



HAL
open science

Caractérisation clinique et biologique d'une population de l'arc alpin présumée atteinte d'un néoplasme myéloprolifératif Philadelphie négatif: apport respectif des différents marqueurs biologiques

Julie Mondet

► **To cite this version:**

Julie Mondet. Caractérisation clinique et biologique d'une population de l'arc alpin présumée atteinte d'un néoplasme myéloprolifératif Philadelphie négatif: apport respectif des différents marqueurs biologiques. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00641042

HAL Id: dumas-00641042

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00641042>

Submitted on 14 Nov 2011

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

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

**Caractérisation clinique et biologique d'une
population de l'arc alpin présumée atteinte d'un
néoplasme myéloprolifératif Philadelphie
négatif : apport respectif des différents
marqueurs biologiques**

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Julie MONDET

Née le 4 Novembre 1983 à Lyon (69)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE GRENOBLE

Le 28 Octobre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Monsieur le Professeur Pascal MOSSUZ

Membres :

Monsieur le Professeur Benoît POLACK

Monsieur le Docteur Claude-Eric BULABOIS

Madame le Docteur Pascale CONY-MAKHOUL

Monsieur le Docteur Selim CORM

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I.)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- <i>À partir du 1^{er} mai</i>
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR, SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I.) -
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	René	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH) - <i>À partir du 1^{er} mai</i>
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotecnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre Emmanuel	Maître de conférence
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	professeur Certifié

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI : Bureau de la Scolarité Pharmacie

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



ATER (n=5)

DEFENDI Frédérica	ATER	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA Séverine	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT Myriam	½ ATER	Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI Caroline	ATER	Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN Emilie	ATER	Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
SAPIN Emilie	ATER	Physiologie Pharmacologie (HP2)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)	Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)	Laboratoire HP2 (JR)

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET :	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Rogot
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio-pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Scolarité Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**

Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2010-2011

MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Rogat
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 19/05/2011

Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Sclarité Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Remerciements

A Monsieur le Professeur Pascal Mossuz, Directeur et Président de thèse

Merci de m'avoir encadrée pour ce travail de thèse, merci pour ton soutien dans cette année riche en découvertes. Le milieu de la recherche fondamentale et clinique est passionnant. Merci pour cette collaboration, ces conseils qui, j'en suis sûre, aboutiront à la réalisation de nombreux projets futurs.

A Monsieur le Professeur Benoît Polack,

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites de participer à ce jury de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée. Je vous adresse mon respect et ma plus grande reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Claude-Eric Bulabois,

Je te remercie de participer à ce jury en tant que clinicien. J'ai apprécié ta disponibilité et je saurais en faire autant dans l'exercice futur de mes fonctions. Merci d'avoir pris le temps pour tes précieuses réponses à mes questionnements.

A Madame le Docteur Pascale Cony-Makhoul

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail en tant que clinicienne. Merci pour les nombreux documents que vous m'avez fournis, pour vos pertinentes corrections et pour votre aide précieuse. Merci également de m'avoir mise en relation avec l'unité de recherche clinique du CH d'Annecy pour le recueil des données cliniques.

A Monsieur le Docteur Selim Corm

Merci de participer à ce jury et d'avoir accepté avec gentillesse et sans hésitation de juger ce travail. Je vous remercie d'avoir pris de votre temps pour répondre à mes interrogations. Merci également de m'avoir mise en contact avec Dominique Pellier-Cuit du Service de Gestion des Dossiers Médicaux du CH de Chambéry.

Merci au Docteur Elodie Sellier pour son aide capitale dans la réalisation des statistiques.

A l'équipe de biologie moléculaire en onco-hématologie du CHU de Grenoble

Merci notamment au Professeur Dominique Leroux et au Maître de conférences Mary Callanan pour avoir permis de récupérer de l'ADN de patients sélectionnés pour des analyses complémentaires. Un grand merci à Martine Chauvet pour ses corrections de la technique de PCR ARMS ainsi qu'à toute l'équipe technique - Céline, Caroline, Jean Jacques et Isabelle - pour la préparation du matériel et l'envoi de celui-ci.

A Madame le Docteur Christine Lefebvre

Merci pour tes encouragements quotidiens et pour la vérification de la partie cytogénétique.

A Monsieur le Docteur Serge Carillo du CHU de Nîmes et son équipe

Merci pour ce travail collaboratif et pour la réalisation des analyses complémentaires par HRM.

Merci au Docteur Cécile Leyronnas et au Docteur David Assouline de m'avoir permise de consulter les dossiers des patients de l'Institut Daniel Hollard. Merci à **Aude** pour sa sympathie.

Merci à Dominique Pellier-Cuit et à l'équipe du SGDM du CH de Chambéry, en particulier à Eric. Merci pour votre aide à tous, dans le dédale labyrinthique du service des archives. Merci pour les pizzas, pour la bonne humeur au rythme de radio « Nostalgie ».

Merci à Nadine Cadoux, à Gaëlle (bon courage pour le master !) **et aux secrétaires du service d'hématologie clinique du CH d'Annecy**. Merci pour la sortie des dossiers et pour les cafés bienfaiteurs.

Un immense merci à Claire Vettier ! Tes encouragements, tes petites attentions au quotidien ont été une grande source de motivation. Merci pour avoir pris du temps pour les corrections.

A Béné, merci ton soutien et ta bonne humeur!

Merci à Pierre et à toutes les techniciennes de Cytologie : Béatrice, Catherine, Isabelle, Jocelyne, Marie-Jo, Marie-Noëlle, Monique, Nadine, Nicole et Sandrine. Quel plaisir de travailler à vous ! Vous m'avez soutenue tout au long de cette année difficile !

Et merci aux claudettes « Anne et Lauriane » et à Claude...heu non à **François !** Merci pour votre aide, pour vos réponses à mes nombreuses questions, pour le contrôle des 882 patients de la base de données et pour votre gentillesse!!

Un grand merci également à **Patricia** et son classeur magique, aux secrétaires, cadres et au secteur Hémostase.

A Sylvain Carras et à Raph pour leur contribution et leur soutien.

Merci les **amis co-internes** pour les bons moments qu'on a passé ensemble...et ça va continuer ! Spéciale dédicace à David, Béran, Laeti, Cécile, Damien, Pierrot et Xav' ! Merci à tous les internes en Biologie au CHU de Grenoble.

Aux copines de l'internat d'Annecy : Marion, Audrey, Amélie, Aurélie, Béa, Caro, et Clo.

A mes amis de la fac de Lyon : Céline, Tom, ME, Anne-Laure, Carine et Mymy pour ces grands moments partagés ☺

A mes amis du collège Jean Charcot : Rémi, Myriam, Amandine, Cyril et Pat...hé oui 17 ans d'amitié ! Merci d'être toujours là !

Au groupe des « Chamos » ...Chaméliquement vôtre !

A mes grand-parents, ma famille et ma belle famille, merci pour vos encouragements.

A mes parents, au Jé et à sa Popo pour votre soutien sans faille et tout votre amour. Merci de m'avoir épaulée et surtout supportée toutes ces années.

A Tom : je t'aime.

Sommaire

Table des illustrations	13
Tableaux.....	14
Liste des abbréviations.....	15
Introduction	17
Partie 1 : Généralités sur les néoplasmes myéloprolifératifs classiques hors LMC.....	19
1. Définitions et généralités	19
1.1. Les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif	19
1.1.1. La polyglobulie de Vaquez.....	19
1.1.2. La thrombocytémie essentielle	20
1.1.3. La myélofibrose primitive	20
1.2. Complications des néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif.....	22
1.2.1. Complications thrombotiques.....	22
1.2.2. Complications hémorragiques	23
1.2.3. Complications hématologiques.....	23
2. Critères diagnostiques selon la classification OMS 2008	24
2.1. Diagnostic de polyglobulie de Vaquez	24
2.2. Diagnostic de myélofibrose primitive.....	25
2.3. Diagnostic de thrombocytémie essentielle.....	25
3. Les anomalies clonales et mutations dans les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif dits classiques.....	29
3.1. La cytogénétique conventionnelle	29
3.2. Les mutations retrouvées dans les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif dits classiques.....	30
3.2.1. Les mutations touchant la voie de signalisation JAK-STAT.....	30
3.2.1.1. La révolution <i>JAK2V617F</i>	30
3.2.1.2. Les anomalies de l'exon 12 de <i>JAK2</i>	34
3.2.1.3. Les mutations de <i>MPL</i>	36
3.2.1.4. Les mutations de <i>LNK</i>	37
3.2.2. Les mutations touchant des régulateurs potentiels de la transcription épigénétique	38
3.2.2.1. Les mutations de <i>TET2</i>	38
3.2.2.2. Les mutations <i>EZH2</i>	39
4. Les scores pronostiques et la prise en charge thérapeutique	39
4.1. Traitement de la PV et de la TE.....	39
4.1.1. Traitement antiagrégant plaquettaire	39

4.1.2.	Prise en charge selon les risques.....	40
4.2.	Traitement de la MFP	44
4.2.1.	Les traitements conventionnels	45
4.2.1.1.	Le traitement de l'anémie (ou des cytopénies)	45
4.2.1.2.	Le traitement de la splénomégalie/myéloprolifération	46
4.2.2.	L'allogreffe.....	47
4.2.3.	Les traitements récents ou investigationnels	47
4.2.3.1.	Le pomalidomide.....	47
4.2.3.2.	Les inhibiteurs de JAK.....	47
Partie 2 :	Matériels et Méthodes	48
1.	Sélection de la population.....	48
1.1.	Critères d'inclusion.....	48
1.2.	Critères d'exclusion	49
1.3.	Méthodes de recueil et données recueillies.....	49
1.4.	Classification OMS.....	49
1.5.	Caractérisation de la population globale.....	50
2.	Techniques utilisées	51
2.1.	Culture spontanée de progéniteurs hématopoïétiques.....	51
2.1.1.	Principe général	51
2.1.2.	Préparation de l'échantillon sanguin	51
2.1.3.	Préparation de la moelle osseuse	52
2.1.4.	Mises en culture.....	53
2.1.5.	Lectures des boîtes.....	54
2.2.	Détection de clones mutés	55
2.2.1.	Recherche de la mutation <i>JAK2V617F</i>	55
2.2.1.1.	Rappel sur le principe de PCR de type Amplification Refractory Mutation System (ARMS) appliquée à la recherche de <i>JAK2V617F</i>	55
2.2.1.2.	Extraction de l'ADN des polynucléaires	57
2.2.1.3.	Amplification par PCR et révélation des fragments d'ADN	57
2.2.2.	Recherche de mutations de <i>MPL</i>	58
3.	Analyses statistiques	58
Partie 3 :	Résultats	58
1.	Différents profils de prescriptions de la mutation <i>JAK2V617F</i> et/ou de cultures de progéniteurs	58
2.	Néoplasmes myéloprolifératifs classiques Philadelphie négatif dans l'arc alpin	59
2.1.	Cas de polyglobulie de Vaquez dans l'arc alpin.....	59

