffe, et la queue poly(A) côté 3' via la Poly-(A) Binding Protein (PABP). L'ensemble [eIF-4E, 4A et 4G] constitue le complexe eIF4F. Le transcrit prend alors une structure en boucle fermée où les deux extrémités de l'ARNm sont proches l'une de l'autre, favorisant ainsi le recyclage des sous-unités ribosomales pour un nouveau cycle de traduction.

Le complexe de pré-initiation est recruté sur l'ARNm par l'interaction du facteur eIF-3 avec le facteur eIF-4G. Le complexe 43S va ensuite scanner l'ARNm dans le sens 5' vers 3' jusqu'à identifier le codon start AUG. Une fois le complexe de pré-initiation 43S lié de façon stable au codon AUG, l'ensemble donne le complexe d'initiation 48S. Le facteur eIF-2 hydrolyse alors le GTP, permettant la dissociation des facteurs du complexe 48S et l'association de la grande sous-unité 60S au complexe 48S. Ceci donnera naissance au complexe final 80S, capable de catalyser la formation des premiers peptides et ainsi procéder à la phase d'élongation de la traduction.

Les facteurs d'initiation de la traduction et les protéines des sous-unités ribosomales peuvent être la cible de régulations, via des voies de signalisation, visant à agir rapidement sur le taux de protéines.

### **C. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'initiation de la traduction cap-dépendante**

Les deux principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'initiation de la traduction cap-dépendante via les facteurs d'initiation ou les protéines ribosomales sont les voies PI3K/Akt et MAPK, deux voies activées par JAK2 (figure 27) (pour revues, Blagden et Willis E, 2011 (Blagden and Willis, 2011) et Klann E et Thomas E, 2004 (Klann and Dever, 2004)).

La voie PI3K/Akt favorise la traduction de différentes manières. D'une part, mTOR (« mammalian Target of Rapamycin »), une cible d'Akt, phosphoryle 4E-BP1 qui est un régulateur négatif de la traduction interagissant avec le facteur eIF-4E et inhibant ainsi la formation du complexe eIF-4F. La phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR favorise le décrochage de 4E-BP1 de eIF-4E. D'autre part, mTOR active par phosphorylation la kinase p70<sup>S6K</sup> qui phosphoryle à son tour la protéine ribosomale S6. Cette phosphorylation favorise

la traduction d'ARNm possédant un 5'TOP (Terminal OligoPyrimidin tract) qui codent pour des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation. La kinase p70<sup>S6K</sup> phosphoryle également eIF-4B, ce qui stimule son association avec eIF-3 et favorise la traduction, probablement en stimulant l'activité de eIF-4A. De plus, GSK3 $\beta$ , qui est inhibée par Akt est capable de phosphoryler et ainsi de diminuer l'activité de eIF-2B qui est un facteur d'échange du GDP contre le GTP de eIF-2.

La voie des MAPK agit positivement sur la traduction par l'intermédiaire de Mnk1 qui phosphoryle eIF-4E réduisant ainsi son affinité d'interaction avec la coiffe. Mnk1 favorise également la traduction en phosphorylant eIF-4B.

D'autre part, en réponse à certains stress, les kinases GCN2, HRI, PERK et PKR peuvent inhiber la traduction en phosphorylant le facteur eIF-2 $\alpha$  sur serine 51.

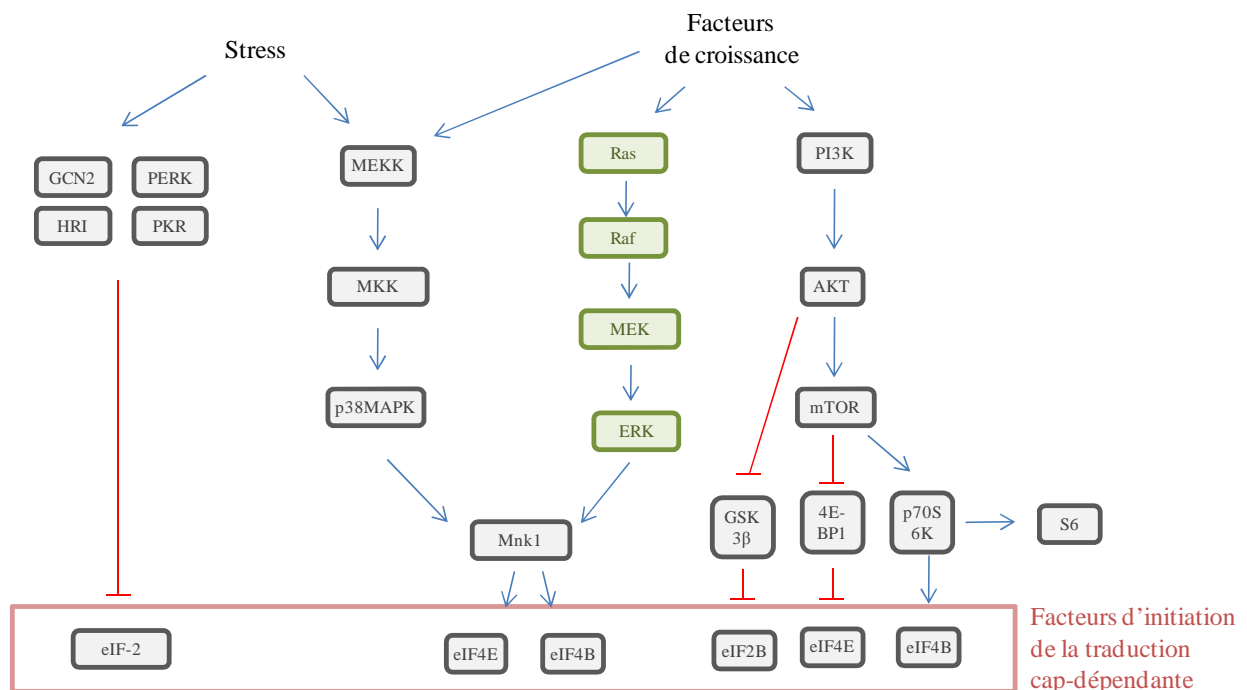


Figure 27 : Principales voies de signalisation impliquées dans l'initiation de la traduction cap-dépendante

Adapté de (Blagden and Willis, 2011).

## D. Le facteur eIF-2 $\alpha$ et sa phosphorylation sur sérine 51

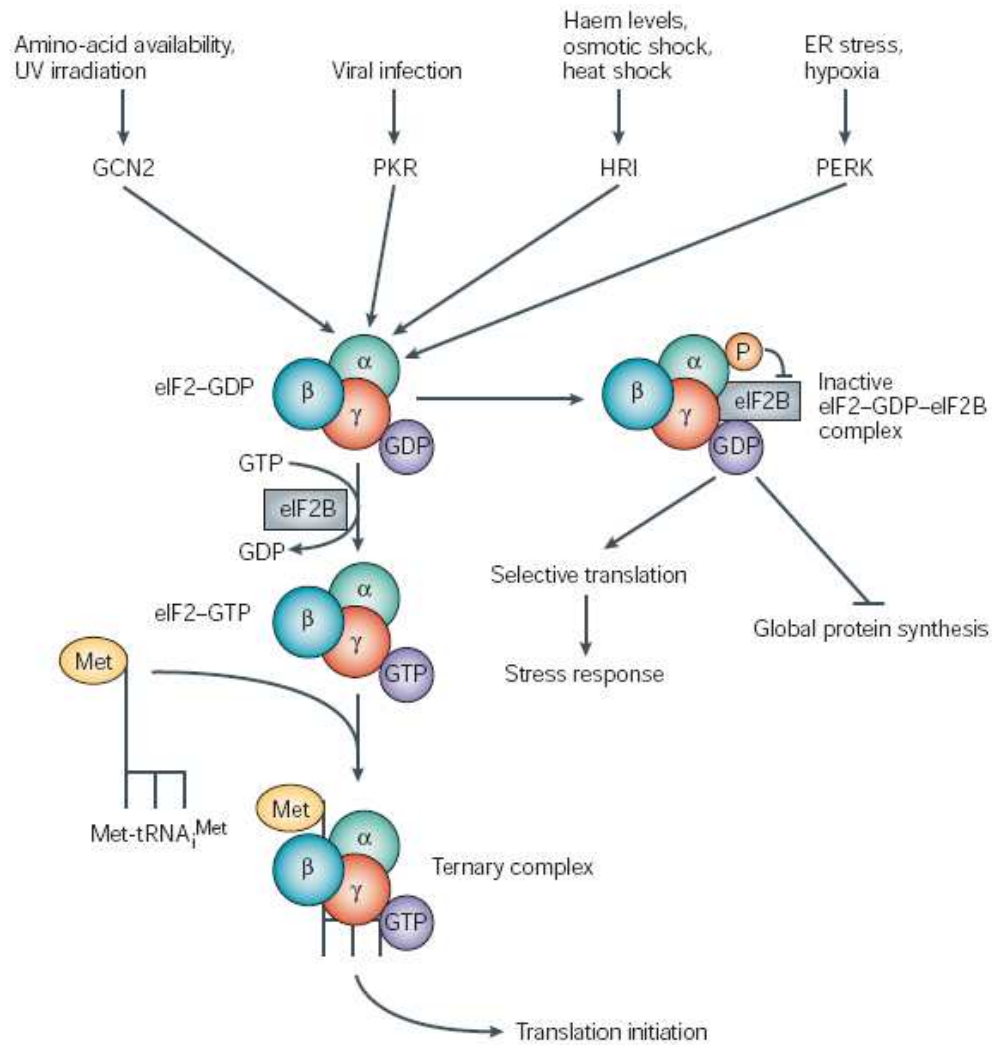
eIF-2 $\alpha$  (« eukaryotic translation Initiation Factor - 2 alpha ») est l'une des trois sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) du facteur d'initiation de la traduction eIF-2. Le facteur eIF-2 a pour fonction le recrutement du Met-tRNA<sup>iMet</sup> au niveau de la sous-unité ribosomale 40S (figure 26). Elle s'associe au ribosome uniquement lorsqu'elle est liée au GTP (« Guanosine TriPhosphate »). Le GTP est hydrolysé lorsque le codon start est reconnu et eIF-2 repasse alors à sa forme inactive liée au GDP. L'échange de GDP contre le GTP est réalisé par eIF-2B (pour revue, Gebauer F *et al*, 2004 (Gebauer and Hentze, 2004)) (figure 28).

La phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  sur sérine 51 réduit le seuil de dissociation entre eIF-2 et eIF-2B empêchant ainsi la création de la forme active de eIF-2 liée au GDP. En conséquence, la traduction globale des ARNm est diminuée. Paradoxalement, la traduction de certains ARNm (notamment des protéines impliquées dans l'adaptation cellulaire au stress) est augmentée suite à la phosphorylation d'eIF-2 $\alpha$  (Dang Do et al., 2009).

Cette phosphorylation a souvent lieu en réponse à un stress cellulaire. Cependant, l'expression d'une forme non phosphorylable de eIF-2 $\alpha$ , dans laquelle la sérine 51 a été remplacée par une alanine, inhibe l'apoptose (Srivastava et al., 1998) et entraîne la transformation des cellules NIH 3T3 (Donze et al., 1995) suggérant que la déphosphorylation de eIF-2 $\alpha$  pourrait participer à des mécanismes oncogéniques.

La sérine 51 de eIF-2 $\alpha$  est phosphorylée par quatre kinases (Holcik and Sonenberg, 2005) (figure 28): PKR (« Protein Kinase activated by double stranded RNA »), HRI (« Haem – Regulated Inhibitor »), GCN2 (« General Control Non-Derepressible-2 ») et PERK (« PKR-like endoplasmic reticulum (ER) Kinase »). Ces quatre kinases sont activées par différents types de stress cellulaires: PKR est notamment activée suite à des infections virales, HRI est stimulée par la déplétion en hème et le stress osmotique ou dû à la chaleur, GCN2 est activée par la carence en acides aminés ou encore les UV et PERK par des stress issus du réticulum endoplasmique et l'hypoxie.

D'autre part, la phosphatase PP1 (« Protein Phosphatase 1 »), en complexe avec GADD34 (« Growth arrest and DNA Damage Protein 34 ») ou CReP (« Constitutive Repressor of eIF-2 $\alpha$  Phosphorylation »), et la phosphatase PP2A (« Protein Phosphatase 2 A ») (Petryshyn et al., 1982) sont capables de déphosphoryler la sérine 51 de eIF-2 $\alpha$ .



**Figure 28 : Intégration de la réponse au stress *via* la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$**

De nombreuses conditions de stress mènent à la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$ . Cette phosphorylation est réalisée par quatre kinases distinctes : PKR, HRI, GCN2 et PERK. Comme le GTP nécessaire à l'activité de eIF-2 $\alpha$  est hydrolysé lors de la traduction, eIF-2 $\alpha$  doit être rechargée en GTP à chaque cycle d'initiation de la traduction. Cette recharge en GTP est réalisée par le facteur d'échange du GDP en GTP eIF-2B. La phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$  sur sa sérine 51 inhibe l'échange du GDP contre le GTP en réduisant le taux de dissociation entre eIF-2 $\alpha$  et eIF-2B entraînant ainsi une séquestration de eIF-2 $\alpha$ . Ceci entraîne une réduction globale de la traduction, bien que la traduction sélective de certains ARNm continue. (D'après (Holcik and Sonenberg, 2005)).



## **PARTIE 2 : RESULTATS**



## I. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les traitements actuels des NMP Philadelphie négatives sont essentiellement des traitements symptomatiques et non curatifs. Si la découverte de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> a permis une réelle avancée dans la compréhension de la physiopathologie des NMP, les traitements ciblés restent décevants. En effet, les inhibiteurs de JAK2 actuellement testés en clinique montrent une réelle efficacité sur les symptômes de ces pathologies. Cependant, ils entraînent des effets secondaires importants et ne permettent pas d'éradiquer le clone muté. Il est donc nécessaire d'approfondir les recherches afin de mieux comprendre les mécanismes oncogéniques de JAK2<sup>V617F</sup> dans la perspective d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer le traitement des NMP positives pour JAK2<sup>V617F</sup>. Notre étude entre dans ce cadre de cet objectif général.

Notre intérêt s'est porté sur la phosphatase CDC25A régulatrice du cycle cellulaire pour les raisons suivantes : (i) l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> favorise la transition G1/S du cycle cellulaire (Walz et al., 2006) or CDC25A est un acteur clé de la transition G1/S (Jinno et al., 1994), (Blomberg and Hoffmann, 1999) ; (ii) CDC25A a été retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers solides et sa surexpression est souvent corrélée à un facteur de mauvais pronostic, cependant son implication dans les hémopathies malignes n'a que très peu été explorée ; (iii) des travaux antérieurs de l'équipe montrent une surexpression de CDC25A en aval d'oncogènes à activité tyrosine kinase : NPM-ALK, BCR-ABL et FLT3-ITD (voir article en annexe (Fernandez-Vidal et al., 2009) ; (iv) enfin, il existe des inhibiteurs des CDC25, et notamment l'IRC-083864 actuellement testé en clinique dans le domaine de l'oncologie (Lavecchia et al., 2010). Cet inhibiteur donne des résultats encourageants chez la souris avec une inhibition de la croissance de xénogreffes tumorale prostatique et pancréatique sans toxicité apparente (Brezak et al., 2009) ; (v) l'implication de CDC25A dans l'hématopoïèse normale reste à ce jour inconnue.

Sur la base de ces observations, l'objectif général de notre étude a donc été d'explorer l'implication de CDC25A dans l'hématopoïèse pathologique en aval de l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> ainsi que dans l'hématopoïèse normale.

L'objectif de la première partie de l'étude a consisté à mesurer le statut de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup>, à identifier les voies de régulation permettant sa surexpression et à évaluer les conséquences fonctionnelles de son inhibition. Cette première partie a donné lieu à une publication dans Blood.

Dans un second temps, cette étude nous a amené à nous intéresser au statut de CDC25A au cours de l'hématopoïèse physiologique et plus particulièrement à la fonction de cette phosphatase. Les premiers résultats de ce second objectif portant sur l'expression protéique de CDC25A au cours de différenciations érythroïdes et granulo-monocytaires réalisées *ex vivo* seront présentés. De plus, dans cette seconde partie de notre étude, nous avons également analysé l'effet de l'inhibition des CDC25 réalisée sur les sept premiers jours de la différenciation, sur les proérythroblastes obtenus à partir de progéniteurs d'un premier patient possédant JAK2<sup>V617F</sup> ou de donneurs sains.

## **II. RESULTAT 1 : IMPLICATION ET REGULATION DE LA PHOSPHATASE CDC25A EN AVAL DE L'ONCOGENE JAK2<sup>V617F</sup> DANS LES NMP**

### **Article:**

The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2<sup>V617F</sup> oncogene

**Emilie-Fleur Gautier, Muriel Picard, Camille Laurent, Caroline Marty, Jean-Luc Villeval, Cécile Demur, François Delhommeau, Elizabeth Hexner, Stéphane Giraudier, Nicolas Bonneville, Bernard Ducommun, Christian Récher, Guy Laurent, Stéphane Manenti et Véronique Mansat- De Mas.**

**Blood 2011, sous presse**

### **A. Introduction**

La mutation JAK2<sup>V617F</sup> est retrouvée dans plus de 95% des cas de Maladie de Vaquez, et environ 50% des cas de thrombocytémie essentielle et de myélofibrose primitive. Son introduction chez la souris reproduit ces maladies suggérant un lien causal entre l'oncogène et la pathologie. Au niveau cellulaire, cette mutation entraîne une hypersensibilité voire une indépendance des cellules vis-à-vis des cytokines ainsi qu'une activation constitutive de JAK2 et des voies principales activées par cette tyrosine kinase (MAPK, PI3K/Akt et JAK/STAT). Chez les patients, les données bibliographiques montrent une phosphorylation anormalement élevée de STAT5, STAT3, Erk 1/2 et Akt dans les mégacaryocytes et les érythroblastes de patients possédant l'oncogène (Grimwade et al., 2009), (Aboudola et al., 2007), (Risum et al., 2011), (Laubach et al., 2009). Cette activation de la signalisation est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire en aval de l'oncogène, cependant le lien entre JAK2<sup>V617F</sup> et l'expansion myéloïde observée dans les NMP n'est pas encore entièrement résolu et ces

pathologies restent toujours incurables en raison de l'incapacité à cibler de manière efficace et spécifique le clone muté.

L'oncogène JAK2<sup>V617F</sup>, décrit comme responsable d'une expansion accrue de la myélopoïèse terminale dans les NMP (Dupont et al., 2007), (Anand et al., 2011), (Bruchova et al., 2009), a été montré comme pouvant favoriser la transition G1/S du cycle cellulaire. Quelques données bibliographiques suggèrent que l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une diminution de p27<sup>kip1</sup> et une induction de l'expression de la cycline D2 (Bruchova et al., 2009), (Walz et al., 2006), (Jakel et al., 2011), (Furuhata et al., 2009). Cependant, leur implication en aval de l'oncogène n'a pas été clairement définie.

La phosphatase CDC25A est un régulateur clé de la transition G1/S. Nous avons montré dans des travaux antérieurs une surexpression de CDC25A en aval d'oncogènes à activité tyrosine kinase responsables d'hémopathies malignes tels que NPM-ALK (présent dans 70% des cas de lymphomes anaplasiques à grandes cellules), BCR-ABL (responsable des LMC) et FLT3-ITD (une forme mutée du récepteur au FLT3 retrouvée dans 30% des cas de LAM) (voir article en annexe (Fernandez-Vidal et al., 2009)).

La surexpression de CDC25A dans les cancers est souvent associée à une augmentation de sa stabilité, notamment *via* la dérégulation de GSK3 $\beta$  dans une large variété de carcinomes (Kang et al., 2008) et de Dub3 dans des cancers du sein (Pereg et al., 2010). En aval de NPM/ALK, la surexpression de CDC25A implique une dérégulation transcriptionnelle de la phosphatase *via* la voie PI3K/Akt et pourrait également impliquer une augmentation de sa stabilité (voir article en annexe Fernandez-Vidal A. *et al*, 2009 (Fernandez-Vidal et al., 2009))). Dans certains cancers du colon, la surexpression de la phosphatase est liée à une stabilisation de son transcrit *via* l'inhibition de l'expression du microARN miR-21 (Wang et al., 2009).

L'évaluation de CDC25A en tant que cible de JAK2<sup>V617F</sup> est d'un grand intérêt en raison de la présence d'inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre les CDC25 et notamment l'IRC-083864 (Debio0931) actuellement testé en cancérologie.

## B. Hypothèses de travail

L'hypothèse de travail est donc que la phosphatase CDC25A est dérégulée dans le sens d'une surexpression en aval de JAK2<sup>V617F</sup> et qu'elle participe à l'expansion érythroïde dans les NMP Philadelphie négatifs.

## C. Résultats

### Modèles cellulaires

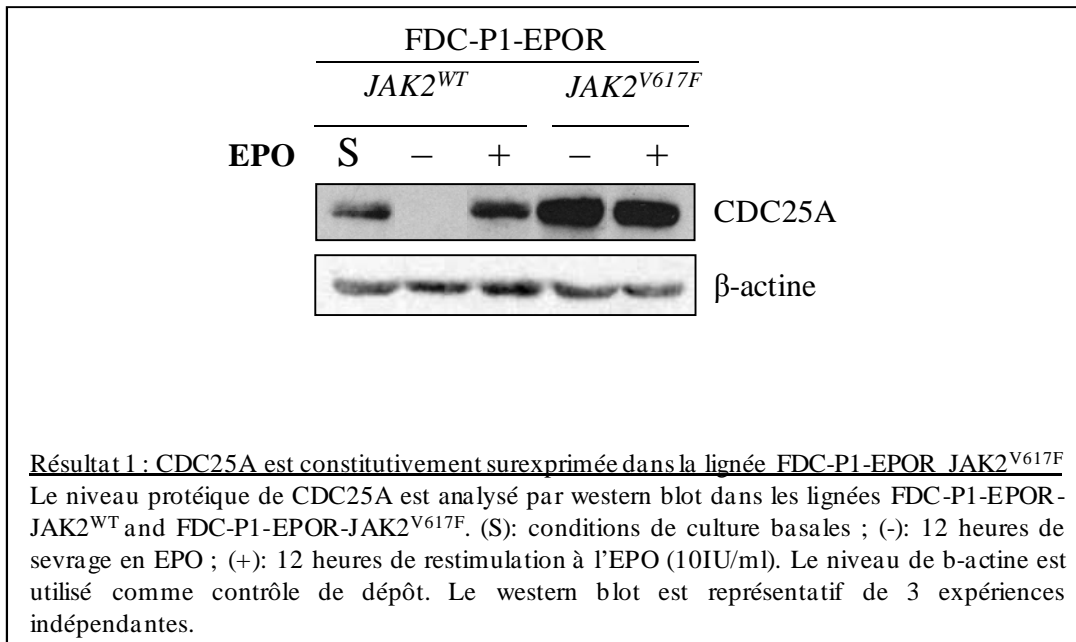
Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des lignées humaines possédant la mutation. Parmi celles-ci, la lignée HEL, homozygote pour JAK2<sup>V617F</sup> est issue d'un patient atteint d'érythroleucémie et la lignée SET-2, hétérozygote pour JAK2<sup>V617F</sup> est issue d'un patient atteint de thrombocytémie essentielle transformée en leucémie mégacaryoblastique. Les lignées murines FDC-P1 et BAF/F3 ont été transduites afin d'exprimer le récepteur à l'EPO associé à JAK2<sup>WT</sup> ou JAK2<sup>V617F</sup> (James et al., 2005).

Les lignées possédant JAK2<sup>V617F</sup> sont indépendantes des cytokines alors que les lignées possédant la forme sauvage de JAK2 sont dépendantes de l'EPO.

Nous avons également utilisé des échantillons de patients : coupes de biopsies ostéo-médullaires, cellules CD34<sup>+</sup> triées à partir de moelle osseuse ou de saignées thérapeutiques, cellules CD36<sup>+</sup> obtenues après mise en culture de cellules CD34<sup>+</sup> en milieu liquide pendant 7 jours, et enfin, des échantillons de moelle et de rate préparés à partir de souris knock-in.

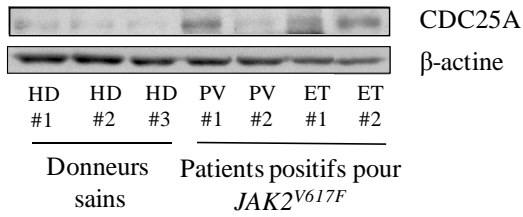
### Analyse du statut de CDC25A en aval de la mutation JAK2<sup>V617F</sup>

Une analyse de l'expression de CDC25A dans les lignées cellulaires FDC-P1-EPOR JAK2<sup>WT</sup> et FDC-P1-EPOR JAK2<sup>V617F</sup> met en évidence une surexpression de CDC25A dans les cellules portant la mutation (résultat 1). De plus, des expériences de sevrage et restimulation à l'EPO réalisées sur ces lignées suggèrent que l'expression de CDC25A en aval de l'oncogène est indépendante de la présence de l'EPO et donc constitutive (résultat 1).

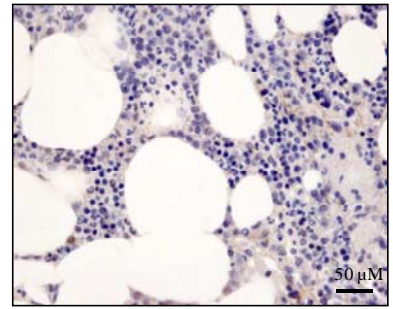
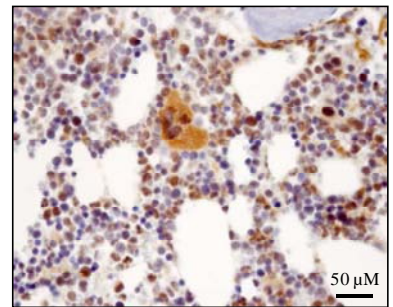
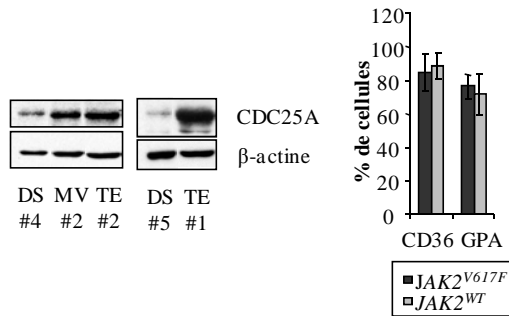


La surexpression de CDC25A est retrouvée dans des cellules primaires humaines portant la mutation *JAK2<sup>V617F</sup>* par rapport à des cellules normales: (i) progéniteurs/précurseurs érythroïdes et mégacaryocytaires *CD36<sup>+</sup>* (obtenus après tri *CD36* de moelle osseuse) (ii) coupes de moelles par immunohistochimie, (iii) proérythroblastes obtenus à partir de cellules *CD34<sup>+</sup>* mises en différenciation (voir résultat 2C p72). Enfin, la surexpression protéique de CDC25A a été retrouvée dans des échantillons de moelle et de rate d'un modèle de souris *knock-in* exprimant l'allèle de *JAK2<sup>V617F</sup>* de manière constitutive et hétérozygote et possédant une expression de l'oncogène similaire au niveau physiologique (Marty et al., 2010) (résultats 3). Ces souris développent un phénotype de NMP sévère avec TE, MV, splénomégalie et MFP.



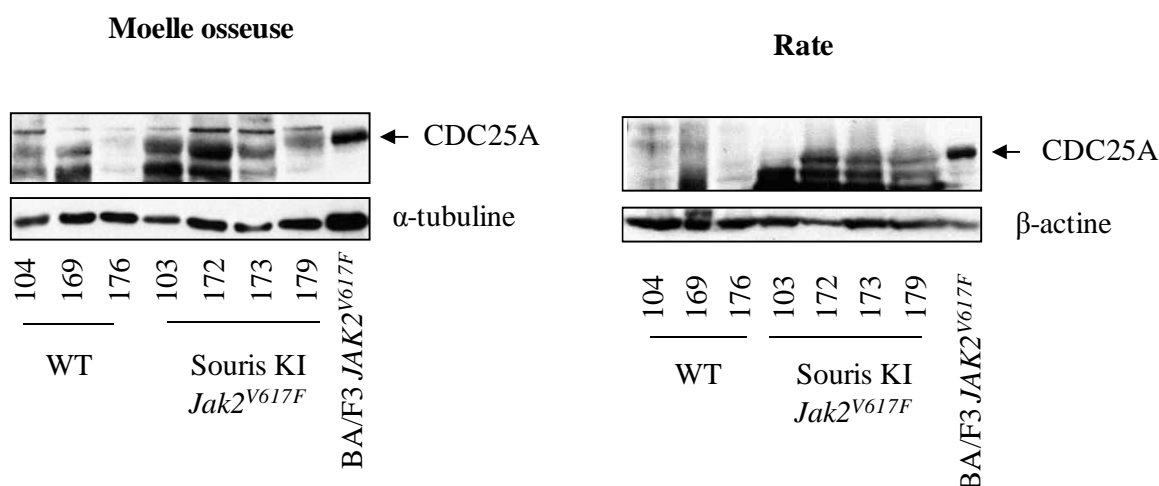
**A****B**

Contrôles sains

Moelle osseuse  $JAK2^{V617F}$ **C**

**Résultat 2 : CDC25A est surexprimée dans des cellules de patients atteints de NMP possédant la mutation  $JAK2^{V617F}$**

(A) L'expression de CDC25A est analysée par western blot dans des cellules CD36<sup>+</sup> purifiées à partir de moelle osseuse de 4 patients  $JAK2^{V617F}$  (MV = maladie de Vaquez, TE = thrombocytémie essentielle) et de 3 donneurs sains (DS) ; (B) Des coupes de moelle de 3 patients  $JAK2^{V617F}$  et de 2 contrôles sains sont soumises à une analyse de l'expression de CDC25A par immunohistochimie. Sont montrées des photographies représentative d'une moelle positive pour  $JAK2^{V617F}$  et d'une moelle contrôle ; (C) Des progéniteurs CD34<sup>+</sup> triés à partir de moelle d'un patient atteint de maladie de Vaquez (MV) possédant la mutation, de 2 patients atteints de thrombocytémie essentielle (TE) possédant la mutation et de 2 donneurs sains sont mis en culture liquide dans un milieu de différenciation érythroïde. Au bout de 7 jours, jour correspondant au stade de proérythroblaste, les cellules sont prélevées et soumises à une analyse de l'expression de CDC25A par western blot. La présence des antigènes de surface CD36 et GPA est analysée par cytométrie en flux.



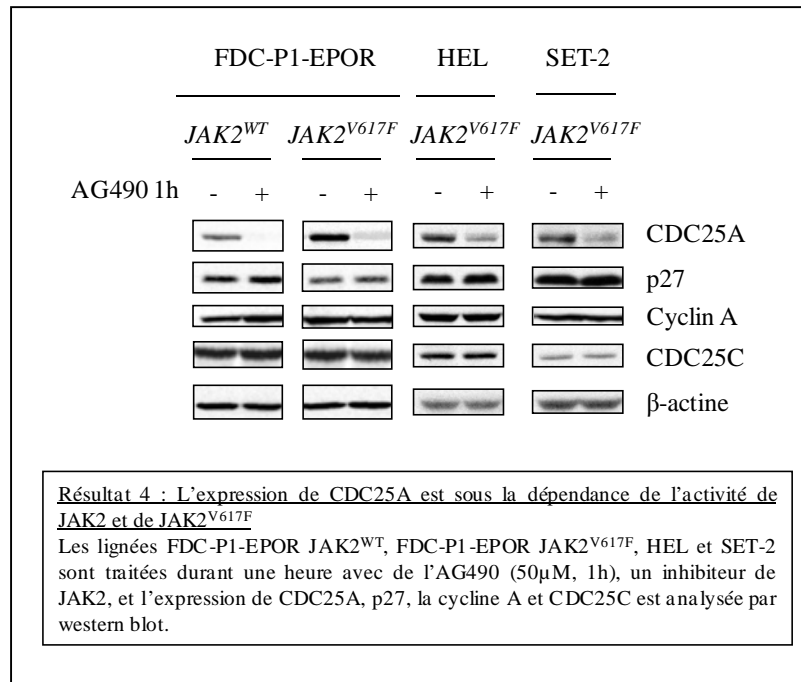
**Résultat 3 : CDC25A est surexprimée dans des échantillons de moelle osseuse et de rate de souris possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>**

L'expression de CDC25A est analysée par western blot dans des échantillons de moelle osseuse et de rate de 3 souris contrôles et de 4 souris *knock-in* possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. L'expression de CDC25A dans la lignée BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup> est utilisée comme contrôle de poids moléculaire. Le niveau de β-actine ou de α-tubuline est utilisé comme contrôle de dépôt.

**L'activité kinase de JAK2 et JAK2<sup>V617F</sup> est requise pour la régulation de CDC25A.**

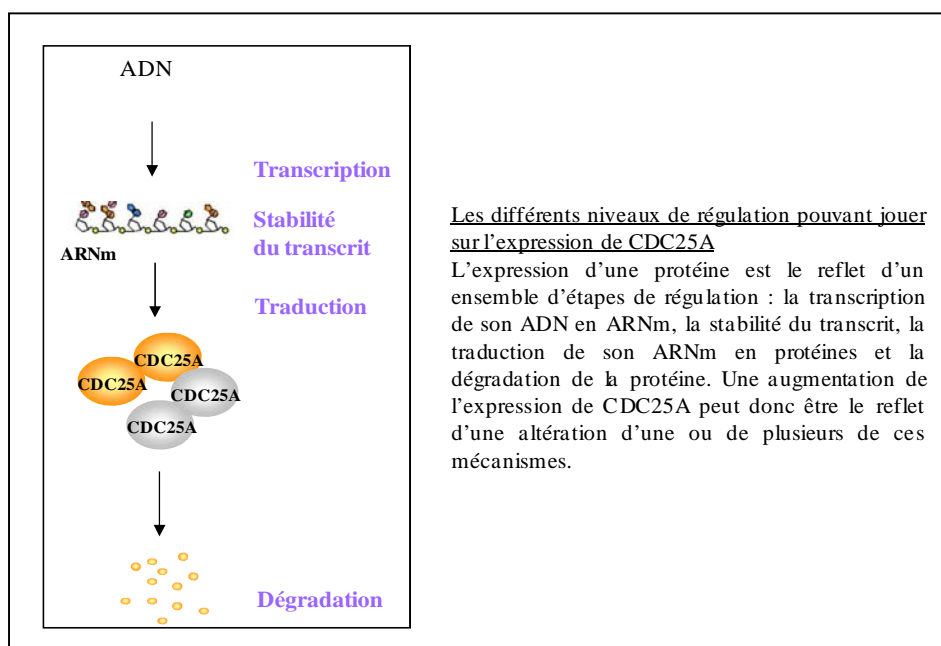
Afin d'évaluer si JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une dérégulation de l'expression de CDC25A *via* son activité kinase, et non une dérégulation indirecte de la phosphatase *via* une augmentation de la prolifération cellulaire, nous avons analysé le statut de CDC25A suite à l'inhibition pharmacologique de l'activité de JAK2<sup>V617F</sup> par l'AG490 (résultat 4) ou le JAK2 inhibitor II. Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité de JAK2 et de JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une diminution extrêmement rapide de l'expression de CDC25A, et ce dès 30 minutes (figure 3A de la publication). L'expression des autres protéines du cycle cellulaire testées reste inchangée après une heure d'inhibition et notamment l'expression de la cycline A utilisée comme marqueur de prolifération cellulaire et du CDKI p27<sup>kip1</sup> qui est un autre acteur de la transition G1/S dont l'expression est diminuée en présence de la mutation (Walz et al., 2006).

Ces résultats suggèrent que la surexpression de CDC25A observée en aval de l'oncogène dépend de l'activité kinase de JAK2<sup>V617F</sup>.



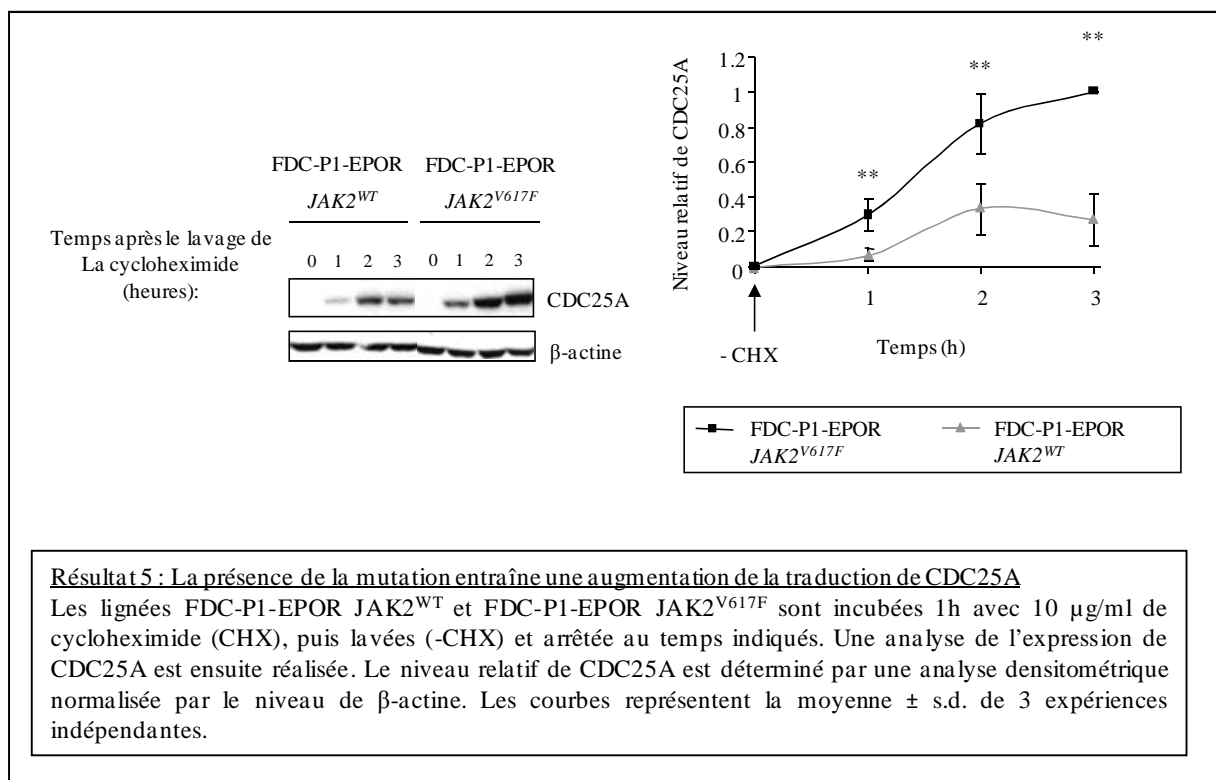
### Analyse du niveau de dérégulation de CDC25A en aval de JAK2<sup>V617F</sup>

Nous avons ensuite étudié le niveau de dérégulation de CDC25A. L'expression de CDC25A peut être régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, traductionnel ou au niveau de la dégradation de la protéine.



Les résultats des expériences de PCR quantitatives réalisées sur les lignées cellulaires ne montrent pas d'augmentation du taux de transcrite de CDC25A en présence de la mutation ni même d'inhibition de celui-ci suite à l'inhibition pharmacologique de l'activité de JAK2<sup>V617F</sup> (figure supplémentaire 3 de l'article). Ces résultats suggèrent que la surexpression de CDC25A observée en aval de l'oncogène ne fait pas intervenir une dérégulation de la transcription ou une stabilisation de son ARNm comme cela avait été décrit en aval de NPM-ALK.

La phosphatase CDC25A est finement régulée au niveau de sa stabilité et ce mécanisme est retrouvé dans les cancers solides. Cependant, dans notre modèle, nous n'avons pas retrouvé de différence de stabilité de la protéine en aval de JAK2 sauvage et de JAK2 muté (figure 4A de l'article). Ceci suggère que la stabilité de la protéine n'est pas non plus concernée par la dérégulation entraînée par JAK2<sup>V617F</sup>.



La transcription, la stabilité du transcrite et la stabilité de la protéine CDC25A n'étant pas altérées en aval de la mutation JAK2<sup>V617F</sup>, l'ensemble de ces résultats mènent à penser à une dérégulation traductionnelle de la phosphatase.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la cinétique de re-synthèse de la phosphatase dans la ligné FDC-P1 possédant JAK2<sup>WT</sup> et celle possédant JAK2<sup>V617F</sup> suite à

l'inhibition de son expression protéique par un traitement à la cycloheximide (résultat 5). Les résultats obtenus montrent une réexpression protéique de CDC25A plus rapide et plus forte en aval de l'oncogène.