2.1.1.	Informations générales sur les patients atteints de polyglobulie de Vaquez	59
2.1.2.	Proportion de polyglobulies de Vaquez <i>JAK2V617F</i> positif.....	62
2.1.3.	Proportion de polyglobulies de Vaquez <i>JAK2</i> exon12 positif.....	63
2.1.4.	Application des critères de l'OMS 2008	63
2.2.	Cas de thrombocytémies essentielles dans l'arc alpin.....	67
2.2.1.	Informations générales des cas de thrombocytémies essentielles de l'arc alpin	67
2.2.2.	Mutations <i>JAK2V617F</i> et MPL chez les patients atteints de thrombocytémie essentielle..	69
2.2.3.	Application des critères diagnostiques de l'OMS 2008.....	70
2.3.	Cas de myélofibroses primitives dans l'arc alpin.....	72
2.3.1.	Informations générales des cas de myélofibroses primitives de l'arc alpin	72
2.3.2.	Cytogénétique et statut mutationnel dans les MFP de l'arc alpin.....	74
2.3.3.	Application des critères de l'OMS 2008	74
3.	Cas d'érythrocytoses idiopathiques.....	75
4.	Cas non répertoriés comme néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif. ...	77
4.1.	Exclusion du diagnostic de NMP Ph-	77
4.1.1.	Patients avec manifestations cliniques.....	77
4.1.2.	Patients avec anomalies de l'hémogramme	78
4.1.2.1.	Les polyglobulies	78
4.1.2.2.	Les thrombocytoses	79
4.2.	Cas de diagnostic non posé	80
4.3.	Mutations <i>JAK2V617F</i> et autres hémopathies	80
5.	Place de la culture de progéniteurs hématopoïétiques dans le diagnostic des NMP Philadelphie négatif.....	82
5.1.	Apports de la culture des progéniteurs hématopoïétiques vis-à-vis du statut mutationnel <i>JAK2V617F</i>	82
5.1.1.	Dans la polyglobulie de Vaquez	82
5.1.2.	Dans la thrombocytémie essentielle	82
5.1.3.	Dans la myélofibrose primitive	82
5.2.	Facteurs de variabilité de la pousse endogène de progéniteurs hématopoïétiques	83
5.2.1.	Influence du type de prélèvement.....	83
5.2.2.	Colonies spontanées mégacaryocytaires versus érythrocytaires	83
5.2.2.1.	Dans la polyglobulie de Vaquez	83
5.2.2.2.	Dans la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose idiopathique.....	85
5.2.2.3.	Dans les érythrocytoses idiopathiques	86
5.2.3.	Culture de progéniteurs versus diagnostic posé.....	87
5.2.3.1.	Les hémopathies hors NMP Philadelphie négatif	87

5.2.3.2. Les accidents thrombo-emboliques.....	88
5.2.3.3. Discordance clinico-biologique	88
5.2.4. Analyses de culture de progéniteurs réalisées en doublon	89
Partie 4 : Discussion et Perspectives	91
Références	105

Table des illustrations

Figure 1 : Anomalies cytologiques des hématies visibles dans la MFP.	22
Figure 2 : Rôle physiologique de JAK2 dans la transduction du signal de l'EPO.	32
Figure 3 : Phénomène de disomie uniparentale	31
Figure 4 : Mutations touchant l'exon 12 de <i>JAK2</i>	35
Figure 5 : Aspect caractéristique de la moelle sur la BOM de patients porteurs de mutations de l'exon 12 de <i>JAK2</i>	36
Figure 6 : Rôle de LNK dans la régulation de la signalisation JAK-STAT	37
Figure 7 : Réaction enzymatique catalysée par TET2	38
Figure 8 : Démarche thérapeutique dans la Polyglobulie de Vaquez hors grossesse	42
Figure 9: Démarche thérapeutique dans la Thrombocytémie Essentielle hors grossesse	43
Figure 10: Formules structurales des principales molécules chimiques utilisées comme cytoréducteur dans la PV ou dans la TE.	43
Figure 11: Algorithme de prise en charge de MFP	45
Figure 12 : Gestion d'un prélèvement sanguin pour la mise en culture de progéniteurs hématopoïétiques.	52
Figure 13 : Gestion d'un prélèvement de moelle pour une mise en culture de progéniteurs hématopoïétiques.	53
Figure 14 : Aspect microscopique des CFU-E et CFU-Meg.	55
Figure 15 : Principe de la PCR ARMS	56
Figure 16 : Fragments d'ADN génomique sur gel d'agarose.	56
Figure 17: Indications des prescriptions de la mutation <i>JAK2V617F</i> et/ou de culture de progéniteurs.	58
Figure 18: Prise en charge thérapeutique chez 131 patients atteints de PV.	61
Figure 19: Complications observées à court et long terme chez les patients atteints de TE dans l'arc alpin	68
Figure 20: Prise en charge thérapeutique chez les patients atteints de TE	69
Figure 21: Prise en charge chez 27 patients atteints de MFP de l'arc alpin.	73
Figure 22: Etude cytogénétique des myélofibroses primitives de l'arc alpin	74
Figure 23 : Démarche diagnostique proposée devant la suspicion d'une polyglobulie de Vaquez.	99
Figure 24 : Proposition d'une démarche diagnostique devant une thrombocytose.	100
Figure 25 : Proposition de démarche diagnostique devant une manifestation vasculaire atypique .	101

Tableaux

Tableau 1 : Critères de l’OMS pour le diagnostic de polyglobulie de Vaquez.....	26
Tableau 2 : Critères de l’OMS pour le diagnostic de myélofibrose primitive.....	27
Tableau 3 : Critères de l’OMS pour le diagnostic de thrombocytémie essentielle.	28
Tableau 4 : Principales anomalies chromosomiques communément retrouvées dans la PV, MFP, et la TE.....	29
Tableau 5: Facteurs pronostiques selon le DIPSS-plus.....	44
Tableau 6: Caractéristiques des patients étudiés	51
Tableau 7: Liste des amorces utilisées pour la détection de <i>JAK2V617F</i>	57
Tableau 8 : Complications observées chez 133 patients atteints de Polyglobulie de Vaquez.....	61
Tableau 9: Répartition des cas de polyglobulies de Vaquez et pourcentage de patients <i>JAK2V617F</i> mutés selon les sites.....	63
Tableau 10: Récapitulatif des 25 patients diagnostiqués comme atteints de polyglobulie de Vaquez mais ne respectant pas les critères de l’OMS 2008	66
Tableau 11 : Proportion de TE porteuses de la mutation <i>JAK2V617F</i> sur l’ensemble de l’arc alpin et selon les sites.....	70
Tableau 12: Complications observées chez 31 patients atteints de myélofibrose primitive dans l’arc alpin.....	73
Tableau 13: Résultats des analyses réalisées afin d’exclure une polyglobulie de Vaquez.....	76
Tableau 14: Récapitulatif des résultats de la mutation <i>JAK2V617F</i> et des cultures de progéniteurs en fonction des hémopathies.....	81
Tableau 15: Répartition du type de pousses spontanées de progéniteurs hématopoïétiques en fonction du type de prélèvement chez les patients atteints de PV.	84
Tableau 16: Répartition du type de pousses spontanées de progéniteurs hématopoïétiques en fonction du type de prélèvement et du site de prélèvement chez les patients atteints de polyglobulie de Vaquez.....	85
Tableau 17: Répartition du type de pousses spontanées de progéniteurs hématopoïétiques en fonction du type de prélèvement chez les patients atteints de TE.....	86

Liste des abbréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AIT : Accident Ischémique Transitoire
ARMS: Amplification Refractory Mutation System
ASA: Acide acétylsalicylique
ASXL1: Additional sex comb-like 1
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
AVK: Antivitamine K
BCR-ABL: Break Cluster Region-Abelson
BET: Bromure d'éthidium
BFU-E: Burst-Forming Units-Erythroid
BOM: Biopsie ostéomédullaire
CAC: Clinical Advisory Commitee
CBL: Casitas B-cell lymphoma
CFU-E: Colony Forming Unit- Erythroid
CFU-GM: Colony Forming Unit Granulocyte Macrophage
CFU-Meg: Colony Forming Unit-Megakaryocytic
CMN : Cellules Mononuclées
CSF-E : Formation spontanée de colonie -érythroïde
CSF-Meg : Formation spontanée de colonie -mégacaryocytaire
EEC: Endogenous Erythroid Colony
EMC : Endogenous Megacaryocytic Colony
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique
EI: Erythrocytose idiopathique
ELN: European Leukemia Net
EPO: Erythropoïétine
EZH: Enhancer of Zeste homolog
G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor
Hb: Hémoglobine
HBPM: Héparine de Bas Poids Moléculaire
HEL: Human Erythro Leukemia
IDH : Isocitrate Déshydrogénase
IL-3: Interleukine 3

IL-6: Interleukine 6
IWG-MRT: International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment
JAK2: Just an another kinase, Janus kinase
JH2 : JAK Homology 2
LDH : Lactate déshydrogénase
LNH : Lymphome non hodgkinien
LNK : Lymphocyte specific adaptor protein
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MFP: MyéloFibrose Primitive
MGG: May Grünwald Giemsa
MPL: MyeloProliferative Leukemia
NF1 : Neurofibromatosis 1
NFS : Numération Formule Sanguine
NMP (Ph-): Néoplasmes myéloprolifératifs (Philadelphie négatif)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PV : Polyglobulie de Vaquez
PVSG: Polycythemia Vera Study Group
SMD: Syndrome Myéloprolifératif
SMP Ph- : Syndrome myéloprolifératif Philadelphie négatif
SNP: Single nucleotide Polymorphism
STAT: Signal transducer and activator of transcription
TAE: Tris Acétate EDTA
Taq : *Thermus aquaticus* polymérase
TE : Thrombocytémie essentielle
TET 2 : Ten Eleven Translocation 2
TPO : Thrombopoïétine
U937 : Human leukemic monocyte lymphoma cell line
VG : Volume globulaire isotopique

Introduction

Les néoplasmes myéloprolifératifs chroniques (NMP), plus connus sous le terme de syndromes myéloprolifératifs (SMP), ont été décrits pour la première fois en 1951 par William Dameshek (1). Ils sont caractérisés par une prolifération clonale et dérégulée de cellules souches hématopoïétiques, sans blocage de maturation, ni dysplasie. D'après la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé publiée en 2008 (2), les néoplasmes myéloprolifératifs chroniques regroupent plusieurs hémopathies telles que la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP) mais également la mastocytose systémique, la leucémie chronique à éosinophiles non caractérisée, la leucémie à polynucléaires et les néoplasmes myéloprolifératifs inclassables.