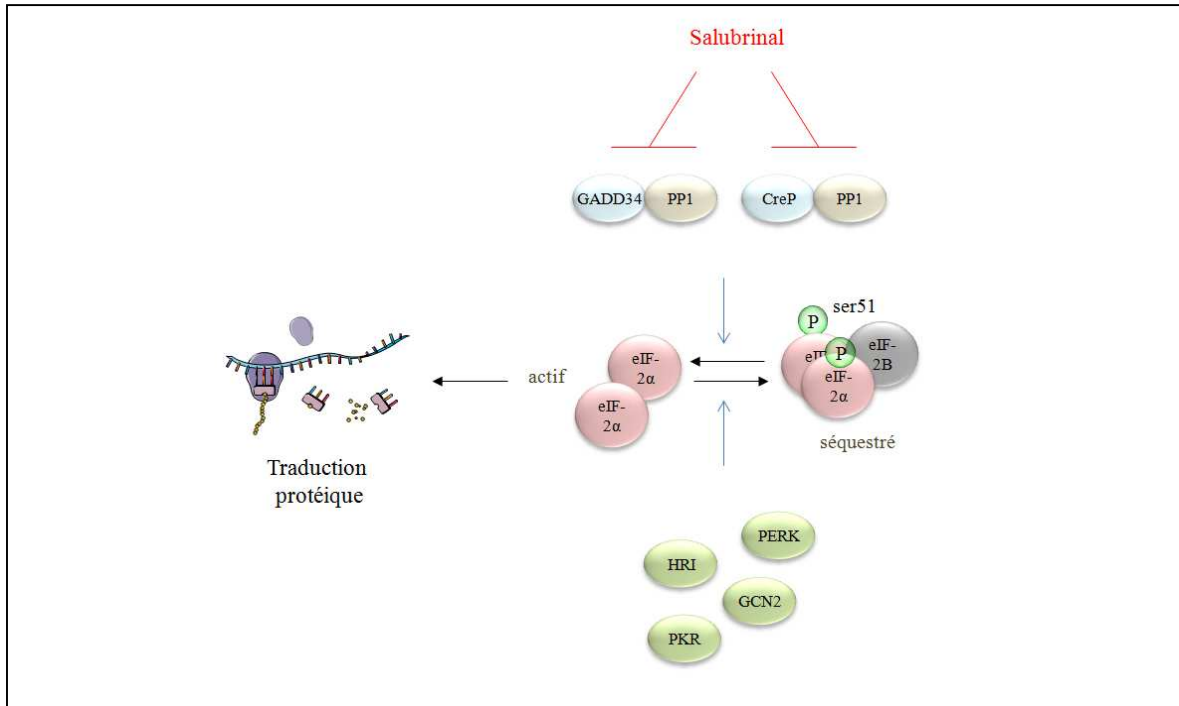
Ces résultats suggèrent que la mutation JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une augmentation de la traduction de l'ARNm de CDC25A en protéines.

### **Implication de la phosphorylation sur sérine 51 du facteur d'initiation de la traduction cap-dépendante eIF-2 $\alpha$ dans la dérégulation traductionnelle de CDC25A**

Par la suite, nous avons analysé une potentielle dérégulation de différents acteurs de la traduction décrits dans les données bibliographiques comme pouvant réguler la phosphatase. Nous avons notamment testé l'implication du microARN let-7a, décrit comme étant sous-exprimé en aval de l'oncogène (Bruchova et al., 2008) et qui est un régulateur négatif de CDC25A (Johnson et al., 2007), (Huang et al., 2007); et de la voie PI3K/Akt/mTOR, car les données bibliographiques montrent une augmentation de la phosphorylation d'Akt en aval de l'oncogène et mTOR est un régulateur clé de la traduction de par sa phosphorylation activatrice de p70S6K et inhibitrice de 4E-BP1 souvent dérégulé dans les cancers (Clemens, 2004). Cependant, le taux de let-7a et le statut de phosphorylation de la sérine 473 de Akt, de la thréonine 70 de 4E-BP1 et de la thréonine 289 de p70S6K restent inchangés suite à l'inhibition de l'activité de JAK2<sup>V617F</sup> dans la lignée murine FDC-P1-EPOR JAK2<sup>V617F</sup> par un traitement d'une heure à l'AG490. De plus, un traitement court des cellules au LY294002 ou à la Wortmanine, deux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt, n'entraîne pas de diminution de l'expression de CDC25A dans cette même lignée.

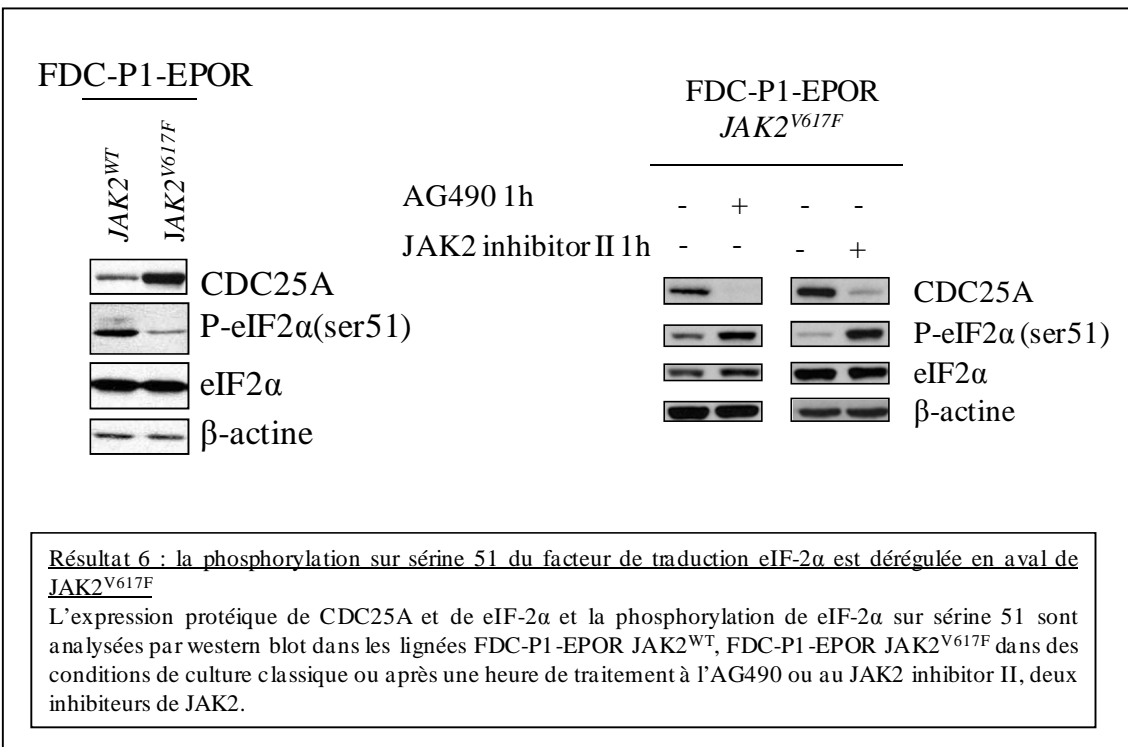
A l'issue de cette analyse, nous avons mis en évidence une dérégulation du facteur d'initiation de la traduction cap-dépendante eIF-2 $\alpha$  en aval de JAK2<sup>V617F</sup> et plus particulièrement une dérégulation de sa phosphorylation sur sérine 51. Les mécanismes de régulation de eIF-2 $\alpha$  par sa phosphorylation sur sérine 51 sont représentés dans la figure 29.

Nous observons que eIF-2 $\alpha$  est moins phosphorylé dans les lignées cellulaires possédant JAK2<sup>V617F</sup> que dans les lignées contrôles (résultat 6). De plus, l'inhibition pharmacologique de JAK2<sup>V617F</sup> par l'AG490 ou le JAK2 inhibiteur II entraîne une phosphorylation de ce facteur observée après une heure de traitement.

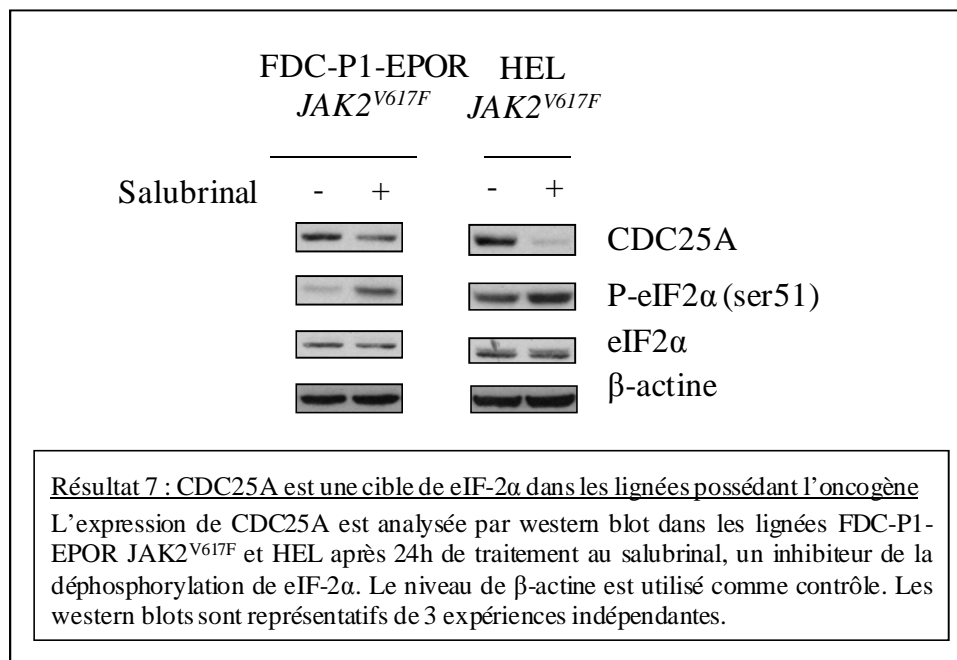


**Figure 29 : Représentation schématique de la régulation de eIF-2α par sa phosphorylation sur sérine 51**

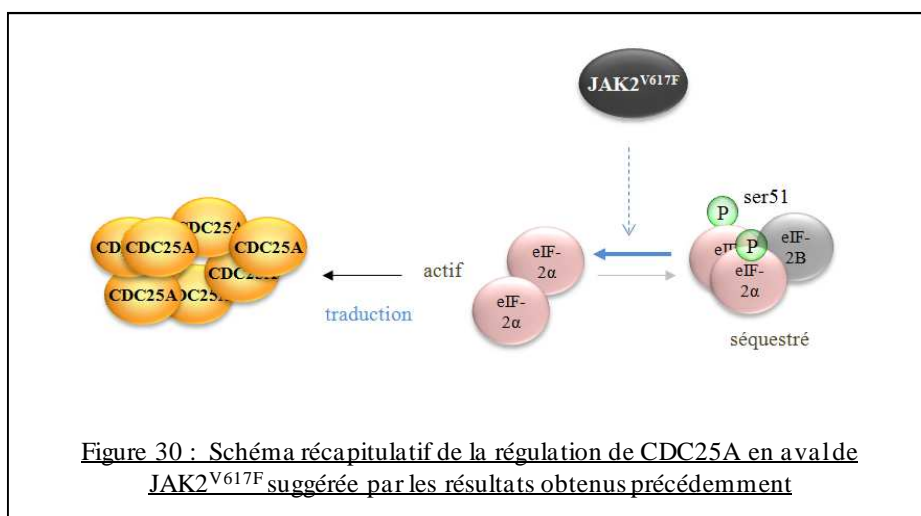
Le facteur d'initiation de la traduction cap-dépendante eIF-2α est actif à l'état non phosphorylé. Son rôle est de favoriser la traduction des ARNm en protéines en apportant l'ARN de transfert et la méthionine nécessaire à l'initiation de la traduction à la sous-unité ribosomique 40S. Les kinases PKR, HRI, PERK et GCN2 peuvent phosphoryler la sérine 51 du facteur eIF-2α, ce qui entraîne sa séquestration par eIF-2B. eIF-2α ne peut donc plus assurer sa fonction et la traduction générale est altérée. Les complexes PP1/GADD34 et PP1/CreP permettent la déphosphorylation de la sérine 51 de eIF-2α rétablissant ainsi sa fonction. Le salubrinal est un inhibiteur des complexes PP1/GADD34 et PP1/CreP qui empêche la déphosphorylation de la sérine 51 de eIF-2α et donc le maintien à un état actif.



Afin de vérifier que la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  est bien impliquée dans la régulation de l'expression de CDC25A en aval de JAK2<sup>V617F</sup>, nous avons utilisé le salubrinal, un inhibiteur qui induit la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  et donc inhibe sa fonction (voir figure 29). Les résultats montrent que la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  induite par le salubrinal est concomitante à l'inhibition d'expression de CDC25A (résultat 7).

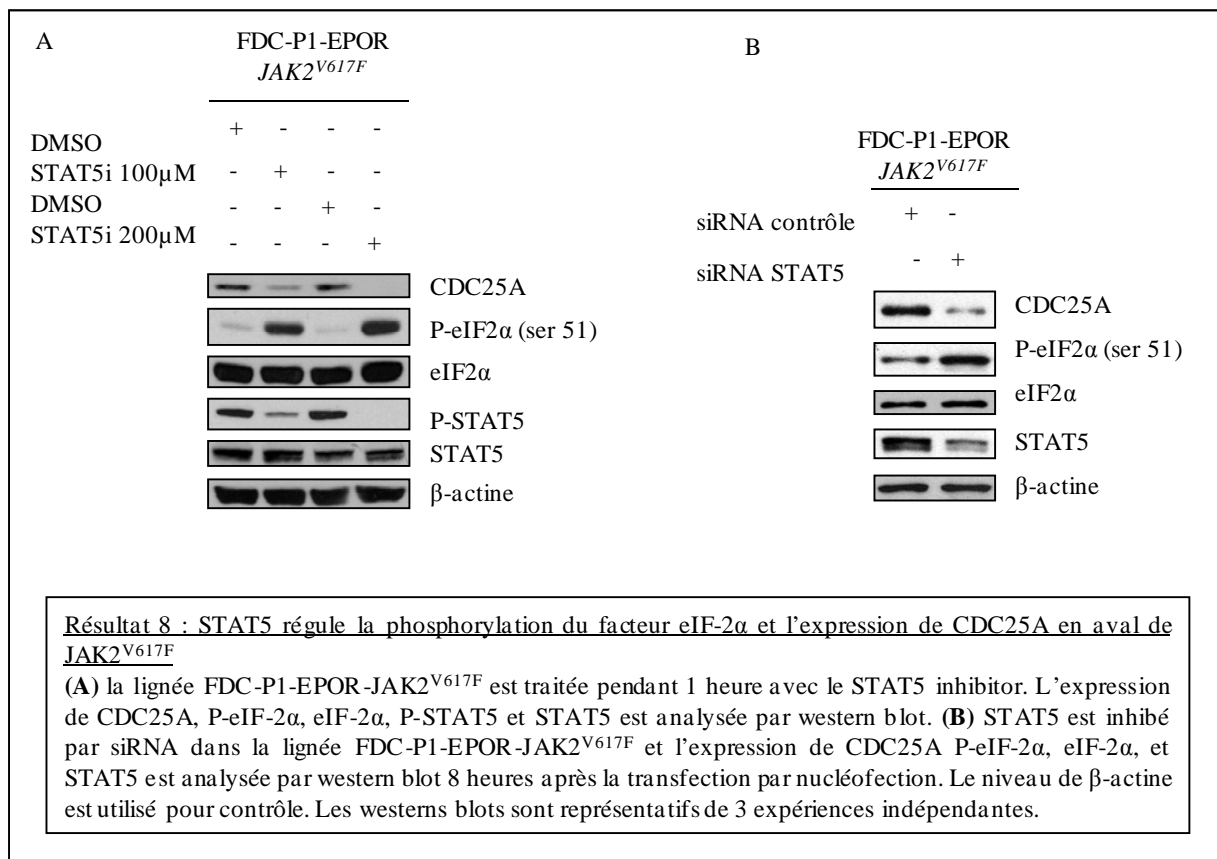


L'ensemble de ces résultats suggèrent que la levée de la phosphorylation inhibitrice de eIF-2 $\alpha$  par JAK2<sup>V617F</sup> pourrait être impliquée dans la dérégulation de CDC25A observée en aval de l'oncogène.



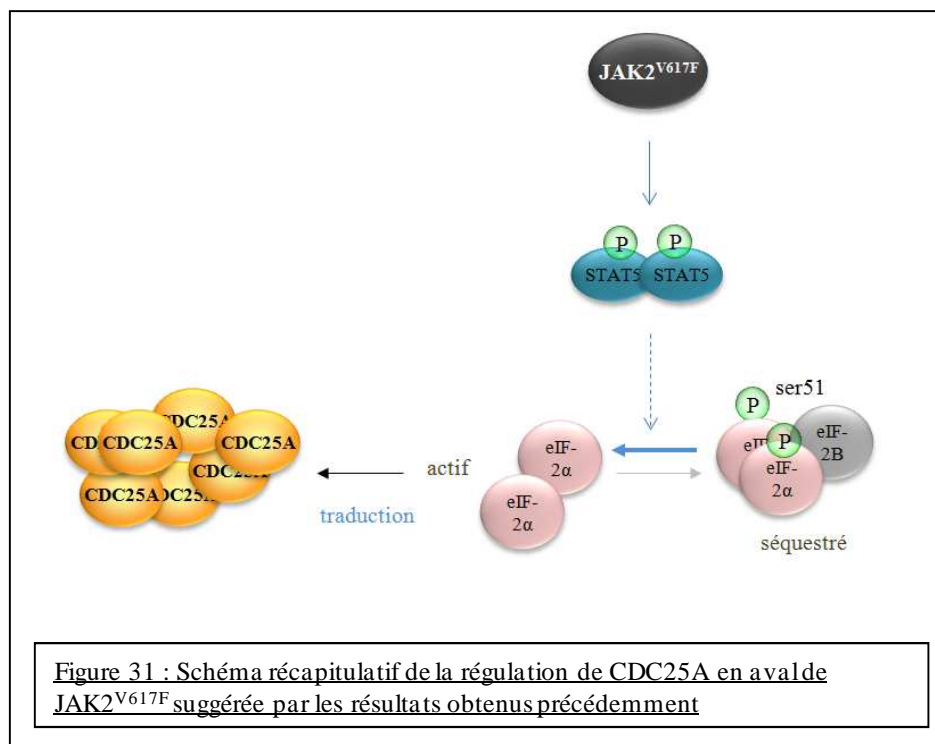
**Implication du facteur de transcription STAT5 dans la régulation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  et de CDC25A en aval de l'oncogène**

Les résultats précédents suggèrent une dérégulation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  en aval de l'oncogène. Cependant, aucune donnée bibliographique ne décrit de lien entre JAK2 et le facteur eIF-2 $\alpha$ . Nous avons analysé une potentielle implication des voies de signalisation connues pour être dérégulées en aval de l'oncogène. Les expériences d'inhibition pharmacologique n'ont pas mis en évidence d'implication des voies des MAPK et de la PI3K/Akt (figure supplémentaire 2 de l'article). En revanche, l'inhibition de STAT5 par inhibiteur pharmacologique et par siRNA entraîne, à la fois, une phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  sur sérine 51 et une inhibition de l'expression de CDC25A (résultat 8).



Ces résultats suggèrent que le facteur STAT5 est impliqué dans la régulation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  et l'expression de CDC25A en aval de l'oncogène.





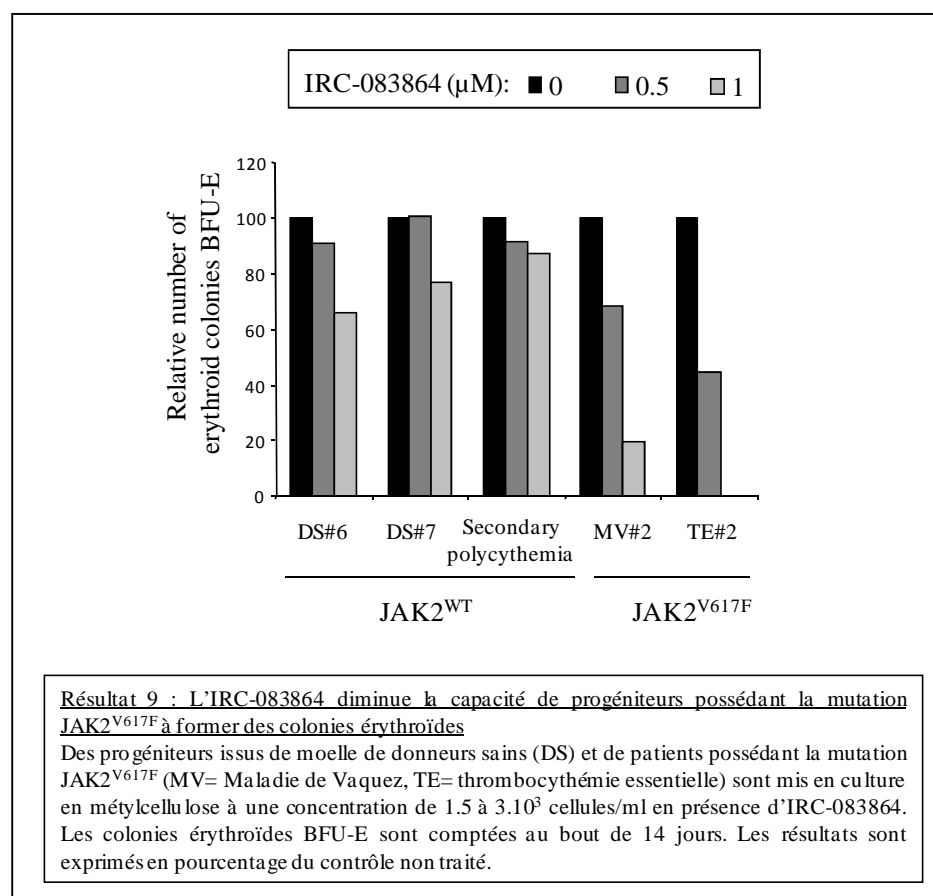
### Impact de l'inhibition de CDC25A sur la capacité des progéniteurs à former des colonies érythroïdes.

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'inhibiteur pharmacologique spécifique de CDC25A. Cependant, de nombreux inhibiteurs des CDC25 sont en développement. L'IRC-083864 est compté parmi les plus efficaces de ces inhibiteurs (Brezak et al., 2009). Ce composé a montré son efficacité chez la souris en diminuant la croissance tumorale induite par des xénogreffes de LNCaP, une lignée de tumeur de la prostate et MIA PaCa-2, une lignée de tumeur pancréatique. Il est actuellement testé en phase clinique de type II sous le nom de Debio 0931 (Lavecchia et al., 2010). Nous avons testé l'impact de cet inhibiteur sur la capacité de progéniteurs CD34<sup>+</sup> (normaux et de patients JAK2 mutés) à former des colonies érythroïdes (BFU-E) en méthylcellulose (résultat 9).

L'IRC-083864 inhibe la formation des BFU-E de manière dose-dépendante dans les échantillons issus de patients portant la mutation (n=2). Dans les mêmes conditions, la croissance des BFU-E de donneurs sains (n=2) ou d'un patient atteint de polyglobulie secondaire (n=1) est peu affectée (résultat 9).

Une des caractéristiques des NMP Philadelphie négatives classiques est la capacité des progéniteurs à former des colonies érythroïdes en absence d'EPO. Ces colonies sont nommées

colonies érythroïdes endogènes (CEE). Or, l'impact de l'inhibition des CDC25 dans les progéniteurs de patients est également observé sur la formation des CEE (figure 7A de l'article).

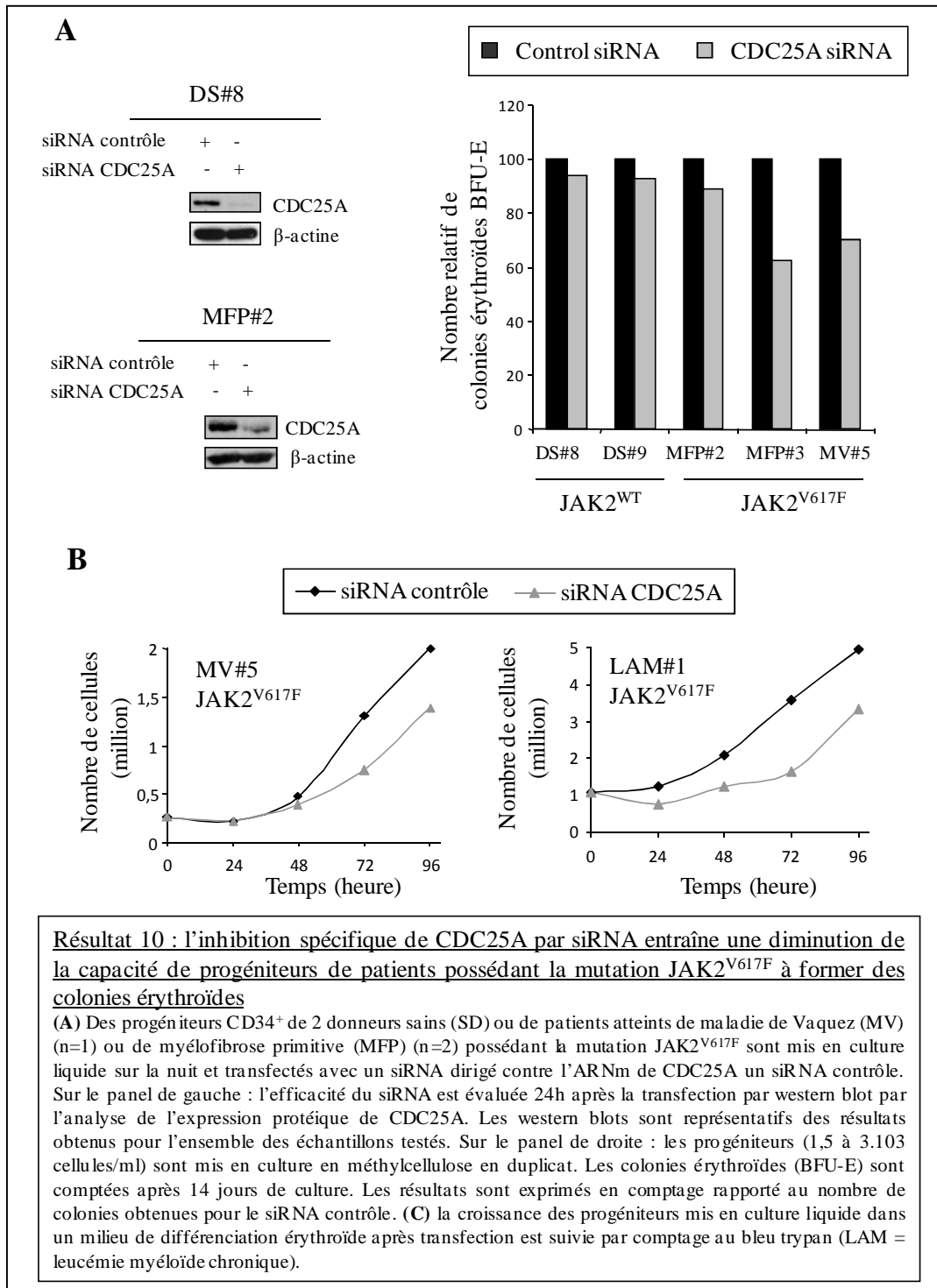


Afin de confirmer que les effets observés sont bien la conséquence de l'inhibition de CDC25A, nous avons réalisé la même expérience en inhibant CDC25A de manière spécifique par siRNA (résultat 10 A). Nos résultats montrent que cette inhibition réduit également la capacité de progéniteurs de deux patients atteints de NMP JAK2 mutés à former des BFU-E. En revanche, la capacité des progéniteurs du troisième patient, tout comme des progéniteurs de donneurs sains, à former des BFU-E n'est que très peu affectée. En corrélation avec les résultats observés avec l'inhibiteur, l'effet de l'inhibition spécifique de CDC25A a également été retrouvé sur la capacité des progéniteurs de patients à former des CEE (Figure 7B de l'article, panel de droite). Enfin, l'inhibition spécifique de CD25A diminue également la croissance de progéniteurs de patients en milieu liquide (résultat 10 B).

Notons également que le salubrinal qui, nous l'avons vu précédemment, inhibe eIF-2 $\alpha$  et diminue l'expression protéique de CDC25A, inhibe la croissance de la lignée FDC-P1-

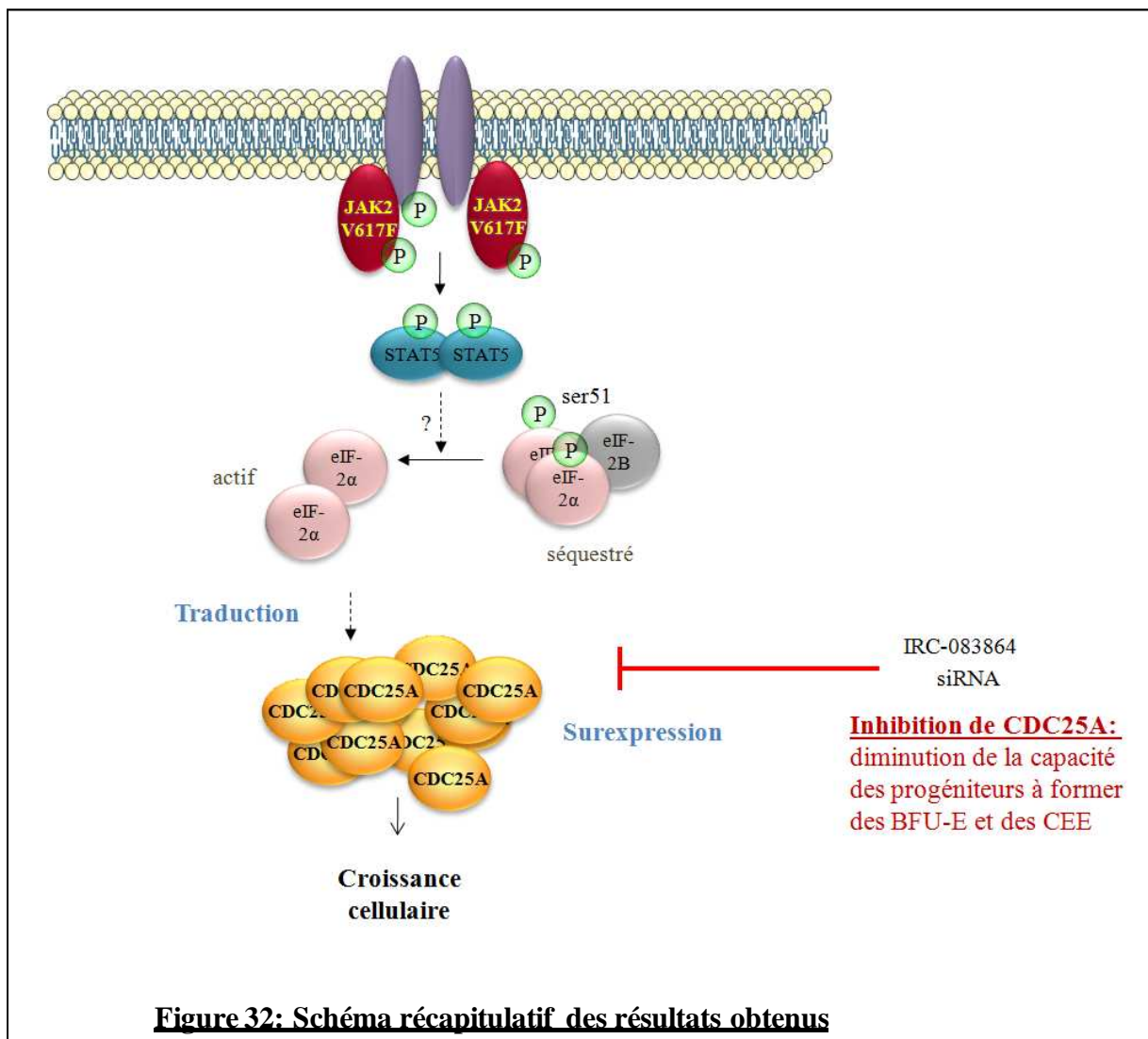
EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> et de progéniteurs de patients atteints de NMP possédant la mutation (figure 5C de l'article).

L'ensemble de ces résultats suggèrent une sensibilité accrue des progéniteurs de patients possédant la mutation vis-à-vis de l'inhibition de CDC25A et ouvre la perspective d'une fenêtre thérapeutique.



## D. Conclusion, discussion et perspectives

En conclusion, cette étude a mis en évidence une dérégulation de CDC25A menant à sa surexpression dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Cette dérégulation fait intervenir le facteur de transcription STAT5 et une levée de la phosphorylation inhibitrice de eIF-2 $\alpha$  menant à une augmentation traductionnelle de la phosphatase. De plus, l'inhibition de CDC25A dans les progéniteurs de patients portant la mutation diminue leur capacité à former des colonies érythroïdes alors qu'elle n'a que peu d'effet sur les progéniteurs de donneurs sains.



**Figure 32: Schéma récapitulatif des résultats obtenus**

Cependant ces observations soulèvent de nombreuses questions.

### **Lien entre le facteur de transcription STAT5 et la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$**

Nos résultats suggèrent que JAK2<sup>V617F</sup> lève la phosphorylation inhibitrice du facteur d'initiation de la traduction cap-dépendante eIF-2 $\alpha$  *via* l'activation de STAT5. Cependant, contrairement à la relation entre l'oncogène et STAT5 qui est aujourd'hui bien établie, le lien entre le facteur de transcription STAT5 et la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  n'est pas connu.

Des travaux antérieurs avaient déjà mis en évidence une régulation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  par STAT5. En effet, la déplétion de STAT5 dans des érythroblastes induit une augmentation de la phosphorylation de la sérine 51 du facteur eIF-2 $\alpha$ . Cependant, le mécanisme de cette régulation n'est pas élucidé (Kerenyi et al., 2008).

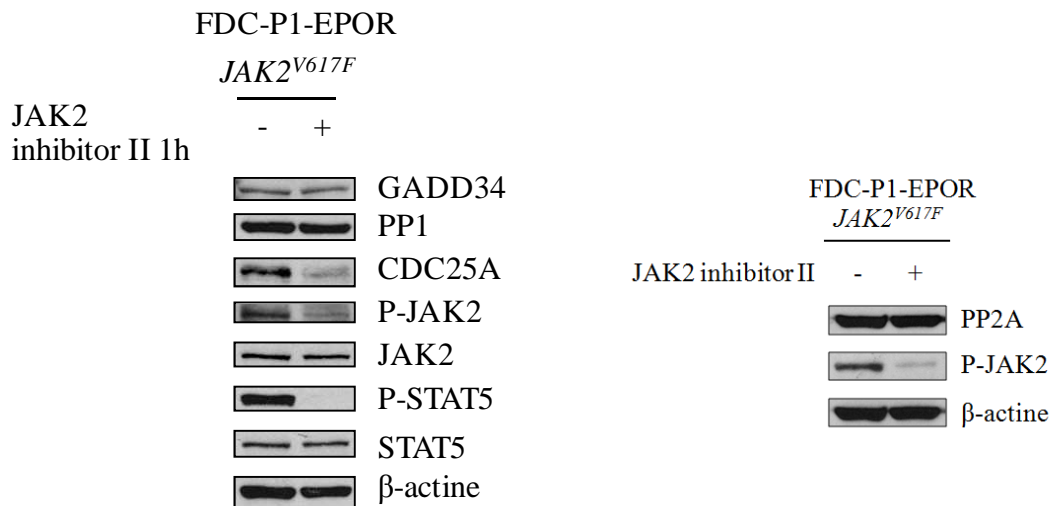
La régulation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  implique, d'une part, les phosphatases PP1 et PP2A, et d'autre part, les kinases PKR, HRI, PERK et GCN2. Cependant, aucune donnée bibliographique ne suggère de régulation de ces acteurs par STAT5. Les possibilités de dérégulation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  sont donc nombreuses (voir figure 33). Les principales hypothèses concernant cette dérégulation en vue des données bibliographiques sont présentées ci-dessous.

- **Hypothèses de régulation impliquant l'activité transcriptionnelle de STAT5**

STAT5 est un facteur de transcription mais son inhibition n'influence pas l'expression protéique de eIF-2 $\alpha$  suggérant une régulation indirecte de eIF-2 $\alpha$ . Nous avons donc émis l'hypothèse d'une augmentation de la transcription d'une phosphatase de eIF-2 $\alpha$ , *via* STAT5 en aval de l'oncogène. Cependant, nous n'avons pas trouvé de variation du taux protéique des phosphatases PP1 et PP2A suite à l'inhibition de l'activité de la voie JAK2<sup>V617F</sup> - STAT5 (résultat supplémentaire 1.1).

Ces résultats suggèrent que l'action de STAT5 sur eIF-2 $\alpha$  ne fait pas intervenir la régulation transcriptionnelle de PP1, ni de PP2A.

Les phosphatases PP1 et PP2A sont en grande partie régulées par leur association avec des protéines régulatrices (Cohen, 2002). De plus, le salubrinal agit à la fois sur les complexes PP1/GADD34 et PP1/CreP (Boyce et al., 2005) (figure 29 page 80). La phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  en aval de JAK2<sup>V617F</sup> et STAT5 pourrait donc faire intervenir la régulation transcriptionnelle de GADD34 ou de CreP ou d'un autre complexe ciblé par le salubrinal non décrit à ce jour.



Résultat supplémentaire 1.1: Analyse de l'expression protéique de PP1, PP2A et GADD34 suite à l'inhibition de l'activité de JAK2<sup>V617F</sup>

La lignée FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> est traitée durant 1h au JAK2 inhibiteur II, un inhibiteur de JAK2, et l'expression protéique de PP1, PP2A et GADD34, CDC25A, P-JAK2, JAK2, P-STAT5 et STAT5 est analysée par western blot. Le niveau d'expression de la  $\beta$ -actine est utilisé comme contrôle.

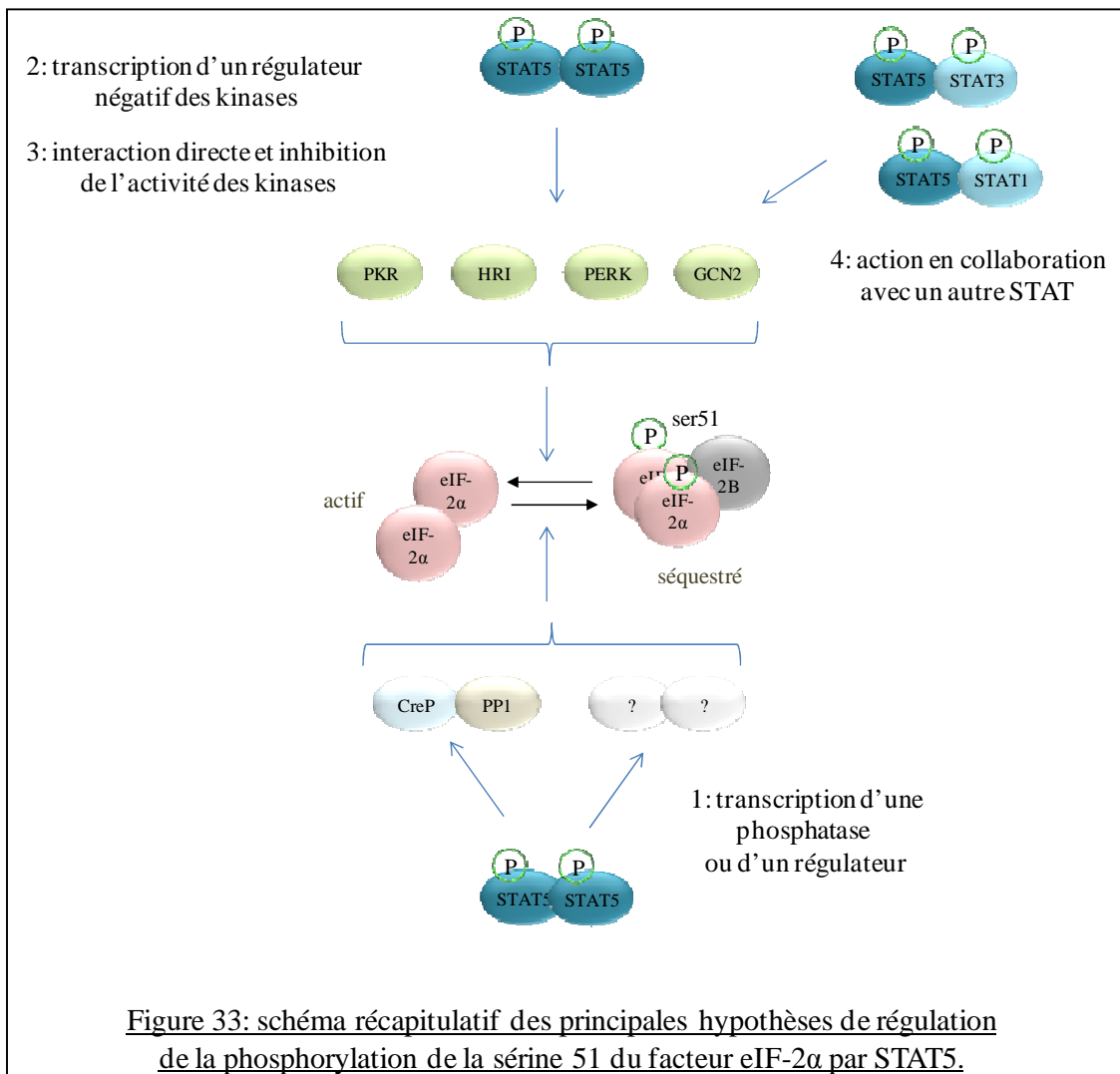
L'inhibition de l'activité de JAK2<sup>V617F</sup> dans la lignée FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> n'entraîne pas de diminution de l'expression GADD34 suggérant que la transcription de ce régulateur n'est pas non plus impliquée (résultat supplémentaire 1.1). L'analyse de l'expression de CreP pourrait nous donner des éléments de réponse quant à l'implication de ce régulateur. L'évaluation de l'implication d'un autre complexe nécessiterait des analyses protéomiques.

L'expression de PKR est altérée dans certains cancers (Blalock et al., 2010). Une diminution de l'expression de cette kinase ainsi que de HRI, PERK et GCN2 en aval de la voie JAK2<sup>V617F</sup>/STAT5 est donc envisageable.

Les kinases PKR, HRI, GCN2 et PERK possèdent des sites de phosphorylation régulant leur activité. Akt peut ainsi inhiber l'activité de PERK en le phosphorylant sur thréonine 799 (Mounir et al., 2011). Une analyse prédictive de la phosphorylation de ces kinases révèle un grand nombre de sites de phosphorylation potentiels. STAT5 pourrait donc induire la transcription d'une protéine phosphorylant et inhibant ainsi une de ces kinases.

- Hypothèses de régulation indépendante de l'activité transcriptionnelle de STAT5

Bien que les STATs soient des facteurs de transcription, des données bibliographiques suggèrent qu'ils peuvent agir indépendamment de leur activité transcriptionnelle (Wong et al., 2001), (Chaix et al., 2011). Dans ce sens, STAT1, un autre membre de la famille des STATs, interagit avec le domaine kinase de PKR et inhibe son activité kinase *in vitro* et chez la levure, indépendamment de son rôle d'activateur de la transcription, par un mécanisme encore indéterminé nécessitant l'interaction des deux protéines (Wong et al., 2001). De plus, la déplétion de STAT1 chez la levure entraîne une augmentation de l'activité de PKR qui devient 5 fois plus importante. On peut donc également penser à une action directe de STAT5 sur l'activité d'une de ces kinases, de manière similaire à STAT1. De plus, les STATs peuvent tout aussi bien s'hétérodimériser que s'homodimériser. STAT5 pourrait donc agir en collaboration avec STAT1 ou un autre membre de sa famille.



De plus, Su *et al* ont montré que JAK2 peut phosphoryler le domaine catalytique de PKR sur tyrosine *in vitro* (Su et al., 2007). On pourrait donc encore penser à une régulation impliquant une phosphorylation de PKR par JAK2 comme par exemple une compétition pour des sites d'interaction.

Des expériences de déplétion par siRNA et d'analyse des interactions protéiques par immunoprécipitation et imagerie confocale ainsi que des tests d'activité kinase et phosphatase seraient nécessaires afin d'élucider ce mécanisme d'action.

### **La déphosphorylation de eIF-2 $\alpha$ observée en aval de l'oncogène est-elle suffisante pour entraîner une augmentation de la traduction ?**

Les données bibliographiques montrent qu'une faible variation de la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$  suffit pour entraîner une modification de la traduction des ARNm en protéines (Wek et al., 2006). Nous pouvons par conséquent supposer que la déphosphorylation observée en aval de JAK2<sup>V617F</sup> est suffisante pour entraîner une augmentation de la traduction. Cependant, afin de répondre à cette question, des expériences complémentaires sont nécessaires telles qu'une analyse comparative du profil global de la traduction en aval de la lignée FDC-P1-EPOR JAK2<sup>WT</sup> et de la lignée FDC-P1-EPOR JAK2<sup>V617F</sup> ainsi qu'après une inhibition de l'activité de JAK2<sup>V617F</sup>. L'analyse du profil global de la traduction pourra être évaluée par la technique SUnSET, une technique non-radioactive mise en place récemment (Schmidt et al., 2009). Dans cette technique, les cellules sont incubées avec de la puromycine, un antibiotique qui se fixe aux peptides néosynthétisés, et son incorporation est révélée par western blot à l'aide d'un anticorps anti-puromycine.

### **Lien entre eIF-2 $\alpha$ et CDC25A**

Nos résultats suggèrent un lien entre la phosphorylation sur sérine 51 de eIF-2 $\alpha$  et l'expression de CDC25A. Dans le seul travail ayant mis en évidence ce mode de régulation, les auteurs suggèrent qu'un composé entraînant un stress oxydatif (le SNCEE) inhibe la traduction de CDC25A via la phosphorylation du facteur eIF-2 $\alpha$ , favorisant ainsi une réponse apoptotique (Tomko and Lazo, 2008). Une autre étude menée par Matthieu Lemaire et ses collègues montre une régulation traductionnelle d'un autre membre de la famille des CDC25, CDC25B, via la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  en réponse aux rayonnements ultra-violets (Lemaire et al., 2010). Cependant, le lien entre la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  et la traduction



de CDC25A, même s'il est fortement suggéré, n'a jamais vraiment été démontré. Dans notre étude, des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de renforcer ce lien, notamment l'introduction d'une forme non phosphorylable de eIF-2 $\alpha$  en parallèle de l'inhibition de STAT5 et l'analyse de l'interaction de eIF-2 $\alpha$  avec l'ARNm de CDC25A. Il serait également intéressant d'évaluer l'état de phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  dans les coupes de moelles testées en immunohistochimie dans nos travaux ainsi que dans des précurseurs de patients et des échantillons de souris par western blot, comme nous l'avons fait pour CDC25A.

### **Comment peut-on expliquer la variabilité inter-patient concernant la surexpression de CDC25A**

Nous n'avons pas retrouvé de surexpression de CDC25A dans un des échantillons de progéniteurs/précurseurs CD36<sup>+</sup> de patient testés (Figure 2A de l'article) alors que les analyses de discrimination allélique montrent un rapport JAK2<sup>V617F</sup>/JAK2<sup>WT</sup> élevé pour cet échantillon. Cependant, ce rapport analysé au niveau de l'ADN, ne nous donne pas l'expression protéique de l'oncogène ni son activité. Cette variabilité peut donc être la conséquence d'une différence du taux d'activité de JAK2<sup>V617F</sup> dans les cellules. Aussi, ces cellules pourraient avoir d'autres altérations de la signalisation cellulaire régulant négativement l'expression de CDC25A. De plus, il est possible que le patient pour lequel nous n'observons pas de surexpression de CDC25A au niveau des cellules CD36<sup>+</sup> possède une surexpression de la phosphatase dans un autre compartiment cellulaire.

Le nombre peu élevé d'échantillons ne nous permet pas de corréler la surexpression de CDC25A à un pronostic ou d'autres caractéristiques de ces pathologies, ni d'évaluer la fréquence de surexpression de CDC25A dans le cas des NMP positives pour JAK2<sup>V617F</sup>.

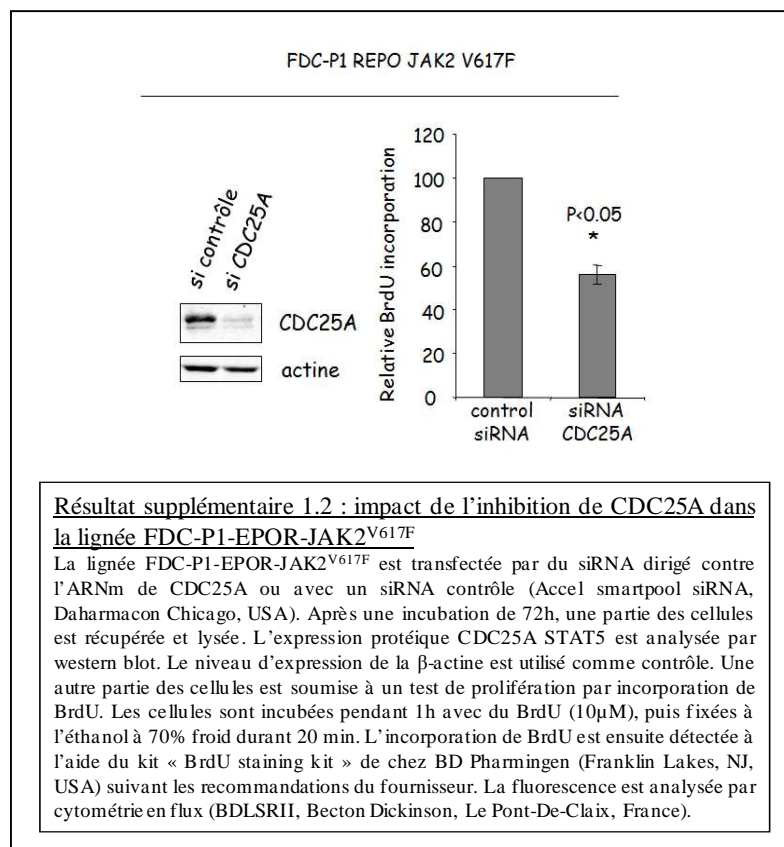
### **Fonction de CDC25A en aval de JAK2<sup>V617F</sup>**

Nos études ont été réalisées sur des lignées cellulaires mais également sur des cellules de patients. Dans les NMP Philadelphie négatives, la recherche de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> est effectuée au diagnostic sur le sang, les prélèvements de moelle osseuse étant exceptionnels et ne concernant que les cas de diagnostic difficile JAK2<sup>V617F</sup> négatifs. Nous avons donc été limités dans notre étude quant au rôle exact de CDC25A.

Dans nos travaux, nous observons une surexpression de CDC25A dans les cellules JAK2<sup>V617F</sup> notamment au niveau des précurseurs myéloïdes. Divers travaux suggèrent que la

présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une amplification myéloïde terminale et qu'elle favorise la transition G1/S (Dupont et al., 2007), (Anand et al., 2011), (Bruchova et al., 2009). Etant donné le rôle de CDC25A dans la transition G1/S, on peut supposer que sa surexpression participe à l'effet oncogénique de JAK2 en favorisant la prolifération cellulaire. Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'inhibition de CDC25A par siRNA dans la lignée FDC-P1 possédant l'oncogène entraîne une diminution de la prolifération cellulaire (résultat supplémentaire 1.2).

L'inhibition de CDC25A dans les cellules CD34<sup>+</sup> portant la mutation inhibe le nombre de BFU-E suggérant un rôle de CDC25A dans l'érythropoïèse précoce. De plus, le suivi de la croissance des cellules par comptage au bleu trypan montre un effet rapide de l'inhibition de CDC25A sur les CD34<sup>+</sup> de patients, qui n'est pas compensé par la suite, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette inhibition transitoire entraîne un effet visible à long terme (le comptage des colonies en méthylcellulose et réalisée 14 jours après la transfection).



On note cependant que, parmi les patients testés, le potentiel clonogénique de cellules CD34<sup>+</sup> d'un patient n'est pas affecté par l'inhibition de CDC25A. Cette absence de réponse

pourrait être due à une absence de surexpression de la phosphatase chez ce patient, une fenêtre de temps d'inhibition de la phosphatase moins importante ou encore à la présence d'une altération supplémentaire de voies de signalisation entraînant une résistance à la déplétion de CDC25A.

L'inhibition spécifique de CDC25A n'a qu'un très faible impact sur la capacité des progéniteurs sains à former des colonies érythroïdes. Ce phénomène surprenant est souvent observé lorsqu'on inhibe les CDC25 dans les cellules possédant une surexpression d'une ou plusieurs de ces phosphatases. On note par exemple que les cellules d'adénocarcinome du colon HCT116 ou les lignées d'adénocarcinome pancréatiques qui expriment un niveau plus important de CDC25B sont plus sensibles aux inhibiteurs de CDC25 (Boutros et al., 2007), (Guo et al., 2004). Nous avons déjà retrouvé une sensibilité plus importante vis-à-vis de l'IRC-083864 de lignées cellulaires possédant l'oncogène NPM-ALK surexprimant CDC25A en comparaison à des lignées contrôles. Cependant, nous n'avons pas pu comparer le niveau d'expression de CDC25A dans les progéniteurs CD34<sup>+</sup> de patients portant la mutation à ceux de donneurs sains en raison d'une trop faible quantité de progéniteurs obtenus après le tri cellulaire. Cette analyse pourrait nous permettre de savoir si une surexpression de la phosphatase dans ces échantillons pourrait expliquer ce différentiel. Ce phénomène pourrait également être lié à une fonction différente de CDC25A dans les cellules mutées.

Enfin, en plus de favoriser la prolifération cellulaire, la surexpression de CDC25A pourrait aussi participer à l'instabilité génomique observée dans les NMP par l'abrogation du point de contrôle G1/S, protéger les cellules contre l'apoptose induite par certains stress ou modifier la communication des cellules avec leur environnement. Ce sont des hypothèses qu'il serait également intéressant de tester.

### **Implication de eIF-2 $\alpha$ en aval de JAK2<sup>V617F</sup>**

La phosphorylation sur sérine 51 du facteur de traduction eIF-2 $\alpha$  est la cible de nombreux stress (tels que des infections virales, la déplétion en hème et le stress osmotique ou dû à la chaleur, la carence en acides aminés ou encore les UV et l'hypoxie). Il est également intéressant de noter que des données bibliographiques suggèrent une implication de ce facteur dans la transition G1/S face à ce stress. Par exemple, l'arrêt en G1 entraîné par l'hypoxie peut être inhibé par l'abolition de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  induite par ce stress (Liu et al., 2010). Il en est de même du délai de répllication de l'ADN entraîné par les UV (Tvegard et al., 2007). De plus, nos résultats suggèrent que eIF-2 $\alpha$  est un régulateur positif de CDC25A.

On peut donc penser que la déphosphorylation de eIF-2 $\alpha$  puisse conférer aux cellules possédant JAK2<sup>V617F</sup> une résistance à certains stress et ainsi un avantage de croissance. Dans ce sens, la mutation JAK2<sup>V617F</sup> confère aux cellules une résistance au TNF $\alpha$  alors qu'elle réduit la capacité clonale des progéniteurs sains, suggérant qu'un microenvironnement riche en TNF $\alpha$  pourrait favoriser une sélection du clone muté (Fleischman et al., 2011), or le taux de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF $\alpha$ , est élevé dans les NMP. D'autre part, l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  corrèle avec l'augmentation de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  et l'expression d'une forme non phosphorylable de ce facteur protège partiellement les cellules contre cette apoptose (Srivastava et al., 1998). On peut donc imaginer que la levée de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$  puisse participer à la résistance au TNF $\alpha$  observée en aval de l'oncogène.

De plus, des données bibliographiques montrent que la déplétion de GADD34, cible du salubrinal, entraîne une anémie chez la souris avec une réduction du taux d'érythroblastes tardifs au niveau du foie fœtal (Harding et al., 2009) et ce phénomène est en grande partie contrecarré par l'introduction d'une forme mutée non phosphorylable de eIF-2 $\alpha$ .

L'ensemble de ces résultats nous mènent à penser que eIF-2 $\alpha$  pourrait participer à l'expansion clonale observée dans les NMP possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup> en conférant aux cellules, et notamment celles de la lignée érythroïde, un avantage de croissance face à certains stress, entre autre en favorisant la transition G1/S.

Une analyse plus approfondie de la fonction de eIF-2 $\alpha$  en aval de JAK2<sup>V617F</sup> pourra donc nous permettre de savoir si ce facteur pourrait être impliqué dans la réponse au stress des cellules et dans leur transition G1/S ou si ce facteur possède d'autres fonctions en aval de l'oncogène.

# blood

2012 119: 1190-1199  
Prepublished online November 7, 2011;  
doi:10.1182/blood-2011-01-327742

## The cell cycle regulator **CDC25A** is a target for **JAK2<sup>V617F</sup>** oncogene

Emilie-Fleur Gautier, Muriel Picard, Camille Laurent, Caroline Marty, Jean-Luc Villeval, Cécile Demur, François Delhommeau, Elizabeth Hexner, Stéphane Giraudier, Nicolas Bonneville, Bernard Ducommun, Christian Récher, Guy Laurent, Stéphane Manenti and Véronique Mansat-De Mas

---

Updated information and services can be found at:  
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/119/5/1190.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections  
[Myeloid Neoplasia](#) (664 articles)

---

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:  
[http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub\\_requests](http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests)

Information about ordering reprints may be found online at:  
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:  
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.  
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



## The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2<sup>V617F</sup> oncogene

Emilie-Fleur Gautier,<sup>1</sup> Muriel Picard,<sup>1,2</sup> Camille Laurent,<sup>1,3</sup> Caroline Marty,<sup>4</sup> Jean-Luc Villeval,<sup>4</sup> Cécile Demur,<sup>1,5</sup> François Delhommeau,<sup>4,6</sup> Elizabeth Hexner,<sup>7</sup> Stéphane Giraudier,<sup>4,8</sup> Nicolas Bonneville,<sup>9</sup> Bernard Ducommun,<sup>5,10</sup> Christian Récher,<sup>1,2</sup> Guy Laurent,<sup>1,2</sup> Stéphane Manenti,<sup>1</sup> and Véronique Mansat-De Mas<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Inserm, Unité Mixte de Recherche 1037—Cancer Research Center of Toulouse, Université de Toulouse, Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; <sup>2</sup>Service d'Hématologie—Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; <sup>3</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques—Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; <sup>4</sup>Inserm U1009, Université Paris XI, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>5</sup>Laboratoire d'Hématologie—Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; <sup>6</sup>Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; <sup>7</sup>Department of Medicine, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA; <sup>8</sup>AP-HP, Laboratoire d'Hématologie, Université Paris-Est Créteil, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France; <sup>9</sup>Service d'Orthopédie—Centre Hospitalier Universitaire Purpan, Toulouse, France; and <sup>10</sup>Centre Pierre Potier ITAV-UMS3039 CRT-RIV, Toulouse, France

**The JAK2<sup>V617F</sup> mutation is present in the majority of patients with polycythemia vera and one-half of those with essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. JAK2<sup>V617F</sup> is a gain-of-function mutation resulting in constitutive JAK2 signaling involved in the pathogenesis of these diseases. JAK2<sup>V617F</sup> has been shown to promote S-phase entry. Here, we demonstrate that the CDC25A phosphatase, a key regulator of the G1/S cell-cycle transition, is constitutively overexpressed in JAK2<sup>V617F</sup>-positive cell lines, JAK2-**

**mutated patient CD36<sup>+</sup> progenitors, and in vitro-differentiated proerythroblasts. Accordingly, CDC25A is overexpressed in BM and spleen of JAK2<sup>V617F</sup> knock-in mice compared with wild-type littermates. By using murine FDC-P1-EPOR and human HEL and SET-2 cell lines, we found that JAK2<sup>V617F</sup>-induced CDC25A up-regulation was caused neither by increased CDC25A transcription or stability nor by the involvement of its upstream regulators Akt and MAPK. Instead, our results suggest that CDC25A is regulated**

**at the translational level through STAT5 and the translational initiation factor eIF2 $\alpha$ . CDC25A inhibition reduces the clonogenic and proliferative potential of JAK2<sup>V617F</sup>-expressing cell lines and erythroid progenitors while moderately affecting normal erythroid differentiation. These results suggest that CDC25A deregulation may be involved in hematopoietic cells expansion in JAK2<sup>V617F</sup> patients, making this protein an attracting potential therapeutic target. (*Blood*. 2012; 119(5):1190-1199)**

### Introduction

A unique somatic mutation, JAK2<sup>V617F</sup>, recently was described in myeloproliferative neoplasms (MPNs), including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF).<sup>1-4</sup> This mutation promotes cytokine independence in cell lines and is sufficient to induce MPNs in mouse models, suggesting that it represents a major molecular event in the pathogenesis of these diseases.<sup>5,6</sup> At the molecular level, JAK2<sup>V617F</sup> leads to JAK2 tyrosine kinase autophosphorylation and constitutive activation of downstream cell signaling pathways, including STAT, MAPK/Erk, and PI3K.<sup>1,4</sup> Although these pathways are known to be involved in cell proliferation and survival, the link between JAK2<sup>V617F</sup> and hematopoietic cell expansion remains not entirely understood.

JAK2<sup>V617F</sup> has been shown to promote G1/S cell cycle transition in parallel with p27<sup>kip1</sup> down-regulation and cyclin D2 induction in HEL and Ba/F3-EPOR cell lines.<sup>7,8</sup> Cell cycle progression is controlled by cyclin/cyclin-dependent kinase (CDK) complexes that are inactive when phosphorylated. One of the key regulators of the G1/S transition is CDC25A, a member of the CDC25 dual (Tyr/Thr) specificity phosphatase family. The CDC25 enzymes stimulate cell proliferation by dephosphorylating the 2 inhibitory residues of CDK1 and CDK2.<sup>9</sup> The main target of CDC25A is the

cyclin E- or cyclin A-associated CDK2, whose activation is necessary for both the full completion of the G1 phase and DNA synthesis activation. It has been shown that CDC25A expression can be regulated by transcriptional factors such as E2F-1,<sup>10</sup> c-myc,<sup>11</sup> and STAT3.<sup>12</sup> Moreover, the posttranslational down-regulation of CDC25A in response to genotoxic stress by the ubiquitin-dependent proteasomal degradation pathway has been greatly documented.<sup>13</sup> This degradation involves CDC25A phosphorylation by different kinases, including CHK1, CHK2, p38 MAPK,<sup>14</sup> and GSK3 $\beta$ ,<sup>15</sup> but can be counteracted by deubiquitylation by Dub3.<sup>16</sup>

Up-regulation of CDC25A has been reported in various solid cancers, in which it is frequently correlated with a poor prognosis.<sup>9</sup> Moreover, the authors of recent studies confirmed a role of CDC25A in oncogene-dependent tumorigenesis in mice.<sup>17,18</sup> Previously, we have established that CDC25A is up-regulated downstream of integrins in acute myeloid leukemia<sup>19</sup> and thus participates in leukemic cell proliferation induced by their adhesion to fibronectin. More recently, we described CDC25A overexpression in cells expressing different tyrosine kinase oncogenic products such as NPM-ALK (present in 70% of anaplastic large cell lymphomas), BCR-ABL (responsible for chronic myeloid leukemia), and FLT3-ITD (a mutated form of

Submitted January 3, 2011; accepted October 5, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, November 7, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-01-327742.

An Inside *Blood* analysis appears at the front of this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

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

© 2012 by The American Society of Hematology

the FLT3 receptor found in 30% of patients experiencing acute myeloid leukemia).<sup>20</sup> As far as NPM-ALK is concerned, we have reported that CDC25A regulation involves both transcriptional and posttranslational mechanisms downstream of the PI3K/Akt pathway.<sup>20</sup>

Whether CDC25A is a target for JAK2<sup>V617F</sup> had never been documented. This question could be of high interest in the light of the preparation of potent CDC25 inhibitors.<sup>9,21,22</sup> One of them, IRC-083864, is entered in clinical trial phase 2 under the name of Debio 0931.<sup>22</sup> In this study, we show that JAK2<sup>V617F</sup> expression results in enhanced CDC25A expression and that CDC25 inhibition leads to a dramatic reduction of JAK2<sup>V617F</sup> erythroid progenitor proliferation.

## Methods

### Cell lines culture and treatment

Murine JAK2<sup>WT</sup>- and JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR, human erythroleukemia HEL (expressing JAK2<sup>V617F</sup>; ATCC), and SET-2 (expressing both JAK2<sup>V617F</sup> and JAK2<sup>WT</sup>) cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% fetal FBS (Invitrogen) and 1 IU/mL human recombinant erythropoietin (EPO) for JAK2<sup>WT</sup>-expressing cells. Murine JAK2<sup>WT</sup>- and JAK2<sup>V617F</sup>-expressing BA/F3-EPOR cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1 IU/mL EPO for JAK2<sup>WT</sup>-expressing cells.

For inhibition of signaling pathways, cells were preincubated with AG490, JAK2 inhibitor II, STAT5 inhibitor, salubrinal, or cycloheximide (Calbiochem). IRC-083864 was synthesized by IPSEN (Biomeasure), as described previously.<sup>21</sup>

### Patient samples

BM samples from JAK2<sup>V617F</sup>-positive and JAK2<sup>WT</sup> patients were obtained after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and stored at the HIMIP collection, at the Tumorothèque Cancer-Est, and at the hematologic malignancies tissue bank, an institutional review board-approved protocol at the University of Pennsylvania. According to the French law, HIMIP collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by ethical committees (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II and APHP ethical committee). Clinical and biologic annotations of the samples from French laboratories have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés).

### Purification of CD36<sup>+</sup> cells and CD34<sup>+</sup> cells

Mononuclear cells were purified from BM by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Next, CD36<sup>+</sup> cells were obtained by positive selection on magnetic beads (Miltenyi Biotec) after incubation with an anti-CD36 antibody (Beckman Coulter). The purity of recovered cells was always > 97% as determined by cytometry.

Purification of CD34<sup>+</sup> cells was performed by magnetic positive selection (StemCell Technologies) in accordance to the manufacturer's recommendation. The purity of recovered cells was always > 95% as determined by flow cytometry. The presence of JAK2<sup>V617F</sup> mutation was determined by allelic discrimination as previously described.<sup>23</sup>

### Mouse BM and spleen lysates

Mouse BM and spleen cells were isolated from *Jak2*<sup>V617F</sup> knock-in (KI) animals and wild-type (WT) littermates, as previously described,<sup>6</sup> counted, and lysed in Laemmli buffer.

### Immunohistochemistry

BM samples were fixed in 10% buffered formalin or in Duboscq-Brazil (alcohol-based Bouin), embedded in paraffin, and processed for routine

histopathologic examination. Then, 3- $\mu$ m-thick sections were stained with H&E. For immunohistochemical examination, paraffin sections (3- $\mu$ m-thick sections) were rehydrated and subjected to microwaving (750W at 6 minutes) with the use of 1 mmol/L EDTA buffer, pH 8, as the antigen retrieval solution. Then, 3- $\mu$ m-thick sections were tested with a TechMate (Glostrup). The panel included antibodies directed against CDC25A (polyclonal; Santa Cruz Biotechnology). Staining was performed on CDC25A and detected with a Leica DMR microscope (Rueil-Malmaison and IM50 software; Leica).

### Western blot

Western blotting was performed via the use of the following primary antibodies: anti-CDC25A (F6), anti-CDC25C (C20), and anti-Cyclin A (C19 and BF683; Santa Cruz Biotechnology); anti-p27 (BD Biosciences Pharmingen); anti-phospho-Akt (Ser 473), anti-Akt, anti-phospho-STAT5 (Tyr694), anti-STAT5, anti-phospho-JAK2 (Tyr1007/1008), anti-JAK2, anti-Erk, anti-phospho-eIF-2 $\alpha$  (ser 51), and anti-eIF-2 $\alpha$  (Cell Signaling Technologies); anti-phospho-ERK and anti- $\alpha$  tubulin (Sigma-Aldrich); or anti- $\beta$ -actin (Lab Vision). Quantifications were performed with the use of Quantity One Software.

### Cell cycle analysis

Cells were labeled with 10  $\mu$ M BrdU for 1 hour, washed with PBS, and fixed in cold 70% ethanol for 20 minutes. BrdU detection was performed with the BrdU staining kit from BD Pharmingen and cell cycle distribution with a 30-minute propidium iodide staining (Invitrogen). Fluorescence was analyzed on a BDLSRII cytometer (BD Biosciences).

### siRNA transduction

The FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> cell line was transfected with the Amaxa nucleofection technology (Amaxa). Cells ( $2 \times 10^6$ ) were resuspended in 100  $\mu$ L of Amaxa solution L. Specific STAT5A and STAT5B siRNA ( $2 \times 30$  pmol; ON-TARGETplus SMARTpool, mouse STAT5A and STAT5B; Dharmacon) or negative control (60 pmol; AllStars Negative Control siRNA; QIAGEN) were added, and cells were transfected with the nucleofector device (program D-17). Cells were subsequently resuspended in normal culture medium at a concentration of  $3 \times 10^5$  cells/mL. Twelve hours after transfection, cells were counted (trypan blue staining), and Western blotting was performed.

CD34<sup>+</sup> cells were sorted as previously described, cultured overnight in erythroid differentiation culture medium previously described, and nucleofected with the use of Amaxa nucleofection technology. Cells ( $3.4 \times 10^5$  to  $2.1 \times 10^6$ ) were resuspended in 100  $\mu$ L of Amaxa Human CD34<sup>+</sup> Cell Nucleofector solution. Specific CDC25A-siRNA (Hs\_CDC25A\_9 Flexi-Tube siRNA; QIAGEN) or a siRNA-negative control (30 pmol; AllStars Negative Control siRNA; QIAGEN) were added and cells were transfected by the use of program U-08. CD34<sup>+</sup> cells were then resuspended in IMDM 10% FBS. Cells ( $3 \times 10^4$  per dish) were immediately plated in duplicate in methylcellulose. The other cells were cultured in erythroid differentiation culture medium, counted (trypan blue staining) 24 hours after transfection, and controlled for transfer efficiency.

### Clonogenic assays

Fresh human BM CD34<sup>+</sup> cells were plated in duplicate between 1500 and 3000 cells per dish culture in H4431 StemCell Technologies methylcellulose medium. IRC-083864 was initially added at the correct concentration in the culture medium. Erythroid colonies were scored at day 14.

### Amplification of erythroid progenitors

CD34<sup>+</sup> cells were cultured in IMDM supplemented with 10% FBS, 50 ng/mL recombinant human SCF, 10 ng/mL IL-3 (R&D systems), and 1 U/mL EPO. Erythroid differentiation was followed by May Grunwald Giemsa staining and analysis of CD34, CD36, and GPA expression by flow cytometry (BDLSRII cytometer; BD Biosciences).

### Statistical analysis

Results are expressed as mean value  $\pm$  SD. Statistical analysis of the data was performed by the Student *t* test or the Mann-Whitney *U* test with the SigmaStat 3.0 software (SPSS). Differences were considered as significant for *P* values  $< .05$ , \**P*  $< .05$ , \*\**P*  $< .01$ .

## Results

### CDC25A is over- and constitutively expressed in JAK2<sup>V617F</sup>-positive cell lines

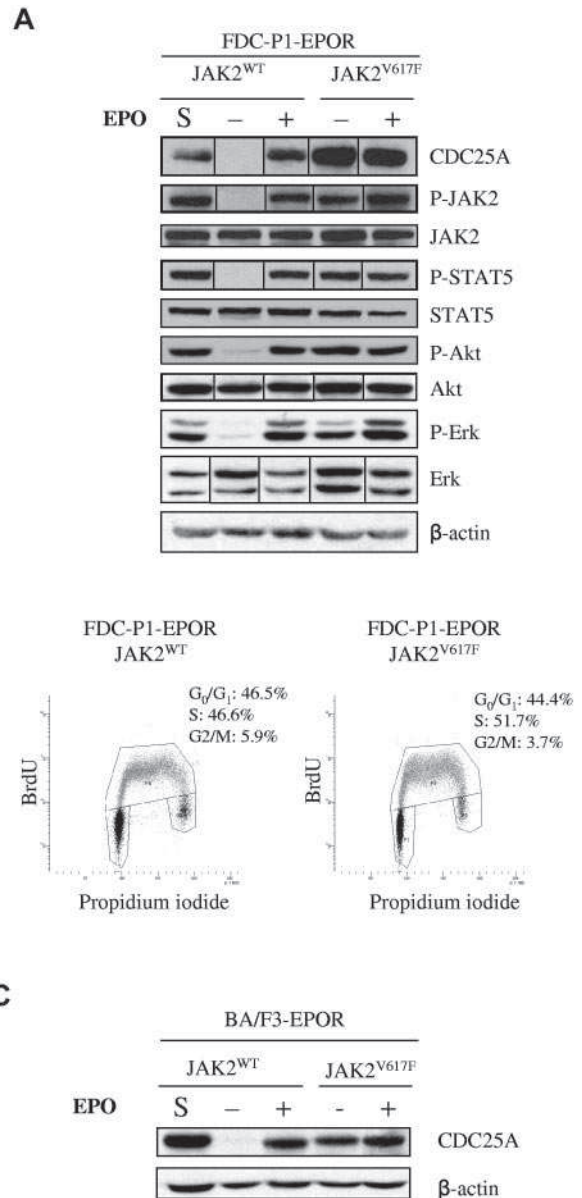
The FDC-P1 cell line was transduced to coexpress the EPOR with either JAK2<sup>V617F</sup> or JAK2<sup>WT</sup>. JAK2<sup>V617F</sup> cells were grown in the absence of EPO, whereas EPO was added in the culture medium of JAK2<sup>WT</sup> cells. Although JAK2 expression was similar in the 2 cell lines, CDC25A protein level was significantly greater in JAK2<sup>V617F</sup> cells than in JAK2<sup>WT</sup> (Figure 1A). In contrast, protein and phosphorylation levels of Akt, STAT5, or Erk were not influenced by JAK2<sup>V617F</sup> in these culture conditions. Because CDC25A expression is cell cycle dependent, we compared cell cycle distribution and BrdU incorporation rates in the 2 cell lines (Figure 1B). No significant difference in JAK2<sup>V617F</sup> or JAK2<sup>WT</sup> cells was found, suggesting that modified CDC25A protein levels was cell cycle-independent.

We next investigated the influence of EPO in CDC25A regulation. In JAK2<sup>V617F</sup> cells, the addition of EPO changed neither CDC25A level nor the protein and phosphorylation levels of JAK2, Akt, STAT5, or Erk (Figure 1A). Similarly, serum starvation did not decrease CDC25A protein expression in these cells (data not shown). By contrast, EPO deprivation resulted in a dramatic reduction of CDC25A protein level in JAK2<sup>WT</sup> cells. The phosphorylation of Akt, STAT5, and Erk was also reduced in these conditions (Figure 1A). These results suggest that not only CDC25A is a target for EPO signaling in nonmutated JAK2 expressing cells but also that JAK2<sup>V617F</sup> could substitute for EPO-mediated CDC25A regulation. This EPO- and JAK2<sup>V617F</sup>-dependent regulation of CDC25A was confirmed in another cellular model, BA/F3 cells coexpressing the EPOR and the WT and V617F forms of JAK2 (Figure 1C).

Myeloproliferative leukemia virus oncogene (MPL; or thrombopoietin receptor) W515L mutations have been described in 5%-10% of PMF and 1%-3% ET cases. In vitro effects of MPL<sup>W515L</sup> are similar to those of JAK2<sup>V617F</sup>, triggering spontaneous MPL and JAK/STAT pathway activation and accelerating G1/S transition.<sup>24</sup> In consequence, we tested the status of CDC25A protein expression downstream of this mutated receptor. BA/F3-MPL<sup>WT</sup> cells were grown in the presence of TPO, whereas BA/F3-MPL<sup>W515L</sup> ones were independent of TPO. As shown in supplemental Figure 1 (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article), the status of CDC25A protein expression observed in BA/F3-MPL<sup>W515L</sup> was similar to that described in BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup> cells. These results show constitutive up-regulation of CDC25A downstream of JAK2<sup>V617F</sup> and MPL<sup>W515L</sup> oncogenes.

### CDC25A is overexpressed in human and murine JAK2<sup>V617F</sup>-expressing primary cells

We next investigated whether JAK2<sup>V617F</sup> could influence CDC25A levels in primary murine and human hematopoietic cells. First, we examined CDC25A expression in human CD36<sup>+</sup>-purified marrow cells issued from 4 JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients and 3 healthy



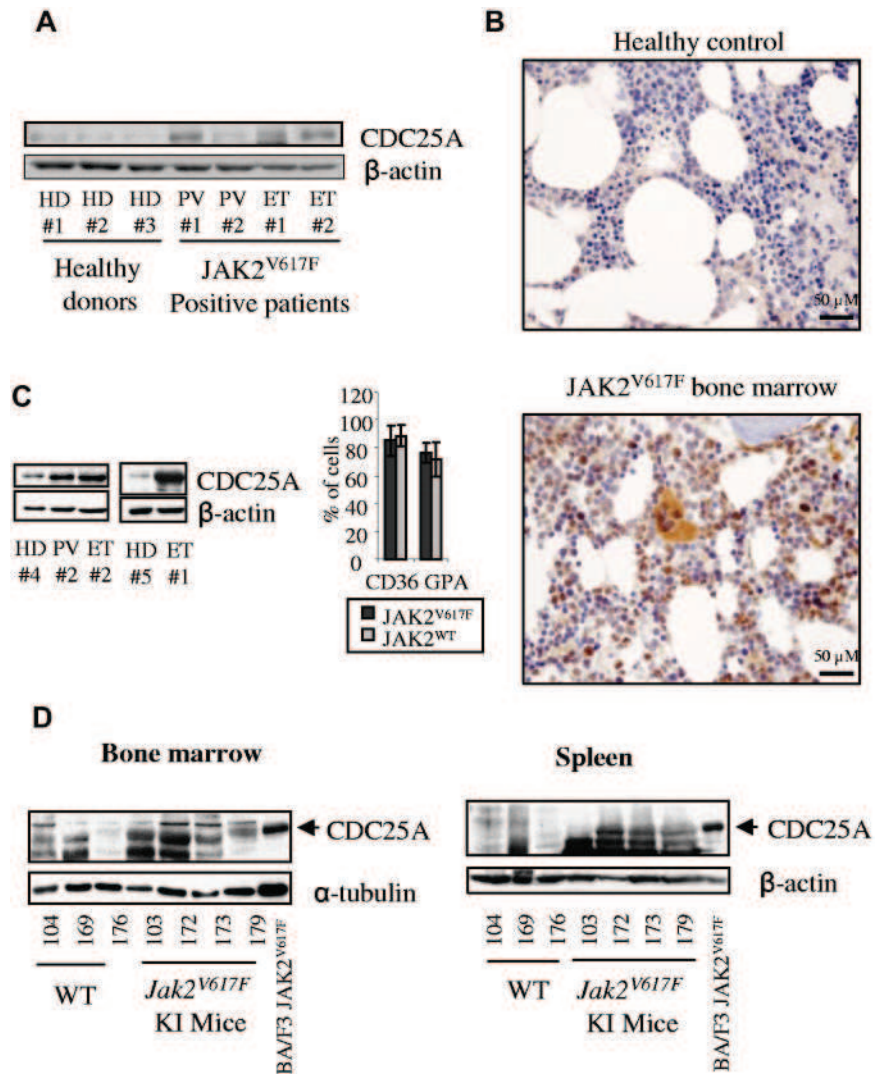
**Figure 1. CDC25A is overexpressed and constitutively expressed in JAK2<sup>V617F</sup>-positive cell lines.** (A) JAK2, STAT5, Akt, and Erk phosphorylation and protein levels were analyzed by Western blotting in FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>WT</sup> and FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> cells. S indicates steady-state culture conditions; -, 12 hours of EPO deprivation; +, 12 hours of EPO restimulation (10 IU/mL). β-actin was used as a loading control. Western blots are representative of 3 independent experiments. Vertical lines have been inserted to indicate a repositioned gel lane. (B) Cell cycle distribution of JAK2<sup>WT</sup> and JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells was analyzed by BrdU and propidium iodide containing under normal culture conditions. Results are representative of 3 independent experiments. (C) Western blot analysis of CDC25A protein level in JAK2<sup>WT</sup>- and JAK2<sup>V617F</sup>-expressing BA/F3-EPOR cells. S indicates steady-state culture conditions; -, 12 hours of EPO deprivation; +, 12 hours of EPO restimulation (10 IU/mL). β-actin was used as a loading control. Western blots are representative of 3 independent experiments.

donors (Figure 2A). Among these, all patients but one displayed CDC25A overexpression compared with healthy donors. These results were confirmed by immunohistochemistry on BM biopsies of JAK2<sup>V617F</sup> patients (3 PV, 1 ET), where CDC25A was found overexpressed in megakaryocytes and erythroblasts (Figure 2B).

We next estimated the expression of CDC25A protein during erythroid differentiation in liquid culture in both normal and JAK2<sup>V617F</sup> marrow cells. Purified CD34<sup>+</sup> cells from healthy donors and JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients were cultured in liquid medium in



**Figure 2. CDC25A is overexpressed in JAK2<sup>V617F</sup>-positive primary cells.** (A) CDC25A expression was analyzed by Western blot in CD36<sup>+</sup> cells purified from the BM of 4 JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients (PV, ET) and 3 healthy donors (HD). (B) Paraffin-embedded BM biopsies from 3 JAK2<sup>V617F</sup>-positive PV patients, 1 JAK2<sup>V617F</sup>-positive ET patient, and 2 HDs were subjected to an immunohistochemical staining for CDC25A. Pictures representative of JAK2<sup>V617F</sup>-positive and control BM biopsies are shown. (C) Purified CD36<sup>+</sup> cells from a JAK2<sup>V617F</sup>-positive PV patient, 2 JAK2<sup>V617F</sup>-positive ET patients, and 2 representative healthy controls (HD) were grown in liquid erythroid differentiation medium. Cells were harvested at day 7, corresponding to a proerythroblast stage, and subjected to a Western blot analysis for CDC25A (left). The presence of CD36 and GPA markers was visualized by flow cytometry (right). (D) BM (left) and spleen lysates (right) from 3 WT and 4 *Jak2*<sup>V617F</sup> KI mice were subjected to Western blot analysis for CDC25A. CDC25A expression in BA/F3 JAK2<sup>V617F</sup> cell line was used as molecular weight control.  $\beta$ -actin or  $\alpha$ -tubulin levels were used as control.



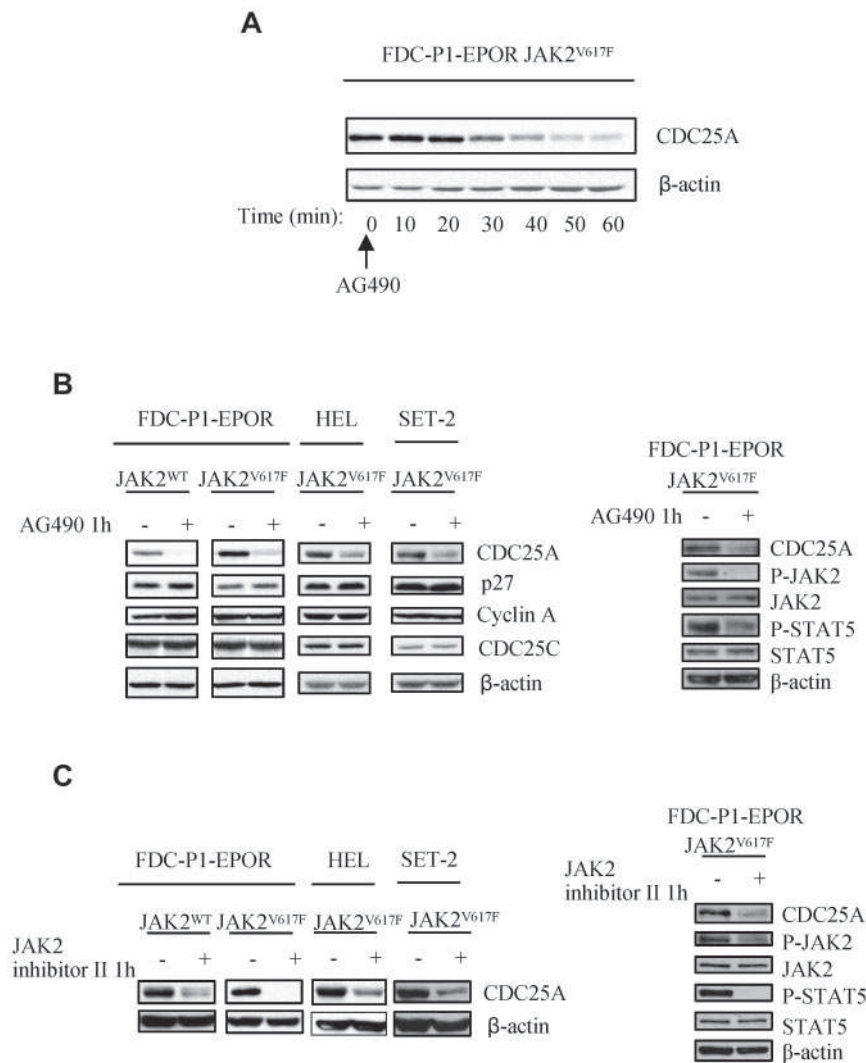
conditions inducing their differentiation as described in the Methods. CDC25A expression was analyzed at the proerythroblast stage. At day 7, morphology (data not shown) and cytometry analysis (Figure 2C) revealed that CD36<sup>+</sup>GPA<sup>+</sup> proerythroblasts represented approximately 75% of cultured cells in both normal and JAK2<sup>V617F</sup> cells. At this stage, CDC25A was clearly overexpressed in JAK2<sup>V617F</sup> cells compared with healthy donor cells.