La leucémie myéloïde chronique est caractérisée la plupart du temps par la présence du chromosome Philadelphie, produit de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 [t (9 ; 22) (q34 ; q11)]. Cette fusion des gènes, *bcr* et *abl* aboutit à la synthèse d'une protéine chimère à activité tyrosine kinase constitutive. La LMC est une entité clinico-biologique homogène dont le pronostic a été radicalement amélioré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase. Les autres SMP représentent un ensemble hétérogène de syndromes, regroupés sous le terme récent de néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif. Parmi ces NMP Ph-, nous nous sommes intéressés dans ce mémoire aux syndromes myéloprolifératifs classiques que sont la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MFP).

En 2005, la découverte de la mutation *JAK2 V617F* par différents groupes indépendants a largement modifié le diagnostic et la stratification des NMP Ph-. En effet, la mutation est retrouvée dans plus de 90% des polyglobulies de Vaquez, dans 50% des thrombocytémies essentielles et dans 50% des myélofibroses primitives (3-6). Dans ce contexte, les critères diagnostiques des NMP Ph- ont été revus par l'OMS tenant compte de la prévalence de la mutation *V617F* de *JAK2* et d'autres anomalies moléculaires (*MPL*, *JAK2* exon12...). En particulier, la place des cultures de progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires a dû être révisée.

Le laboratoire d'Hématologie cellulaire du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble réalise l'exploration fonctionnelle de l'hématopoïèse par la technique des cultures de progéniteurs hématopoïétiques depuis le début des années 90. Cette exploration donne un

argument en faveur d'un NMP par la mise en évidence d'une pousse endogène ou spontanée, de progéniteurs, en l'absence de cytokines, sur des prélèvements sanguins et/ou médullaires. Ce travail rétrospectif a repris les résultats d'analyses de cultures et/ou de mutations *JAK2V617F* prescrites par les Centres Hospitaliers d'Annecy, de Chambéry, par l'Institut Daniel Hollard, ainsi que par le Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble entre le 1^{er} janvier 2007 et le 31 décembre 2010 pour des patients de l'arc alpin.

Notre étude a pour but d'analyser la fréquence des mutations *JAK2V617F* et des cultures spontanées de progéniteurs recueillies sur quatre années afin de caractériser la population atteinte dans les centres étudiés et de définir l'intérêt diagnostique des différents critères biologiques identifiés dans la classification de l'OMS. En particulier, nous avons étudié les corrélations entre la présence de la mutation *V617F* et la présence d'une pousse autonome de progéniteurs afin de déterminer leur place respective dans un algorithme diagnostique des NMP Ph-. Enfin, l'impact des nouveaux critères de l'OMS 2008 sur la classification clinique des patients a été étudié.

Dans la première partie, sera présentée une revue des connaissances générales concernant les NMP Ph- classiques (critères diagnostiques, recommandations de prises en charge...), les anomalies clonales recherchées habituellement en routine et celles ouvrant des perspectives diagnostiques futures seront aussi décrites ou explicitées. Dans la seconde partie, les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, biologiques des patients de l'arc alpin seront analysées et cette analyse permettra l'élaboration d'une stratégie diagnostique.

Partie 1 : Généralités sur les néoplasmes myéloprolifératifs classiques hors LMC

1. Définitions et généralités

1.1. Les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif

1.1.1. La polyglobulie de Vaquez

La maladie de Vaquez ou « polycythemia vera » chez les Anglo-Saxons résulte de l'expansion clonale d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente, à l'origine d'une prolifération non régulée du tissu myéloïde prédominant sur la lignée érythrocytaire. Son incidence est faible, de l'ordre de 0.02 à 2.8 cas pour 100 000 habitants/an (7, 8) avec une prévalence estimée selon les études entre 22 et 30 cas pour 100 000 habitants (9, 10). Le sex ratio est un peu controversé. Une égalité homme/femme a été décrite (8, 11). Au contraire, certaines études montrent une prédominance féminine de la pathologie (12, 13). A l'inverse, une prépondérance masculine a également été observée (14-16). La polyglobulie de Vaquez peut survenir à tous âges (16), cependant elle touche en priorité l'adulte avec une moyenne d'âge au diagnostic estimée à 60 ans (17). Vingt pour cent des patients sont toutefois diagnostiqués avant l'âge de 50 ans (18).

Le plus souvent, la découverte de la maladie est fortuite, liée à une augmentation de l'hémoglobine ou de l'hématocrite sur l'hémoграмme. Une hyperleucocytose et une thrombocytose dues à une amplification concomitante des lignées granuleuse et plaquettaire sont souvent observées (19). Dans certaines formes plus trompeuses, seule une thrombocytose marquée est initialement visiblement à l'hémoграмme, la polyglobulie étant masquée par une carence martiale ou un saignement (20). Une splénomégalie modérée est présente dans 50 à 75% des cas. Une érythrose cutanéomuqueuse peut apparaître progressivement surtout visible au niveau du visage et des mains. Un prurit aquagénique est évocateur d'une PV mais inconstant et non spécifique (21). De plus, il peut précéder l'hémopathie de plusieurs années (22). De la même manière, ce NMP peut être diagnostiqué secondairement à une crise d'érythromélgie. Ces crises atteignent souvent les pieds et sont marquées par des accès douloureux de type brûlures pulsatiles, rougeur et chaleur des extrémités. Des signes fonctionnels traduisant l'hyperviscosité sanguine peuvent également conduire au diagnostic. Les patients peuvent se plaindre de céphalées, de vertiges, de troubles visuels ou de paresthésies. Une complication thrombotique, veineuse ou artérielle, peut également être

évocatrice. Dans ces circonstances (ex : thromboses veineuses splanchniques, splénomégalies...), l'hémogramme notamment lié à l'hémodilution peut ne pas révéler de polyglobulie (23-25). La polyglobulie primitive est une maladie qui évolue lentement, avec toutefois une espérance de vie diminuée par rapport à la population générale (26, 27).

1.1.2. La thrombocytémie essentielle

La thrombocytémie essentielle est une maladie clonale caractérisée par une prolifération préférentielle de la lignée mégacaryocytaire entraînant une thrombocytose. L'incidence est d'environ 1.55 cas pour 100000 habitants chaque année (13). Cependant, une étude française rapporte une incidence plus élevée, proche de 3 cas pour 100000 habitants (8). Cette augmentation semble plutôt découler de la modification des critères diagnostiques notamment avec l'abaissement du taux plaquettaire de 600G/l à 450G/l (28, 29), et de l'apport de la mutation *JAK2V617F*. Cette fréquence annuelle reste faible et contraste avec la forte prévalence de l'ordre de 30 pour 100000 habitants (7). Ce décalage entre l'incidence et la prévalence s'explique par le fait que la TE ne modifie pas significativement l'espérance de vie des patients (27). Par contre, une étude a montré l'impact négatif sur la qualité de vie des patients atteints de TE (30). La TE est deux fois plus fréquente chez la femme (7, 13). Bien que l'âge médian au diagnostic soit d'environ 60 ans, le début de la maladie serait plus précoce chez la jeune femme avec un pic vers 30 ans (31). La TE est par contre rare chez l'adolescent et l'enfant avec peu de mutations clonales classiquement acquises (ex : *JAK2V617F* ...) (32).

Comme pour la polyglobulie de Vaquez, le diagnostic peut être révélé de manière fortuite ou à la suite de la découverte d'une splénomégalie, ou de signes cliniques traduisant l'occlusion vasculaire de la microcirculation : douleurs des extrémités, acroparesthésies, érythromélagie... Ces troubles de la microcirculation peuvent atteindre le système nerveux central (cécité transitoire, accidents ischémiques transitoires). Des complications thrombotiques artérielles ou veineuses peuvent également survenir.

1.1.3. La myélofibrose primitive

La myélofibrose primitive (MFP) est également anciennement appelée « myélofibrose idiopathique chronique » ou « splénomégalie myéloïde » ou encore « métaplasie myéloïde avec myélofibrose ». Le terme myélofibrose primitive permet de la distinguer des myélofibroses secondaires, notamment post-PV et post-TE (33). L'incidence de la pathologie est faible de 0.21 à 0.5 cas pour 100 000 habitants par an (34-36). L'âge médian au diagnostic

se situe entre 60 et 65 ans (37). Le sex ratio montre une prédominance masculine plus ou moins marquée selon les études (8, 34, 38). Ce néoplasme myéloprolifératif est caractérisé par la prolifération d'une cellule souche hématopoïétique clonale se différenciant en cellules hématopoïétiques myéloïdes notamment mégacaryocytaires. Le relargage de cytokines lié à la prolifération clonale notamment mégacaryocytaire (39) entraîne une néoangiogenèse et une ostéogenèse (40) ainsi qu'une prolifération de cellules stromales non clonales à l'origine de l'apparition d'une fibrose médullaire (41). La fibrose réactionnelle altère l'environnement des cellules de la moelle et perturbe l'hématopoïèse médullaire. Les cytokines et chimiokines libérées participent également à la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques des niches médullaires vers les niches spléniques, conduisant à l'hématopoïèse splénique (42).

La clinique observée chez les patients découle de la physiopathologie. Le tableau clinique révélateur est variable, souvent d'apparition insidieuse. Le diagnostic de MFP repose sur la découverte d'une splénomégalie et/ou d'anomalies de l'hémogramme. Des signes généraux à type d'asthénie, d'amaigrissement, des sueurs nocturnes significatives peuvent être à l'origine du diagnostic (30). La splénomégalie est quasi constante, de taille variable au diagnostic. L'hémogramme montre fréquemment une anémie d'origine mixte, centrale et par hémodilution, souvent associée à une érythromyélocytose. Une morphologie globulaire peut montrer des anomalies érythrocytaires non spécifiques telles que des dacryocytes, des anneaux de Cabot Figure 1. La myélofibrose primitive a une évolution plus péjorative que la PV ou la TE avec une médiane de survie estimée de 40 à 60 mois (34). Les complications sont multiples dans la MFP. Certaines complications leucémiques et thromboemboliques sont communes aux NMP Ph- (cf partie 1.2). D'autres sont propres à la MFP et participent à ce mauvais pronostic. L'anémie est pratiquement inéluctable et requiert souvent des transfusions de concentrés de globules rouges à l'origine de complications secondaires possibles comme l'hémochromatose. D'autres complications touchent ces patients telles que l'hypertension portale, la cachexie, l'insuffisance médullaire elle-même à l'origine d'éventuelles complications infectieuses ou hémorragiques.