Finally, we took advantage of our new model of KI mice expressing JAK2<sup>V617F</sup> to confirm these results. As we recently reported, these mice displayed splenomegaly and spleen myeloid metaplasia, with the percentage of erythroblasts in this tissues being as high as 60%.<sup>6</sup> Thus, BM and spleen from 4 *Jak2*<sup>V617F</sup> and 3 control littermates were analyzed by Western blot for CDC25A expression. Mice were from 2 to 6 months of age in each group. As shown in Figure 2D, CDC25A protein level was greater in both spleen and BM cells expressing JAK2<sup>V617F</sup> compared with controls expressing JAK2<sup>WT</sup>. Altogether, these data show up-regulation of CDC25A in JAK2<sup>V617F</sup> cells, suggesting a potential link between the JAK2<sup>V617F</sup> oncogene and CDC25A protein expression level.

#### JAK2 kinase activity is required for CDC25A up-regulation

The JAK2<sup>V617F</sup> kinase has been shown to promote G1/S transition in the HEL cell line.<sup>7</sup> To understand the functional

link between JAK2<sup>V617F</sup> and cell cycle progression, we assessed the expression of CDC25A and other cell cycle regulators known to be molecular targets of oncogenic signaling pathways. We conducted Western blot analysis of p27<sup>Kip1</sup>, cyclin A, and CDC25A in response to JAK2 inhibition by AG490 in FDC-P1 cell lines expressing either JAK2<sup>WT</sup> or JAK2<sup>V617F</sup> and in the human JAK2<sup>V617F</sup>-expressing SET-2 and HEL cell lines. Treatment with AG490, leading to JAK2 and STAT5 phosphorylation inhibition, resulted in a rapid decrease in CDC25A protein expression in JAK2<sup>V617F</sup> cells (Figure 3A-B right), without modifications of p27<sup>Kip1</sup> and cyclin A levels (Figure 3B left). Similar effects were observed with another more specific JAK2 kinase inhibitor (JAK2 inhibitor II; Figure 3C). Because we did not observe major reproducible modifications of cell proliferation or survival on 1 hour of treatment with these inhibitors (data not shown), we conclude that JAK2<sup>V617F</sup>-dependent CDC25A regulation is cell cycle and cell death independent. Interestingly, PI3K/Akt and Erk activities known to be up-regulated downstream of JAK2<sup>V617F</sup> and involved in CDC25A regulation in other models remained unchanged after AG490 treatment (supplemental Figure 2A). Moreover, their respective inhibitions had no influence on CDC25A expression in FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> (supplemental Figure 2B-C). These results



**Figure 3. JAK2 activity is required for CDC25A up-regulation.** (A) JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1 EPOR cells were treated with AG490 (50 μM), an inhibitor of JAK2, harvested at indicated time, and subjected to Western blot analysis for CDC25A. (B) Left, JAK2<sup>WT</sup> and JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1 EPOR, HEL, and SET-2 cell lines were treated with AG490 (50 μM, 1 hour) and subjected to Western blot analysis for the cell cycle regulators CDC25A, p27<sup>Kip1</sup>, cyclin A, and CDC25C. Right, Western blot analysis of P-STAT5, STAT5, P-JAK2, and JAK2 was performed in JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1 EPOR cell lines in response to AG490 treatment. (C) Left: JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR and HEL cell lines were treated with JAK2 inhibitor II (50 μM, 1 hour), an inhibitor of JAK2, and subjected to Western blot analysis for CDC25A. Right: Western blot analysis of P-STAT5, STAT5, P-JAK2, and JAK2 was performed in JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1 EPOR cell lines in response to JAK2 inhibitor II treatment. β-actin levels were used as control. Western blots are representative of at least 3 independent experiments.

indicate that the JAK2<sup>V617F</sup> oncogene influences CDC25A protein expression through its kinase activity.

#### CDC25A is not regulated at the mRNA level downstream of JAK2<sup>V617F</sup>

We then asked whether *CDC25A* transcript levels were modified on JAK2<sup>V617F</sup> inhibition. By using quantitative PCR (supplemental Figure 3A), we found that FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> cells did not display greater *CDC25A* mRNA levels compared with FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>WT</sup>. Furthermore, whereas treatment with AG490 resulted in a dramatic decrease in CDC25A protein expression in JAK2<sup>V617F</sup>-expressing cells (Figure 3B), no decrease in *CDC25A* mRNA transcripts was found in FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup>, HEL, and SET2 cells (supplemental Figure 3B). These data show a decoupling between CDC25A protein and mRNA levels in JAK2<sup>V617F</sup> expressing cells, suggesting that in these cells, CDC25A is regulated through a translational or a posttranslational mechanism.

#### Translational regulation of CDC25A by JAK2<sup>V617F</sup>

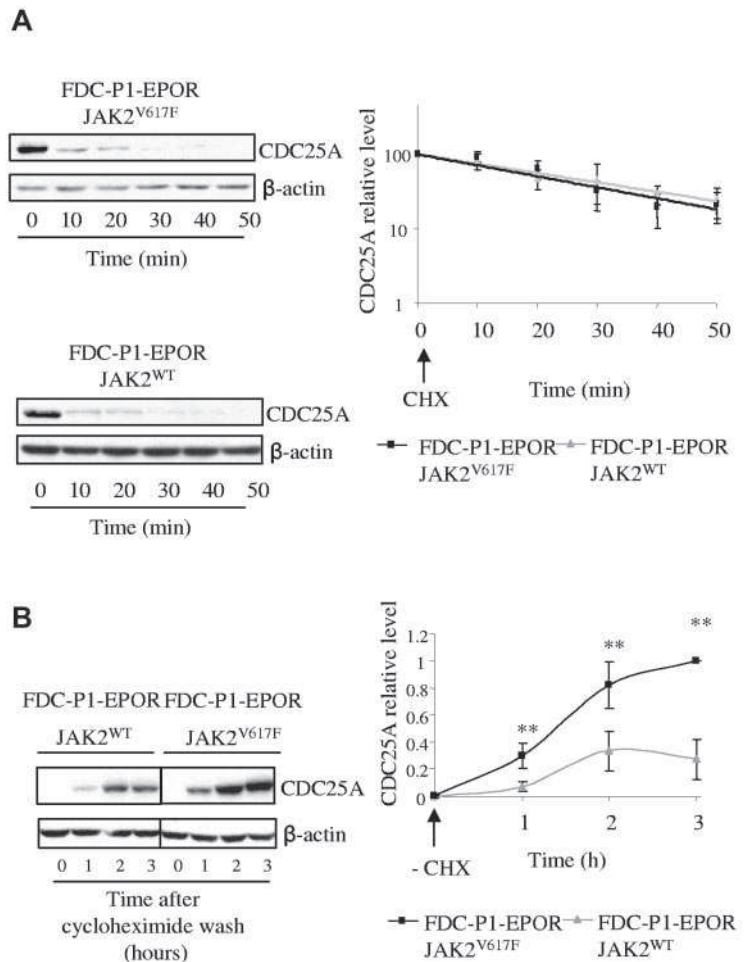
First, we investigated whether expression of JAK2<sup>V617F</sup> could affect the stability of the CDC25A protein. For this purpose, FDC-P1-

EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> and FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>WT</sup> cells were incubated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide, and CDC25A protein expression was measured by Western blot. As shown in Figure 4A, CDC25A degradation was similar in the 2 cell lines, with an estimated half-life of approximately 20 minutes, a value expected from previous studies.<sup>25</sup> By contrast, when cycloheximide was removed, CDC25A was re-expressed faster and at a greater magnitude in JAK2<sup>V617F</sup> cells, compared with JAK2<sup>WT</sup> cells (Figure 4B), indicating that CDC25A protein synthesis was greater downstream of JAK2<sup>V617F</sup>. These data suggest that JAK2<sup>V617F</sup> facilitates CDC25A synthesis without influencing its stability.

#### Translational regulation of CDC25A by the eIF2α pathway

Protein synthesis is controlled by different translation regulators, among which eIF2α plays an important role in cap-dependent translation initiation.<sup>26</sup> Furthermore, a role for eIF2α in CDC25A synthesis regulation has been recently described.<sup>27</sup> The function of eIF2α is regulated by phosphorylation on ser 51, which results in eIF2α sequestration and subsequent loss of function.<sup>28</sup> Thus, we investigated the status of eIF2α phosphorylation downstream of JAK2<sup>V617F</sup>.

**Figure 4. The presence of the JAK2<sup>V617F</sup> mutation induces an increase in CDC25A protein translation.** (A) JAK2<sup>V617F</sup> and JAK2<sup>WT</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells were incubated with 10  $\mu$ g/mL of cycloheximide (CHX), an inhibitor of protein translation, harvested at indicated times, and subjected to Western blot analysis of CDC25A (left). Quantification of CDC25A protein levels was performed by densitometric analysis normalized to  $\beta$ -actin level (right). The results are expressed as mean  $\pm$  SD for 3 independent experiments. (B) JAK2<sup>V617F</sup> and JAK2<sup>WT</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells were incubated for 1 hour with 10  $\mu$ g/mL of CHX, then washed ( $-$ CHX), and harvested at the indicated times. Cell lysates were prepared and subjected to Western blot to analyze the reappearance of CDC25A (left). CDC25A levels were determined by densitometric analysis normalized to  $\beta$ -actin level (right). The results are the means  $\pm$  SD for 3 independent experiments. Vertical lines have been inserted to indicate a repositioned gel lane.



We first compared eIF2 $\alpha$  phosphorylation level in JAK2<sup>WT</sup> and JAK2<sup>V617F</sup> cells, in the presence or the absence of JAK2 inhibitors (AG490 or JAK2 inhibitor II) for 1 hour. As shown in Figure 5A, eIF2 $\alpha$  ser51 phosphorylation was lower in JAK2<sup>V617F</sup> compared with JAK2<sup>WT</sup> cells and was restored by the JAK2 inhibitor AG490 and JAK2 inhibitor II, demonstrating for the first time that eIF2 $\alpha$  is indirectly regulated by JAK2<sup>V617F</sup>. To investigate the link between eIF2 $\alpha$  and CDC25A in JAK2<sup>V617F</sup> cells, we used salubrinal, a compound that inhibits the function of eIF2 $\alpha$  by interfering with ser 51 dephosphorylation. As shown in Figure 5B, treatment with salubrinal resulted in a concomitant increase of eIF2 $\alpha$  ser51 phosphorylation and a decrease in CDC25A protein level, thus establishing a correlation between CDC25A expression and eIF2 $\alpha$  phosphorylation profile. Importantly, the proliferation of FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> cells was dramatically reduced in the presence of salubrinal (Figure 5C), as well as the growth of primary cells from 3 independent JAK2<sup>V617F</sup>-positive samples. Altogether, these data suggest that eIF2 $\alpha$  is an important regulator of CDC25A protein translation in JAK2<sup>V617F</sup> cells and of JAK2<sup>V617F</sup> positive cells proliferation.

#### eIF2 $\alpha$ and CDC25A regulation by the STAT5 pathway

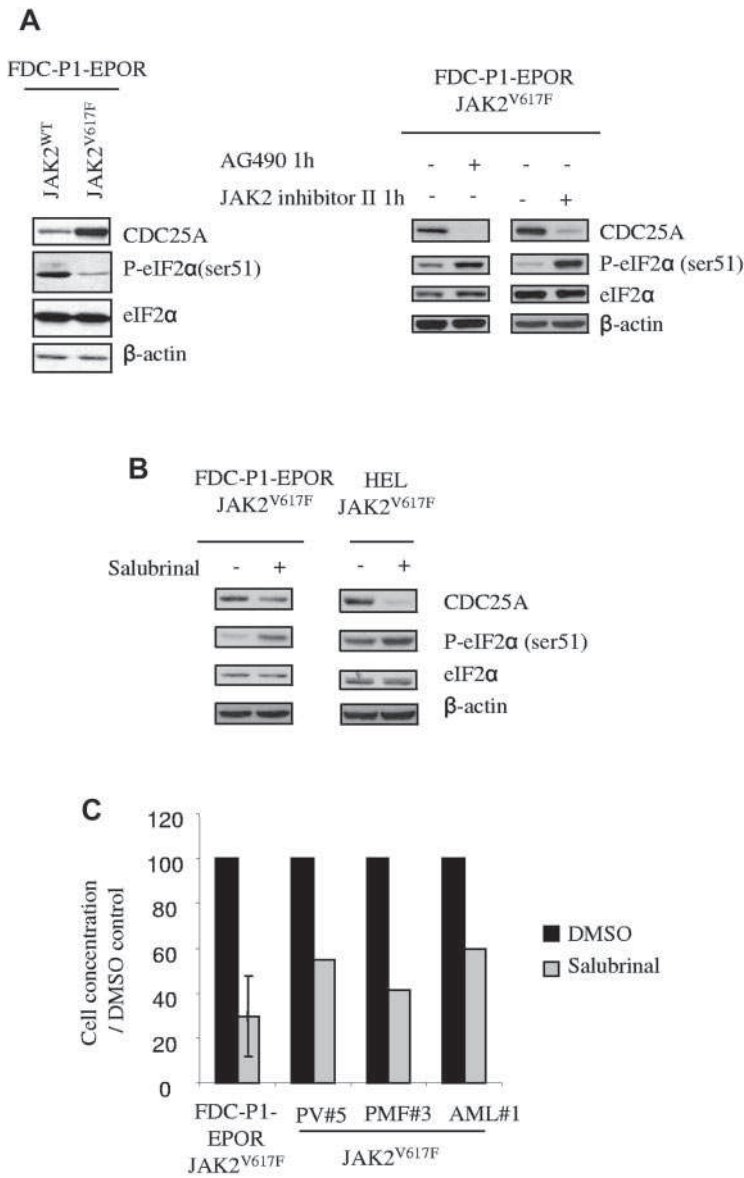
To identify the link between JAK2<sup>V617F</sup> and eIF2 $\alpha$ , we tested the involvement of STAT5, the main direct JAK2 target. For this purpose, FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> cells were incubated with a

STAT5 inhibitor for 1 hour at 2 different concentrations. As shown in Figure 6A, this treatment resulted in a dose-dependent reduction of STAT5 phosphorylation, an increase of eIF2 $\alpha$  phosphorylation, and a concomitant decrease in CDC25A levels. The same results were obtained with the human HEL cell line (data not shown). Finally, these data were nicely confirmed by RNA interference-induced STAT5 down-regulation (Figure 6B).

Because STAT5 is a transcription factor, we then tested whether the protein level of the 4 kinases (PKR, PERK, HRI, and GCN2) and the phosphatases (GADD34/PP1 and PP2A), known to regulate eIF2 $\alpha$  phosphorylation, were affected on AG490 treatment. The basal levels of these proteins were not modified in these conditions, suggesting that STAT5 does not regulate their expression in our model (data not shown). Thus, our study suggests that STAT5, the main direct target of JAK2<sup>V617F</sup>, is a key intermediate for the regulation of eIF2 $\alpha$  by JAK2.

#### Effects of CDC25A inhibition on JAK2<sup>V617F</sup>-expressing BFU-E

We firstly investigated the effect of the pan CDC25 inhibitor IRC-083864<sup>21</sup> on BFU-E colony formation from JAK2<sup>V617F</sup> human primary cells. Purified marrow CD34<sup>+</sup> cells were plated in methylcellulose for 14 days in the presence of adequate stimulating factors, as described in the Methods. As illustrated in Figure 7A (left), IRC-083864 inhibited in a dose-dependent manner the growth of BFU-E derived from 2 independent JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients. In the same conditions, the growth of BFU-E from healthy



**Figure 5. eIF2 $\alpha$  regulates CDC25A downstream of JAK2<sup>V617F</sup>.** (A) CDC25A and eIF-2 $\alpha$  protein levels, as well as eIF-2 $\alpha$  phosphorylation on ser 51, were analyzed by Western blot in JAK2<sup>WT</sup> and JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells under normal conditions of culture or after 1 hour of treatment with AG490 or JAK2 inhibitor II. (B) CDC25A expression was analyzed by Western blot after 24 hours of treatment with Salubrinal, an inhibitor of eIF2 $\alpha$  dephosphorylation, in JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells or HEL cell lines.  $\beta$ -actin levels were used as control. Western blots are representative of 3 independent experiments. (C) FDC-P1-EPOR JAK2<sup>V617F</sup> and JAK2<sup>V617F</sup>-positive cells from 3 different patients (PV patient 5, PMF 3, and AML 1) were cultured in the presence or the absence of salubrinal at 75 $\mu$ M. Cells were stained with trypan blue and counted after 48 hours.

donors ( $n = 2$ ), or from a patient with secondary polycythemia (JAK2<sup>WT</sup>), was poorly affected. Importantly, the effect of CDC25 inhibition was also observed on the clonogenic potential of JAK2<sup>V617F</sup>-positive cells from 2 additional patients, grown in the absence of EPO (Figure 7A right). To confirm the specific role of CDC25A, we transfected purified normal or JAK2<sup>V617F</sup>-positive CD34<sup>+</sup> cells with CDC25A siRNA and performed the same experiments. As shown in Figure 7B (top), CDC25A siRNA decreased CDC25A protein expression and reduced the growth of BFU-E derived from 2 JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients, with no significant effect on BFU-E from healthy donors. For a third JAK2<sup>V617F</sup>-positive sample, the clonogenic potential was less affected by CDC25A down-regulation. As with the pharmacologic inhibitor, the inhibitory effect of CDC25A down-regulation on clonogenicity was reproduced in the absence of EPO (Figure 7B right).

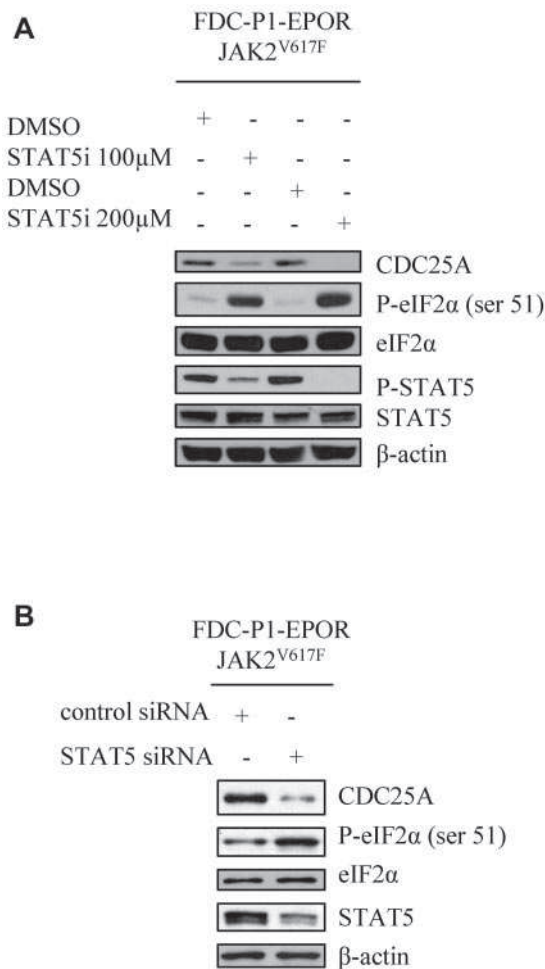
In good correlation with the effects observed on the clonogenicity of these cells, CDC25A siRNA also reduced the proliferation potential in erythroid differentiation medium of 2 JAK2<sup>V617F</sup> samples, as shown in Figure 7C. These data demonstrate that

CDC25A inhibition reduces the growth of JAK2<sup>V617F</sup>-positive erythroid progenitors while sparing normal BFU-E.

## Discussion

This study shows that CDC25A is constitutively overexpressed downstream of the JAK2<sup>V617F</sup> oncogene. JAK2<sup>V617F</sup> is not the unique oncogenic tyrosine kinase capable of regulating this enzyme in hematopoietic cells. Indeed, our group has recently described that cells expressing the BCR-ABL, FLT3-ITD, and NPM-ALK oncogenes display an increase in levels of CDC25A protein compared with their WT counterparts.<sup>20</sup>

The mechanism by which JAK2<sup>V617F</sup> regulates CDC25A was examined. Our study supports the fact that JAK2<sup>V617F</sup> influences CDC25A expression by acting at the translational level. This mechanism of regulation is rather uncommon. For example, as NPM-ALK cells are concerned, our group has shown that this oncogene acts at the transcriptional level, whereas it may also



**Figure 6. STAT5 regulates eIF2 $\alpha$  downstream of JAK2<sup>V617F</sup>.** (A) JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells were treated with DMSO or STAT5 inhibitor (100 or 200 $\mu$ M for 1 hour) and CDC25A, P-eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ , P-STAT5, and STAT5 protein levels were analyzed by Western blot. (B) JAK2<sup>V617F</sup>-expressing FDC-P1-EPOR cells were transfected with control or STAT5 siRNA and CDC25A, P-eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$  and STAT5 protein levels were analyzed by Western blot 8 hours after transfection.  $\beta$ -actin levels were used as control. Western blots are representative of 3 independent experiments.

affect CDC25A stability.<sup>20</sup> As a matter of fact, stability appears as one of the major regulatory mechanism of CDC25A expression.<sup>13</sup> This mechanism was further investigated in cancer cells models. Indeed, recent studies have emphasized the role of GSK3 $\beta$  in CDC25A stability. In this model, GSK3 $\beta$  interacts with and phosphorylates CDC25A, with this phosphorylation facilitating its ubiquitination and subsequent proteasome-dependent degradation. Conversely, GSK3 $\beta$  deregulation, a common event in cancer cells, results in overexpression of CDC25A. This mechanism has been described in a large variety of carcinomatous cells.<sup>15</sup> Other studies have also very recently documented that CDC25A degradation could be counteracted by the specific ubiquitin hydrolase Dub3, with the deregulation of this enzyme resulting in high levels of CDC25A in a subset of human breast cancers.<sup>16</sup>

The mechanism by which JAK2<sup>V617F</sup> regulates CDC25A synthesis also was investigated. Our study suggests a role for eIF2 $\alpha$ , a major regulator of cap-dependent translation initiation. The role of eIF2 $\alpha$  is supported by 2 lines of evidences. First, JAK2<sup>V617F</sup> expression and function modulate eIF2 $\alpha$  phosphorylation (see Figure 5), and thus presumably eIF2 $\alpha$  function. Second, eIF2 $\alpha$  inhibition by salubrinal resulted in the down-regulation of CDC25A

in JAK2<sup>V617F</sup> cells. We identified STAT5, the main target of JAK2<sup>V617F</sup>, is involved in eIF2 $\alpha$  regulation. Because basal eIF2 $\alpha$  expression remained unchanged after STAT5 down-regulation, it is unlikely that eIF2 $\alpha$  is transcriptionally regulated by STAT5. In addition, we did not detect any significant variations of the level of the 4 kinases (PKR, PERK, GCN2, and HRI) and the phosphatase complex (PP1/GADD34) known as key eIF2 $\alpha$  regulators. In consequence, the molecular link(s) between STAT5 and eIF2 $\alpha$  still remain(s) to be established.

More generally, the fact that JAK2<sup>V617F</sup> could affect eIF2 $\alpha$  function may have important consequences for the biology of JAK2<sup>V617F</sup> cells. Indeed, eIF2 $\alpha$  is considered as a master regulator of the stress response by regulating antiapoptotic proteins like Bcl-xL for instance.<sup>29</sup> Interestingly, Bcl-xL accumulates in PV<sup>30</sup> and BCR-ABL<sup>31</sup> cells, presumably through a STAT5-dependent transcriptional mechanism.<sup>32</sup> Thus, it is possible that, in MPN, transcriptional and posttranscriptional mechanisms cooperate to facilitate the accumulation of apoptosis inhibitors.

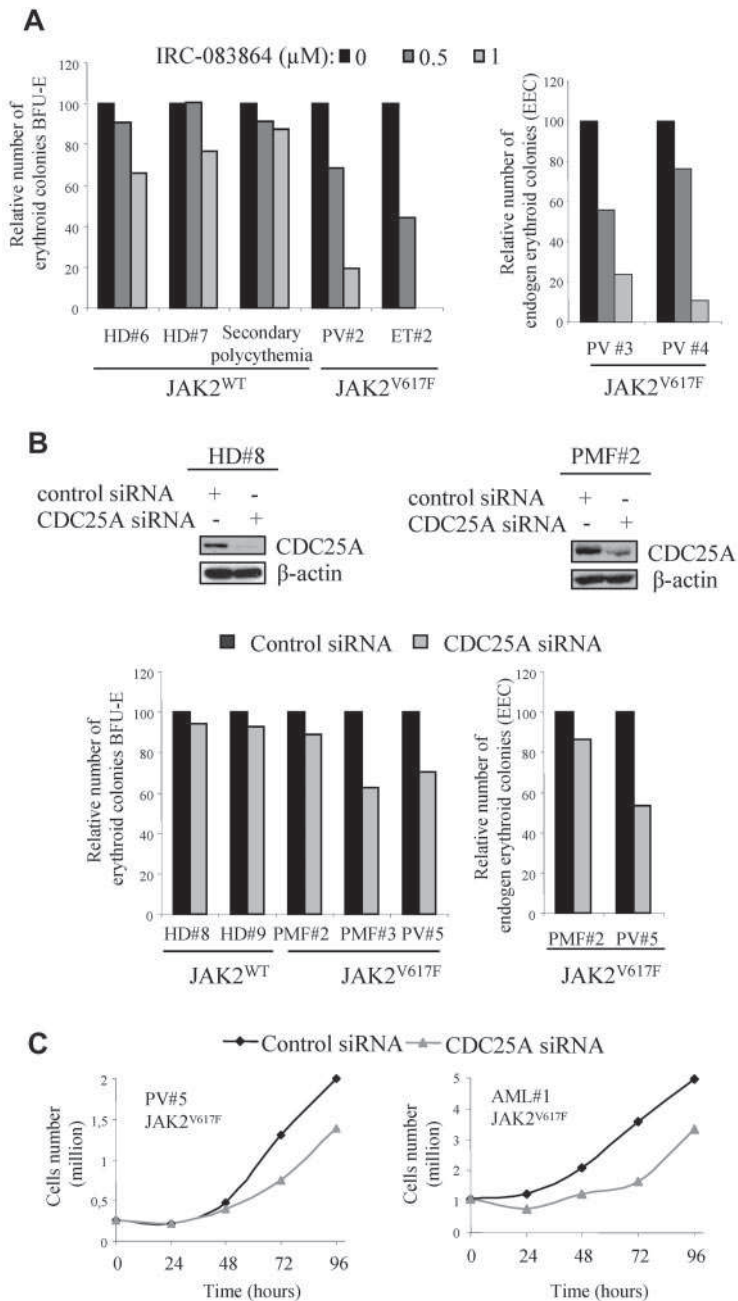
With regard to cell-cycle regulation, JAK2<sup>V617F</sup> has been shown to promote G1/S phase transition.<sup>7,33</sup> Indeed, JAK2 inhibition with JAK inhibitor I induces p27<sup>kip1</sup> up-regulation and a decrease in cyclin D2 after an 18-hour incubation followed with G1 arrest, suggesting that these proteins are implicated in JAK2<sup>V617F</sup>-induced proliferation.<sup>7</sup> In our model, the rapid kinetics of CDC25A down-regulation in response to pharmacologic JAK2 inhibitors (30 minutes), together with the absence of modifications of other cell-cycle proteins expression, such as p27<sup>kip1</sup> or cyclin A, and similar cell-cycle distribution between JAK2<sup>WT</sup> and mutated cell lines, strongly argue for CDC25A being an early target of JAK2<sup>V617F</sup> rather than just a cell proliferation marker.

CDC25A up-regulation was observed not only in cell lines but also in human CD36<sup>+</sup> cells issued from JAK2<sup>V617F</sup>-positive PV patients and BM biopsies compared with healthy donors cells. Moreover, CDC25A overexpression was found in BM and spleen cells in JAK2<sup>V617F</sup> KI mice, an animal model that develops a PV-like disease.<sup>6</sup> These results further support the notion that CDC25A overexpression is a common feature of JAK2<sup>V617F</sup>-related diseases and perhaps of other MPN. However, in some cases JAK2<sup>V617F</sup> and CDC25A levels were not correlated, suggesting additional ways of regulation of the protein.

Our study also shows that CDC25A is overexpressed at the proerythroblast stage of erythroid differentiation in JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients. These results suggest that CDC25A could be involved in terminal erythroid differentiation. We previously observed an erythroid amplification and a selective advantage for JAK2<sup>V617F</sup>-mutated cells in late stages of erythropoiesis.<sup>34</sup> Our hypothesis is that CDC25A could mediate this effect by stimulating proliferation. This hypothesis is supported by the fact that CDC25A depletion by siRNA results in decreased proliferation of FDC-P1-EPOR-JAK2<sup>V617F</sup> cells (data not shown).

The CDC25 inhibitor IRC-083864 and more specific CDC25A siRNA inhibit BFU-E in JAK2<sup>V617F</sup>-positive samples being less active in normal BFU-E, suggesting a therapeutic window between normal and JAK2<sup>V617F</sup> hematopoietic cells. However, clonogenic potential is not affected for one patient (PMF patient 2), suggesting either that CDC25A is not overexpressed in CD34<sup>+</sup> cells of this patient (Figure 2), or that additional events can compensate CDC25A inhibition in some patients. Whatever, CDC25 inhibitors should represent a new class of drugs in most JAK2<sup>V617F</sup>-MPN therapy, beside the JAK2 inhibitors that are currently tested.<sup>35</sup>

To conclude, we propose a model in which JAK2<sup>V617F</sup> drives through STAT5 an eIF2 $\alpha$ -mediated pathway that results in the



**Figure 7. Pharmacologic or genetic inhibition of CDC25A inhibits clonogenic capacities of CD34<sup>+</sup> cells from JAK2<sup>V617F</sup>-positive patients.** (A) CD34<sup>+</sup> cells from BM of HD, JAK2<sup>V617F</sup>-positive PV, or ET patients, and a patient with secondary polycythemia (JAK2<sup>WT</sup>), were purified and plated at a concentration of 1.5-3.10<sup>3</sup> cells/mL in duplicate, in the presence or the absence of the CDC25 inhibitor IRC-083864 and in the presence (left) or the absence (right) of EPO. The erythroid colonies (BFU-E) were scored at day 14. Results are expressed as percentage of control (untreated). (B) CD34<sup>+</sup> cells from HD, or from JAK2<sup>V617F</sup>-positive PV or PMF patients, were purified, cultured overnight, and transfected with control or CDC25A siRNA. Top, siRNA efficiency was evaluated by Western blot 24 hours after transfection. Western blots are representative of results obtained on control and JAK2<sup>V617F</sup> samples. Bottom, cells (1.5-3.10<sup>3</sup>) were plated in duplicate, in the presence (left) or the absence of EPO (right). The erythroid colonies (BFU-E) were scored at day 14. Results are expressed as percentage of control (control siRNA). (C) The growth of cells in erythroid differentiation medium was followed by cell counting after trypan blue staining.

stimulation of synthesis and accumulation of CDC25A, with this enzyme responsible for increased proliferation and expansion of hematopoietic cells in PV or ET, and, perhaps, in other MPN.

France, Novartis, MPN research foundation. E.-F.G. was supported by a fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Anne Fernandez-Vidal for quantitative PCR; Michel March for immunohistochemistry technical assistance; Grégoire Prevost (Ipsen) for providing the CDC25 inhibitor; Fanny Fava (Tumorothèque Cancer-Est) for preparing the samples; and Fanny Grimal, Anne Quillet-Mary, and Christine Didier for helpful technical assistance.

This work was supported by grants from the Inserm, Institut National du Cancer (PL2008, INCa\_Gov\_1345), Fondation de

## Authorship

Contribution: E.-F.G. performed the experiments and collected and analyzed data; M.P. performed experiments; C.L. performed immunohistochemistry; C.M. and J.-L.V. developed and prepared the samples from KI mice models; F.D. established JAK2-expressing cell lines and provided MPN samples; E.H. provided MPN samples; S.G. established MPL-expressing cell lines; C.D., C.R., and G.L. provided MPN samples; N.B. provided the discarded fragments from hip surgery; B.D. and C.R. were involved in the design of the study; E.-F.G., G.L., S.M., and V.M.-D.M. designed

the research and wrote the paper; and all authors reviewed and approved the manuscript.

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

Correspondence: Véronique Mansat-De Mas, Laboratoire d'Hématologie, Pavillon Lefèbvre, CHU Purpan, Place du Dr Baylac, 31059 Toulouse Cedex, France; e-mail: demas.v@chu-toulouse.fr.

## References

- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434(7037):1144-1148.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005; 365(9464):1054-1061.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397.
- Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010;115(17):3589-3597.
- Marty C, Lacout C, Martin A, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knockin mice. *Blood*. 2010; 116(5):783-787.
- Walz C, Crowley BJ, Hudon HE, et al. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem*. 2006; 281(26):18177-18183.
- Lelièvre H, Cervera N, Finetti P, et al. Oncogenic kinases of myeloproliferative disorders induce both protein synthesis and G1 activators. *Leukemia*. 2006;20(10):1885-1888.
- Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(7):495-507.
- Chen X, Prywes R. Serum-induced expression of the cdc25A gene by relief of E2F-mediated repression. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):4695-4702.
- Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J, Lukas J. Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol*. 2000;20(10):3497-3509.
- Barr é B, Vigneron A, Coqueret O. The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem*. 2005;280(16):15673-15681.
- Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene*. 2004;23(11):2050-2056.
- Khaled AR, Bulavin DV, Kittipatarin C, et al. Cytokine-driven cell cycling is mediated through Cdc25A. *J Cell Biol*. 2005;169(5):755-763.
- Kang T, Wei Y, Honaker Y, et al. GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell*. 2008;13(1):36-47.
- Pereg Y, Liu BY, O'Rourke KM, et al. Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(4):400-406.
- Ray D, Terao Y, Fuhrken PG, et al. Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. *Cancer Res*. 2007;67(3):984-991.
- Ray D, Terao Y, Nimbalkar D, et al. Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res*. 2007;67(14):6605-6611.
- Fernandez-Vidal A, Ysebaert L, Didier C, et al. Cell adhesion regulates CDC25A expression and proliferation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2006;66(14):7128-7135.
- Fernandez-Vidal A, Mazars A, Gautier EF, Prevost G, Payrastra B, Manenti S. Upregulation of the CDC25A phosphatase down-stream of the NPM/ALK oncogene participates to anaplastic large cell lymphoma enhanced proliferation. *Cell Cycle*. 2009;8(9):1373-1379.
- Brezak MC, Valette A, Quaranta M, et al. IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells. *Int J Cancer*. 2009;124(6):1449-1456.
- Lavecchia A, Di Giovanni C, Novellino E. Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2010;20(3):405-425.
- Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107(10):4139-4141.
- Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008;22(8):1557-1566.
- Löffler H, Sijljasen RG, Bartkova J, Worm J, Lukas J, Bartek J. Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 2003; 22(50):8063-8071.
- Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):827-835.
- Tomko RJ Jr, Lazo JS. Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress. *Cancer Res*. 2008; 68(18):7457-7465.
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 1):7-11.
- Bevilacqua E, Wang X, Majumder M, et al. eIF2alpha phosphorylation tips the balance to apoptosis during osmotic stress. *J Biol Chem*. 2010;285(22):17098-17111.
- Silva M, Richard C, Benito A, Sanz C, Olalla I, Fernandez-Luna JL. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338(9):564-571.
- Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*. 1998;16(11):1383-1390.
- Garçon L, Rivat C, James C, et al. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood*. 2006;108(5):1551-1554.
- Furuhata A, Kimura A, Shide K, et al. p27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383(4):411-416.
- Dupont S, Masse A, James C, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;110(3):1013-1021.
- Kiss R, Sayeski PP, Keseru GM. Recent developments on JAK2 inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2010;20(4):471-495.

## **Supplemental methods**

### **Cell line**

Murine MPL<sup>WT</sup>- and MPL<sup>W515L</sup>- expressing BA/F3 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 10 ng/ml TPO and 2ng/ml IL3 for MPL<sup>WT</sup>-expressing cells.

### **Inhibitors**

LY294009, Wortmannin and PD98059 were purchased from Calbiochem.

### **Western blot**

Western blotting was performed using the following primary antibodies: anti-CDC25A (F6), (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho-AKT (ser 473), anti-AKT, anti-ERK (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), anti-phospho- ERK (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or anti- $\beta$ -actin (Lab vision corporation, Francheville, France).

### **Quantitative RT-PCR (RQ-PCR)**

Total RNA was isolated with Trizol Reagent (Invitrogen). The cDNA were synthesized using SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) from 3 $\mu$ g (for mouse cell lines) or 1 $\mu$ g (for human cell lines) of total mRNA according to the manufacturer's instructions. For mouse samples, cDNA were subjected to a quantitative real-time PCR using an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) using SYBR green Premix (SYBR<sup>®</sup> Green JumpStart<sup>TM</sup> Taq ReadyMix<sup>TM</sup>, Sigma, France), with initial denaturation at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C. The primer sequences were for mouse CDC25A: 5'-ACG GTC ACC ATG GAC CAG C-3' (forward) and 5'-TTC AGG GCT GGG CTA CAT CC-3' (reverse), and for 14S: 5'-GGT GGC TGA GGG AGA GAA TG-3' (forward) and 5'-CTC GGC AGA TGG TTT CCT TG-3' (reverse). Results were analyzed using the conventional  $\Delta\Delta$ Ct method. For human samples, CDC25A and two control genes (HPRT and YWHAZ) were amplified using the TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix and Taqman<sup>®</sup> inventoried assay (respectively, hs 00947994-m1, hs 01003267-m1, hs 00237047-m1) (Applied Biosystem). Results were normalized using GeNorm program.



## Supplemental figure legends

### Figure S1. CDC25A is constitutively expressed in $MPL^{W515L}$ -positive cell lines

CDC25A protein level was analyzed by western blot on  $MPL^{WT}$  and  $MPL^{W515L}$ -expressing BA/F3 cells. S: steady state; (-): TPO deprivation for 12hours; (+): TPO (10 ng/ml) re-stimulation for 12 hours.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Western blots are representative of 3 independent experiments.

### Figure S2. PI3K/Akt and MAPK pathways are not involved in CDC25A deregulation downstream of $JAK2^{V617F}$ .

$JAK2^{V617F}$ -expressing FDC-P1-EPOR cell lines were treated with AG490 (50 $\mu$ M, 1h) (A), LY294002 (25 $\mu$ M, 1h), Wortmannin (100nM, 1h) (B) or PD98059 (50 $\mu$ M, 1h) (C) and subjected to Western blot analysis for CDC25A, P-Akt (ser 473), P-Erk. Erk, Akt and  $\beta$ -actin levels were used as control. Western blots are representative of 3 independent experiments.

### Figure S3. CDC25A is not regulated at the mRNA level downstream of $JAK2^{V617F}$ .

CDC25A transcripts were quantified by RQ-PCR in (A)  $JAK2^{WT}$  and  $JAK2^{V617F}$ -expressing FDC-P1-EPOR cell lines under normal conditions of culture and in (B)  $JAK2^{V617F}$ -expressing FDC-P1-EPOR cell lines, HEL and SET-2 cell lines after treatment with AG490 (50 $\mu$ M, 1h). Results are the mean  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments.

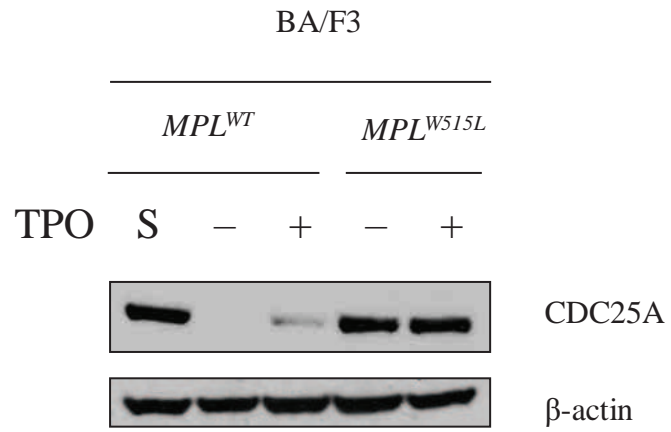


Figure S1

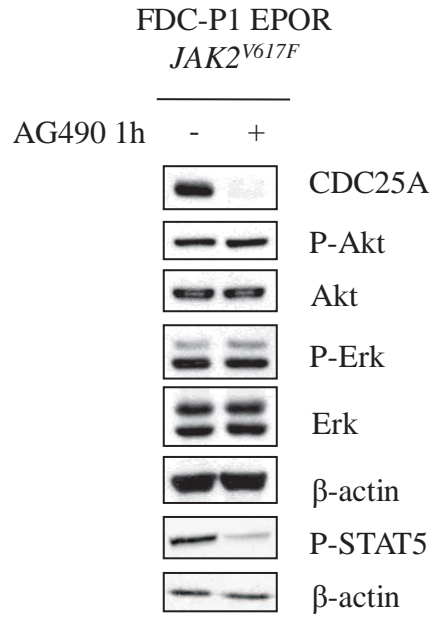
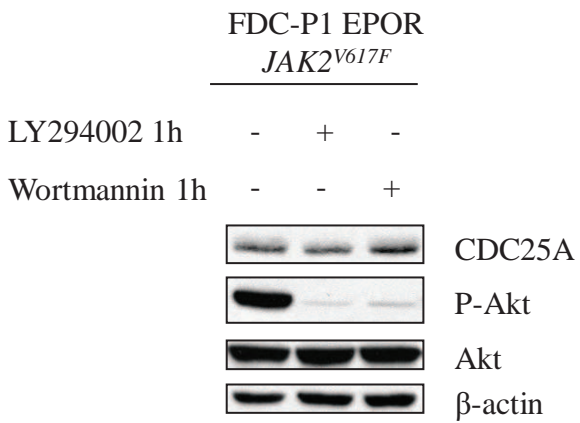
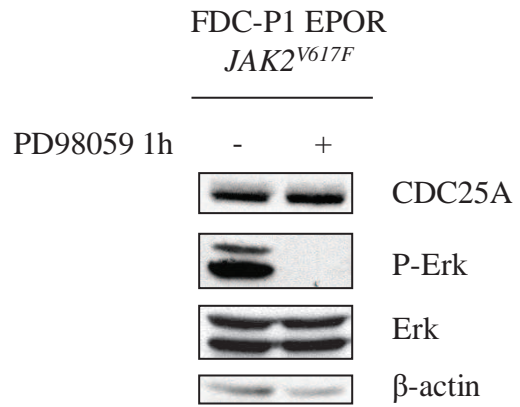
**A****B****C**

Figure S2

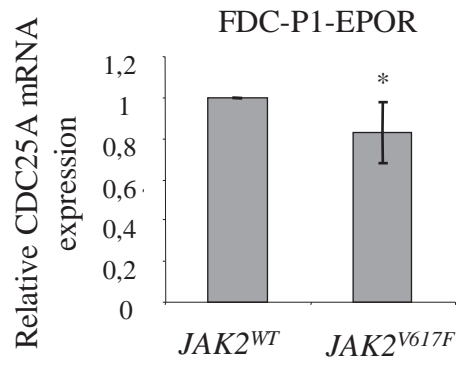
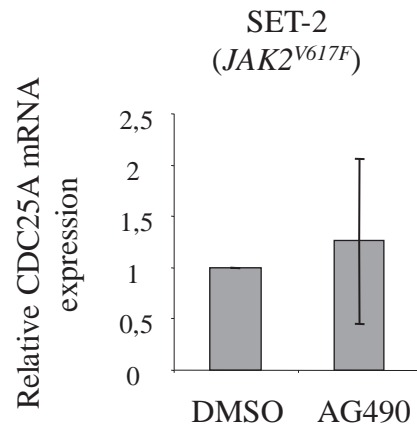
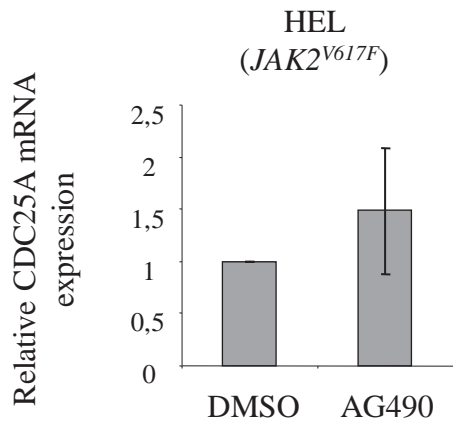
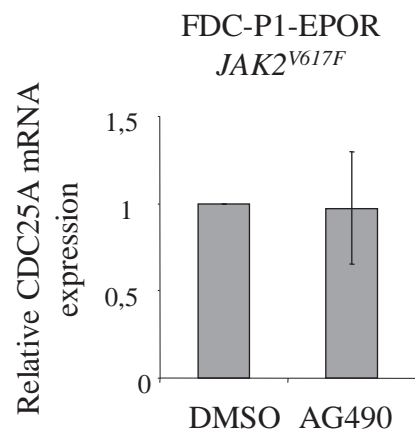
**A****B**

Figure S3

### III. RESULTAT 2 : STATUT DE CDC25A ET ANALYSE DE SON INHIBITION DANS LA MYELOPOIESE PHYSIOLOGIQUE ET EN AVAL DE JAK2<sup>V617F</sup>

#### A. Introduction

La première partie de notre travail nous a permis d'observer une surexpression de CDC25A en aval de l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> ainsi qu'un rôle potentiel de CDC25A dans l'érythropoïèse précoce. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle CDC25A joue un rôle majeur dans l'expansion hématopoïétique accrue des NMP.

Les données bibliographiques bien que peu nombreuses suggèrent l'implication de régulateurs du cycle cellulaire dans l'hématopoïèse physiologique. Deux des acteurs les plus étudiés au cours de la différenciation myéloïde sont p27<sup>kip1</sup> et p21<sup>cip1</sup>. Ces protéines possèdent une fonction antagoniste à celle de CDC25A sur les couples CDK/Cycline. En effet, leur rôle principal est d'inhiber les couples CDK/Cycline de la transition G1/S. Des travaux montrent que le taux d'ARNm et protéique de p27<sup>kip1</sup> et p21<sup>cip1</sup> augmente en fin de différenciation érythroïde de progéniteurs de donneurs sains (Panzenbock et al., 1998) et également granulocytaire pour p27<sup>kip1</sup> (Klausen et al., 2004). Ces deux protéines semblent jouer un rôle en faveur des différenciations myéloïdes. En effet, la surexpression de p27<sup>kip1</sup> induit la différenciation granulocytaire des lignées leucémique U937 et HL60 (Liu et al., 1996), (Muto et al., 1999) et érythroïde de la lignée K562 (Munoz-Alonso et al., 2005). De son côté, la surexpression de p21<sup>cip1</sup> entraîne également la différenciation granulocytaire de la lignée U937 (Liu et al., 1996) et la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire des lignées K562 (Munoz-Alonso et al., 2005) et CMK (Matsumura et al., 1997) respectivement. Aussi, des expériences d'inhibition de p27<sup>kip1</sup> ou p21<sup>cip1</sup> par siRNA suggèrent qu'elles sont nécessaires pour la différenciation granulocytaire de la lignée leucémique HL-60 par l'ATRA (Horie et al., 2004). De manière intéressante, des analyses de PCR quantitative réalisées au cours de la différenciation érythroïde de progéniteurs de patients suggèrent que le taux d'ARNm de p27<sup>kip1</sup> est diminué dans certains stades érythroblastiques de cellules portant la mutation JAK2<sup>V617F</sup> en association avec une augmentation de la prolifération cellulaire (Bruchova et al., 2009).

D'autres régulateurs du cycle cellulaire voient leur taux varier au cours des différenciations érythroïde et granulo-monocytaire. Ainsi, lors de la différenciation érythroïde, l'augmentation de la prolifération s'accompagne d'une forte augmentation de l'expression protéique des cyclines D3 et E ainsi que de CDK2 (Dai et al., 2000). L'expression de ces protéines, au cours de la différenciation, corrèle avec la proportion de cellules en phase S et décroît rapidement en fin de maturation terminale (Dai et al., 2000). Aussi, l'expression de la cycline D et des CDK2, 4 et 6 diminue lors de la différenciation granulocytaire terminale, alors que l'expression de la cyclin E paraît augmenter (Klausen et al., 2004).

En ce qui concerne CDC25A, les données bibliographiques sont peu nombreuses. Des travaux montrent une diminution de son expression lors de différenciations granulocytaire et érythroïde des lignées leucémique ML-1 (induite par l'ATRA) (Shimizu et al., 1999) et HB60-5 (induite par l'EPO) (Tamir et al., 2000) respectivement. Cependant, son expression et sa fonction n'ont jamais été étudiées au cours de la différenciation de cellules primaires.

La deuxième partie de mes travaux vise donc à (i) déterminer le statut et la fonction de CDC25A au cours de différenciations myéloïdes physiologiques (ii) évaluer les stades auxquels CDC25A est surexprimée en aval de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> (iii) étudier les conséquences de sa surexpression à ces stades et (iv) déterminer l'effet d'un inhibiteur des CDC25 aux différents stades de différenciation de progéniteurs sains et de progéniteurs possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

Ces travaux devraient nous permettre une meilleure compréhension du rôle de CDC25A au cours de l'hématopoïèse physiologique et pathologique et une meilleure évaluation de l'impact de l'inhibition pharmacologique des CDC25 dans les NMP possédant l'oncogène.

## **B. Hypothèse de travail**

Les hypothèses de travail sont donc les suivantes : (i) la phosphatase CDC25A est impliquée dans la prolifération cellulaire au cours de la différenciation myéloïde physiologique (ii) sa surexpression entraîne une prolifération excessive des précurseurs

possédant la mutation  $JAK2^{V617F}$  et participe ainsi à l'amplification myéloïde terminale observée dans les NMP Philadelphie négatives (ii) l'inhibiteur des CDC25 diminue la prolifération cellulaire avec une meilleure efficacité sur les cellules mutées.

Ce projet relativement récent est actuellement en cours. Nous n'avons donc pour l'instant répondu qu'à une partie des ces hypothèses. Nous avons mis au point et caractérisé des différenciations érythroïde et granulo-monocytaire *ex vivo*, et évalué l'expression protéique de CDC25A au cours de ces différenciations. Nous avons également commencé à tester l'effet d'un inhibiteur des CDC25 sur la différenciation érythroïde de progéniteurs sains ou muté pour  $JAK2^{V617F}$ . Les premiers résultats obtenus sont présentés.

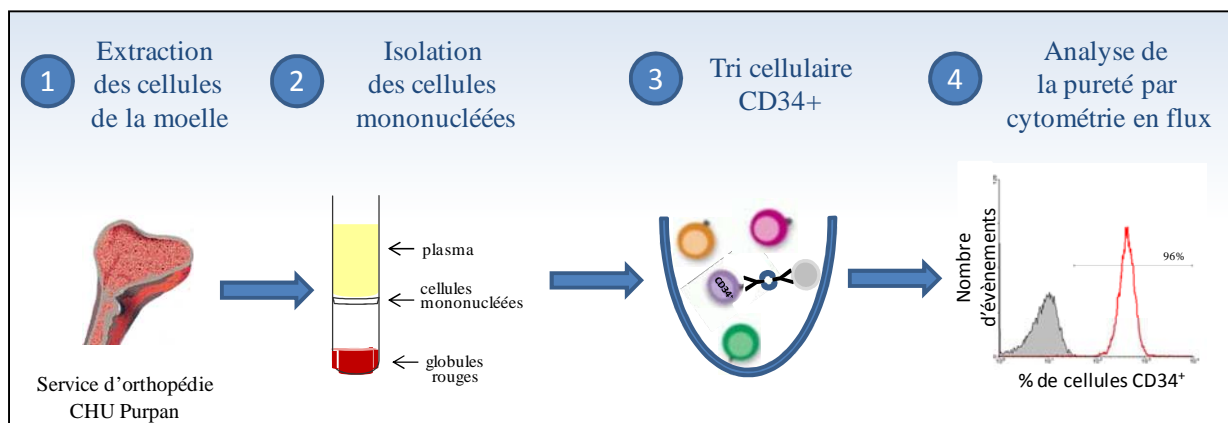
## C. Résultats

### 1. Statut de CDC25A dans les différenciations érythroïdes et granulo-monocytaires

#### a. Matériel et méthodes

##### Purification des progéniteurs $CD34^+$ normaux

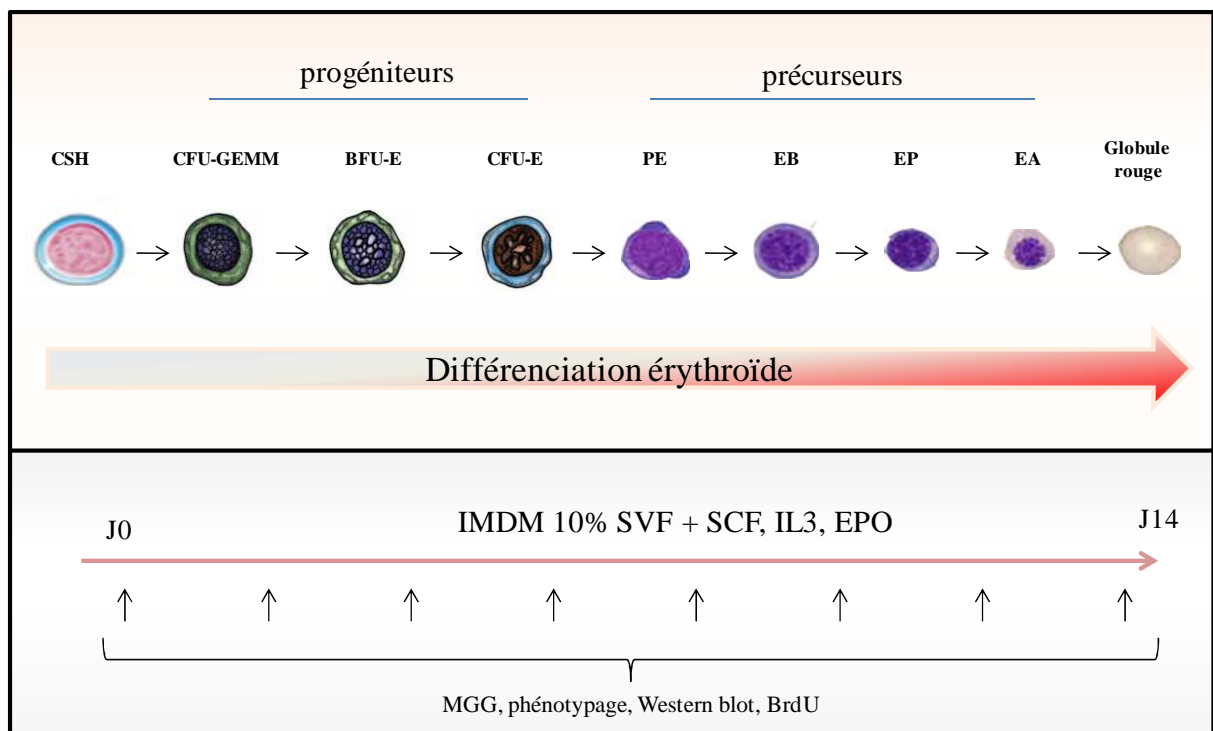
Les cellules hématopoïétiques sont obtenues à partir d'os spongieux issu de chirurgie de la hanche. Après ficoll, les cellules mononucléées sont soumises à un tri magnétique visant à obtenir les progéniteurs  $CD34^+$  (Stem Cell Technologies, Grenoble, France) suivant les recommandations du fournisseur. La pureté cellulaire est ensuite analysée par cytométrie en flux et seuls les échantillons possédant plus de 94% de pureté sont utilisés.



#### Représentation schématique du protocole de tri cellulaire

### Différenciation érythroïde

Les progéniteurs CD34<sup>+</sup> issus de moelle osseuse sont mis en culture dans du milieu Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Lonza) supplémenté de 10% SVF, 50 ng/ml de SCF, 10 ng/ml d'IL-3 (R&D systems, Oxon, UK) et d'1 U/ml d'EPO (protocole inspiré de da Costa Reis Monte-Môr B. *et al.*, 2009 (da Costa Reis Monte-Mor et al., 2009)). La différenciation érythroïde est suivie par coloration MGG (« May-Grünwald Giemsa ») et par analyse de l'expression des antigènes CD34, CD36 et GPA par cytométrie en flux (BDLSRII cytometer, BD Biosciences).



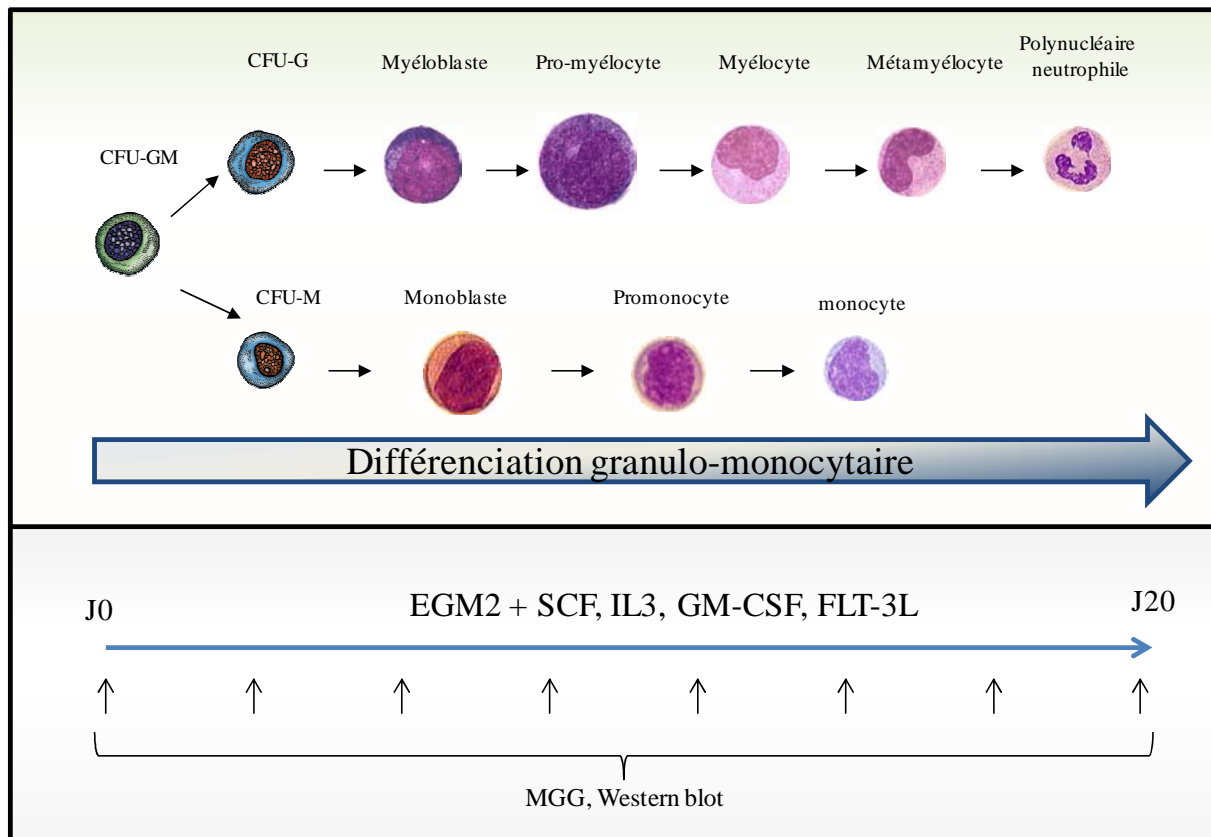
### Représentation schématique du protocole de différenciation érythroïde ex vivo de progéniteurs sains

#### Différenciation granulo-monocytaire :

Les progéniteurs CD34<sup>+</sup> issues de moelle osseuse sont mis en culture dans un milieu « Endothelial Growth Medium 2 » (EGM2) (Lonza, Walkersville, Etats-Unis) supplémenté avec 100 ng/mL de SCF, 4 ng/mL d'IL-3, 10 ng/mL de « Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor » (GM-CSF) et de 100 ng/mL de « FMS-Like Tyrosine kinase 3 Ligand » (FLT-3 Ligand), recombinants humains (R&D systems). La différenciation est suivie par



coloration MGG (« May-Grünwald Giemsa ») et phénotypage à l'aide des anticorps anti-CD34, CD11b et CD14.



**Représentation schématique du protocole de différenciation granulo-monocytaire *ex vivo* de progéniteurs sains**

Western blot

Les westerns blots sont réalisés à partir des anticorps anti-CDC25A (F6), anti-CDC25B (C20), anti-cyclin A (C19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) et anti- $\beta$ -actin (Lab vision corporation, Francheville, France).

Analyse de la prolifération cellulaire par incorporation de BrdU

Les cellules sont incubées pendant 1h avec du BrdU (10 $\mu$ M), puis fixées à l'éthanol à 70% froid durant 20 min. L'incorporation de BrdU est ensuite détectée à l'aide du kit « BrdU staining kit » de chez BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA) suivant les recommandations du fournisseur. La fluorescence est analysée par cytométrie en flux (BDLSRII, Becton Dickinson, Le Pont-De-Claix, France).

## *b. Résultats*

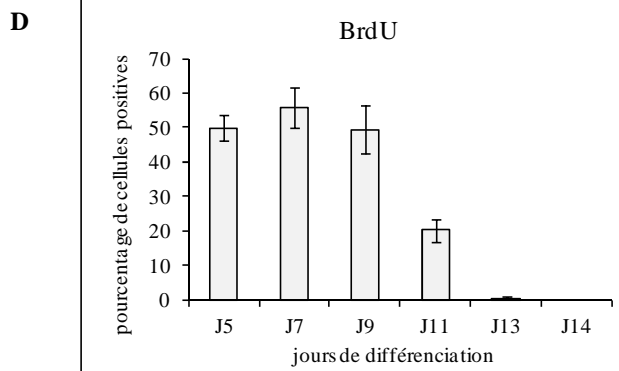
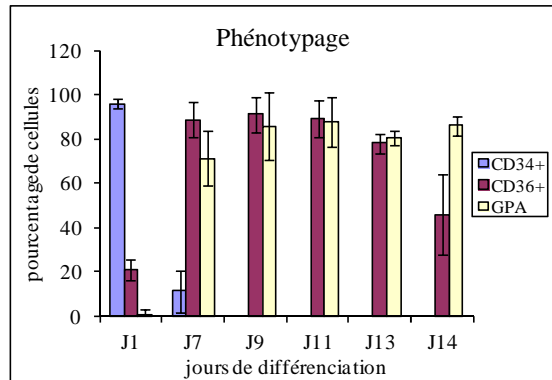
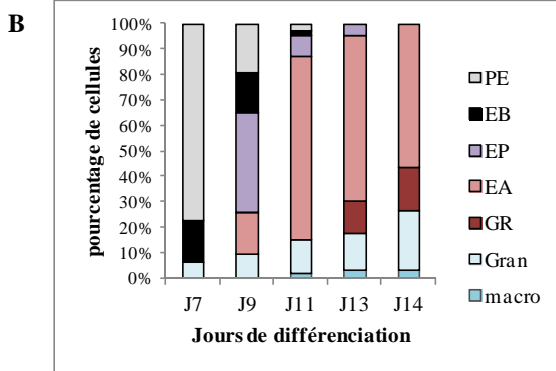
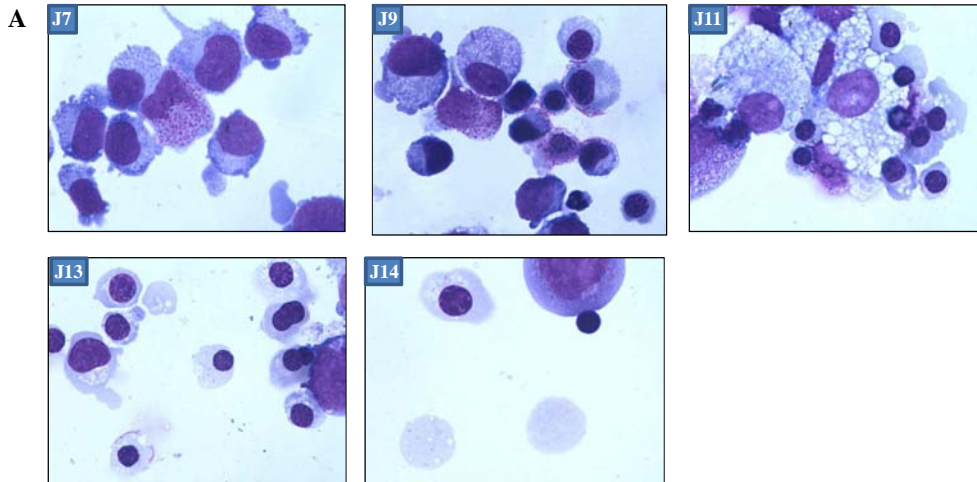
### (1) Caractérisation de la différenciation érythroïde

La différenciation érythroïde est réalisée comme décrit dans le matériel et méthodes. Brièvement, après tri, les cellules CD34<sup>+</sup> sont cultivées dans de l'IMDM additionné de 10% SVF, de SCF, d'IL-3 et d'EPO. Des expériences de phénotypage à l'aide d'anticorps anti-CD34 (un marqueur d'immaturité cellulaire), anti-CD36 (un antigène exprimé par les progéniteurs et précurseurs érythroïdes) et anti-GPA (un antigène présenté spécifiquement par les précurseurs érythroïdes) (résultat 1 C), et une analyse morphologique après coloration des cellules au MGG (résultat 1 A et B) nous ont permis de suivre la différenciation des cellules à partir du 7<sup>ème</sup> jour de culture.

Au jour 0 (J0), qui correspond au jour du tri cellulaire, au moins 94% des cellules (<5.10<sup>5</sup> cellules/ml) possèdent le marqueur d'immaturité CD34<sup>+</sup> à leur surface. Le pourcentage de cellules CD34<sup>+</sup> reste le même au premier jour de différenciation (J1, résultat 1 C). A partir du 7<sup>ème</sup> jour de différenciation, la présence du marqueur CD36 et le fort taux de GPA (environ 75%, résultat 1C) indiquent que les cellules sont en cours de différenciation terminale (voir figure 34 page 102). L'analyse morphologique montre que la majorité des cellules (environ 80%) se trouvent au stade de proérythroblaste à J7 puis apparaissent progressivement les stades ultérieurs jusqu'aux globules rouges à J14. Nous observons à côté de la lignée érythroïde la présence de quelques cellules de la lignée granulocytaire et quelques macrophages probablement due à la présence de sérum dans le milieu de culture.

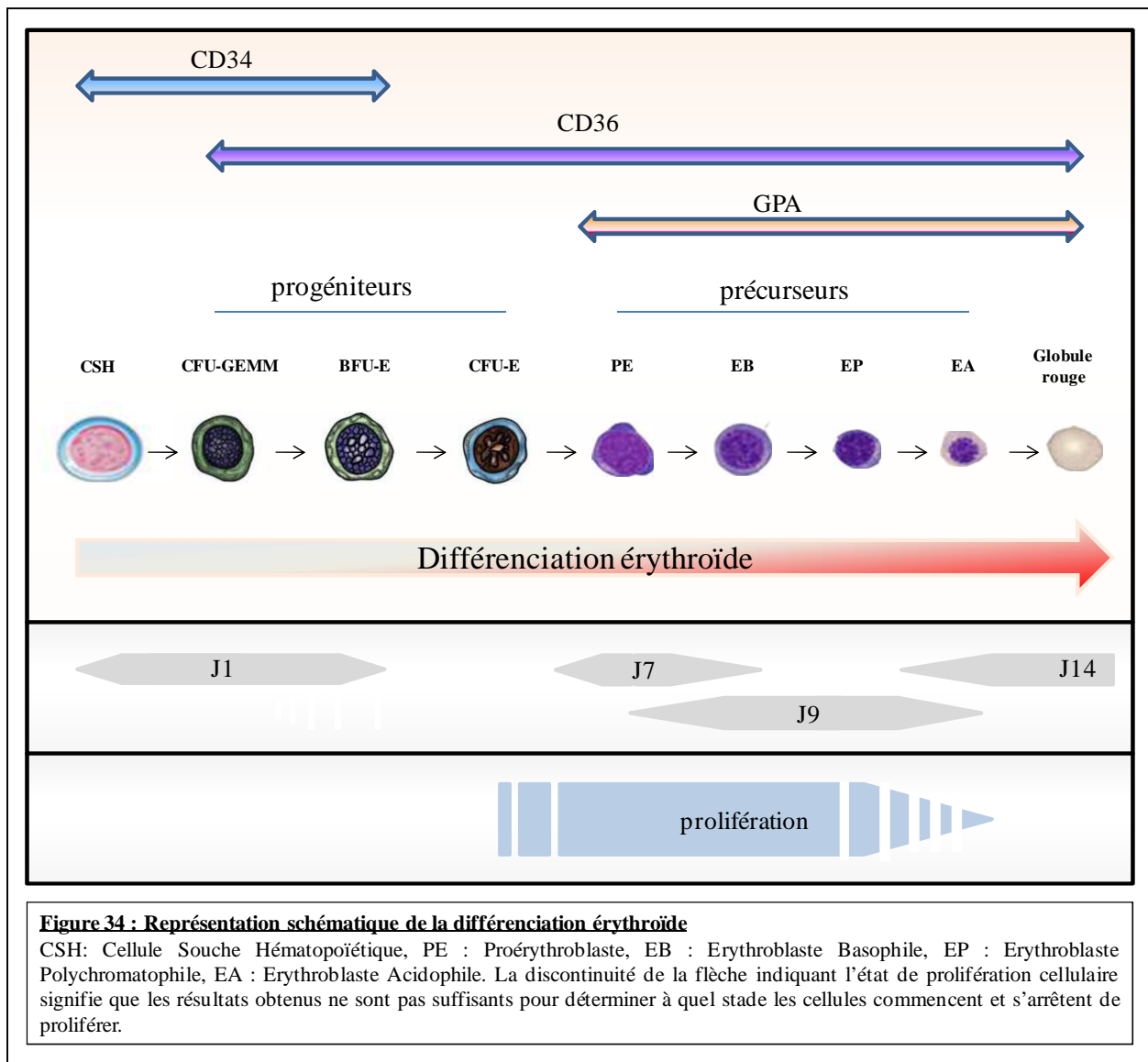
Le taux de prolifération (évalué par incorporation de BrdU) n'a pu être évalué qu'à partir de J5. Du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour, les cellules prolifèrent activement (entre 40 et 60% des cellules ont incorporé du BrdU en l'espace d'une heure) (résultat 1D) puis cessent progressivement de proliférer. Au 11<sup>ème</sup> jour, le pourcentage de cellules ayant incorporé du BrdU en une heure n'est plus que de 25% environ et dans les dernières phases de différenciation terminale (J13-J14), il est nul.

La figure 34 représente de manière schématique l'avancement de la différenciation cellulaire au cours du temps.



**Résultat 1 : Caractérisation de la différenciation érythroïde**

Les progéniteurs CD34<sup>+</sup> sont mis en différenciation érythroïde pendant 14 jours. La différenciation érythroïde est suivie par morphologie après coloration au MGG (Figure 1A et 1B) et phénotypage (Figure 1C) comme décrit dans le matériel et méthode (n= 3). Une analyse de la prolifération cellulaire est réalisée à différents jours de la différenciation par test d'incorporation de BrdU (Figure 1D) (n=3). PE = Proérythroblaste, EB = Erythroblaste Basophile, EP = Erythroblaste Polychromatophile, EA = Erythroblaste Acidophile, GR = Globule Rouge



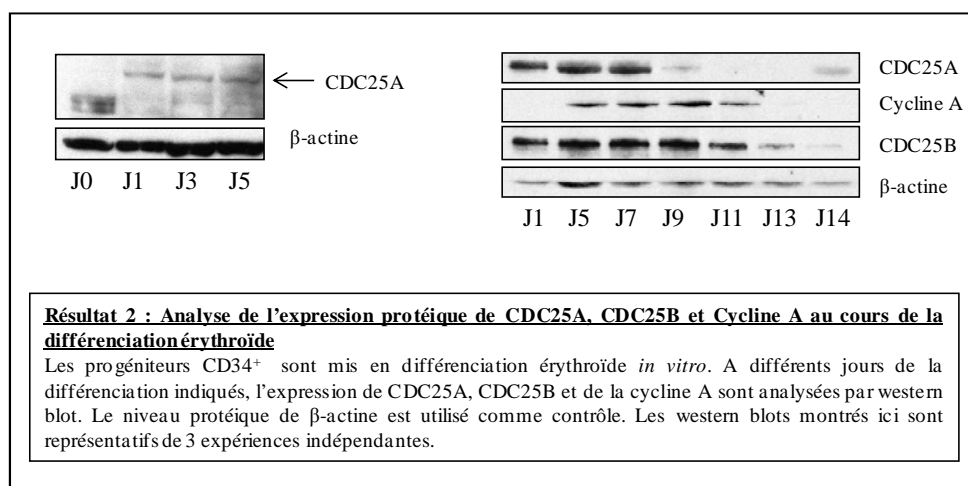
(2) Expression protéique de CDC25A, CDC25B et de la cycline A au cours de la différenciation érythroïde

Nous avons analysé l'expression de CDC25A par western blot au cours de cette différenciation érythroïde (résultat 2) mais également le statut de CDC25B, une autre phosphatase de la famille des CDC25 connue pour être dérégulée dans de nombreuses pathologies malignes (Boutros et al., 2007). Aussi, l'augmentation de son expression suite à des dommages à l'ADN est impliquée dans la capacité de la lignée de LAM U937 d'entrer rapidement en mitose après l'activation du point de contrôle à la transition G2/M (Didier et al., 2008).

Les résultats obtenus suggèrent que CDC25A et B sont toutes deux précocement exprimées au cours de la différenciation érythroïde (résultat 2). En effet, elles sont exprimées dès le premier jour de différenciation (J1) alors que les cellules présentent encore le marqueur d'immaturité CD34. L'expression de CDC25A apparaît constante jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour de différenciation puis diminue et devient indétectable au 11<sup>ème</sup> jour. On note qu'au jour du tri (J0), elle n'est pas exprimée mais l'anticorps révèle trois bandes de poids moléculaire inférieur, légèrement supérieur à 50kDa.

L'expression de CDC25B est, quant à elle, plus stable. En effet, son expression commence à décroître au 11<sup>ème</sup> jour de différenciation alors que les cellules sont majoritairement au stade d'érythroblaste acidophile (résultat 1 et 2), et reste détectable aux derniers jours de la différenciation (résultat 2).

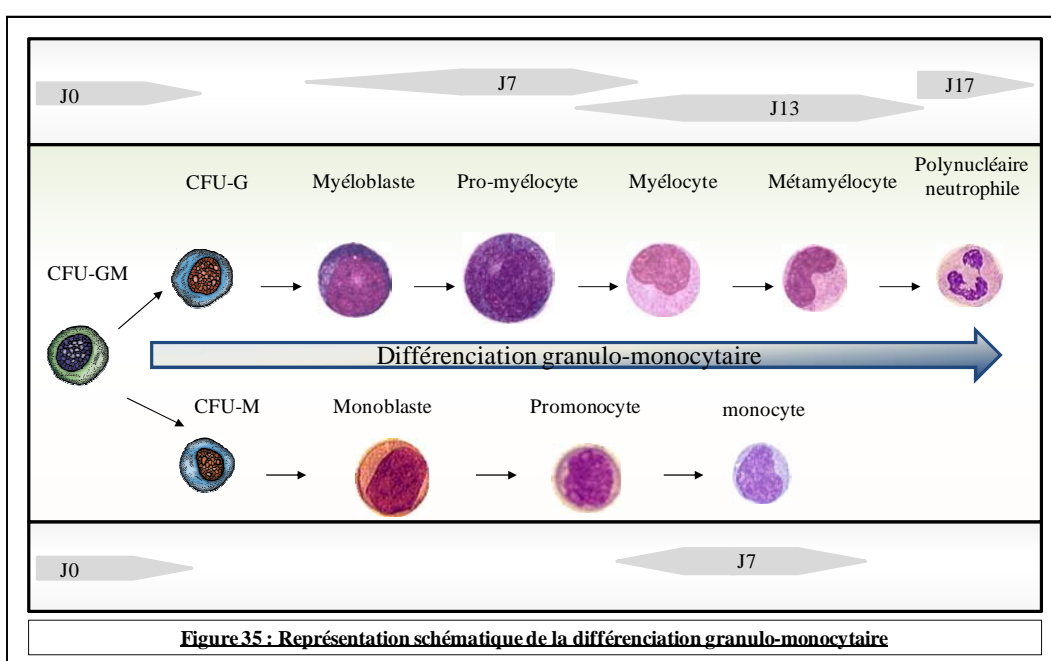
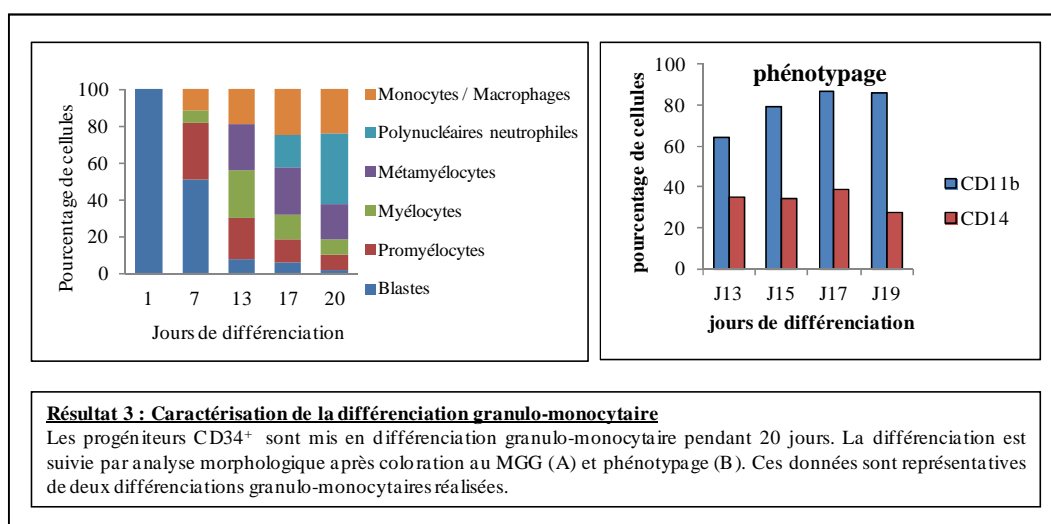
Nous avons également évalué le niveau protéique de la cycline A dans cette différenciation. L'expression de cette cycline de la phase S est souvent corrélée à la prolifération cellulaire et certains auteurs l'utilisent comme marqueur de prolifération dans leurs études (Strand et al., 2011), (Ahlin et al., 2009), (Poikonen et al., 2005). Nos résultats suggèrent qu'elle est absente dans les stades précoces de la différenciation (J1, résultat 2). De plus, son expression corrèle avec le taux de prolifération cellulaire tout au long de la différenciation avec une diminution de son expression observée au 11<sup>ème</sup> jour et une expression indétectable au cours des derniers stades de différenciation (résultats 1 et 2).



L'ensemble de ces résultats montrent une expression précoce des CDC25A et B non corrélée à la prolifération suggérant une autre fonction dans l'hématopoïèse physiologique.

### (3) Caractérisation de la différenciation granulo-monocytaire

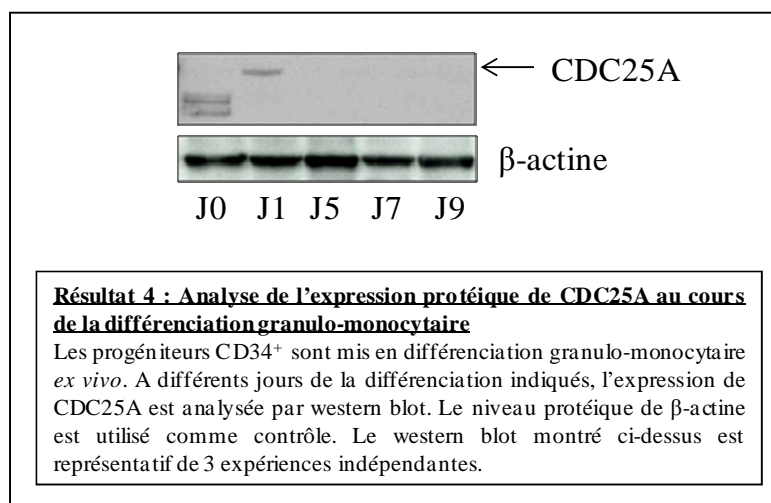
La différenciation granulo-monocytaire est réalisée comme décrit dans le matériel et méthodes. Brièvement, après tri, les cellules  $CD34^+$  sont cultivées dans du milieu EGM2 additionné de SCF, d'IL-3, de GM-CSF et de FLT-3L. Ce protocole, réalisé sur 20 jours, permet d'obtenir une différenciation granulo-monocytaire complète avec la présence de polynucléaires neutrophiles à J17 et de monocytes dès J7 (résultat 3). De plus, on note qu'environ 90% des cellules analysées par phénotypage expriment le marqueur CD11b en fin de différenciation (résultat 3 B), qui est un marqueur connu pour être présent à la fois dans les lignées granulocytaire et monocytaire ce qui suggère une bonne spécificité de la différenciation.



(4) Analyse de l'expression protéique de CDC25A au cours de la différenciation granulo-monocytaire

L'analyse de l'expression de CDC25A par western blot au cours de cette différenciation granulo-monocytaire montre, comme dans la différenciation érythroïde, une expression précoce de CDC25A (résultats 4). Cependant, dans cette différenciation, la phosphatase est déjà indétectable au 5<sup>ème</sup> jour et n'apparaît pas (ou très faiblement) ré-exprimée dans les jours qui suivent.

Ces résultats, bien que préliminaires, montrent une expression différente des CDC25A dans la différenciation érythroïde et granulo-monocytaire.



## 2. Effet d'un inhibiteur des CDC25 sur la différenciation érythroïde de progéniteurs sains ou possédant JAK2<sup>V617F</sup>

Dans la première partie de notre étude, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique des CDC25 par l'IRC-083864 entraîne, tout comme l'inhibition spécifique de CDC25A par siRNA, une diminution de la capacité des progéniteurs CD34<sup>+</sup> de patients possédant la mutation à former des colonies érythroïdes en méthylcellulose.