La myélofibrose au stade préfibrotique (pré-MF) correspond à un stade précoce de la maladie, et se manifeste par une thrombocytose isolée. Ce stade a été décrit par plusieurs études (43, 44) et intégré dans les critères diagnostiques de l'OMS 2008 (2). Toutefois, le diagnostic différentiel avec la TE, qui repose sur l'analyse de la biopsie ostéomédullaire (BOM), reste controversé en pratique courante car il nécessite un observateur entraîné et semble soumis à d'importantes variabilités inter-observateurs (45, 46). Cependant, il semble intéressant en terme de pronostic de différencier la pré-MF et la TE. D'après des études multicentriques, la

médiane de survie diffère entre les 2 pathologies (47) ainsi que l'évolution à 10 ans en leucémie aiguë (5.8% vs 0.7% respectivement pour pré-MFP et TE) ou en myélofibrose (12.3% vs 0.8% respectivement pour pré-MFP et TE) (48).

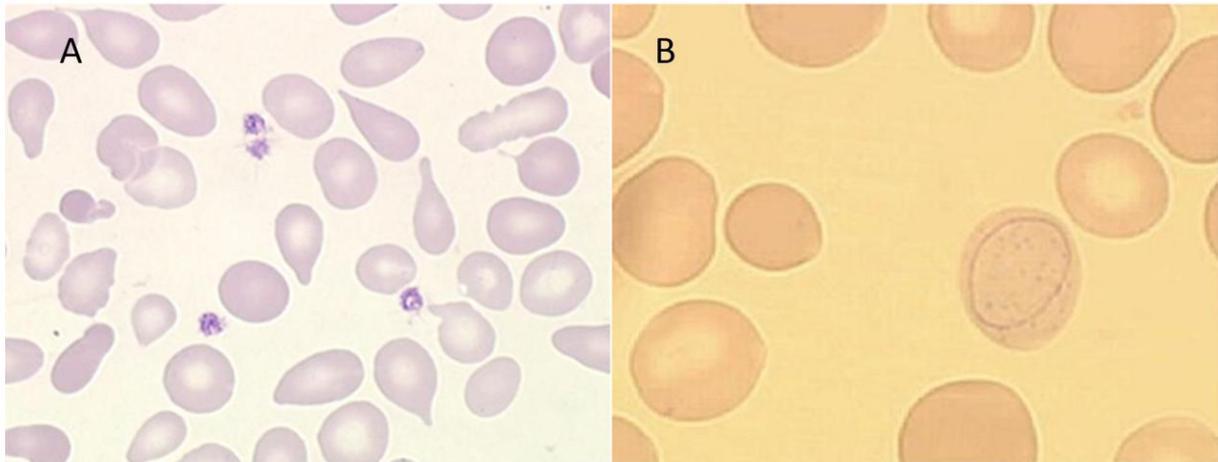


Figure 1 : Anomalies cytologiques des hématies visibles dans la MFP (coloration MGG x100).
A : Dacryocytes ou hématies en larme. B : Anneau de Cabot.

1.2. Complications des néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif

Les complications impactent de manière significative le pronostic et la qualité de vie des patients. On distingue les complications à court terme, thrombotiques ou hémorragiques, des complications hématologiques qui apparaissent à plus long terme.

1.2.1. Complications thrombotiques

Les thromboses sont des complications fréquentes de la PV et de la TE qu'elles soient révélatrices du diagnostic ou qu'elles surviennent lors du suivi du patient. Leur incidence varie selon les études de 22 à 38.6% et de 9.7 à 29.4% respectivement pour la PV et la TE (49). Elles affectent surtout les patients âgés ou ayant présentés des antécédents thrombotiques (50, 51). Concernant la MFP, 13.2% des cas ont eu un événement vasocclusif au diagnostic ou précédemment (52).

Le risque thrombotique est artériel ou veineux, avec des sites parfois inhabituels. En effet, les syndromes myéloprolifératifs sont des facteurs de risques associés au développement de thromboses veineuses en particulier splanchniques (53) ou cérébrales (24). Cinquante pour cent (de 45% à 58% selon les études) des patients atteints de syndromes de Budd Chiari sont affectés par un NMP Ph- (53-56). Dans ces thromboses de sites peu communs, les NMP Ph- occultes ou latents sont souvent diagnostiqués par la mutation *JAK2V617F* et/ou la culture des

progéniteurs sans anomalie de l'hémogramme (24, 25, 57). Les troubles de la microcirculation de type érythromélagie sont également fréquents notamment dans les TE (58).

La physiopathologie du risque thrombotique dans ces hémopathies est multifactorielle. L'augmentation de l'hématocrite dans la PV (59), la leucocytose (60, 61), l'activation plaquettaire (58) ou leucocytaire jouent un rôle très probable dans les mécanismes prothrombotiques. Le rôle de la présence de la mutation *JAK2V617F* et de la quantité d'allèles mutés serait établi dans les TE mais reste contradictoire (49, 62).

1.2.2. Complications hémorragiques

Curieusement, une hyperplaquettose majeure entraîne plus volontiers des complications hémorragiques que thrombotiques. Les complications hémorragiques au diagnostic sont de 1.7% à 20% dans les PV, et de 3.6 % à 37% dans les TE (63). Elles surviennent spontanément ou après chirurgie. Ces manifestations hémorragiques telles que des gingivorragies, des épistaxis sont les plus souvent mineures. Les hémorragies plus sévères (gastrointestinales, cérébro-méningées...) sont également plus rares. Elles s'apparentent à une maladie de Willebrand acquise. En effet, dans les TE fortement thrombocytémiques (>1000G/l), les plaquettes activées entraînent la consommation des multimères de haut poids moléculaire du facteur de Willebrand notamment par la formation de microthrombi (64).

1.2.3. Complications hématologiques

La tendance montre qu'avec la réduction, ces 10 dernières années, du nombre de décès dus à des événements thromboemboliques et cardiaques, les complications onco-hématologiques représentent maintenant les premières causes de décès chez les patients atteints de PV et de TE (65).

Une proportion des patients atteints de PV et TE peut évoluer secondairement vers une myélofibrose. On parle alors de myélofibrose post-PV et de myélofibrose post-TE (33). Comme la myélofibrose primitive, la médiane de survie de ces myélofibroses secondaires est d'environ 5 ans (66). La mutation *JAK2V617F* est présente chez environ 50% des MF post-TE et chez la quasi totalité des MF post-PV (67). La fréquence de progression en myélofibrose augmente avec la durée du NMP. Ainsi, 10 ans après le diagnostic, des études rétrospectives sur des sujets atteints de TE ont montré une évolution en MF post-TE allant de 3 à 10% et de 15% après 15 ans (68-70). Concernant la PV, le risque augmente également avec la progression de la maladie. Il est de 2% à 15% selon les traitements prescrits et la

période de suivi (16, 71). La transformation en myélofibrose secondaire serait favorisée par le traitement des PV par saignées (72).

Une proportion des patients atteints de PV, TE et MFP évolue vers la transformation en leucémies aiguës. Les acutisations observées sont majoritairement myéloblastiques avec un pronostic sévère (médiane de survie < 6mois) (73, 74). Dans la MFP, la transformation blastique est d'environ 15 % avec un délai très variable. Chez les patients en dépendance transfusionnelle, la probabilité d'acutisation à 2 ans est de 6.9% (75). Pour la PV, elle est décrite à 15% chez le sujet jeune, 20 ans après le diagnostic (16). Leur fréquence est rapportée dans la TE de 1 à 2.5% les 10 premières années, et de 5 à 8%, 20 ans après le diagnostic (68, 69). Cependant, ces études ont inclus des patients traités par des cytoréducteurs notamment les agents alkylants dont le rôle leucémogène a été prouvé (76). De plus, un risque cumulatif de survenue de leucémie aiguë a également été démontré (77). Le rôle leucémogène de l'hydroxyurée utilisée seule est controversé (78-80). L'expérience au long court chez les patients drépanocytaires paraît sans risque leucémogène (81). Cependant, il est recommandé d'adopter un principe de précaution et de limiter la prescription d'hydroxyurée chez les patients jeunes ou ayant eu d'autre traitement potentiellement leucémogène (82). Curieusement, les leucémies aiguës secondaires aux NMP Ph- ne portent bien souvent pas la mutation *JAK2V617F* même si elles dérivent d'un NMP *JAK2V617F* positive (83).

2. Critères diagnostiques selon la classification OMS 2008

2.1. Diagnostic de polyglobulie de Vaquez

Les critères diagnostiques de l'OMS 2008 (29) sont présentés dans le Tableau 1. Le diagnostic de PV exige la présence de deux critères majeurs et d'un critère mineur ou la présence du premier critère majeur associé à deux critères mineurs. On remarque qu'aucune hiérarchie de valeur entre l'hémoglobine, l'hématocrite ou le volume globulaire isotopique n'est indiquée et que seules les formations spontanée érythroïdes font partie des critères diagnostiques de la PV. De plus, les critères de l'OMS 2008 ne tiennent pas compte des circonstances de découvertes. Lorsque le tableau initial se manifeste par exemple sous la forme d'une thrombose veineuse splanchnique ou d'une splénomégalie, l'hémogramme peut ne pas révéler de polyglobulie du fait de la présence notamment d'une hémodilution (23-25).

2.2. Diagnostic de myélofibrose primitive

Les critères diagnostiques de l’OMS 2008 (29) sont présentés dans le Tableau 2. Le diagnostic de MFP exige la présence de trois critères majeurs et de deux critères mineurs. On remarque que la myélofibrose au stade préfibrotique a été intégrée à ces critères diagnostiques (1^{er} critère majeur). Elle correspond à une phase cellulaire, identifiée par des anomalies morphologiques de la mégacaryopoïèse considérées comme spécifiques associées à une hyperplasie de la lignée granuleuse et à une diminution de l’érythroïèse. Le diagnostic de MFP ne nécessite donc plus la présence caractéristique de fibrose collagène ou même de densification de la trame réticulinique pour être évoqué. Le 2^{ème} critère majeur nécessite la réalisation de nombreux examens afin d’exclure d’autres hémopathies, notamment une ferritine, la recherche d’un transcrite de fusion bcr-abl, un myélogramme. Il est précisé que les critères mineurs peuvent être justes au-dessus de la normale, nécessitant une bonne sensibilité des analyses biologiques.

2.3. Diagnostic de thrombocytémie essentielle

Les critères diagnostiques de l’OMS 2008 (29) sont présentés dans le Tableau 3. Le diagnostic de TE exige la présence des quatre critères cités. Le diagnostic reste difficile en raison de l’absence d’anomalies moléculaires spécifiques. Ainsi, un large panel d’examens doit être effectué pour affirmer le caractère primitif et clonal de la pathologie et exclure les autres hémopathies. Il est précisé que l’existence d’une cause de thrombocytose réactionnelle n’exclut pas l’existence d’une TE associée si les trois premiers critères sont présents.

Critères majeurs

1. Hémoglobine >185g/l chez l'homme, et >165g/l chez la femme ou toute autre preuve de l'augmentation de la masse globulaire érythrocytaire*
2. Présence de *JAK2V617F* ou d'autres mutations fonctionnellement similaires (par exemple mutation de *JAK2* exon 12)

Critères mineurs

1. Biopsie médullaire montrant, en fonction de l'âge, une hyperplasie cellulaire portant sur les lignées érythrocytaire, granulocytaire, mégacaryocytaire (panmyélose)
2. Taux d'érythropoïétine sérique au-dessous des valeurs normales de référence
3. Pousse spontanée des progéniteurs érythrocytaires *in vitro*

*Hémoglobine ou hématocrite >99^{ème} percentile des valeurs spécifiques de référence en fonction de l'âge, du sexe, de l'altitude de résidence

ou Hémoglobine >170 g/l chez l'homme, 150 g/l chez la femme associée à la preuve d'une augmentation d'au moins 20 g/l par rapport aux valeurs antérieures (mais sans atteindre les valeurs seuils citées plus haut) et ne pouvant s'expliquer par la correction d'une carence martiale

ou Masse globulaire érythrocytaire >25% de la valeur normale calculée.

Tableau 1 : Critères de l'OMS pour le diagnostic de polyglobulie de Vaquez

Critères majeurs

1. Présence d'une prolifération mégacaryocytaire et d'atypies morphologiques* habituellement accompagnées par la présence de fibrose réticulinique ou collagène, Ou en l'absence de fibrose réticulinique significative, les anomalies morphologiques mégacaryocytaires doivent être accompagnées par une augmentation de la cellularité médullaire caractérisée par une prolifération granuleuse et souvent une érythropoïèse diminuée (c'est à dire phase cellulaire ou préfibrotique de la maladie)
2. Absence de critères retenus par l'OMS en faveur du diagnostic de : PV^a, LMC^b, SMD^c ou d'une autre maladie de la lignée myéloïde
3. Démonstration de la mutation *JAK2V617F* ou d'un autre marqueur de clonalité (*MPLW515L/K*)
Ou, en l'absence de marqueur de clonalité, démonstration de l'absence d'argument en faveur d'une myélofibrose secondaire à une infection, à une maladie autoimmune ou à une condition inflammatoire chronique, leucémie à tricholeucocytes ou autres néoplasmes lymphoïdes, affection néoplasique, myélopathies (toxiques) chroniques^d

Critères mineurs

1. Leuco-érythroblastose sanguine^e
2. Augmentation des taux sériques de lactate déshydrogénase (LDH)^e
3. Anémie^e
4. Splénomégalie palpable^e

* Eléments regroupés en amas denses, de taille variant de petite à grande, dont le rapport nucléo-cytoplasmique est anormal avec un aspect hyperchromatique, bulbeux ou irrégulièrement contourné des noyaux.

^a En présence d'une ferritinémie basse, l'exclusion d'une PV repose sur l'absence d'augmentation, après traitement martial, de l'hématocrite ou de l'hémoglobine au-dessus des valeurs définissant le phénotype polyglobulie. L'exclusion de la PV est basée sur les taux Hb et d'hématocrite, la mesure du volume isotopique n'est pas requise.

^b Requier l'absence de bcr-abl

^c Requier l'absence de dysérythropoïèse et de dysgranulopoïèse.

^d Les patients présentant des conditions de myélofibrose réactive ne sont pas exclus de myélofibrose primitive et le diagnostic doit être considéré si les autres critères sont remplis.

^e Le degré de ces anomalies varie entre des valeurs juste au-dessus de la normale jusqu'à des anomalies importantes.

Tableau 2 : Critères de l'OMS pour le diagnostic de myélofibrose primitive

1. Augmentation persistante du nombre de plaquettes $\geq 450 \text{G/l}^{\text{a}}$
2. Prolifération, en biopsie médullaire, prédominant sur la lignée mégacaryocytaire et faite d'une majorité d'éléments mûrs et de grande taille. Pas d'augmentation significative de la granulopoïèse neutrophile ni de l'érythropoïèse et pas d'excès d'éléments immatures dans ces deux lignées
3. Absence des critères retenus par l'OMS en faveur du diagnostic de PV^b, MFP^c, LMC^d, SMD^e ou d'une autre maladie maligne de la lignée myéloïde
4. Démonstration de la mutation *JAK2V617F* ou d'un autre marqueur de clonalité ou en l'absence de marqueur de clonalité : absence d'argument en faveur d'une thrombocytose réactionnelle ^f

^a Durant la période d'évaluation.

^b L'exclusion de la PV requiert, en présence d'une ferritinémie basse, l'absence, après traitement martial, d'augmentation de l'hématocrite ou de l'hémoglobine au-dessus des valeurs définissant le phénotype polyglobulie. L'exclusion de la PV est basée sur les taux d'hémoglobine et d'hématocrite au-dessus des valeurs définissant le phénotype polyglobulie. La mesure de la masse globulaire n'est pas nécessaire.

^c Requiert l'absence de fibrose réticulinique significative et de toute fibrose collagène ; l'absence d'érythromyélemie sanguine ; l'absence d'hypercellularité médullaire manifeste (fonction de l'âge), accompagnée d'un aspect des mégacaryocytes typique de myélofibrose primitive (éléments regroupés en amas denses, de taille variant de petite à grande, dont le rapport nucléocytoplasmique est anormal avec un aspect hyperchromatique, bulbeux ou irrégulièrement contourné des noyaux.)

^d Requiert l'absence de bcr-abl.

^e Requiert l'absence de dysérythropoïèse et de dysgranulopoïèse.

^f Les causes de thrombocytose réactionnelles incluent la présence d'une carence martiale, d'un antécédent de splénectomie, d'une intervention chirurgicale récente, d'infection, d'inflammation, de « collagénose », de cancer métastatique, de syndrome lymphoprolifératif. Cependant, si les trois premiers critères sont présents, l'existence d'une des causes précédentes de thrombocytose réactionnelle, n'exclut pas l'existence d'une TE associée.

Tableau 3 : Critères de l'OMS pour le diagnostic de thrombocytémie essentielle.

3. Les anomalies clonales et mutations dans les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif dits classiques

3.1. La cytogénétique conventionnelle

La mise en évidence d'une population clonale peut être révélée par l'étude du caryotype. A l'inverse de la leucémie myéloïde chronique, aucune anomalie chromosomique spécifique n'est associée aux NMP Ph-. Des anomalies caryotypiques récurrentes sont décelées chez approximativement un tiers à 50% des patients atteints de myélofibrose primitive (84), 11 à 33% des PV (85, 86) et 5 à 7% des TE (87). Leurs fréquences augmentent avec l'âge et l'évolution de la maladie. Les anomalies sont retrouvées quel que soit le type de NMP Ph-. Les plus fréquemment retrouvées sont des délétions (del(20q), del(13q)...), des trisomies (trisomie 8, 9, 1q...) (Tableau 4). Certaines anomalies sont également présentes dans les syndromes myélodysplasiques comme la délétion 20 q, les anomalies des chromosomes 5 et 7 et moins fréquemment la délétion 13q.

Chromosomes	Caryotype	Pourcentage		
		PV	MFP	TE
1	Trisomie 1q, translocations...	3-10*	≈3-10	<1
5	Délétion 5q, Monosomie 5...	3	1.5	<1
7	Délétion 7q, Monosomie 7...	≈1-3.6	4	<1
8	Trisomie 8 totale ou partielle...	5-27	5-8	≈1
9	Trisomie 9 totale ou partielle...	≈10	8	1-7
13	Délétion 13 q, duplications...	3-7	6-8	1-4
20	Délétion 20q...	≈10%	7-28	0.2-7
Caryotype anormal (à l'exclusion de -Y)		11-33	33-40	5-7

Tableau 4 : Principales anomalies chromosomiques communément retrouvées dans la PV, MFP, et la TE. D'après (86, 88, 89). *70-80% dans MF post-PV.

3.2. Les mutations retrouvées dans les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatifs classiques

Les mutations présentes dans les néoplasmes myéloprolifératifs sont nombreuses. Pour la plupart, elles ne sont pas spécifiques et constituent probablement des événements secondaires apparaissant de manière imprévisible. Dans cette revue de la bibliographie, nous nous sommes intéressés aux mutations retrouvées plus souvent en phase chronique (*JAK2V617F*, mutations de l'exon 12 de *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *LNK*, *EZH2*...). Les mutations souvent retrouvées dans la phase blastique telles que *NF1*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *Ikaros* (90) n'ont pas été développées dans cette étude bien que la frontière entre ces 2 groupes de mutations ne soit pas si nette (91).

3.2.1. Les mutations touchant la voie de signalisation JAK-STAT

3.2.1.1. La révolution *JAK2V617F*

La découverte en 2005 de la mutation *JAK2V617F* par plusieurs équipes indépendantes a considérablement amélioré la connaissance de la physiopathologie des néoplasmes myéloprolifératifs Ph- (92-95). La protéine JAK2 ou Janus kinase 2 est une tyrosine kinase cytosolique dont le gène est localisé en 9p24. Elle se fixe côté intracellulaire à certains récepteurs de cytokines telles que l'EPO, la TPO ou le G-CSF et a un rôle dans la transduction de leur message (96). La Figure 3 explique le rôle physiologique de la protéine JAK2 avec l'exemple du récepteur à l'EPO. Après fixation d'un ligand au niveau du récepteur, un changement de conformation de celui-ci induit la phosphorylation de la protéine JAK2. Celle-ci, devenue active, phosphoryle soit directement des protéines de signalisation (ex :STAT5...), soit indirectement par l'intermédiaire des résidus tyrosine du domaine cytosolique du récepteur, ceux-ci devenant des sites d'ancrage pour la phosphorylation en cascade d'autres protéines de signalisations (PI3K, RAS...). STAT5 phosphorylé se dimérise et est transloqué vers le noyau afin d'agir sur la transcription. JAK2 est donc un médiateur de la signalisation cellulaire des facteurs de croissance hématopoïétiques régulant la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

La mutation *JAK2V617F* est une mutation ponctuelle de l'exon 14, qui génère une modification de l'acide aminé encodé au niveau du codon 617 suite à la substitution d'une guanine en thymidine au nucléotide 1849. La valine (V) est remplacée par la phénylalanine (F) donnant le nom à la mutation *JAK2V617F* acquise par les cellules souches hématopoïétiques. Cette mutation située dans le domaine pseudo-kinase JH2, régulateur de l'activité kinase, conduit à une perte de la fonction inhibitrice (97). L'activation de JAK2 et

des voies de signalisations en aval devient constitutive et indépendante de l'EPO. Ainsi le clone affecté par la mutation se trouve doté d'un avantage de croissance et de survie tout en utilisant une voie de signalisation normale. Le résultat conduit donc à une surproduction de cellules sanguines morphologiquement normales.