Les travaux qui suivent visent à analyser l'effet d'un traitement à l'IRC-083864 réalisé tout au long de la différenciation érythroïde précoce (de J1 à J7, voir figure 34 page 102) sur l'état de prolifération, d'apoptose et de différenciation des proérythroblastes obtenus à J7 à

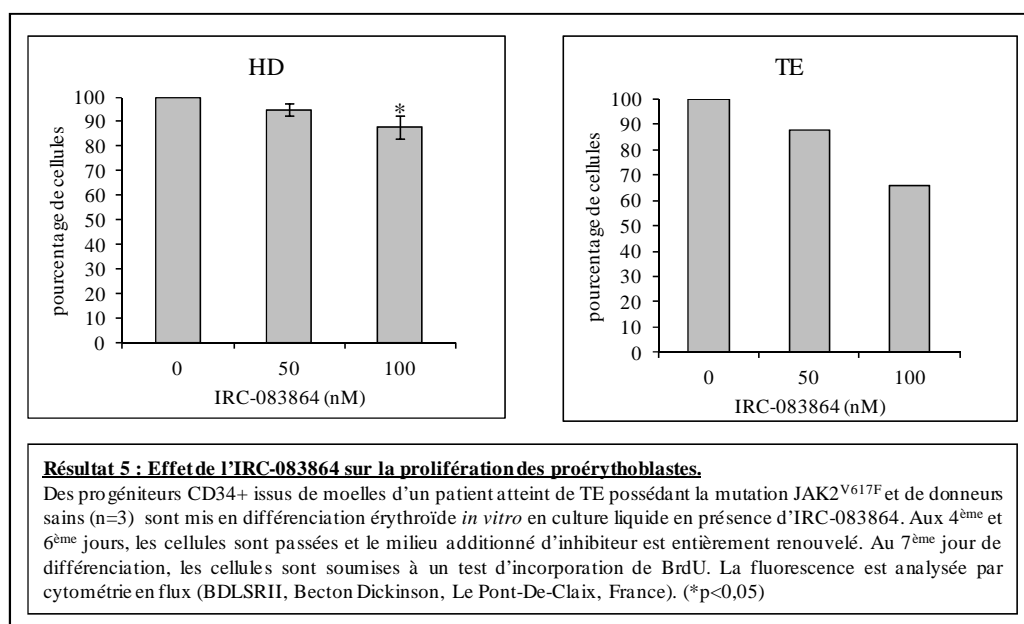
partir de progéniteurs de donneurs sains et d'un premier patient possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

*a. Impact sur la prolifération cellulaire*

Des différenciations érythroïdes sont réalisées *ex vivo*, comme décrit précédemment, à partir de progéniteurs CD34<sup>+</sup> de donneurs sains ou d'un patient atteint de TE portant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. L'IRC-083864 est ajouté à différentes concentrations au milieu dès la mise en culture des cellules. A chaque passage (à J4 et J6), les cellules sont centrifugées et le milieu est entièrement remplacé par du milieu contenant la concentration correspondante d'inhibiteur. Au 7<sup>ème</sup> jour de différenciation (stade proérythroblastique) (résultat 1 page 101), leur taux prolifération est analysé par incorporation de BrdU (résultat 5). Sur les cellules de patient, on observe une inhibition de la prolifération des cellules dès 50 nM qui s'accroît à 100 nM d'inhibiteur (35% des cellules ont incorporé le BrdU en 1 heure contre 54% pour le contrôle non traité).

En revanche, l'effet observé sur la prolifération dans le cas de cellules saines est significative mais moindre.

Ces résultats préliminaires, qui doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients, vont dans le sens d'un effet de l'IRC-083864 sur la prolifération des érythroblastes possédant la mutation alors qu'il a un effet moindre sur la prolifération des proérythroblastes issus de la différenciation de progéniteurs sains.

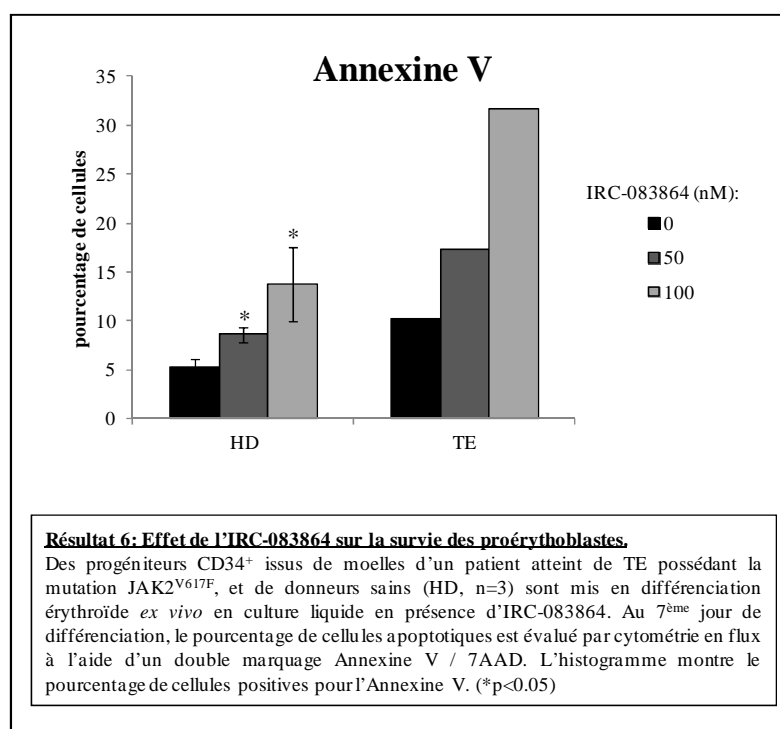




### b. Impact sur la survie cellulaire

En parallèle de l'analyse de la prolifération cellulaire, une évaluation de l'impact de l'IRC-083864 sur la survie cellulaire a également été réalisée par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'annexine V / 7AAD (résultat 6). On note que cet inhibiteur induit de l'apoptose, à la fois dans les proérythroblastes non mutés et mutés. Cependant, il semblerait que les cellules issues de la moelle du patient atteint de TE soient plus sensibles à l'inhibition des CDC25.

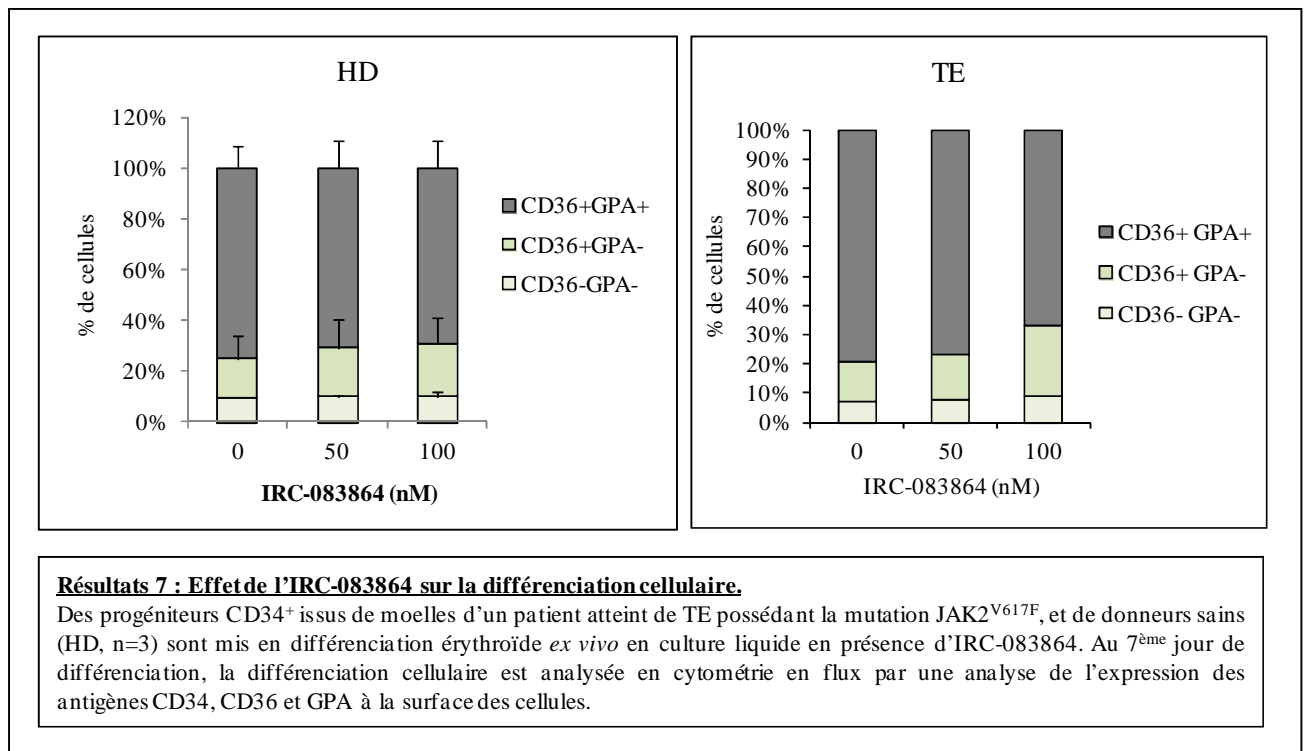
Ces résultats, à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons de patients, suggèrent que cet inhibiteur possède des propriétés pro-apoptotiques sur l'ensemble des progéniteurs mais avec une sensibilité plus importante en présence de la mutation.



### c. Impact sur l'état de différenciation cellulaire

Des analyses de phénotypage réalisées au même jour sur les cellules possédant la mutation montrent une légère diminution de la proportion de cellules GPA positives en fonction de la dose d'IRC-083864 (figure 6). Les tests de statistique ne montrent pas de différence significative pour les cellules de donneurs sains. Cependant, l'effet observé dans le

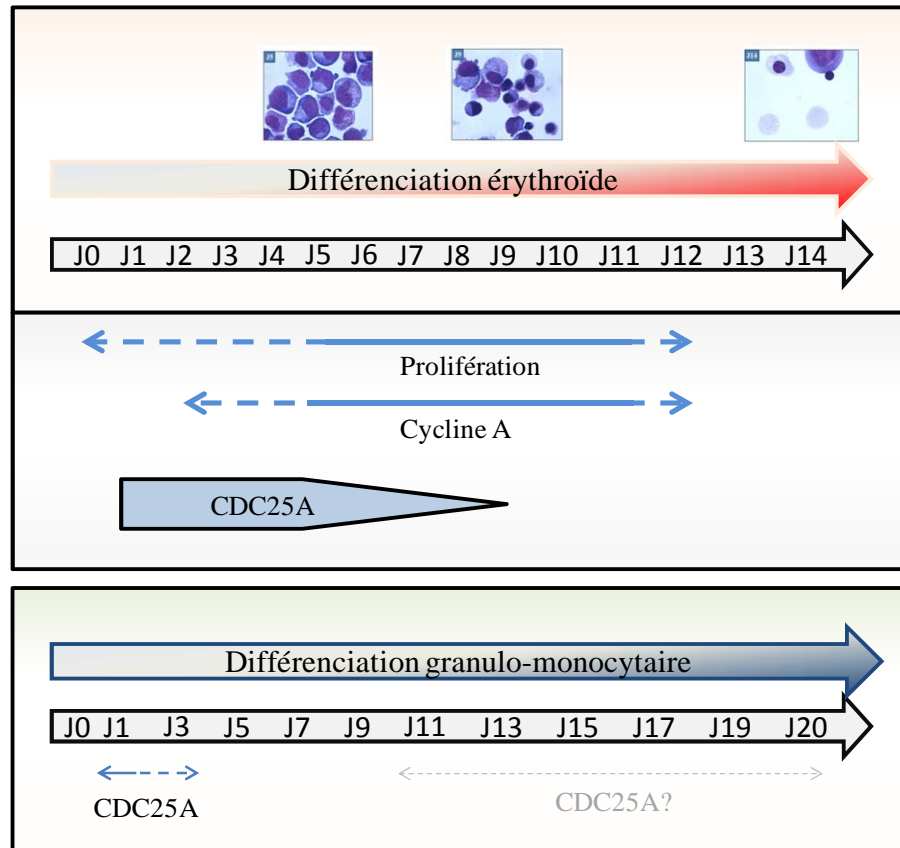
cas des cellules mutées est trop faible pour pouvoir conclure à une réelle altération de la différenciation érythrocytaire.



## D. Conclusion, discussion et perspectives

En conclusion, nos résultats suggèrent que CDC25A est une protéine précocement exprimée au cours des différenciations érythroïde et granulo-monocytaire et qu'elle est absente lors de la différenciation érythroïde terminale. D'autre part, l'inhibition des CDC25 par l'IRC-083864 sur les 7 premiers jours de différenciation entraîne une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose cellules au 7<sup>ème</sup> jour de différenciation de progéniteurs d'un premier patient testé. De plus, les cellules des donneurs sains apparaissent moins sensibles à cet inhibiteur.

Ces travaux apportent des éléments supplémentaires dans la connaissance du statut de CDC25A au cours des différenciations érythroïde et granulo-monocytaire et dans l'évaluation de l'effet différentiel de l'inhibition des CDC25 dans les cellules primaires saines ou possédant JAK2<sup>V617F</sup>. Cependant, certains points restent encore à élucider.



**Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur la statut de CDC25A**

### Expression de CDC25A et prolifération cellulaire

Dans notre modèle de différenciation érythroïde, l'expression de la cycline A corrèle à la prolifération cellulaire (résultat 1 et 2 pages 101 et 103). Ces résultats confirment ceux de Dai et ses collègues qui montrent également une corrélation entre l'expression des cyclines A, E, D3 et de la kinase CDK2, et la prolifération cellulaire dans le modèle de différenciation érythroïde (Dai et al., 2000). En revanche, nos résultats montrent que l'expression de CDC25A n'est pas totalement corrélée à la prolifération. En effet, au 9<sup>ème</sup> jour de différenciation, les cellules prolifèrent encore fortement alors que le niveau de CDC25A est fortement réduit, et au 11<sup>ème</sup> jour, nous n'observons plus d'expression de CDC25A alors que des cellules prolifèrent encore et expriment encore la cycline A (résultat 1D et 2 pages 101 et 103). Cette observation est surprenante étant donné le rôle majeur de la phosphatase dans la transition G1/S et le fait que les composants des complexes CDK2/Cycline E et CDK2/Cycline A, qui font partie de ses substrats, sont exprimés. Ceci peut s'expliquer, soit par une expression de CDC25A non détectée dans nos expériences mais suffisante pour

assurer sa fonction pouvant être associée à une baisse d'expression de ses antagonistes Wee1 et Myt1 qui phosphorylent ces complexes, soit par une possible compensation de la phosphatase à ces stades de différenciation cellulaire. De plus, on note qu'au 1<sup>er</sup> jour de la différenciation (J1), l'expression de CDC25A n'est pas non plus corrélée à l'expression de la cycline A (résultat 2 page 103). Il serait intéressant d'évaluer le statut de prolifération des cellules à ce stade de différenciation. En effet, on peut se demander si CDC25A ne pourrait pas avoir un rôle autre que celui de favoriser la prolifération cellulaire dans ces stades précoces de la différenciation.

### **Stade de décroissance de CDC25A et d'arrêt de prolifération**

La décroissance de CDC25A observée ici en différenciation érythroïde terminale corrèle avec les données bibliographiques montrant une diminution de l'expression de la phosphatase au cours de la différenciation érythroïde de la lignée HB60-5 induite par l'EPO (Tamir et al., 2000). De plus, l'état de prolifération des cellules tout au long de la différenciation corrèle également avec les travaux précédemment réalisés (Dai et al., 2000). Notre étude apporte des informations complémentaires quant aux stades auxquels CDC25A disparaît et à son absence de corrélation avec l'arrêt de prolifération cellulaire discutée précédemment.

Cependant, cette analyse ne nous permet pas de dire précisément à quel stade les cellules s'arrêtent de proliférer ni à quel stade l'expression de CDC25A décroît. En effet, la composition cellulaire est très hétérogène lors de la différenciation terminale (voir résultat 1B page 101). Des expériences de phénotypage avec des anticorps anti-GPA, CD36 et CD71 associée à l'analyse de la prolifération cellulaire par cytométrie en flux nous apporteraient plus de précision quant au niveau de maturation cellulaire auquel les cellules s'arrêtent de proliférer (Merryweather-Clarke et al., 2011) et ainsi d'affiner notre analyse. En ce qui concerne CDC25A, l'absence d'anticorps permettant de détecter des niveaux endogènes d'expression protéique par cytométrie en flux ne nous permet pas de réaliser cette analyse.

### **Expression de CDC25A dans la différenciation granulo-monocytaire et mégacaryocytaire**

Concernant la différenciation granulo-monocytaire, nos résultats sont encore préliminaires. Cependant, nous observons une expression précoce de la phosphatase (J1) et

une chute de son expression entre le 1<sup>er</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de différenciation (résultat 4 page 105). Ces jours sont difficiles à corréler avec un état de différenciation des cellules, d'autant plus que la différenciation monocytaire est plus rapide que la différenciation granulocytaire (résultats 3 et 4 pages 104 et 105). Nous projetons par conséquent de réaliser ces deux types de différenciation séparément avant d'approfondir notre étude.

Nous n'avons pas encore étudié le statut de CDC25A dans la différenciation mégacaryocytaire. Ceci est prévu dans la suite de notre projet.

### **Expression de CDC25A dans les progéniteurs CD34<sup>+</sup> fraîchement triés**

Nous n'avons pas observé d'expression de la phosphatase le jour du tri (J0). Cependant, l'anticorps reconnaît trois protéines d'un poids moléculaire d'environ 50 kDa (résultats 2 et 4). Ces bandes observées sur tous les western blots pourraient être la conséquence soit d'une non-spécificité de l'anticorps, soit de l'existence d'une autre isoforme de CDC25A (il existe une forme de CDC25A peu caractérisée ayant un poids moléculaire d'environ 50 kDa (Wegener et al., 2000)), soit d'un clivage de CDC25A par les caspases dû par exemple à un stress entraîné par le tri cellulaire. Cette dernière hypothèse pourrait être vérifiée en inhibant l'apoptose *via* des inhibiteurs des caspases-2 et 3 tels que VDVAD et DEVD. Notons tout de même qu'une analyse de P-H2AX à J0 n'a pas révélé de dommages à l'ADN (résultat non montré).

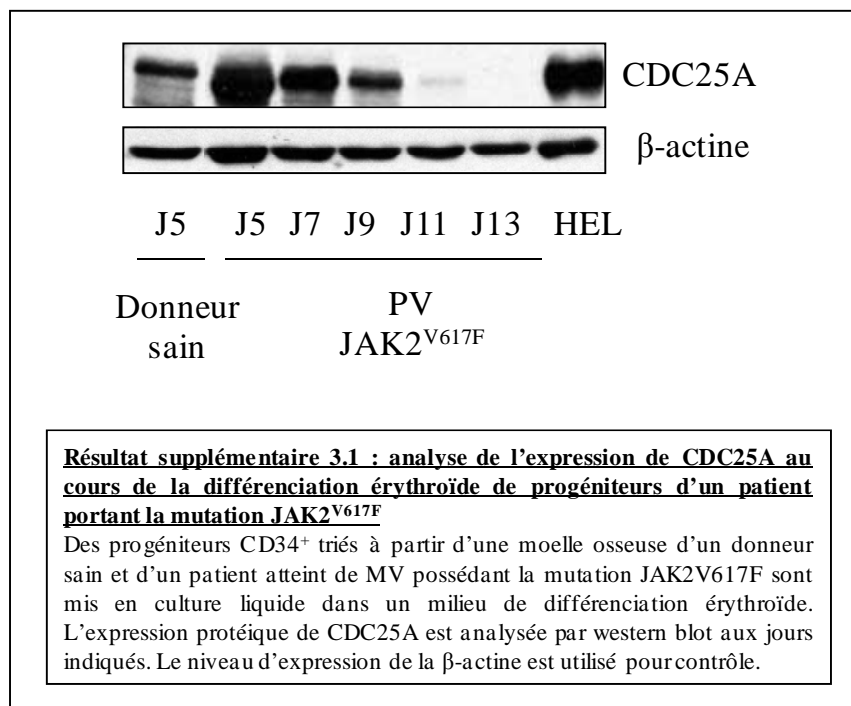
### **Différence d'efficacité de l'IRC-083864 en milieu semi-solide et liquide**

Que ce soit en milieu liquide ou en milieu semi-solide, on note que l'IRC-083864 est efficace à des doses inférieures au micromolaire. Cependant, les doses nécessaires d'IRC-083864 pour obtenir une réponse cellulaire sont plus faibles en milieu liquide (résultats 9 page 84 et résultats 5,6 et 7 et page 106-108). Cette observation est en adéquation avec les données bibliographiques montrant que la dose d'IRC-083864 nécessaire pour obtenir une réponse cellulaire dépend des conditions de culture. Par exemple lorsque la lignée HCT-116 est traitée avec de l'IRC-083864 en culture liquide, l'IC50 de l'IRC-083864 est de 65 nM alors que lorsque les cellules sont à l'état de sphéroïdes, son IC50 est de 750 nM (Brezak et al., 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par une meilleure accessibilité aux cellules de l'inhibiteur en culture liquide, ou une meilleure solubilité du produit, ou encore au fait que le milieu soit entièrement renouvelé à J4 et J6 dans le cas de la culture liquide.

## Identification de la fenêtre de surexpression de CDC25A en aval de l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup>

Dans la première partie de ces travaux, nous avons mis en évidence une surexpression de la phosphatase en aval de la mutation dans les précurseurs myéloïdes (résultat 2 page 75). Dans la deuxième partie, nous avons observé que CDC25A n'est plus exprimée dans les derniers stades de différenciation érythroïde *ex vivo*. Cependant, nous ne connaissons toujours pas la totalité de sa fenêtre de surexpression.

Une première expérience visant à analyser le profil d'expression de CDC25A en aval de l'oncogène a été réalisée. En effet, nous avons suivi l'expression de CDC25A par western blot au cours d'une différenciation érythroïde réalisée *ex vivo* à partir de progéniteurs CD34<sup>+</sup> d'un patient atteint de MV positifs pour JAK2<sup>V617F</sup> et comparé son niveau à celui obtenu à au 5<sup>ème</sup> jour de la différenciation de progéniteurs d'un donneur sain (résultat supplémentaire 3.1).



Aux 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours de la différenciation, les cellules de ce patient présentent une surexpression de CDC25A en comparaison avec des cellules de donneurs sains (résultat supplémentaire 3.1 et résultat 2C page 75 (PV#2)). De plus, contrairement aux cellules de donneurs sains, même si l'expression de la phosphatase décroît au cours de la différenciation terminale, CDC25A est toujours exprimée à J9 dans les cellules mutées.

Lors de la différenciation des progéniteurs sains (résultats 2 page 75), nous avons observé, dans tous les cas, un niveau de CDC25A similaire au 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour et fortement réduit à J9. Or, on note ici que le niveau de CDC25A à J9 chez le patient est presque aussi élevé qu'au J5 du donneur sain.

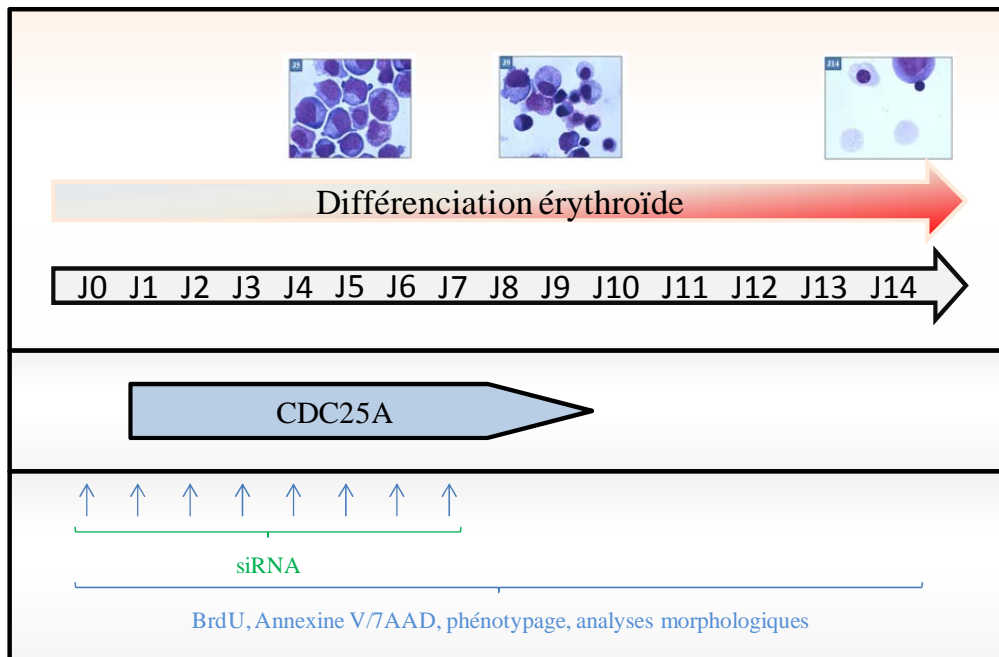
Ces résultats mènent à penser à une surexpression de CDC25A chez ce patient, au moins dès le 5<sup>ème</sup> jour de la différenciation et qui semble, bien que plus faible, toujours surexprimée au 9<sup>ème</sup> jour. Cependant, des expériences sur d'autres échantillons de patients sont nécessaires afin de confirmer la prolongation de l'expression de CDC25A. De plus, il serait également intéressant d'analyser si cette surexpression concerne les stades précoces de la différenciation.

Concernant les différenciations mégacaryocytaire, granulocytaire et monocytaire, en dehors de la surexpression de CDC25A observée dans l'ensemble des précurseurs myéloïdes par immunohistochimie (figure 2 B page 75), nous n'avons pour le moment pas plus d'éléments concernant sa surexpression.

Nous projetons donc, dans la suite de nos travaux, de comparer le profil d'expression de CDC25A dans l'ensemble de ces différenciations à partir de progéniteurs sains et possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

### **Evaluation de la fonction de CDC25A au cours de la différenciation myéloïde de progéniteurs sains**

Afin d'appréhender les conséquences d'une dérégulation de CDC25A dans des pathologies hématologiques myéloïdes, il est important de connaître sa fonction au cours de la myélopoïèse physiologique. Pour cela, nous allons réaliser des expériences d'inhibition transitoire de CDC25A par siRNA selon le protocole schématisé ci-dessous tout au long des différenciations myéloïdes et analyser leur conséquences sur la prolifération (test BrdU), l'apoptose (test Annexine V/ 7AAD), et la différenciation cellulaire (phénotypage et étude morphologique). La transfection des cellules au 1<sup>er</sup> et 5<sup>ème</sup> jour de différenciation érythroïde a déjà été mise au point.



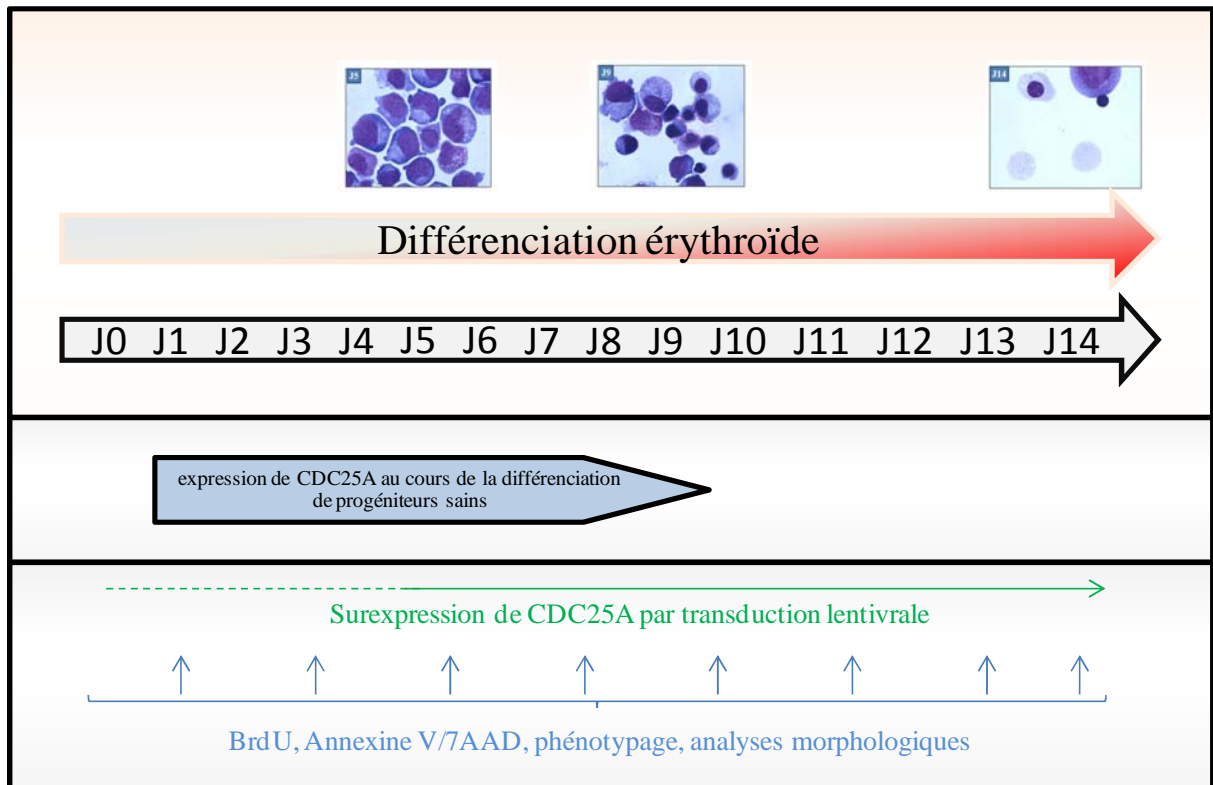
**Schéma représentatif du protocole visant à évaluer la fonction de CDC25A dans le cas de la différenciation érythroïde**

L'utilisation des modèles cellulaires (HB60, UT7) nous permettra également de réaliser des analyses plus rapides et moins coûteuses en cellules primaires.

**L'analyse des conséquences de la surexpression de CDC25A dans les progéniteurs possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>**

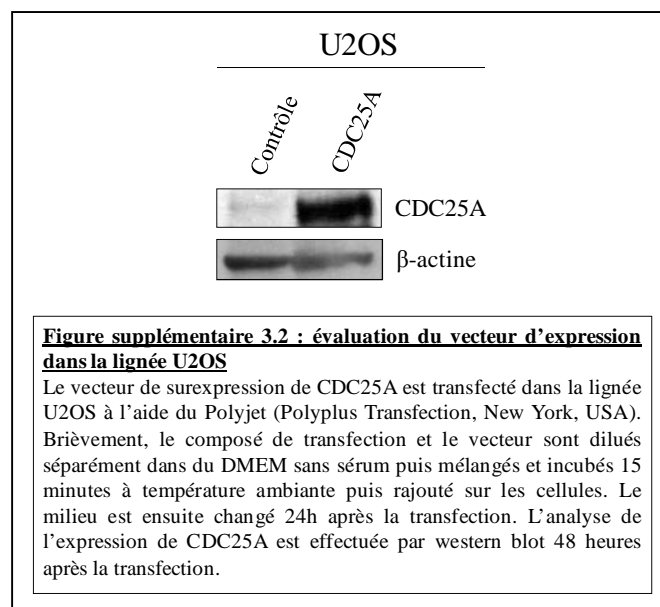
Afin d'évaluer les conséquences de sa surexpression en aval de l'oncogène, après avoir identifié les stades auxquels CDC25A est surexprimée chez les patients, nous projetons de surexprimer CDC25A dans les cellules de donneurs sains à ces stades de différenciation par transduction lentivirale.





**Schéma représentatif du protocole visant à évaluer les conséquences d'une surexpression de CDC25A au cours de la différenciation érythroïde**

Cette partie du projet est déjà amorcée. En effet, Christine Didier et Christine Dozier, deux membres de notre équipe, ont déjà construit le vecteur d'infection contenant CDC25A et le gène de la GFP exprimé sous la dépendance d'une IRES. La transfection de ce vecteur dans la lignée U2OS entraîne bien une surexpression de CDC25A (figure supplémentaire 3.2).



Des premières expériences de transduction lentivirale de ce vecteur ont été réalisées dans des progéniteurs et proérythroblastes issus de différenciation érythroïdes réalisées *ex vivo*. Ces expériences de mise au point sont encourageantes en ce qui concerne la faisabilité de cette expérience. En effet, une double infection de cellules CD34<sup>+</sup>, et de cellules à J8-J9 d'une différenciation érythroïde et J8-J9 d'une différenciation granulo-monocytaire a permis d'obtenir un taux de transduction de 70%, 65% et 85% réciproquement. Nous n'avons cependant pas encore déterminé si les cellules transduites surexpriment bien CDC25A ni les conséquences de sa surexpression.

## **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude a mis en évidence une surexpression de la phosphatase CDC25A en aval de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> mettant en jeu un mécanisme de régulation positif impliquant STAT5 et la déphosphorylation du facteur d'initiation de la traduction cap-dépendante eIF-2 $\alpha$ . De plus, les progéniteurs de patients portant la mutation apparaissent plus sensibles à l'effet de l'inhibition des CDC25 que les progéniteurs de donneurs sains (résultat 9 et 10 page 84 et 85) et des premiers travaux mènent à penser que ce pourrait aussi être le cas des proérythroblastes (résultats 5-6-7 pages 106-108). Nous avons également vu que le salubrinal, un inhibiteur de eIF-2 $\alpha$ , diminue nettement la croissance de la lignée FDC-P1-EPOR JAK2<sup>V617F</sup> et de progéniteurs possédant la mutation (figure 5C de l'article).

Suite à ces observations nous pouvons proposer 3 perspectives d'études visant à évaluer l'intérêt thérapeutique de certains inhibiteurs en aval de JAK2 et une ouverture de l'étude à d'autres pathologies:

➤ L'inhibiteur des CDC25

La reproduction des résultats obtenus sur un plus grand nombre d'échantillons serait avant tout nécessaire afin de confirmer nos observations. Cependant, l'ensemble des résultats obtenus concernant cet inhibiteur suggèrent la présence d'une fenêtre thérapeutique concernant le compartiment érythrocytaire et sont donc encourageants.

Pour aller plus loin dans l'évaluation de l'intérêt thérapeutique de l'inhibition des CDC25, nous projetons de tester l'efficacité et la toxicité de l'inhibiteur des CDC25 utilisé dans notre étude (l'IRC-083864) sur le modèle murin possédant l'oncogène déjà utilisé dans l'article. Ce modèle exprime l'allèle de JAK2<sup>V617F</sup> de manière constitutive et hétérozygote sur le locus de JAK2, avec un niveau protéique de JAK2 comparable à celui des souris contrôles (Marty et al., 2010). Les souris développent un phénotype de NMP sévère avec TE, MV, splénomégalie et MFP. Nous pourrions également tester, à cette occasion, l'effet de l'association de l'IRC-083864 avec des inhibiteurs de JAK2 testés en clinique.

➤ Le salubrinal

Le facteur eIF-2 $\alpha$  a déjà été retrouvé dérégulé dans divers cancers (Rosenwald et al., 2008), (Wang et al., 1999), (Rosenwald et al., 2003), (Rosenwald et al., 2001), (Wang et al., 2001), (pour revue, Rosenwald et al., Oncogene, 2004 (Rosenwald, 2004)). Certaines équipes ont déjà envisagé une potentielle efficacité d'un traitement au salubrinal dans certaines pathologies malignes. Cette perspective est souvent évaluée en vue d'une sensibilisation à un traitement anticancéreux (Sequeira et al., 2009), (Schewe and Aguirre-Ghiso, 2009). Aussi, cet inhibiteur a déjà été testé sur la souris et ne paraît pas avoir d'effet toxique à lui seul (Wu et al., 2011).

L'ensemble de ces données nous mènent à penser à un potentiel intérêt thérapeutique du salubrinal dans les NMP possédant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. Cette perspective peut notamment être envisagée en association avec d'autres inhibiteurs car il pourrait permettre de potentialiser l'effet de certains traitements comme des agents génotoxiques tel que l'hydroxyurée (utilisée actuellement en thérapie) ou encore des inhibiteurs de JAK2.

Des analyses complémentaires visant à définir la présence d'une potentielle fenêtre thérapeutique *in vitro* sont nécessaires afin de savoir si les cellules possédant la mutation ont une sensibilité accrue à cet inhibiteur en association, ou non, à d'autres traitements. Pour ce faire, nous pourrions réaliser le même type d'expériences que celles réalisées avec l'IRC-083864 mais, cette fois-ci, avec le salubrinal. Nous pourrions également évaluer l'effet de cet inhibiteur à la sensibilisation à différents stress, en associant ce traitement avec des agents génotoxiques tels que l'hydroxyurée ou des inhibiteurs de JAK2 ou encore des facteurs négatifs de la myélopoïèse comme le TNF- $\alpha$ . Une étude plus poussée pourra ensuite être envisagée chez la souris.

➤ D'autres stratégies

Notre étude met en avant une interférence de JAK2<sup>V617F</sup> avec une voie stress pouvant jouer sur la traduction globale des protéines et ainsi moduler l'ensemble de l'activité cellulaire. Nous ne sommes pas les seuls à avoir mis en évidence la mise à profit des voies de stress cellulaire par JAK2<sup>V617F</sup>. En effet, Nakatake et ses collègues ont déjà observé une altération des voies de réponse aux dommages à l'ADN impliquant p53 en aval de la mutation

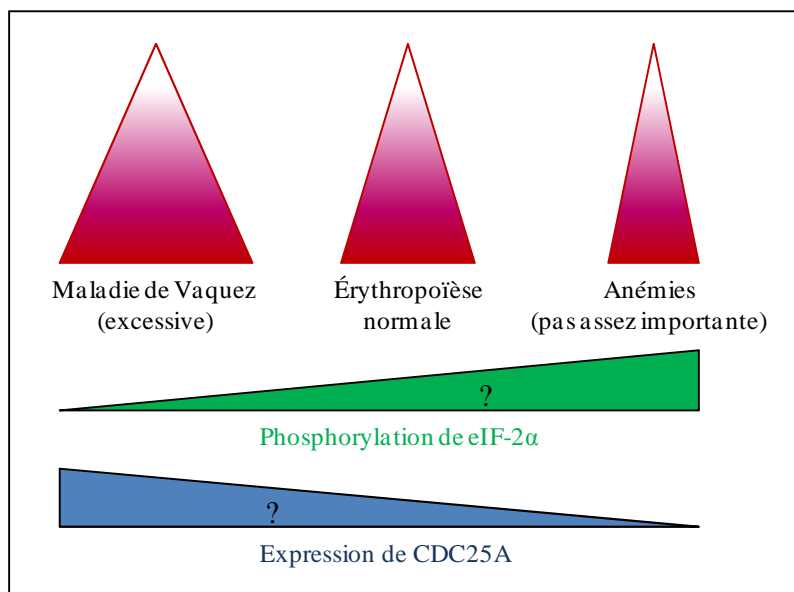
(Nakatake et al., 2011). Cette altération serait également impliquée dans l'indépendance des cellules vis-à-vis du sevrage en cytokines. De plus, d'autres travaux suggèrent que les cellules possédant JAK2<sup>V617F</sup> produiraient une grande quantité de TNF $\alpha$  auquel elles seraient, contrairement aux cellules saines, résistantes (Fleischman et al., 2011). Aussi, les érythroblastes portant la mutation JAK2<sup>V617F</sup> possèdent une résistance à l'apoptose induite par l'activation des récepteurs de morts (Zeuner et al., 2006). La mutation JAK2<sup>V617F</sup> pourrait par conséquent conférer aux cellules un avantage de croissance face à divers types de stress (comme la diminution du taux de cytokines, les dommages à l'ADN, l'augmentation du taux de facteurs solubles inhibant la myélopoïèse ou encore certains signaux de mort cellulaires) qui, cumulés, pourrait participer à l'expansion myéloïde terminale observée dans les NMP. De plus, cette altération de la réponse au stress pourrait aussi entraîner une accumulation d'altérations génétiques et la transformation en LAM. On peut donc se demander si cette altération de la réponse au stress ne pourrait pas être mise à profit dans le traitement des NMP philadelphie négatives en poussant les cellules à acquérir des altérations irrémédiables et entraîner ainsi leur mort. Il s'agit d'une stratégie déjà envisagée dans le cadre des acteurs de la prolifération cellulaire. C'est le cas notamment de l'utilisation des inhibiteurs de Chk1 visant à sensibiliser préférentiellement les cellules cancéreuses aux dommages à l'ADN entraînés par la chimiothérapie ou les radiations ionisantes (Garrett and Collins, 2011). Or certains de ces inhibiteurs de Chk1 sont actuellement testés en clinique.

➤ L'ouverture de l'étude à l'ensemble des NMP philadelphie négatives et à d'autres pathologies

D'autres mutations que JAK2<sup>V617F</sup> ont été mises en évidence dans les NMP (voir tableau page 24). Nous avons également retrouvé, dans nos travaux, une dérégulation de CDC25A en aval de l'oncogène MPL<sup>W515L</sup>, qui est une mutation du récepteur de la TPO retrouvée dans certains cas de MFP (figure supplémentaire 1 de l'article). L'élargissement de notre étude aux autres mutations trouvées dans les NMP nous permettrait d'évaluer si le ciblage de CDC25A (ou de la phosphorylation de eIF-2 $\alpha$ ) serait envisageable dans l'ensemble des NMP, juste en aval de certaines mutations, ou uniquement en aval de JAK2<sup>V617F</sup>. De plus, la surexpression de CDC25A en aval de JAK2<sup>V617F</sup> apparaît faire intervenir le facteur de transcription STAT5. Or STAT5 est également activé de manière constitutive dans de nombreux autres cancers. C'est le cas notamment dans des LAM, des LMC, des érythroleucémies, des leucémies aiguës lymphoblastiques mais également dans des cancers

solides tels que le cancer du sein de la tête et du cou (Yu and Jove, 2004) (Ferbeyre and Moriggl, 2011), de la prostate (Liao and Nevalainen, 2011), du colon (Mao et al., 2011), du foie (Lee et al., 2006) ou encore de la peau (Mirmohammadsadegh et al., 2006). On peut aussi se demander si la dérégulation de la voie STAT5/eIF-2 $\alpha$ /CDC25A ne pourrait pas également concerner certains de ces cancers.

A l'inverse des NMP, certaines pathologies sont accompagnées d'une dérégulation négative de la myélopoïèse. L'une des dérégulations négatives les plus répandues est l'anémie. Elle est souvent rencontrée suite à des pathologies chroniques (Cullis, 2011) ou encore dans les syndromes myélodysplasiques. Il s'agit d'une complication fréquente de cancers (près de 40% des patients sont anémiés au diagnostic) mais également de pathologies inflammatoires telles que des infections chroniques ou des maladies auto-immunes (Morceau et al., 2009). On peut donc se demander si eIF-2 $\alpha$  et CDC25A ne pourraient pas être négativement dérégulées dans certaines de ces anémies, notamment celles liées à la présence de cytokines inflammatoires comme le TNF $\alpha$  puisque eIF-2 $\alpha$  semble impliqué dans l'apoptose entraînée par le TNF $\alpha$  (Srivastava et al., 1998).