Certaines données suggèrent que le taux de *JAK2* muté pourrait être à l'origine des différents phénotypes. En effet, chez 90% des PV *JAK2V617F* +, une disomie uniparentale au niveau du locus 9p24 entraîne une homozygotie pour *JAK2V617F* (Figure 2), alors qu'elle est rarement retrouvée dans la TE (98). De plus, des études ont montré que la thrombocytose et le pourcentage d'allèle muté étaient inversement proportionnels (62, 99).

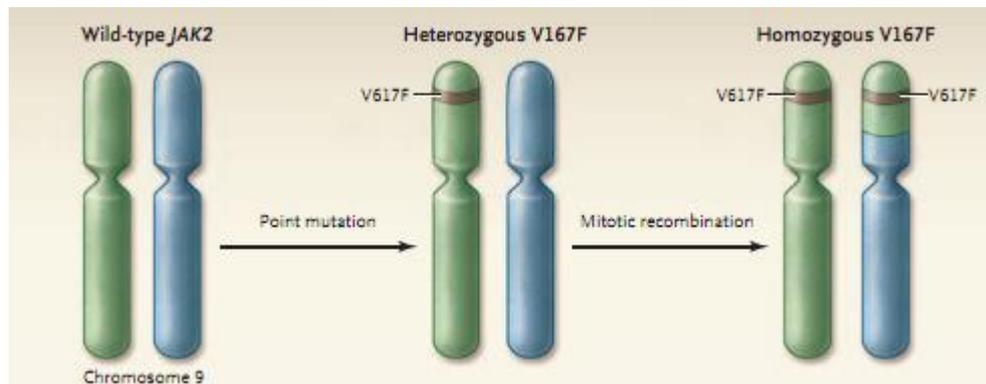


Figure 2 : Phénomène de disomie uniparentale aboutissant en 2 étapes à l'homozygotie pour la mutation *JAK2V617F* d'après (100)

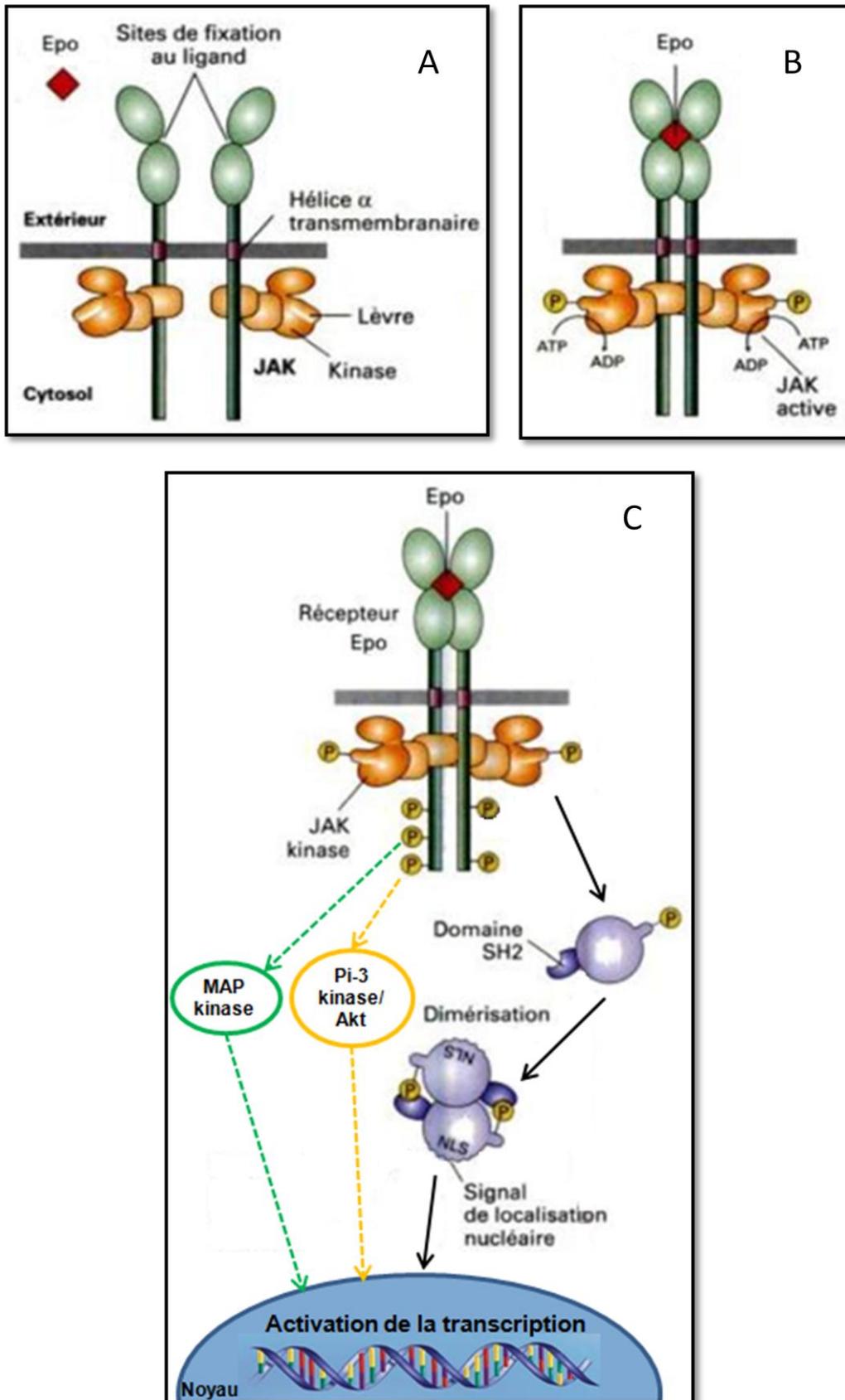


Figure 3 : Rôle physiologique de JAK2 dans la transduction du signal de l'EPO d'après (101). A : Récepteur de l'EPO sous forme inactivée B : Fixation de l'EPO, autophosphorylation de JAK2 C : Transduction du signal par les voies de signalisation JAK-STAT, MAP kinase, PI3 kinase/Akt.

La fréquence de la mutation varie considérablement selon les études dans les NMP Ph- allant de 65-97% dans les PV, 23 à 57% dans les TE, et 30-57% dans les MFP (92, 95, 102). Ces différences peuvent s'expliquer par la différence de sensibilité des techniques de dépistage de la mutation ou par des diagnostics initiaux insuffisamment documentés, ou encore un traitement de certains patients notamment par l'interféron α (103).

La proportion de *JAK2V617F* considérée par la majorité de la communauté médicale est de 95%, 50% et 50% respectivement pour la polyglobulie de Vaquez, la thrombocyémie essentielle et la myélofibrose primitive (95, 104). On note que l'OMS n'impose pas de techniques de détection de la mutation pourtant différentes quant à leur sensibilité (séquençage, ou PCR allèle spécifique...), ni de recommandations préanalytiques (*JAK2V617F* réalisé sur sang total ou sur la population granuleuse). Le séquençage moins sensible a l'avantage de pouvoir détecter d'autres mutations rares de l'exon 14 (L611V, D620E...) (105, 106).

Dans plusieurs études, la mutation *JAK2V617F* a été détectée chez 0.2% à 10% des individus *a priori* sains sans anomalie de l'hémogramme ou d'événement thrombotique. Une première étude réalisée sur 52 patients sains montrait 5 (9.6%) patients avec des faibles taux de mutation *JAK2V617F* confirmés sur 2 prélèvements et par séquençage (107). Dans une équipe danoise, la mutation a été retrouvée chez 18 sujets sains au moment du diagnostic sur les 10 507 participants (soit 0.2%). Quatre n'ont pas développé de cancers hématologiques mais tous les sujets sont décédés durant le suivi (108). Chez des patients chinois, une PCR qualitative a été positive chez 36 patients sur 3935 (0.9%) sans anomalie de l'hémogramme cependant les seuils plaquettaires acceptés n'étaient pas ceux de l'OMS et certains patients avaient présentés des manifestations thrombotiques (109). Martinaud et ses collègues (110) ont détecté par PCR quantitative chez 2.5% de volontaires sains un faible pourcentage de *JAK2V617F* muté mais inférieur au cut-off défini à 1%. Cependant, dans toutes ces études, on ne peut que regretter l'absence de dosage de la ferritine et/ou de mesure du volume globulaire isotopique afin d'écarter des éventuelles polyglobulies masquées. Ces données suggèrent cependant que, dans certains cas, la présence de la mutation peut précéder le diagnostic clinique.

La mutation *JAK2V617F* n'est pas spécifique des NMP Ph- classiques. La mutation peut être très rarement retrouvée dans les leucémies aiguës (111, 112). Elle a également été décrite dans 3 à 9% des LMMC (113, 114), dans 2% des leucémies à éosinophiles (6). Elle est présente dans 4% des mastocytoses systémiques (115), dans 11% à 20% des néoplasmes myéloprolifératifs inclassables (6, 114). Environ 5% des syndromes myélodysplasiques sont

JAK2 mutés (113, 116). L'entité provisoire décrite par l'OMS 2008, appelée anémie réfractaire avec excès de sidéroblastes en couronne et thrombocytose marquée (RARS-T) (29) est classé dans les NMP/SMD. La fréquence de la mutation *JAK2V617F* dans cette entité est d'environ 60% des cas (114, 117-119).

3.2.1.2. Les anomalies de l'exon 12 de *JAK2*

D'autres mutations activatrices de *JAK2* ont été découvertes dans l'exon 12 dans 1% à 5% des PV (120, 121). A ce jour, 37 mutations de l'exon 12 ont été décrites (Figure 4) (122-124). Ces mutations aboutissent à une activation constitutive de *JAK2* comparable à la mutation *JAK2V617F*. Contrairement à *JAK2V617F*, elles sont spécifiques de la PV et ne sont pas retrouvées dans la TE ou la MFP. Elles sont toutefois présentes dans les formes compliquées telles que LAM post-PV (125) ou MF post-PV (126). Chez certains patients, les 2 mutations *JAKV617F* et *JAK2* exon 12 peuvent coexister (127).

La majorité des patients (91%) ont un taux d'érythropoïétine bas (<5UI/ml), 8% ont un taux normal et 1% ont un taux élevé (>45UI/ml) (123). Quarante vingt trois pour cent montre une hypercellularité médullaire. Une étude histopathologique des PV exon 12 + montre une moelle hypercellulaire avec une hyperplasie érythroïde (128). Les mégacaryocytes sont dystrophiques, avec une distribution anormale de la chromatine et une lobulation nucléaire atypique (Figure 5). Ils sont rarement regroupés en clusters. Ces caractéristiques ne sont pas celles habituellement observées dans les PV, ni celles définies dans l'OMS 2008. Ainsi, ces patients porteurs d'une mutation dans l'exon 12 de *JAK2* montrent une érythrocytose isolée et sont souvent classés en érythrocytose idiopathique (EI) (129). En effet, les EI regroupent des érythrocytoses pour lesquelles aucune cause étiologique primitive ou secondaire n'est identifiée.

Le phénotype des patients porteurs de mutation de l'exon 12 montre un taux d'hémoglobine significativement plus élevé, tandis que les plaquettes et les globules blancs observés sont plus bas par rapport aux patients porteurs de la mutation *JAK2V617F*. Aucune différence significative n'a été observée concernant les complications à court ou long terme dans les 2 groupes (129).

SUBSTITUTIONS

wildtype

F533IK539L
F537IK539L
H538QK539L
H538DK539LI540S
K539L
K539LL545V
I540T
D544G
L545S
F547L
F547V

(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~HKIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~M~~I~~QMV~~F~~H~~L~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~I~~H~~L~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~Q~~LIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~D~~L~~S~~RNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~L~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~L~~IRNED~~V~~IF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~T~~RNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNE~~G~~LIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNED~~S~~IF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~~~L~~
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~~~V~~

DELETIONS

wildtype

F537-K539delinsK
F537-K539del
F537-K539delinsL
H538del
H538-K539del
H538-K539delinsF
H538-K539delinsI
H538-K539delinsL
I540-N542delinsS
I540-N542delinsK
I540-E543delinsKK
I540-E543delinsMK
I540-D544delinsMK
I540S,R541-E543delinsK
R541-E543delinsK
R541-D544del
N542-E543del
N542-D544delinsN
E543-D544del
D544-L545del

(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~HKIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~K~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~I~~RNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~L~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~K~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~I~~RNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~F~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~I~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~L~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~S~~EDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~K~~EDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~K~~DLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~M~~KDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~M~~KLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~S~~KDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~I~~KDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~I~~LIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~I~~RDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~I~~R~~N~~LIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~I~~R~~N~~LIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~~~I~~RNE~~I~~F

DUPLICATIONS

wildtype

V536-I546dup11
V536-F547dup12
V536F, F37-I546dup10
F537-F547dup11
F537-I546dup10,F547L
F547L, I540-F547dup8

(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~HKIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~V~~F~~H~~K~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~~~F~~V~~F~~H~~K~~IRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~F~~H~~KIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~~~F~~F~~H~~KIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~~~L~~F~~H~~KIRNEDLIF
(D) KSNLLVFRTNGVSDVPTSPTLQRP~~TH~~MNQMV~~F~~H~~K~~IRNED~~L~~~~I~~~~F~~~~L~~IRNEDLIF

Figure 4 : Mutations touchant l'exon 12 de JAK2 (D'après (123) del : délétion ; ins : insertion.

La technique de dépistage par HRM (High Resolution Melting) apparaît comme une technique sensible, détectant toutes les mutations, bien adaptée à un usage en routine (130). Brièvement, après amplification de l'ADN par PCR, un fluorochrome intercalant est ajouté. L'augmentation de température programmée et progressive entraîne une dénaturation de certains fragments du brin d'ADN (domaines de fusion), provoquant l'élimination du fluorochrome puis l'extinction totale de fluorescence lorsque la dénaturation est complète. A

une séquence d'ADN donnée correspond donc une courbe de fusion, représentation de la fluorescence émise en fonction de la température. Si la séquence d'ADN analysée comporte des variants, des mutations, des délétions, un profil de fusion différent permet de révéler l'anomalie. A la différence du séquençage, la technique HRM ne permet pas d'identifier le type de mutations. Cependant, aucune différence phénotypique ou pronostique n'a été observée entre les différentes mutations de l'exon 12 de *JAK2* (129).

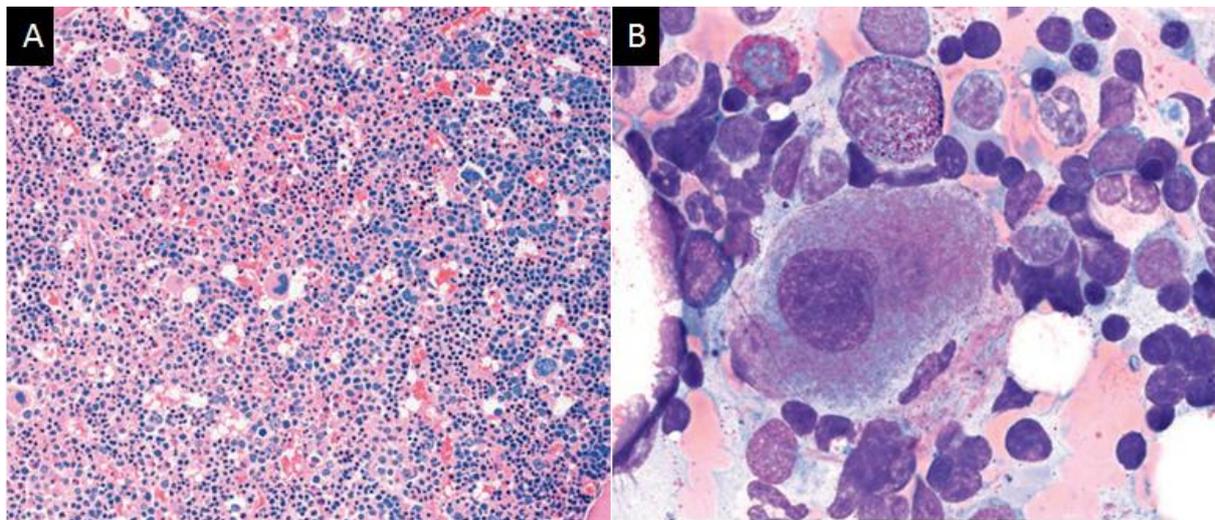


Figure 5 : Aspect caractéristique de la moelle sur la BOM de patients porteurs de mutations de l'exon 12 de *JAK2* . A : Hypercellularité de la moelle avec hyperplasie érythroïde. B : Mégacaryocytes avec lobulation nucléaire atypique d'après (128).

3.2.1.3. Les mutations de *MPL*

Le produit du gène *MPL* (*MyeloProliferative Leukemia*) correspond au récepteur de la thrombopoïétine. La protéine *JAK2* intervient également comme transducteur du signal de la thrombopoïétine suite à sa fixation sur *MPL*. La mutation germinale Baltimore *K39N* au niveau de l'exon 2 (131) retrouvée dans la population afro-américaine a participé à la découverte des mutations acquises de *MPL*. Parmi les mutations acquises de l'exon 10, on retrouve majoritairement une substitution du tryptophane (W) en position 515 par la leucine (L) ou la lysine (K) ou l'asparagine (R) ou l'alanine (A) (132, 133). La conformation cytosolique de *MPL* est modifiée et entraîne une activation spontanée du récepteur (134). La mutation *MPLS505N* est également décrite dans les thrombocytoses familiales (133) et conduit également à une activation de la voie de signalisation de la tyrosine kinase *JAK2*.

Les mutations de *MPL* touchent approximativement 10% des MFP (135) et 3% des TE (136), la plupart du temps sans association avec *JAK2V617F* (137). La mutation a également été rarement rapportée dans des cas de RARS-T (119). Les TE *MPL+* touchent

préférentiellement les femmes âgées, avec un taux plaquettaire élevé et un taux d'hémoglobine bas (138).

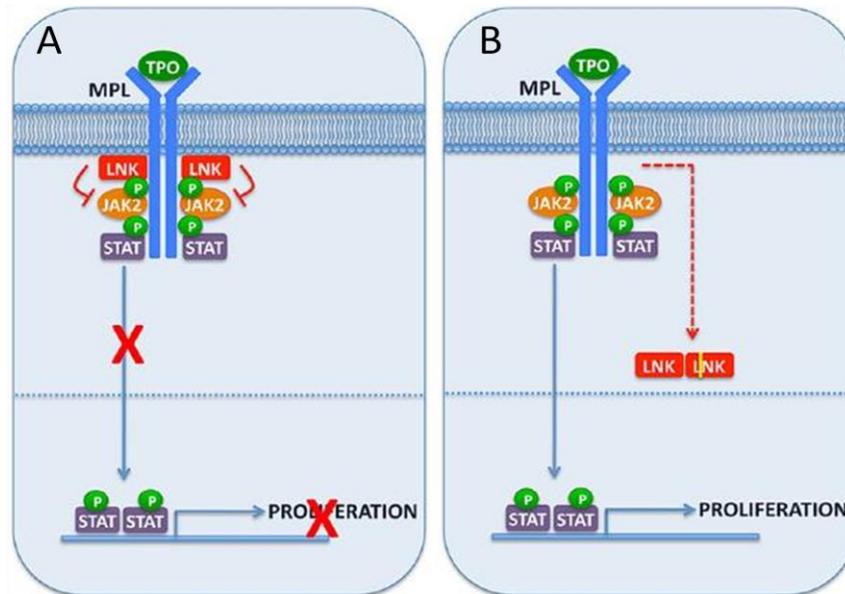


Figure 6 : Rôle de LNK dans la régulation de la signalisation JAK-STAT d'après (139) A : Rôle physiologique de LNK, inhibiteur de JAK2. B : Hypothèse du dysfonctionnement lors de mutations touchant le domaine PH de LNK à l'origine d'une anomalie de localisation.

3.2.1.4. Les mutations de *LNK*

LNK « lymphocyte specific adaptor protein » est une protéine adaptatrice dont la fonction est d'inhiber la phosphorylation de JAK2 (sauvage ou muté) après activation par les récepteurs à l'EPO ou à la TPO (140). Elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation JAK-STAT. Les mutations inhibitrices de *LNK* conduisent à une perte de fonction et entraînent une activation non régulée de la voie de signalisation JAK-STAT (Figure 6) (139, 141). Une quinzaine de mutations non sens, faux-sens ou délétions, ont été décrites à ce jour (142). La majorité des mutations identifiées touchent soit le domaine d'homologie à la plekstrine soit le domaine SH2 (Src homology 2) dont les rôles respectifs sont la localisation à la membrane cellulaire et la liaison simultanée au récepteur activé et à JAK2. Les mutations *LNK* sont rares (<10% des NMP) retrouvées dans de rares cas de PV *JAK2V617F* négatif. Cependant, une étude plus récente a montré que la région C terminale pouvait être mutée chez des patients également *JAK2V617F* positif (142). On retrouve également les mutations de *LNK* dans 3 à 6% des TE ou des myélofibroses, qu'elles soient primitives ou post-PV ou post-TE. Elles sont par contre fréquentes dans les phases blastiques (\approx 10%) des NMP (143).