L'étude de la régulation et de l'implication de eIF-2 $\alpha$  et de CDC25A dans ces pathologies pourrait être intéressante dans le but d'améliorer la compréhension de certaines d'entre elles et peut être, à plus long terme, d'en améliorer le traitement.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



## REFERENCES

- Abdel-Wahab, O. (2011). Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 18, 117-123.
- Aboudola, S., Murugesan, G., Szpurka, H., Ramsingh, G., Zhao, X., Prescott, N., Tubbs, R.R., Maciejewski, J.P., and Hsi, E.D. (2007). Bone marrow phospho-STAT5 expression in non-CML chronic myeloproliferative disorders correlates with JAK2 V617F mutation and provides evidence of in vivo JAK2 activation. *Am J Surg Pathol* 31, 233-239.
- Adams, J.A., Barrett, A.J., Beard, J., and McCarthy, D.M. (1988). Primary polycythaemia, essential thrombocythaemia and myelofibrosis--three facets of a single disease process? *Acta Haematol* 79, 33-37.
- Ahlin, C., Zhou, W., Holmqvist, M., Holmberg, L., Nilsson, C., Jirstrom, K., Blomqvist, C., Amini, R.M., and Fjallskog, M.L. (2009). Cyclin A is a proliferative marker with good prognostic value in node-negative breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 2501-2506.
- Akada, H., Yan, D., Zou, H., Fiering, S., Hutchison, R.E., and Mohi, M.G. (2010). Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 115, 3589-3597.
- Anand, S., Stedham, F., Beer, P., Gudgin, E., Ortmann, C.A., Bench, A., Erber, W., Green, A.R., and Huntly, B.J. (2011). Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood* 118, 177-181.
- Bahassi el, M., Yin, M., Robbins, S.B., Li, Y.Q., Conrady, D.G., Yuan, Z., Kovall, R.A., Herr, A.B., and Stambrook, P.J. (2011). A human cancer-predisposing polymorphism in Cdc25A is embryonic lethal in the mouse and promotes ASK-1 mediated apoptosis. *Cell Div* 6, 4.
- Balduini, A., Badalucco, S., Pugliano, M.T., Baev, D., De Silvestri, A., Cattaneo, M., Rosti, V., and Barosi, G. (2011). In vitro megakaryocyte differentiation and proplatelet formation in Ph-negative classical myeloproliferative neoplasms: distinct patterns in the different clinical phenotypes. *PLoS One* 6, e21015.
- Baran-Marszak, F., Magdoud, H., Desterke, C., Alvarado, A., Roger, C., Harel, S., Mazoyer, E., Cassinat, B., Chevret, S., Tonetti, C., *et al.* (2010). Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 116, 5961-5971.
- Barre, B., Vigneron, A., and Coqueret, O. (2005). The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and riboblastoma proteins on the Cdc25A promoter. *J Biol Chem* 280, 15673-15681.
- Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., *et al.* (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061.
- Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., and Tong, W. (2008). Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest* 118, 2832-2844.
- Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-169.
- Blagden, S.P., and Willis, A.E. (2011). The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 280-291.
- Blalock, W.L., Bavelloni, A., Piazzzi, M., Faenza, I., and Cocco, L. (2010). A role for PKR in hematologic malignancies. *J Cell Physiol* 223, 572-591.

- Blomberg, I., and Hoffmann, I. (1999). Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 19, 6183-6194.
- Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7, 495-507.
- Boyce, M., Bryant, K.F., Jousse, C., Long, K., Harding, H.P., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Ma, D., Coen, D.M., Ron, D., *et al.* (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307, 935-939.
- Brezak, M.C., Valette, A., Quaranta, M., Contour-Galcera, M.O., Jullien, D., Lavergne, O., Frongia, C., Bigg, D., Kasprzyk, P.G., Prevost, G.P., *et al.* (2009). IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells. *Int J Cancer* 124, 1449-1456.
- Bruchova, H., Merkerova, M., and Prchal, J.T. (2008). Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica* 93, 1009-1016.
- Bruchova, H., Yoon, D., Agarwal, A.M., Swierczek, S., and Prchal, J.T. (2009). Erythropoiesis in polycythemia vera is hyper-proliferative and has accelerated maturation. *Blood Cells Mol Dis* 43, 81-87.
- Bumm, T.G., Elsea, C., Corbin, A.S., Loriaux, M., Sherbenou, D., Wood, L., Deininger, J., Silver, R.T., Druker, B.J., and Deininger, M.W. (2006). Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res* 66, 11156-11165.
- Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G.F., and Donzelli, M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 23, 2050-2056.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.
- Chaix, A., Lopez, S., Voisset, E., Gros, L., Dubreuil, P., and De Sepulveda, P. (2011). Mechanisms of STAT protein activation by oncogenic KIT mutants in neoplastic mast cells. *J Biol Chem* 286, 5956-5966.
- Chang, Y., Bluteau, D., Debili, N., and Vainchenker, W. (2007). From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1, 318-327.
- Chen, E., Beer, P.A., Godfrey, A.L., Ortmann, C.A., Li, J., Costa-Pereira, A.P., Ingle, C.E., Dermitzakis, E.T., Campbell, P.J., and Green, A.R. (2010). Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell* 18, 524-535.
- Chou, S.T., Yen, Y.C., Lee, C.M., and Chen, M.S. (2010). Pro-apoptotic role of Cdc25A: activation of cyclin B1/Cdc2 by the Cdc25A C-terminal domain. *J Biol Chem* 285, 17833-17845.
- Clark, A.J., Doyle, K.M., and Humbert, P.O. (2004). Cell-intrinsic requirement for pRb in erythropoiesis. *Blood* 104, 1324-1326.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and te Riele, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-330.
- Clemens, M.J. (2004). Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation. *Oncogene* 23, 3180-3188.
- Cohen, P.T. (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* 115, 241-256.
- Contour-Galcera, M.O., Sidhu, A., Prevost, G., Bigg, D., and Ducommun, B. (2007). What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. *Pharmacol Ther* 115, 1-12.
- Correa, P.N., Eskinazi, D., and Axelrad, A.A. (1994). Circulating erythroid progenitors in polycythemia vera are hypersensitive to insulin-like growth factor-1 in vitro: studies in an improved serum-free medium. *Blood* 83, 99-112.

Cullis, J.O. (2011). Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. *Br J Haematol* 154, 289-300.

da Costa Reis Monte-Mor, B., Plo, I., da Cunha, A.F., Costa, G.G., de Albuquerque, D.M., Jedidi, A., Villeval, J.L., Badaoui, S., Lorand-Metze, I., Pagnano, K.B., *et al.* (2009). Constitutive JunB expression, associated with the JAK2 V617F mutation, stimulates proliferation of the erythroid lineage. *Leukemia* 23, 144-152.

Dai, M.S., Mantel, C.R., Xia, Z.B., Broxmeyer, H.E., and Lu, L. (2000). An expansion phase precedes terminal erythroid differentiation of hematopoietic progenitor cells from cord blood in vitro and is associated with up-regulation of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2. *Blood* 96, 3985-3987.

Dang Do, A.N., Kimball, S.R., Cavener, D.R., and Jefferson, L.S. (2009). eIF2alpha kinases GCN2 and PERK modulate transcription and translation of distinct sets of mRNAs in mouse liver. *Physiol Genomics* 38, 328-341.

Dawson, M.A., Bannister, A.J., Gottgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., and Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461, 819-822.

De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U., and Peschle, C. (1999). Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 401, 489-493.

Delhommeau, F., Dupont, S., Tonetti, C., Masse, A., Godin, I., Le Couedic, J.P., Debili, N., Saulnier, P., Casadevall, N., Vainchenker, W., *et al.* (2007). Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 109, 71-77.

Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. (2006). Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 63, 2939-2953.

Didier, C., Cavelier, C., Quaranta, M., Galcera, M.O., Demur, C., Laurent, G., Manenti, S., and Ducommun, B. (2008). G2/M checkpoint stringency is a key parameter in the sensitivity of AML cells to genotoxic stress. *Oncogene* 27, 3811-3820.

Dong, H.Y., Wilkes, S., and Yang, H. (2011). CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A. *Am J Surg Pathol* 35, 723-732.

Donze, O., Jagus, R., Koromilas, A.E., Hershey, J.W., and Sonenberg, N. (1995). Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J* 14, 3828-3834.

Dupont, S., Masse, A., James, C., Teyssandier, I., Lecluse, Y., Larbret, F., Ugo, V., Saulnier, P., Koscielny, S., Le Couedic, J.P., *et al.* (2007). The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* 110, 1013-1021.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.

Feng, X., Wu, Z., Wu, Y., Hankey, W., Prior, T.W., Li, L., Ganju, R.K., Shen, R., and Zou, X. (2011). Cdc25A regulates matrix metalloprotease 1 through Foxo1 and mediates metastasis of breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 31, 3457-3471.

Ferbeyre, G., and Moriggl, R. (2011). The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 1815, 104-114.

Fernandez-Vidal, A., Mazars, A., Gautier, E.F., Prevost, G., Payrastre, B., and Manenti, S. (2009). Upregulation of the CDC25A phosphatase down-stream of the NPM/ALK oncogene

participates to anaplastic large cell lymphoma enhanced proliferation. *Cell Cycle* 8, 1373-1379.

Fero, M.L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C.E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L.H., Broudy, V., Perlmutter, R.M., *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.

Fleischman, A.G., Aichberger, K.J., Luty, S.B., Bumm, T.G., Petersen, C.L., Doratotaj, S., Vasudevan, K.B., Latocha, D.H., Yang, F., Press, R.D., *et al.* (2011). Tumor necrosis factor-alpha facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*.

Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Abe, M., Sonoda, Y., and Kasahara, T. (2010). STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *J Biol Chem* 285, 5296-5307.

Furuhata, A., Kimura, A., Shide, K., Shimoda, K., Murakami, M., Ito, H., Gao, S., Yoshida, K., Tagawa, Y., Hagiwara, K., *et al.* (2009). p27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 383, 411-416.

Furukawa, Y., Kikuchi, J., Nakamura, M., Iwase, S., Yamada, H., and Matsuda, M. (2000). Lineage-specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br J Haematol* 110, 663-673.

Galaktionov, K., and Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* 67, 1181-1194.

Galaktionov, K., Chen, X., and Beach, D. (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511-517.

Galaktionov, K., Lee, A.K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M., and Beach, D. (1995). CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* 269, 1575-1577.

Garcon, L., Rivat, C., James, C., Lacout, C., Camara-Clayette, V., Ugo, V., Lecluse, Y., Bennaceur-Griscelli, A., and Vainchenker, W. (2006). Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 108, 1551-1554.

Garrett, M.D., and Collins, I. (2011). Anticancer therapy with checkpoint inhibitors: what, where and when? *Trends Pharmacol Sci* 32, 308-316.

Gebauer, F., and Hentze, M.W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 827-835.

Geest, C.R., and Coffey, P.J. (2009). MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 86, 237-250.

Gery, S., Cao, Q., Gueller, S., Xing, H., Tefferi, A., and Koeffler, H.P. (2009). Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol* 85, 957-965.

Girodon, F., Steinkamp, M.P., Cleyrat, C., Hermouet, S., and Wilson, B.S. (2011). Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood* 118, 2633-2634.

Gozgit, J.M., Beberitz, G., Patil, P., Ye, M., Parmentier, J., Wu, J., Su, N., Wang, T., Ioannidis, S., Davies, A., *et al.* (2008). Effects of the JAK2 inhibitor, AZ960, on Pim/BAD/BCL-xL survival signaling in the human JAK2 V617F cell line SET-2. *J Biol Chem* 283, 32334-32343.

Grimwade, L.F., Happerfield, L., Tristram, C., McIntosh, G., Rees, M., Bench, A.J., Boyd, E.M., Hall, M., Quinn, A., Piggott, N., *et al.* (2009). Phospho-STAT5 and phospho-Akt expression in chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 147, 495-506.

Guo, J., Kleeff, J., Li, J., Ding, J., Hammer, J., Zhao, Y., Giese, T., Korc, M., Buchler, M.W., and Friess, H. (2004). Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 23, 71-81.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Harding, H.P., Zhang, Y., Scheuner, D., Chen, J.J., Kaufman, R.J., and Ron, D. (2009). Ppp1r15 gene knockout reveals an essential role for translation initiation factor 2 alpha (eIF2alpha) dephosphorylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1832-1837.

Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 910-916.

Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* *13*, 4302-4310.

Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 318-327.

Hookham, M.B., Elliott, J., Suessmuth, Y., Staerk, J., Ward, A.C., Vainchenker, W., Percy, M.J., McMullin, M.F., Constantinescu, S.N., and Johnston, J.A. (2007). The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* *109*, 4924-4929.

Horie, N., Mori, T., Asada, H., Ishikawa, A., Johnston, P.G., and Takeishi, K. (2004). Implication of CDK inhibitors p21 and p27 in the differentiation of HL-60 cells. *Biol Pharm Bull* *27*, 992-997.

Huang, J.C., Babak, T., Corson, T.W., Chua, G., Khan, S., Gallie, B.L., Hughes, T.R., Blencowe, B.J., Frey, B.J., and Morris, Q.D. (2007). Using expression profiling data to identify human microRNA targets. *Nat Methods* *4*, 1045-1049.

Iavarone, A., King, E.R., Dai, X.M., Leone, G., Stanley, E.R., and Lasorella, A. (2004). Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature* *432*, 1040-1045.

Iavarone, A., and Massague, J. (1999). E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* *19*, 916-922.

Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* *359*, 295-300.

Jakel, H., Weinl, C., and Hengst, L. (2011). Phosphorylation of p27Kip1 by JAK2 directly links cytokine receptor signaling to cell cycle control. *Oncogene* *30*, 3502-3512.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., *et al.* (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* *434*, 1144-1148.

Jedidi, A., Marty, C., Oligo, C., Jeanson-Leh, L., Ribeil, J.A., Casadevall, N., Galy, A., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2009). Selective reduction of JAK2V617F-dependent cell growth by siRNA/shRNA and its reversal by cytokines. *Blood* *114*, 1842-1851.

Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H., and Okayama, H. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J* *13*, 1549-1556.

Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., *et al.* (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* *67*, 7713-7722.

Jones, A.V., Chase, A., Silver, R.T., Oscier, D., Zoi, K., Wang, Y.L., Cario, H., Pahl, H.L., Collins, A., Reiter, A., *et al.* (2009). JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* *41*, 446-449.

- Kallstrom, H., Lindqvist, A., Pospisil, V., Lundgren, A., and Rosenthal, C.K. (2005). Cdc25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import. *Exp Cell Res* 303, 89-100.
- Kamishimoto, J., Tago, K., Kasahara, T., and Funakoshi-Tago, M. (2011). Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal* 23, 849-856.
- Kang, T., Wei, Y., Honaker, Y., Yamaguchi, H., Appella, E., Hung, M.C., and Piwnicka-Worms, H. (2008). GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* 13, 36-47.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.
- Kawamoto, H., Wada, H., and Katsura, Y. (2010). A revised scheme for developmental pathways of hematopoietic cells: the myeloid-based model. *Int Immunol* 22, 65-70.
- Kerenyi, M.A., Grebien, F., Gehart, H., Schiffrer, M., Artaker, M., Kovacic, B., Beug, H., Moriggl, R., and Mullner, E.W. (2008). Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood* 112, 3878-3888.
- Klann, E., and Dever, T.E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 931-942.
- Klausen, P., Bjerregaard, M.D., Borregaard, N., and Cowland, J.B. (2004). End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6. *J Leukoc Biol* 75, 569-578.
- Klco, J.M., Vij, R., Kreisel, F.H., Hassan, A., and Frater, J.L. (2010). Molecular pathology of myeloproliferative neoplasms. *Am J Clin Pathol* 133, 602-615.
- Kondo, M. (2010). Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol Rev* 238, 37-46.
- Kozar, K., Ciemerych, M.A., Rebel, V.I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R.T., *et al.* (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, 1779-1790.
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., and May, W.S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Lacout, C., Pisani, D.F., Tulliez, M., Gachelin, F.M., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 108, 1652-1660.
- Larsson, J., and Karlsson, S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24, 5676-5692.
- Laubach, J.P., Fu, P., Jiang, X., Salter, K.H., Potti, A., and Arcasoy, M.O. (2009). Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp Hematol* 37, 1411-1422.
- Lavecchia, A., Di Giovanni, C., and Novellino, E. (2010). Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 20, 405-425.
- Lee, E.Y., Chang, C.Y., Hu, N., Wang, Y.C., Lai, C.C., Herrup, K., Lee, W.H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288-294.
- Lee, S.O., Masyuk, T., Splinter, P., Banales, J.M., Masyuk, A., Stroope, A., and Larusso, N. (2008). MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects



hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* *118*, 3714-3724.

Lee, T.K., Man, K., Poon, R.T., Lo, C.M., Yuen, A.P., Ng, I.O., Ng, K.T., Leonard, W., and Fan, S.T. (2006). Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* *66*, 9948-9956.

Leisser, C., Rosenberger, G., Maier, S., Fuhrmann, G., Grusch, M., Strasser, S., Huettnerbrenner, S., Fassl, S., Polgar, D., Krieger, S., *et al.* (2004). Subcellular localisation of Cdc25A determines cell fate. *Cell Death Differ* *11*, 80-89.

Lemaire, M., Ducommun, B., and Nebreda, A.R. (2010). UV-induced downregulation of the CDC25B protein in human cells. *FEBS Lett* *584*, 1199-1204.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., *et al.* (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* *7*, 387-397.

Li, J., Spensberger, D., Ahn, J.S., Anand, S., Beer, P.A., Ghevaert, C., Chen, E., Forrai, A., Scott, L.M., Ferreira, R., *et al.* (2010). JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood* *116*, 1528-1538.

Li, W.X. (2008). Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol* *18*, 545-551.

Liao, Z., and Nevalainen, M.T. (2011). Targeting transcription factor Stat5a/b as a therapeutic strategy for prostate cancer. *Am J Transl Res* *3*, 133-138.

Lin, Y.M., Chung, C.L., and Cheng, Y.S. (2009). Posttranscriptional regulation of CDC25A by BOLL is a conserved fertility mechanism essential for human spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* *94*, 2650-2657.

Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M.W., Levine, R.L., Xu, H., Tefferi, A., *et al.* (2011). JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* *19*, 283-294.

Liu, M., Lee, M.H., Cohen, M., Bommakanti, M., and Freedman, L.P. (1996). Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev* *10*, 142-153.

Liu, Y., Laszlo, C., Liu, W., Chen, X., Evans, S.C., and Wu, S. (2010). Regulation of G(1) arrest and apoptosis in hypoxia by PERK and GCN2-mediated eIF2alpha phosphorylation. *Neoplasia* *12*, 61-68.

Lu, X., Levine, R., Tong, W., Wernig, G., Pikman, Y., Zarnegar, S., Gilliland, D.G., and Lodish, H. (2005). Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 18962-18967.

Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* *288*, 1425-1429.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* *9*, 153-166.

Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P., and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* *118*, 493-504.

Manshour, T., Estrov, Z., Quintas-Cardama, A., Burger, J., Zhang, Y., Livun, A., Knez, L., Harris, D., Creighton, C.J., Kantarjian, H.M., *et al.* (2011). Bone marrow stroma-secreted

cytokines protect JAK2(V617F)-mutated cells from the effects of a JAK2 inhibitor. *Cancer Res* 71, 3831-3840.

Mao, Y.L., Li, Z.W., Lou, C.J., Pang, D., and Zhang, Y.Q. (2011). Phospho-STAT5 expression is associated with poor prognosis of human colonic adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 17, 333-339.

Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.C., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2010). Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* 116, 783-787.

Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakajima, K., Oritani, K., Tomiyama, Y., Miyagawa, J., Kato, T., Miyazaki, H., Matsuzawa, Y., and Kanakura, Y. (1997). Thrombopoietin-induced differentiation of a human megakaryoblastic leukemia cell line, CMK, involves transcriptional activation of p21(WAF1/Cip1) by STAT5. *Mol Cell Biol* 17, 2933-2943.

Mazars, A., Fernandez-Vidal, A., Mondesert, O., Lorenzo, C., Prevost, G., Ducommun, B., Payrastra, B., Racaud-Sultan, C., and Manenti, S. (2009). A caspase-dependent cleavage of CDC25A generates an active fragment activating cyclin-dependent kinase 2 during apoptosis. *Cell Death Differ* 16, 208-218.

Melixetian, M., Klein, D.K., Sorensen, C.S., and Helin, K. (2009). NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint. *Nat Cell Biol* 11, 1247-1253.

Merryweather-Clarke, A.T., Atzberger, A., Soneji, S., Gray, N., Clark, K., Waugh, C., McGowan, S.J., Taylor, S., Nandi, A.K., Wood, W.G., *et al.* (2011). Global gene expression analysis of human erythroid progenitors. *Blood* 117, e96-108.

Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485-491.

Minella, A.C., Loeb, K.R., Knecht, A., Welcker, M., Varnum-Finney, B.J., Bernstein, I.D., Roberts, J.M., and Clurman, B.E. (2008). Cyclin E phosphorylation regulates cell proliferation in hematopoietic and epithelial lineages in vivo. *Genes Dev* 22, 1677-1689.

Mirmohammadsadegh, A., Hassan, M., Bardenheuer, W., Marini, A., Gustrau, A., Nambiar, S., Tannapfel, A., Bojar, H., Ruzicka, T., and Hengge, U.R. (2006). STAT5 phosphorylation in malignant melanoma is important for survival and is mediated through SRC and JAK1 kinases. *J Invest Dermatol* 126, 2272-2280.

Mirza, A.M., Correa, P.N., and Axelrad, A.A. (1995). Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor beta subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. *Blood* 86, 877-882.

Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., and Draetta, G.F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* 1, 71-79.

Morceau, F., Dicato, M., and Diederich, M. (2009). Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. *Mediators Inflamm* 2009, 405016.

Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E., and Weissman, I.L. (1997). Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124, 1929-1939.

Mounir, Z., Krishnamoorthy, J.L., Wang, S., Papadopoulou, B., Campbell, S., Muller, W.J., Hatzoglou, M., and Koromilas, A.E. (2011). Akt Determines Cell Fate Through Inhibition of the PERK-eIF2{alpha} Phosphorylation Pathway. *Sci Signal* 4, ra62.

Mullally, A., Lane, S.W., Ball, B., Megerdichian, C., Okabe, R., Al-Shahrour, F., Paktinat, M., Haydu, J.E., Housman, E., Lord, A.M., *et al.* (2010). Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. *Cancer Cell* 17, 584-596.

Munoz-Alonso, M.J., Acosta, J.C., Richard, C., Delgado, M.D., Sedivy, J., and Leon, J. (2005). p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* 280, 18120-18129.

Muto, A., Kizaki, M., Yamato, K., Kawai, Y., Kamata-Matsushita, M., Ueno, H., Ohguchi, M., Nishihara, T., Koeffler, H.P., and Ikeda, Y. (1999). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of a retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) associated with expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). *Blood* 93, 2225-2233.

Nabel-Rosen, H., Toledano-Katchalski, H., Volohonsky, G., and Volk, T. (2005). Cell divisions in the drosophila embryonic mesoderm are repressed via posttranscriptional regulation of string/cdc25 by HOW. *Curr Biol* 15, 295-302.

Nakatake, M., Monte-Mor, B., Debili, N., Casadevall, N., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., and Plo, I. (2011). JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene*.

Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. (1998). Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, 397-409.

Noon-Song, E.N., Ahmed, C.M., Dabelic, R., Canton, J., and Johnson, H.M. (2011). Controlling nuclear JAKs and STATs for specific gene activation by IFN $\gamma$ . *Biochem Biophys Res Commun* 410, 648-653.

Oku, S., Takenaka, K., Kuriyama, T., Shide, K., Kumano, T., Kikushige, Y., Urata, S., Yamauchi, T., Iwamoto, C., Shimoda, H.K., *et al.* (2010). JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150, 334-344.

Panzenbock, B., Bartunek, P., Mapara, M.Y., and Zenke, M. (1998). Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* 92, 3658-3668.

Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., *et al.* (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385-395.

Passegue, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med* 202, 1599-1611.

Pereg, Y., Liu, B.Y., O'Rourke, K.M., Sagolla, M., Dey, A., Komuves, L., French, D.M., and Dixit, V.M. (2010). Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A. *Nat Cell Biol* 12, 400-406.

Petryshyn, R., Levin, D.H., and London, I.M. (1982). Regulation of double-stranded RNA-activated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase by type 2 protein phosphatase in reticulocyte lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6512-6516.

Piao, S., Lee, S.J., Xu, Y., Gwak, J., Oh, S., Park, B.J., and Ha, N.C. (2011). CK1epsilon targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis under normal conditions and in response to checkpoint activation. *Cell Cycle* 10, 531-537.

Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., and Tavernier, J. (2008). The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 371-381.

Plo, I., Nakatake, M., Malivert, L., de Villartay, J.P., Giraudier, S., Villeval, J.L., Wiesmuller, L., and Vainchenker, W. (2008). JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 112, 1402-1412.

Poehlmann, A., and Roessner, A. (2010). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol Res Pract* 206, 591-601.

Poikonen, P., Sjostrom, J., Amini, R.M., Villman, K., Ahlgren, J., and Blomqvist, C. (2005). Cyclin A as a marker for prognosis and chemotherapy response in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 93, 515-519.

Pradhan, A., Lambert, Q.T., and Reuther, G.W. (2007). Transformation of hematopoietic cells and activation of JAK2-V617F by IL-27R, a component of a heterodimeric type I cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18502-18507.

Quintas-Cardama, A., and Verstovsek, S. (2011). Spleen deflation and beyond: The pros and cons of Janus kinase 2 inhibitor therapy for patients with myeloproliferative neoplasms. *Cancer*.

Ray, D., Terao, Y., Fuhrken, P.G., Ma, Z.Q., DeMayo, F.J., Christov, K., Heerema, N.A., Franks, R., Tsai, S.Y., Papoutsakis, E.T., *et al.* (2007a). Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. *Cancer Res* 67, 984-991.

Ray, D., Terao, Y., Nimbalkar, D., Hirai, H., Osmundson, E.C., Zou, X., Franks, R., Christov, K., and Kiyokawa, H. (2007b). Hemizygous disruption of Cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 67, 6605-6611.

Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. (2005). Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15, 146-155.

Rinaldi, C.R., Rinaldi, P., Alagia, A., Gemei, M., Esposito, N., Formiggini, F., Martinelli, V., Senyuk, V., Nucifora, G., and Pane, F. (2010). Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia. *Blood* 116, 6023-6026.

Risum, M., Madelung, A., Bondo, H., Bzorek, M., Kristensen, M.H., Stamp, I.M., and Hasselbalch, H.C. (2011). The JAK2V617F allele burden and STAT3- and STAT5 phosphorylation in myeloproliferative neoplasms: early prefibrotic myelofibrosis compared with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *APMIS* 119, 498-504.

Rosenwald, I.B. (2004). The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view. *Oncogene* 23, 3230-3247.

Rosenwald, I.B., Hutzler, M.J., Wang, S., Savas, L., and Fraire, A.E. (2001). Expression of eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha is increased frequently in bronchioloalveolar but not in squamous cell carcinomas of the lung. *Cancer* 92, 2164-2171.

Rosenwald, I.B., Koifman, L., Savas, L., Chen, J.J., Woda, B.A., and Kadin, M.E. (2008). Expression of the translation initiation factors eIF-4E and eIF-2\* is frequently increased in neoplastic cells of Hodgkin lymphoma. *Hum Pathol* 39, 910-916.

Rosenwald, I.B., Wang, S., Savas, L., Woda, B., and Pullman, J. (2003). Expression of translation initiation factor eIF-2alpha is increased in benign and malignant melanocytic and colonic epithelial neoplasms. *Cancer* 98, 1080-1088.

Rubert, J., Qian, Z., Andraos, R., Guthy, D.A., and Radimerski, T. (2011). Bim and Mcl-1 exert key roles in regulating JAK2V617F cell survival. *BMC Cancer* 11, 24.

Rudolph, J. (2002). Catalytic mechanism of Cdc25. *Biochemistry* 41, 14613-14623.

Santoni-Rugiu, E., Falck, J., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol* 20, 3497-3509.

Sanz, A., Ungureanu, D., Pekkala, T., Ruijtenbeek, R., Touw, I.P., Hilhorst, R., and Silvennoinen, O. (2011). Analysis of Jak2 catalytic function by peptide microarrays: the role of the JH2 domain and V617F mutation. *PLoS One* 6, e18522.

Sarkar, S., Dey, B.K., and Dutta, A. (2010). MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. *Mol Biol Cell* 21, 2138-2149.

Schewe, D.M., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2009). Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation maximizes bortezomib efficiency and eliminates quiescent multiple myeloma cells surviving proteasome inhibitor therapy. *Cancer Res* 69, 1545-1552.

Schmidt, E.K., Clavarino, G., Ceppi, M., and Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nat Methods* 6, 275-277.

Scott, L.M., Scott, M.A., Campbell, P.J., and Green, A.R. (2006). Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 108, 2435-2437.

Sequeira, S.J., Wen, H.C., Avivar-Valderas, A., Farias, E.F., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2009). Inhibition of eIF2alpha dephosphorylation inhibits ErbB2-induced deregulation of mammary acinar morphogenesis. *BMC Cell Biol* 10, 64.

Shi, L., Zhang, J., Pan, T., Zhou, J., Gong, W., Liu, N., Fu, Z., and You, Y. (2010). MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation. *Brain Res* 1312, 120-126.

Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S.J., Dutta, P., Yan, S.J., and Li, W.X. (2008). Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol* 10, 489-496.

Shimizu, T., Oka, Y., Awai, N., and Takeda, K. (1999). Hypophosphorylation of pRB and repression of cyclin D3 and cdc25A during the granulocytic differentiation of human myeloblastic leukemia ML-1 cells. *Leuk Res* 23, 901-907.

Shuai, K. (2006). Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16, 196-202.

Sorensen, C.S., Syljuasen, R.G., Lukas, J., and Bartek, J. (2004). ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 complex regulate Chk1 and Cdc25A in the absence of DNA damage. *Cell Cycle* 3, 941-945.

Srivastava, S.P., Kumar, K.U., and Kaufman, R.J. (1998). Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273, 2416-2423.

Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.B., Vainchenker, W., and Constantinescu, S.N. (2005). JAK1 and Tyk2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross-talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* 280, 41893-41899.

Stephanou, A., and Latchman, D.S. (2005). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, 177-182.

Strand, C., Ahlin, C., Bendahl, P.O., Fjallskog, M.L., Hedenfalk, I., Malmstrom, P., and Ferno, M. (2011). Combination of the proliferation marker cyclin A, histological grade, and estrogen receptor status in a new variable with high prognostic impact in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*

Su, Q., Wang, S., Baltzis, D., Qu, L.K., Raven, J.F., Li, S., Wong, A.H., and Koromilas, A.E. (2007). Interferons induce tyrosine phosphorylation of the eIF2alpha kinase PKR through activation of Jak1 and Tyk2. *EMBO Rep* 8, 265-270.

Sumi, K., Tago, K., Kasahara, T., and Funakoshi-Tago, M. (2011). Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells. *FEBS Lett* 585, 1884-1890.

Tamir, A., Petrocelli, T., Stetler, K., Chu, W., Howard, J., Croix, B.S., Slingerland, J., and Ben-David, Y. (2000). Stem cell factor inhibits erythroid differentiation by modulating the activity of G1-cyclin-dependent kinase complexes: a role for p27 in erythroid differentiation coupled G1 arrest. *Cell Growth Differ* 11, 269-277.

Tefferi, A. (2011). How I treat myelofibrosis. *Blood* 117, 3494-3504.

Teofili, L., Martini, M., Cenci, T., Petrucci, G., Torti, L., Storti, S., Guidi, F., Leone, G., and Larocca, L.M. (2007). Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among

Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood* *110*, 354-359.

Tomko, R.J., Jr., and Lazo, J.S. (2008). Multimodal control of Cdc25A by nitrosative stress. *Cancer Res* *68*, 7457-7465.

Tumurbaatar, I., Cizmecioglu, O., Hoffmann, I., Grummt, I., and Voit, R. (2011). Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/cyclin B activity. *PLoS One* *6*, e14711.

Tvegard, T., Soltani, H., Skjolberg, H.C., Krohn, M., Nilssen, E.A., Kearsey, S.E., Grallert, B., and Boye, E. (2007). A novel checkpoint mechanism regulating the G1/S transition. *Genes Dev* *21*, 649-654.

Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., Lecluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* *32*, 179-187.

Ungureanu, D., Wu, J., Pekkala, T., Niranjani, Y., Young, C., Jensen, O.N., Xu, C.F., Neubert, T.A., Skoda, R.C., Hubbard, S.R., *et al.* (2011). The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 971-976.

Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S.N., and Bernard, O.A. (2011). New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* *118*, 1723-1735.

Vainchenker, W., Dusa, A., and Constantinescu, S.N. (2008). JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* *19*, 385-393.

Valentino, L., and Pierre, J. (2006). JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* *71*, 713-721.

Van Etten, R.A., Koschmieder, S., Delhommeau, F., Perrotti, D., Holyoake, T., Pardanani, A., Mesa, R., Green, T., Ibrahim, A.R., Mughal, T., *et al.* (2011). The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. *Haematologica* *96*, 590-601.

Vigo, E., Muller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C., and Helin, K. (1999). CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol* *19*, 6379-6395.

Walkley, C.R., Olsen, G.H., Dworkin, S., Fabb, S.A., Swann, J., McArthur, G.A., Westmoreland, S.V., Chambon, P., Scadden, D.T., and Purton, L.E. (2007). A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell* *129*, 1097-1110.

Walkley, C.R., Sankaran, V.G., and Orkin, S.H. (2008). Rb and hematopoiesis: stem cells to anemia. *Cell Div* *3*, 13.

Walz, C., Crowley, B.J., Hudon, H.E., Gramlich, J.L., Neuberg, D.S., and Podar, K. (2006). Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem* *281*, 18177-18183.

Wang, P., Zou, F., Zhang, X., Li, H., Dulak, A., Tomko, R.J., Jr., Lazo, J.S., Wang, Z., Zhang, L., and Yu, J. (2009). microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res* *69*, 8157-8165.

Wang, S., Lloyd, R.V., Hutzler, M.J., Rosenwald, I.B., Safran, M.S., Patwardhan, N.A., and Khan, A. (2001). Expression of eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha correlates with the progression of thyroid carcinoma. *Thyroid* *11*, 1101-1107.

Wang, S., Rosenwald, I.B., Hutzler, M.J., Pihan, G.A., Savas, L., Chen, J.J., and Woda, B.A. (1999). Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol* *155*, 247-255.

Ward, A.C., Touw, I., and Yoshimura, A. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19-29.

Wegener, S., Hampe, W., Herrmann, D., and Schaller, H.C. (2000). Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. *Eur J Cell Biol* 79, 810-815.

Wek, R.C., Jiang, H.Y., and Anthony, T.G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34, 7-11.

Wernig, G., Gonneville, J.R., Crowley, B.J., Rodrigues, M.S., Reddy, M.M., Hudon, H.E., Walz, C., Reiter, A., Podar, K., Royer, Y., *et al.* (2008). The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* 111, 3751-3759.

Wernig, G., Mercher, T., Okabe, R., Levine, R.L., Lee, B.H., and Gilliland, D.G. (2006). Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 107, 4274-4281.

Wong, A.H., Durbin, J.E., Li, S., Dever, T.E., Decker, T., and Koromilas, A.E. (2001). Enhanced antiviral and antiproliferative properties of a STAT1 mutant unable to interact with the protein kinase PKR. *J Biol Chem* 276, 13727-13737.

Wu, C.T., Sheu, M.L., Tsai, K.S., Chiang, C.K., and Liu, S.H. (2011). Salubrinal, an eIF2alpha dephosphorylation inhibitor, enhances cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in a mouse model. *Free Radic Biol Med* 51, 671-680.

Wu, L., Goodwin, E.C., Naeger, L.K., Vigo, E., Galaktionov, K., Helin, K., and DiMaio, D. (2000). E2F-Rb complexes assemble and inhibit cdc25A transcription in cervical carcinoma cells following repression of human papillomavirus oncogene expression. *Mol Cell Biol* 20, 7059-7067.

Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V.E., 3rd, Silvennoinen, O., and O'Shea, J.J. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 5, 253.

Yamashita, Y., Kasugai, I., Sato, M., Tanuma, N., Sato, I., Nomura, M., Yamashita, K., Sonoda, Y., Kumabe, T., Tominaga, T., *et al.* (2010). CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. *J Neurooncol* 100, 43-49.

Yang, X., Feng, M., Jiang, X., Wu, Z., Li, Z., Aau, M., and Yu, Q. (2009). miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes Dev* 23, 2388-2393.

Yaroslavskiy, B., Watkins, S., Donnenberg, A.D., Patton, T.J., and Steinman, R.A. (1999). Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 93, 2907-2917.

Yu, H., and Jove, R. (2004). The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4, 97-105.

Zaleskas, V.M., Krause, D.S., Lazarides, K., Patel, N., Hu, Y., Li, S., and Van Etten, R.A. (2006). Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS One* 1, e18.

Zeuner, A., Pedini, F., Signore, M., Ruscio, G., Messina, C., Tafuri, A., Girelli, G., Peschle, C., and De Maria, R. (2006). Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood* 107, 3495-3502.

Zou, X., Tsutsui, T., Ray, D., Blomquist, J.F., Ichijo, H., Ucker, D.S., and Kiyokawa, H. (2001). The cell cycle-regulatory CDC25A phosphatase inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 21, 4818-4828.





**ANNEXE**  
**AUTRE PUBLICATION**



Report

# Upregulation of the CDC25A phosphatase down-stream of the NPM/ALK oncogene participates to anaplastic large cell lymphoma enhanced proliferation

Anne Fernandez-Vidal,<sup>1</sup> Anne Mazars,<sup>1</sup> Emilie-Fleur Gautier,<sup>1</sup> Grégoire Prévost,<sup>2</sup> Bernard Payrastra<sup>1,3</sup> and Stephane Manenti<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM U563-IFR30; Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan; Département "Oncogénèse, signalisation et innovation thérapeutique"; Université Paul Sabatier; Toulouse, France; <sup>2</sup>IPSEN; Institut Henri Beaufour; Les Ulis, France; <sup>3</sup>CHU de Toulouse; Laboratoire d'Hématologie; Toulouse, France

**Key words:** CDC25A, lymphoma, PI3K, proliferation, oncogene, tyrosine kinase

Here, we demonstrate that the expression of the dual specificity phosphatase CDC25A, a key regulator of cell cycle progression, is deregulated in Ba/F3 cells expressing the oncogenic protein NPM/ALK and in human cell lines derived from NPM/ALK-positive anaplastic large cell lymphomas (ALCL). Both transcriptional and post-translational mechanisms account for the constitutive expression of the protein, and the PI3K/Akt pathway is essential for this process. Importantly, pharmacological inhibition of CDC25 dramatically inhibits the proliferation of NPM/ALK-expressing cells, while moderately affecting the proliferation of control Ba/F3 cells. RNA interference-mediated downregulation of CDC25A confirmed that NPM/ALK-expressing cells are highly dependent on this protein for their proliferation. Moreover, similar PI3K/AKT-mediated constitutive expression of CDC25A takes place down-stream of other hematological oncogenes, including BCR/ABL in Chronic Myeloid Leukemia and FLT3-ITD in Acute Myeloid Leukemia. Altogether, our data point to the functional link between hematopoietic oncogenic tyrosine kinases and the G<sub>1</sub> cell cycle regulator CDC25A, and we propose that this protein may be a potential therapeutic target in ALCL and other hematological malignancies.

## Introduction

Anaplastic large cell lymphomas are a group of non-Hodgkin T-cell or null-cell lymphoid neoplasms.<sup>1</sup> They are characterized by the frequent (70%) chromosomal translocation t(2;5)(p23;q35), leading to the expression of the chimeric NPM/ALK tyrosine kinase,<sup>2</sup> consisting of the N-terminal portion of nucleophosmin

fused to the cytoplasmic domain of the tyrosine kinase receptor ALK. The transforming properties of this chimeric kinase are due to its constitutive and high catalytic activity, leading to cell proliferation increase, cytokine (IL-3)-independent cell growth, and resistance to various stresses.<sup>3,4</sup> Several signaling effectors are over-activated down-stream of NPM/ALK, including PI3K/Akt,<sup>5,6</sup> MAPK,<sup>7</sup> pp60<sup>c-src</sup> tyrosine kinase,<sup>8</sup> and STAT transcription factors.<sup>9,10</sup> While these signaling pathways have been extensively studied, the cell cycle effectors regulated down-stream of these networks are still poorly documented. The CDK inhibitor (CKI) p27<sup>Kip1</sup> was found downregulated in cells expressing NPM/ALK through a PI3K/Akt-dependent mechanism, leading to Akt-mediated phosphorylation and subsequent proteasomal degradation.<sup>11,12</sup> The CDK4/CDK6 regulator cyclin D3 was also found overexpressed in ALCL cells, this upregulation being linked to the activation of STAT3.<sup>13</sup>

The CDC25 dual specificity phosphatases activate proliferation by dephosphorylating the Thr14 and Tyr15 inhibitory residues of different Cyclin-Dependent Kinases (CDKs; reviewed in ref. 14). CDC25A is a key regulator of the G<sub>1</sub> phase and of the G<sub>1</sub>/S transition, although its implication during mitosis was also described. The main CDC25A target is the CDK2 kinase, whose activation is necessary for full completion of the G<sub>1</sub> phase and DNA synthesis activation. Different ways of regulating CDC25A have been described, including transcription by various factors such as E2F in response to growth factors,<sup>15</sup> or Myc in a still to be defined context.<sup>16,17</sup> More recently the STAT3 factor, p21 and p53 were also described as CDC25A transcriptional regulators.<sup>18,19</sup> Post-translational modifications of CDC25A also modify its cellular level through phosphorylation events leading to its degradation by the proteasome (reviewed in ref. 20). Phosphorylation of CDC25A by CHK1, p38MAPK and/or by other non-identified kinases participate to its degradation in response to genotoxic stress, as well as during normal cell cycle. Upregulation of CDC25A has been reported in various solid cancers,<sup>14</sup> and in some cases, post-translational regulations seem to be involved.<sup>21</sup> Recent studies confirmed

\*Correspondence to: Stéphane Manenti; INSERM U563; CPTP; Batiment B; CHU Purpan; Toulouse Cedex 3 31024 France; Tel.: 33.562.74.45.24; Fax: 33.562.74.45.58; Email: stephane.manenti@inserm.fr

Submitted: 02/24/09; Accepted: 02/26/09

Previously published online as a *Cell Cycle* E-publication:  
<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/8302>

a role for CDC25A during tumorigenesis in mice.<sup>22,23</sup>

In this work, we investigate the status of CDC25A down-stream of NPM/ALK and other hematological tyrosine kinase oncogenes. We demonstrate that PI3K/Akt-dependent constitutive expression of CDC25A occurs through different mechanisms, and that cells with high levels of CDC25A become highly sensitive to inhibition of this enzyme.