3.2.2. Les mutations touchant des régulateurs potentiels de la transcription épigénétique

3.2.2.1. Les mutations de *TET2*

Le gène *Ten Eleven Translocation 2* (*TET2*) est localisé sur le chromosome 4q24. Il encode pour une méthylcytosine dioxygénase, qui oxyde le groupement méthoxyle de la 5'méthylcytosine en 5'hydroxyméthylcytosine (Figure 7). La modification en 5'hydroxyméthylcytosine entrainerait une déméthylation de l'ADN (144, 145). La protéine *TET2* agit donc dans la régulation épigénétique de la transcription des cellules souches hématopoïétiques.

TET2 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur dont l'inactivation par mutation joue un rôle oncogénique. Les mutations de *TET2* ont été trouvées dans toutes les régions codantes des pathologies myéloïdes et peuvent être des mutations non sens, faux sens ou décalantes (146). Elles sont détectées par séquençage notamment haut-débit. Les mutations touchant *TET2* ont été décrites chez des patients atteints de PV, TE ou MFP avec des fréquences respectives de 16%, 5% et 17% (147). Elles sont associées ou non à la mutation *JAK2V617F* et peuvent coexister avec *MPLW515L* (148). L'acquisition des mutations somatiques *TET2* associées à *JAK2V617F* augmenterait l'agressivité de la PV.

Comme la mutation *JAK2V617F*, les mutations *TET2* ne sont pas spécifiques des NMP Ph-. Elles ont été découvertes dans d'autres pathologies myéloïdes notamment des syndromes myélodysplasiques, des cas de LMMC, de LAM (149, 150) ainsi que d'autres NMP peu classiques comme la mastocytose systémique (151), ou les NMP inclassables. On note la fréquence de ces mutations dans 20 à 30% des LAM secondaires à un NMP (152).

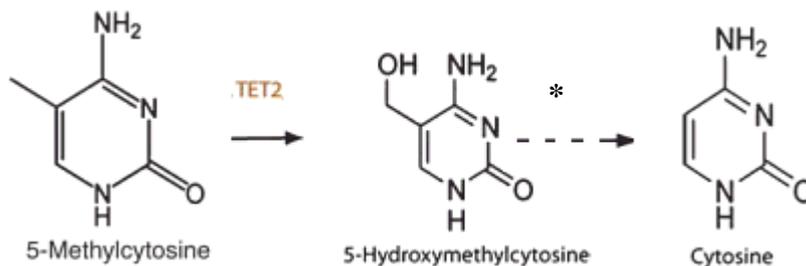


Figure 7 : Réaction enzymatique catalysée par *TET2* d'après (146) * hypothèse émise par (145)

3.2.2.2. Les mutations *EZH2*

Le gène *EZH2* est localisé en 7q36.1. La protéine EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) est une histone méthyltransférase. Dans les pathologies myéloïdes, les mutations retrouvées dans les exons 10, 18, 20 inactivent probablement l'enzyme (153). Ces mutations sont retrouvées dans approximativement 3% des PV, dans 7 à 13% des myélofibroses primitives ou secondaires à une PV ou une TE (153, 154) mais pas dans la TE (155).

4. Les scores pronostiques et la prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des NMP Ph- a pour but de diminuer le risque thrombotique sans exposer les patients à une augmentation du risque de transformation leucémique. La plupart du temps, en dehors de certains jeunes patients greffés, le traitement n'est pas curatif. Parallèlement, les facteurs de risques cardiovasculaires (hypertension, diabète, tabagisme, hypercholestérolémie, et obésité) sont recherchés et traités de manière adaptée. Les indications présentées dans cet ouvrage sont approuvées chez l'adulte par des experts internationaux (156-158). Cependant, les recommandations ne sont pas toujours basées sur des résultats d'études cliniques.

4.1. Traitement de la PV et de la TE

4.1.1. Traitement antiagrégant plaquettaire

Il est recommandé de prescrire de l'aspirine à faible dose chez tous les patients atteints de PV, quel que soit leur âge, à l'exception des éventuelles contre-indications thérapeutiques rares à cette posologie (159). En effet, l'étude collaborative ECLAP a montré une diminution significative des événements cardiovasculaires fatals ou non, sans augmentation du risque hémorragique dans la PV. Concernant la TE, bien que seules des études rétrospectives aient démontrées son efficacité et soient controversées (160), l'aspirine à faible dose est également recommandée quel que soit le risque associé (156, 158). L'hypersensibilité, les ulcères gastrointestinaux en évolution constituent des contre-indications. Pour les taux plaquettaires >1000G/l, il semble nécessaire de contrôler l'activité cofacteur de la ristocétine. Un résultat <30% contre-indique la prise d'aspirine (158). Les autres antiagrégants plaquettaires tels que le clopidogrel ont été peu étudiés dans cette indication, il est suggéré de les utiliser en cas d'intolérance à l'aspirine (156).

4.1.2. Prise en charge selon les risques

Les recommandations internationales pour la prise en charge des patients atteints de PV et de TE sont présentées dans la Figure 8 et Figure 9. Pour déterminer l'indication de cytoréducteurs, les patients sont stratifiés selon 3 groupes : faible risque, risque intermédiaire, et risque élevé. Le faible risque correspond aux patients âgés de moins de 60 ans. Le risque élevé rassemble des patients âgés de plus de 60 ans ou/et ayant des antécédents de thromboses. Le risque intermédiaire s'applique aux patients de moins de 60 ans présentant au moins un facteur de risque cardiovasculaire. Dans les PV, un traitement cytoréducteur est également considéré si les saignées sont mal tolérées ou en cas d'évolution de la pathologie (splénomégalie symptomatique, leucocytose...) (65, 82). Dans la PV ou la TE, les fortes hyperplaquettoses ne sont pas considérées, en dehors des complications hémorragiques sévères, comme critère de haut risque et ne conditionnent pas la mise en place d'un traitement cytoréducteur (58, 158). Toutefois, en pratique courante, certains cliniciens traitent les patients dont les plaquettes sont $>1500\text{G/l}$ (156).

Une thérapie cytoréductrice est recommandée chez les patients appartenant au groupe « risque élevé » (65, 156). Les patients de risque intermédiaire sont traités au cas par cas, notamment selon l'existence ou non de facteurs de risque associés (ex : diabète, hypertension...) (63, 65, 82). Un arrêt du tabac doit être fortement incité. Une abstention thérapeutique est recommandée chez les patients à faible risque thrombotique. Quels que soient les risques, la phlébotomie peut être utilisée en support thérapeutique, en urgence ou non. L'hématocrite cible n'est pas véritablement défini et est de $<55\%$ (161) ou de $<48\%$ (160) ou encore $\leq 45\%$ chez l'homme et $\leq 42\%$ chez la femme (162).

L'hydroxyurée est recommandée en première intention chez le sujet âgé (Figure 10). La molécule est plutôt bien tolérée avec une toxicité principalement cutanéomuqueuse. Agissant sur les 3 lignées, des neutropénies, des thrombopénies et des anémies macrocytaires peuvent s'observer et justifient une surveillance biologique. Son risque leucémogène est controversé et serait de 6.6% au bout d'une dizaine d'années (76, 163-166).

Par principe de précaution, l'interféron α recombinant pégylé, non leucémogène, est préférablement utilisé chez le sujet jeune et chez la femme enceinte nécessitant un traitement cytoréducteur. Il peut également être utilisé en seconde intention après un échec de l'hydroxyurée. Il inhibe la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, a un effet inhibiteur direct sur les fibroblastes médullaires et empêche l'action de facteurs de croissance (TGF- β ..) et autres cytokines probablement impliqués dans le développement de la myélofibrose (167). L'efficacité de l'interféron α pégylé a montré une rémission

hématologique ainsi qu'une réduction (voire une disparition) des taux de *JAK2V617F* mutés (168, 169). Bien que cette forme offre l'avantage d'une seule injection sous cutanée par semaine et d'une meilleure tolérance par rapport à l'interféron non pégylé (168), les effets indésirables conduisent à un arrêt du traitement chez 10% des patients (syndrome pseudo grippal, fatigue, dépression, développement ou exacerbation d'une maladie auto-immune sous jacente notamment dysthyroïdie...) (169). Malgré les recommandations internationales, l'interféron α pégylé n'a pas d'AMM en France pour les NMP Ph-. Dans les différentes études, les doses administrées varient de 90 μ g/semaine à 180 μ g/semaine selon la réponse au traitement (168, 169).

Plusieurs traitements peuvent être prescrits en deuxième intention notamment en cas d'intolérance ou de résistance à l'hydroxyurée. Des définitions de ces états ont par ailleurs été proposées par l'ELN (170, 171).

- Le pipobroman est un agent alkylant, efficace et bien toléré (Figure 10). Il constitue un traitement alternatif des NMP Ph- notamment la PV pour laquelle il possède l'AMM. Le risque leucémogène après plusieurs années de d'exposition est *a priori* non négligeable (76, 165). Comme l'hydroxyurée, sa prescription doit être limitée chez les sujets jeunes.
- En Europe, l'anagrélide (Figure 10) possède l'AMM en deuxième intention après échec ou intolérance à l'hydroxyurée dans la TE. Elle réduit le taux plaquettaire par inhibition de la maturation mégacaryocytaire (172). Chez les patients à haut risque, son efficacité semble moindre sur l'apparition d'événements vasculaires par rapport à l'hydroxyurée (173). Son activité paraît toutefois supérieure sur les thromboses veineuses. En outre, un risque plus élevé d'hémorragies sérieuses est observé dans l'étude PT1 évoquant une probable potentialisation de l'effet antiagrégant plaquettaire de l'aspirine en présence d'anagrélide. De même, plus de transformations en myélofibrose sont observées dans cette étude. Les effets indésirables touchent un tiers des patients. Il s'agit de céphalées, palpitations, rétention hydrique, diarrhées, arythmies...(174) Il est recommandé d'évaluer la fonction myocardique avant prescription notamment chez les personnes âgées et de vérifier l'absence de troubles du rythme.
- Le busulfan est un agent alkylant, parfois utilisé chez les personnes âgées en courtes cures (Figure 10). Il appartient au groupe 1 des produits carcinogènes défini par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) depuis juin 2011.

4.1.3. Cas particuliers des érythermalgies et de prurit

Les patients souffrant de complications microvasculaires type érythermalgie sont généralement traités par antiagrégant plaquettaire seul en dehors de tout autre critère de risque (175). Un traitement cytoréducteur n'est administré que dans les cas résistants.

Le prurit est une manifestation clinique qui affecte la qualité de vie de certains patients atteints de PV. Les recommandations préconisent dans un premier temps, chez les patients à faible risque, des mesures préventives (contrôle de la température de l'eau du bain...) (158). En cas de persistance des symptômes, les antihistaminiques peuvent être prescrits mais ils exercent une efficacité variable selon les patients (176). D'autres options existent telles que la paroxétine (177), habituellement utilisée comme antidépresseur, la photothérapie (178)...L'interféron α (179) ainsi que les nouveaux inhibiteurs de JAK (180) se sont également montrés efficaces.