**Results**

**Deregulation of CDC25A protein expression downstream of NPM/ALK.** The CDC25A protein level was first established by western blot analysis of various ALCL cell lines. SU-DHL1, KARPAS 299 and COST cells express the NPM/ALK oncogene, while FEPD cells do not. As observed in Figure 1A, the four cell lines contain high levels of CDC25A in comparison to peripheral blood lymphocytes (PBL) from healthy donors. Inhibiting NPM/ALK with the pharmacological inhibitor WHI-154 significantly reduced the level of CDC25A in SU-DHL1, KARPAS 299 and COST, but not in FEPD cells, which do not express NPM/ALK. Inhibition of NPM/ALK by WHI-154 was controlled by western blot analysis with an anti-phospho NPM/ALK antibody. We then compared the level of CDC25A in Ba/F3 cells stably expressing NPM/ALK and in control ones (Fig. 1B). Under normal culture conditions, the level of CDC25A was similar in both cell types (left). However, in the absence of IL-3, CDC25A levels were reduced in control cells, but unchanged in NPM/ALK-positive cells. In these conditions, inhibition of NPM/ALK with WHI-154 reduced CDC25A level (right). These data demonstrate that CDC25A is constitutively expressed down-stream of the NPM/ALK in ALCL cells and in other cell types stably expressing this oncogene.

**Molecular mechanisms of CDC25A regulation.** We then investigated whether modifications in CDC25A expression or degradation would explain its NPM/ALK-dependent regulation. In the absence of IL-3, treatment with the proteasome inhibitor MG-132 induced significant CDC25A upregulation in NPM/ALK-expressing cells, while it did not significantly affect the low level of the protein in control cells (Suppl. Fig. 1), suggesting that both synthesis and degradation of CDC25A are active in NPM/

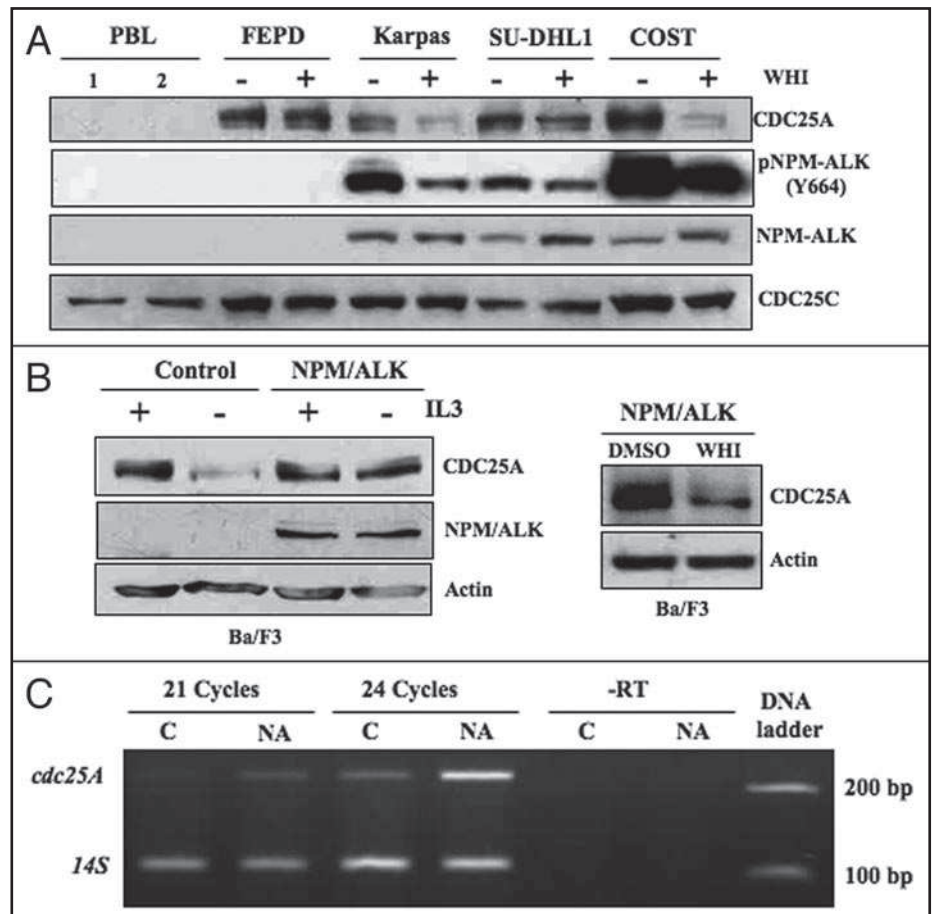


Figure 1. CDC25A is upregulated down-stream of the NPM/ALK oncogene. (A) Crude extracts from three NPM/ALK-positive (Karpas 299, SU-DHL1, COST) and one NPM/ALK-negative (FEPD) ALCL cell lines were analyzed by western blot for the expression of CDC25A. Cells were treated for 3 hours with 15  $\mu$ M of the NPM/ALK inhibitor WHI-154 (WHI). Two fractions of peripheral blood lymphocytes (PBLs) from healthy donors were used as controls. The presence of the oncogene was verified with an antibody against the ALK receptor and its activity was followed with an antibody recognizing its Y664 phosphorylated form. Western blot analysis of CDC25C was performed as a control. (B) Murine Ba/F3 cell line stably transfected with either the NPM/ALK oncogene or with an empty vector (control) were grown in the presence (+) or the absence (-) of IL-3, and western blot analysis of CDC25A was performed (left). Antibody against ALK was used as a control (NPM/ALK). NPM/ALK expressing cells were treated for 4 hours with the WHI-154 inhibitor and tested by western blot for the level of CDC25A (right). In both cases, western blot against Actin was used as a control for protein loading. (C) NPM/ALK-positive (NA) and negative (C) Ba/F3 cells were maintained in the absence of IL-3 for 18 hours, and harvested for total mRNA extraction. CDC25A mRNA was then amplified by RT-PCR in conditions allowing relative quantification in the different fractions. 21 and 24 cycles of amplification are shown, and the 14S ribosomal subunit gene was used as a control. The experiment was performed without reverse transcriptase (-RT) as a control.

ALK cells. We then investigated the mRNA levels of CDC25A by RT-PCR in normal and NPM/ALK-expressing cells, in the absence of IL-3. As shown in Figure 1C, this level was low in control cells, and significantly increased in cells expressing NPM/ALK. As observed by western blot for the protein, inhibition of NPM/ALK by WHI-154 strongly reduced the mRNA level (not shown). Thus, either transcriptional activation of the gene or mRNA stabilization is induced by the oncogene. Altogether, these data demonstrate that NPM/ALK constitutively activates *CDC25A* gene expression and/or mRNA stability.

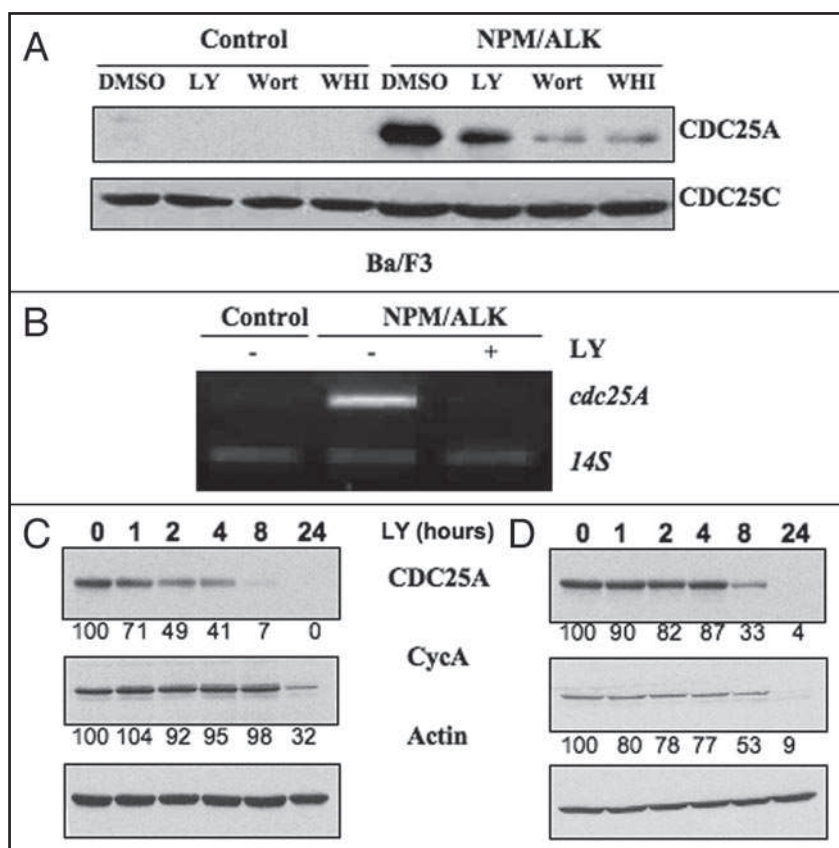


Figure 2. The PI3K pathway regulates CDC25A down-stream of NPM/ALK. (A) Control and NPM/ALK Ba/F3 expressing cells were treated for 5 hours with either LY294002 (25  $\mu$ M; LY) or Wortmannin (100 nM; Wort), two PI3K inhibitors, in the absence of IL-3. As controls, cells were treated either with DMSO, or with the NPM/ALK inhibitor WHI-154 (15  $\mu$ M; WHI). CDC25A was then analyzed by western blot, and CDC25C was used as a control. (B) Control and NPM/ALK-expressing cells were treated for 16 hours with LY294002 in the absence of IL-3, and harvested for total mRNA extraction. CDC25A mRNA was then amplified by RT-PCR in conditions allowing relative quantification in the different fractions. Conditions corresponding to 24 cycles of amplification are shown, and the 14S ribosomal subunit gene was used as a control. (C) NPM/ALK expressing Baf3 cells were treated for different times with LY294002 (25  $\mu$ M; LY), and CDC25A and cyclin A (CycA) proteins were analyzed by western blot. Actin was used as a control. Quantification was performed by densitometry with the Geentools software from syngenes. (D) Same experiment as in C with control Baf3 cells which do not express NPM/ALK.

**The PI3K/Akt pathway regulates CDC25A in ALCLs.** We and others have previously observed that the PI3K pathway is a regulator of CDC25A in various cell types. Since this pathway is constitutively active downstream of NPM/ALK, we tested the effect of a pharmacological inhibition of PI3K on CDC25A levels. As shown in Figure 2A, both LY294002 (LY) and Wortmannin significantly reduced CDC25A levels in NPM/ALK-expressing cells, suggesting that this pathway is involved in its regulation. Accordingly, RT-PCR analysis indicates that the level of CDC25A mRNA was dramatically decreased in NPM/ALK-expressing cells when PI3K was inhibited by LY (Fig. 2B). These data suggest that the PI3K pathway regulates CDC25A transcription or mRNA stability downstream of the NPM/ALK oncogene.

**CDC25A is an early target of the NPM/ALK dependent signaling.** Since CDC25A expression is cell cycle dependent,

we verified that its variations down-stream of the PI3K/Akt pathway were not just the consequence of the proliferation status of the cells. For this purpose we compared the kinetics of regulation by the PI3K/Akt pathway of CDC25A and of the cyclin A protein, which can be considered as a molecular marker of S phase. When NPM/ALK expressing cells were treated with the PI3K inhibitor LY, CDC25A downregulation started as soon as 1 hour after addition of the inhibitor, while cyclin A levels were not modified during the first 8 hours of treatment, to finally dramatically drop after 24 hours (Fig. 2C). Altogether these data demonstrate that CDC25A regulation is an early event occurring down-stream of the NPM/ALK-dependent signaling. Interestingly, in control cells, CDC25A regulation by the PI3K pathway is a much later event, occurring simultaneously with cyclin A decrease (Fig. 2D), suggesting different mechanisms of regulation in NPM/ALK positive and negative cells.

**CDC25A is required for proliferation of NPM/ALK expressing cells.** In order to investigate the impact of CDC25A in proliferation of NPM/ALK-positive cells, we first used the pharmacological CDC25 inhibitor IRC-083864.<sup>24</sup> As shown in Figure 3A, this molecule induced a significant inhibition of proliferation of NPM/ALK-positive cells in the presence of IL-3, while its effect on control cells was not significant in the same conditions. The proliferation of NPM/ALK cells in the absence of IL-3 was also dramatically decreased with the same concentration of the inhibitor (right), suggesting that CDC25 phosphatases are key determinants of the IL-3 independence acquired by these cells. In order to confirm that CDC25A is involved in the increased proliferation of ALCLs, we performed siRNA-mediated downregulation of the protein in NPM/ALK-positive Ba/F3 cells. BrdU incorporation was used to monitor DNA synthesis. As shown in Figure 3B, the siRNA against CDC25A induced a significant decrease of BrdU incorporation in NPM/ALK-expressing cells, reflecting a decrease in DNA synthesis.

We then tested the effect of IRC-083864 on the proliferation of the ALCL cells (Fig. 4). The proliferation of COST and KARPAS cells was impaired with 100 nM of the inhibitor, and higher dose (200 nM) was required to decrease SU-DHL1 cells proliferation. FEPD cells were not affected in these conditions. Altogether, these data demonstrate that CDC25A is indeed a key actor of the IL-3-independent proliferation of NPM/ALK-positive cells. No effect of this inhibitor was detected on cell death under these conditions (not shown).

**CDC25A is upregulated down-stream of other hematopoietic oncogenic tyrosine kinases.** We then performed experiments to define the level of CDC25A down-stream of two other oncogenic

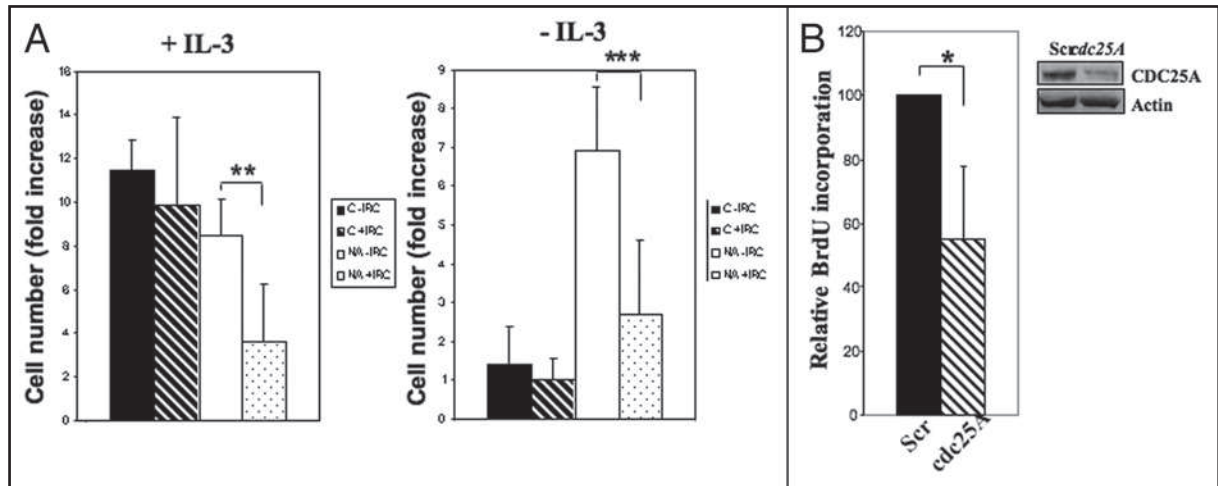


Figure 3. CDC25 inhibition affects the proliferation of NPM/ALK-expressing cells. (A) Control (C) and NPM/ALK-expressing (NA) cells were grown in the presence or the absence of the CDC25 inhibitor IRC-83864 (IRC; 100 nM). Cells were counted at day 3 after seeding and the proliferation rates (number of cells at day 3/number of cells at day 0) of the different culture conditions were compared. The experiment was performed either in the presence (left) or in the absence (right) of IL-3. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate. \*\* $p < 0.025$ ; \*\*\* $p < 0.01$ . (B) NPM/ALK-expressing cells were transfected with siRNA against CDC25A in the absence of IL-3, and DNA synthesis was measured after 18 hours by BrdU incorporation, as described in materials and methods. The results are presented as a percentage of BrdU incorporation by comparison with the BrdU incorporation values obtained with control siRNA. Western blot analysis of the corresponding fractions was performed with an antibody against CDC25A and against actin as a control. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.05$ .

tyrosine kinases, BCR/ABL, responsible of chronic myeloid leukemia (CML), and Flt3-ITD, a mutated form of the Flt3 receptor found in 30% of patients with acute myeloid leukemia (AML). As shown in Figure 5A, Ba/F3 cells stably expressing these oncogenes contain high levels of CDC25A compared to control or wild type cells. This is also the case in the K562 cell line, which express the BCR/ABL fusion protein (Fig. 5C). Inhibiting the PI3K pathway with LY led to rapid (2 hours) downregulation of CDC25A downstream of both oncogenes, confirming that the PI3K-dependent regulation of CDC25A is a common early event down-stream of various oncogenic tyrosine kinases involved in hematological malignancies (Fig. 5B and C).

**Discussion**

In this work, we show that NPM/ALK expression and activity lead to CDC25A constitutive expression in various cell types, demonstrating for the first time a direct link between an oncogene and CDC25A regulation. The rapid kinetics of downregulation in response to pharmacological inhibitors strongly argue for CDC25A being a target and an effector of the PI3K pathway, rather than a simple marker of cell proliferation status. Our comparison of CDC25A and cyclin A kinetics of regulation downstream of NPM/ALK further confirms this hypothesis. The p27<sup>Kip1</sup> CDK

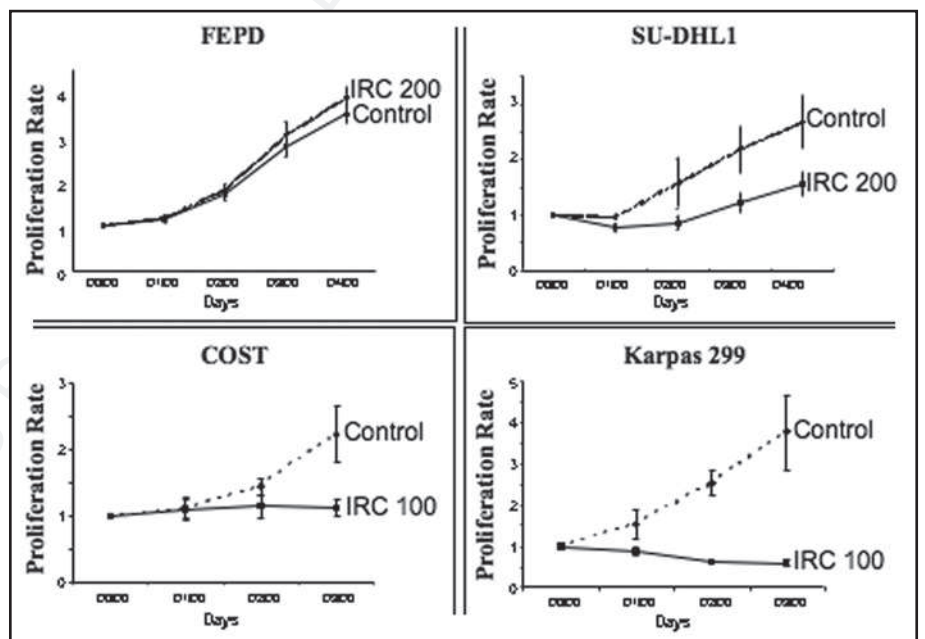


Figure 4. CDC25 inhibition affects the proliferation of ALCL cell lines. (A) The four ALCL cell lines (Karpas 299, SU-DHL1, COST and FEPD) were grown in the presence (black line) or the absence (dashed line) of the CDC25 inhibitor IRC-83864 (100 nM) and cell numbers were counted each day. (B) The same experiment was performed on SU-DHL1 and FEPD as in C, but with 200 nM of the IRC-83864 inhibitor.

inhibitor, a negative regulator of CDK2 activity, is downregulated downstream of NPM/ALK in PI3K/Akt-dependent manner.<sup>11,12</sup> These results suggest that down-stream of NPM/ALK, the PI3K/Akt pathway regulates two major actors of the G<sub>1</sub>/S transition both leading to CDK2 activation.

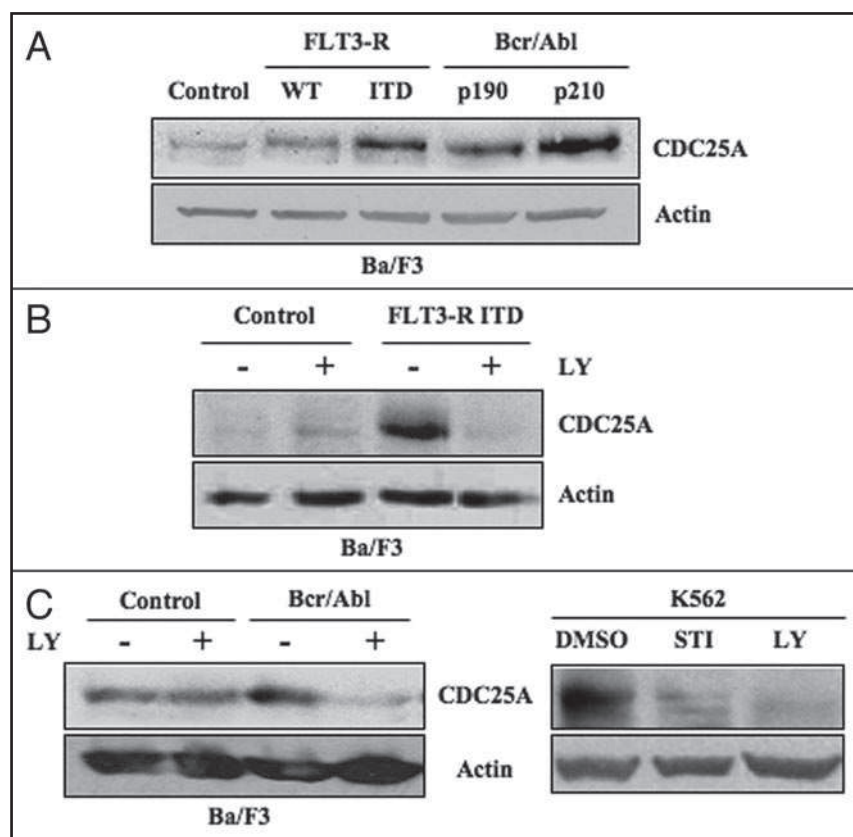


Figure 5. CDC25A is upregulated down-stream of haematological oncogenes. (A) Ba/F3 cells expressing the wild type (WT) Flt3 receptor (Flt3-R), the mutant Flt3-ITD receptor (ITD), the p190 BCR/ABL or p210 BCR/ABL oncogenes, or an empty vector as a control, were harvested and analyzed by western blot to establish the level of CDC25A. (B) Control and Flt3-ITD-expressing Ba/F3 cells were treated for 2 hours with the PI3K inhibitor LY294002 (25  $\mu$ M), and the level of the CDC25A protein was estimated in the corresponding crude by western blot analysis. (C) Left: control and p210 BCR/ABL expressing Ba/F3 cells were treated for 2 hours with the PI3K inhibitor LY294002 (25  $\mu$ M) and the level of the CDC25A protein was estimated in the corresponding crude fractions by western blot analysis. Right panel: the K562 BCR/ABL expressing cell line was treated with 1.2  $\mu$ M STI-571 (STI), or 25  $\mu$ M LY294002 (LY) for 2 hours and analyzed as described before to evaluate the level of CDC25A upon these treatments. Western blot against Actin was used as a control for protein loading in all these experiments.

Elegant studies by Ray et al.<sup>22,23</sup> recently demonstrated the involvement of CDC25A in the carcinogenesis process in synergy with Ras and neu oncogenes. Although there are many reports describing CDC25A overexpression in cancers, the molecular mechanism involved were not investigated in depth. In breast cancer cells, Loffler et al.<sup>21</sup> suggest that post-translational regulations of the protein account for its high cellular levels. Very recently, phosphorylation of CDC25A by GSK3 $\beta$ , and subsequent degradation by the proteasome has been correlated with the high levels of the protein detected in various cancers.<sup>25</sup> Although our data argue for a transcriptional and/or an mRNA regulation of CDC25A down-stream of NPM/ALK, we do not rule out that post-translational regulations also influence the stability of the protein in our system.

Our data show that the PI3K pathway is involved in CDC25A constitutive expression down-stream of NPM/ALK. There are only

a few reports describing a link between this pathway and CDC25A, and the molecular actors of this process remain unknown. Recently, we described a PI3K-dependent upregulation of CDC25A due to protein stabilization in acute myeloid leukemic cells interacting with fibronectin.<sup>26</sup> However, we also observed an increase of CDC25A mRNA in one of the leukemic cell lines, suggesting transcriptional or mRNA regulation. Although we do not exclude a stabilization of the protein, our present data argue for transcriptional and/or mRNA regulation, suggesting that depending on the cell and/or the oncogenic context, different ways of regulation of CDC25A by the PI3K/Akt pathway may exist. E2F1, c-myc and STAT3 are the main transcription factors described to regulate CDC25A expression. STAT3 is upregulated down-stream of NPM/ALK, and recent studies point to its importance in the cell transformation process.<sup>9,10</sup> Whether STAT3 is an intermediate between NPM/ALK and CDC25A expression remains to be established.

One important aspect of this study is the preferential sensitivity of NPM/ALK-expressing cells to CDC25A inhibition. This is particularly intriguing in the presence of IL-3, since in these conditions, the level of CDC25A is very similar in both cell lines. This opens the interesting possibility that the functional status of the phosphatase is different depending on whether it is expressed down-stream of the IL-3 receptor or of the NPM/ALK oncogene. The proliferation experiments performed on the ALCL cell lines also suggest that the functional status of CDC25A may vary between cell types. Indeed the FEPD cells, which contain high levels of CDC25A but do not express NPM/ALK, were not affected by the pharmacological inhibition of the phosphatase. The reasons of this different behavior remain to

be established.

siRNA-mediated CDC25A downregulation inhibits DNA synthesis, suggesting that the protein is indeed a key effector of NPM/ALK-mediated proliferation through its CDK2-activating function at the G<sub>1</sub>/S transition. However, we do not rule out that its role during mitosis is also involved. The modest effect of the inhibitor on control Ba/F3 cells suggests that the activity of CDC25 phosphatases is not crucial for the proliferation of these cells, in good accordance with studies performed on other cell types with previous versions of the inhibitor.<sup>24</sup> However, the reason of this moderate effect remains intriguing, given for instance the dramatic effects of CDC25A knock-out in mice. Whatever the reasons of this high sensitivity of lymphoma or leukemic cells to CDC25 inhibition, this observation opens interesting perspectives in terms of therapeutic targeting of these phosphatases in these pathologies.

In conclusion, we propose that CDC25A levels are upregulated by the NPM/ALK oncogene, rendering these cells dramatically dependent of the presence and/or the activity of this phosphatase. This regulation occurs through the constitutive activity of the PI3K/Akt pathway, and probably affects the transcription of the gene.

## Materials and Methods

**Cytokines, antibodies and pharmacological inhibitors.** LY294002, Wortmannin and cycloheximide were from Sigma, (St. Louis, MO, USA), MG-132 and WHI-154 from Calbiochem (San Diego, CA), and STI-571 (Gleevec) was provided by Novartis Pharma. Interleukin-3 (rmIL-3) was from R and D Systems (Abingdon, UK). Antibodies used were monoclonal anti-CDC25A (1:200), polyclonal anti-CDC25C (1:1,000), polyclonal anti-p27<sup>Kip1</sup> (1:1,000) and polyclonal anti-cyclin A (1:1,000) from Santa-Cruz (CA), monoclonal anti-ALK1 (1:10,000) from Dako Cytomation (Glostrup, Denmark), polyclonal anti-phospho-NPM/ALK-Y604 (1:1,000) from Cell Signaling Technologies (Beverly, MA), and Actin monoclonal antibody (1:10,000) from Sigma (St. Louis, MO).

**Cell lines and culture conditions.** Ba/F3 stably transfected with *flt3-R*, *flt3-R ITD*, *p210* or *p190 bcr-abl* were kindly provided by Prof. G. Laurent (Toulouse, France). Karpas and SU-DHL1 were from DSMZ (Germany), COST and Baf/3 cells stably expressing NPM/ALK were kindly provided by Prof. G. Delsol (Toulouse, France) and FEPD cells by Dr. S.W. Morris (Memphis, USA). Ba/F3 cells were grown in RPMI 1640 with 10% Fetal Calf Serum (FCS), penicillin (100 Units/ml)/streptomycin (100 µg/ml), 0.5 mg/ml geneticin (G418) and 2 ng/ml murine recombinant IL-3 at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. ALCL cell lines FEPD, Karpas 299, SU-DHL1 and COST were grown in IMDM with 15% FCS, and K562 cells in RPMI with 10% FCS.

**Transfection of small interfering RNA (siRNA).** Transfections were performed using the Amaxa nucleofection technology protocols (Amaxa, Koeln, Germany). Ba/F3 cells were grown until sub-confluence (1 x 10<sup>6</sup> cells/ml) and 2 x 10<sup>6</sup> cells were re-suspended in 100 µl of Amaxa solution V. 3 µg cdc25A or scramble siRNA (Dharmacon) were added. Cells were immediately using the Amaxa nucleofector device (program X-01), and grown at 0.4 x 10<sup>6</sup> cells/ml for 18 hours.

**5-bromo-2-deoxyuridine incorporation assay and cell cycle analysis.** Cells were labeled with 10 µM BrdU for 30 min, washed with PBS, and fixed in cold 70% ethanol for 20 min. BrdU detection was performed with the BrdU staining kit from BD Pharmingen. Cells were analyzed by flow cytometry with a FacScan cytometer (Becton Dickinson).

**Western blot analysis.** 2 x 10<sup>6</sup> cells were harvested in 100 µl of Laemmli buffer and boiled for 3 min. Proteins were resolved on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Hybond-C Super, Amersham Pharmacia Biotech). Saturation of the membrane was performed in Tris Buffered Saline with Tween 0.05% (TBS-T) containing 5% non-fat milk. Membranes were blotted with the relevant antibodies overnight at 4°C, washed with TBS-T, and incubated for 30 min with horseradish peroxidase-coupled secondary antibody (Cell Signaling). Detection was achieved with Pierce Supersignal chemiluminescent substrate.

**RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR.** Total RNA was extracted by guanidine isothiocyanate-phenol-chloroform extraction ready-to-use TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer. RNA was stored at -80°C prior to use. cDNA was generated from 5 µg RNA, with the Super Script reverse transcriptase from the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) following the manufacturer instructions. The PCR was performed with Taq DNA polymerase (Invitrogen) with 1 µl of cDNA. The primer sequences were: CDC25A, 5'-ACG GTC ACC ATG GAC CAG C-3' (sense) and 5'-TTC AGG GCT GGG CTA CAT CC-3' (antisense); 14S, 5'-GGT GGC TGA GGG AGA GAA TG-3' and 5'-CTC GGC AGA TGG TTT CCT TG-3' (antisense). 21 and 24 cycles of amplification were performed for each of the experiments. The products were analyzed on 2% agarose gels.

## Acknowledgements

We are grateful to Kelly Thornber, Frédérique Gaits and Georges Delsol for helpful reading and discussion of the manuscript and to Dr. Fatima L'Faqihi for technical assistance in FACS experiments. This work was supported by the "Pôle de Compétitivité Cancer Biosanté/Fonds Uniques interministériels des poles de compétitivité", by the "Région Midi-Pyrénées", and by the "Association pour la Recherche sur le Cancer" (ARC).

## Note

Supplementary materials can be found at: [www.landesbioscience.com/supplement/FernandezVidalCC8-9-Sup.pdf](http://www.landesbioscience.com/supplement/FernandezVidalCC8-9-Sup.pdf)

## References

- Stein H, Foss HD, Durkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford, et al. CD30<sup>+</sup> anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic and clinical features. *Blood* 2000; 96:3681-95.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1281-4.
- Chiarle R, Gong JZ, Guasparri I, Pesci A, Cai J, Liu J, et al. NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumours. *Blood* 2003; 101:1919-27.
- Piva R, Chiarle R, Manazza AD, Taulli R, Simmons W, Ambrogio C, et al. Ablation of oncogenic ALK is a viable approach for anaplastic large-cell lymphomas. *Blood* 2006; 107:689-97.
- Bai RY, Ouyang T, Miething C, Morris SW, Peschel C, Duyster J. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signalling pathway. *Blood* 2000; 96:4319-27.
- Slupianek A, Nieborowska-Skorska M, Hoser G, Morrione A, Majewski M, Xue L, et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase-mediated lymphomagenesis. *Cancer Res* 2001; 61:2194-9.
- Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, Raghunath PN, Wlodarski P, Wasik MA. Oncogenic tyrosine kinase NPM-ALK induces activation of the MEK/ERK signalling pathway independently of c-raf. *Oncogene* 2007; 26:813-21.
- Cussac D, Greenland C, Roche S, Bai RY, Duyster J, Morris SW, et al. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60src to mediate its mitogenicity. *Blood* 2004; 103:1464-71.
- Chiarle R, Simmons W, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, et al. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med* 2005; 11:623-9.
- Amin H, McDonnell T, Ma Y, Lin Q, Fujio Y, Kunisada K, et al. Selective inhibition of STAT3 induces apoptosis and G<sub>1</sub> cell cycle arrest in ALK positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncogene* 2004; 23:5426-34.
- Slupianek A, Skorski T. NPM/ALK downregulates p27<sup>Kip1</sup> in a PI-3K-dependent manner. *Exp Hematol* 2004; 32:1265-71.
- Rassidakis G, Ferezaki M, Atwell C, Grammatikakis I, Lin Q, Lai R, et al. Inhibition of Akt increases p27<sup>Kip1</sup> levels and induces cell cycle arrest in anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 2005; 105:827-39.



13. Dalton R, Rassidakis G, Atwell C, Wang S, Oyarzo M, Medeiros L. Differential expression of cyclin D3 in ALK<sup>+</sup> and ALK<sup>-</sup> anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 2005; 36:806-11.
14. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 2007; 7:1-12.
15. Chen X, Prywes R. Serum-induced expression of the CDC25A gene by relief of E2F-mediated repression. *Mol Cell Biol* 1999; 19:4695-702.
16. Galaktionov K, Chen X, Beach D. CDC25A cell cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 1996; 382:511-7.
17. Santoni-Rugiu E, Falck J, Mailand N, Bartek J, Lukas J. Involvement of Myc activity in a G<sub>1</sub>/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol* 2000; 20:3497-509.
18. Barre B, Vigneron A, Coqueret O. The STAT3 transcription factor is a target for the Myc and retinoblastoma proteins on the CDC25A promoter. *J Biol Chem* 2005; 280:15673-81.
19. Rother K, Kirshner R, Sanger K, Bohlig L, Mossner J, Engeland K. p53 downregulates expression of the G<sub>1</sub>/S cell cycle phosphatase Cdc25A. *Oncogene* 2007; 26:1949-53.
20. Busino L, Chiesa M, Draetta G, Donzelli M. CDC25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* 2004; 23:2050-6.
21. Loffler H, Syljuasen RG, Bartkova J, Worm J, Lukas J, Bartek J. Distinct mode of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 2003; 22:8063-71.
22. Ray D, Terao Y, Fuhrken P, Ma ZQ, DeMayo FJ, Christov K, et al. Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. *Cancer Res* 2007a; 67:984-91.
23. Ray D, Terao Y, Nimbalkar D, Hirai H, Osmundson EC, Zou X, et al. Hemizygous disruption of cdc25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 2007b; 67:6605-11.
24. Brezak MC, Valette A, Quaranta M, Contour-Galcera MO, Jullien D, Lavergne O, et al. IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells. *Int J Cancer* 2009; 124:1449-56.
25. Kang T, Wei Y, Honaker Y, Yamaguchi H, Appella E, Hung MC, et al. GSK-3beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* 2008 ;13:36-47.
26. Fernandez-Vidal A, Ysebaert L, Didier C, Betous R, De Toni F, Prade-Houdellier N, et al. Cell adhesion regulates CDC25A expression and proliferation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2006; 66:7128-35.

© 2009 LANDES BIOSCIENCE. DO NOT DISTRIBUTE.



## ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are hematological malignancies characterized by an excessive clonal amplification of myeloid lineage. The  $JAK2^{V617F}$  oncogene, which induces a constitutive activation of the tyrosine kinase JAK2, is involved in three MPN: polycythemia vera, essential thrombocythemia and primitive myelofibrosis. Several JAK2 inhibitors are currently tested in clinical trials on these pathologies. However, these inhibitors induce important side effect and do not eradicate the mutated clone. Thus, a best understanding of  $JAK2^{V617F}$  oncogenic mechanisms is necessary to improve the treatment of these MPN. Our research belongs to this general objective. We kept a particular interest on the G1/S transition CDC25A phosphatase for several reasons: (i)  $JAK2^{V617F}$  favors this cell cycle transition; (ii) CDC25A is overexpressed in several cancers and downstream other tyrosine kinase oncogenes; (iii) the presence of CDC25A currently tested in clinical trials for other malignant pathologies.

In our study, we demonstrate that the CDC25A phosphatase is constitutively over-expressed downstream of  $JAK2^{V617F}$  mutant in cell lines,  $JAK2^{V617F}$ -positive myeloid precursors of MPN patients and in bone marrow and spleen of  $JAK2^{V617F}$ -positive knock-in mice. This over-expression appears to be the consequence of a translational deregulation of CDC25A involving the cap-dependant translation initiation factor eIF-2 $\alpha$  and the STAT5 transcription factor. Furthermore, our results show that CDC25A inhibition reduces the clonogenic and proliferative potential of  $JAK2^{V617F}$ -expressing erythroid progenitors, while moderately affecting normal counterpart.

In the second part of our study, we show that CDC25A is early expressed in *ex vivo* erythroid and granulo-monocytic differentiations and absent in terminal differentiations.

Thereafter, we prospect to modulate CDC25A expression to better understand the physiological function of this phosphatase in hematopoiesis and the impact of its deregulation, and to evaluate the relevance of CDC25 inhibitors in these pathologies.

**Keywords:**  $JAK2^{V617F}$ , myeloproliferative neoplasms, CDC25A, cell signaling, myeloid differentiations

**Auteur :** Emilie-Fleur GAUTIER

**Directrice de thèse :** Dr Véronique DE MAS

**Titre :** Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> dans les néoplasies myéloprolifératives

**Résumé :**

Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des pathologies malignes caractérisées par une expansion clonale excessive de cellules de la lignée myéloïde. La mutation JAK2<sup>V617F</sup>, qui entraîne une activation constitutive de la tyrosine kinase JAK2, est impliquée dans trois de ces NMP, la maladie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive. De nombreux inhibiteurs de JAK2 ont été développés et certains sont testés en clinique. Cependant, les effets secondaires semblent importants et les premiers résultats suggèrent qu'ils ne permettront pas d'éradiquer le clone muté. Une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques de JAK2<sup>V617F</sup> est nécessaire afin d'améliorer le traitement de ces NMP. Mes travaux de thèse entrent dans cet objectif général. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'analyse de l'implication et de la régulation de la phosphatase CDC25A, une phosphatase impliquée dans la transition G1/S du cycle cellulaire. En effet, l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> favorise cette transition et CDC25A est surexprimée dans de nombreux cancers et en aval d'autres oncogènes à activité tyrosine kinase. De plus, des inhibiteurs des CDC25 dont l'IRC-083864 sont actuellement testés en clinique.

La première partie de nos travaux ont permis de mettre en évidence que la mutation JAK2<sup>V617F</sup> entraîne une surexpression de CDC25A et notamment dans des précurseurs myéloïdes de patients atteints de NMP. Notre étude suggère que cette surexpression est la conséquence d'une dérégulation traductionnelle de CDC25A impliquant le facteur d'initiation de la traduction cap-dépendante eIF-2 $\alpha$  et le facteur de transcription STAT5. De plus, l'inhibition de CDC25A diminue les capacités clonogènes de progéniteurs possédant JAK2<sup>V617F</sup> alors qu'elle a un effet moindre sur celle des progéniteurs de donneurs sains.

La deuxième partie de nos travaux a mis en évidence une expression précoce de CDC25A au cours de différenciations érythroïde et granulo-monocytaire de progéniteurs sains réalisées *ex vivo*, qui est absente au cours des différenciations terminales.

Dans la suite de nos travaux, nous projetons de moduler l'expression de CDC25A dans le but de mieux comprendre le rôle physiologique de CDC25A dans l'hématopoïèse et les conséquences de sa dérégulation ainsi que d'évaluer la pertinence d'inhibiteurs de CDC25A dans ces pathologies.

**Mots clés :** JAK2<sup>V617F</sup>, néoplasies myéloprolifératives, CDC25A, signalisation, différenciations myéloïdes

**Discipline :** Cancérologie

**Laboratoire :** INSERM UMR 1037 – Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse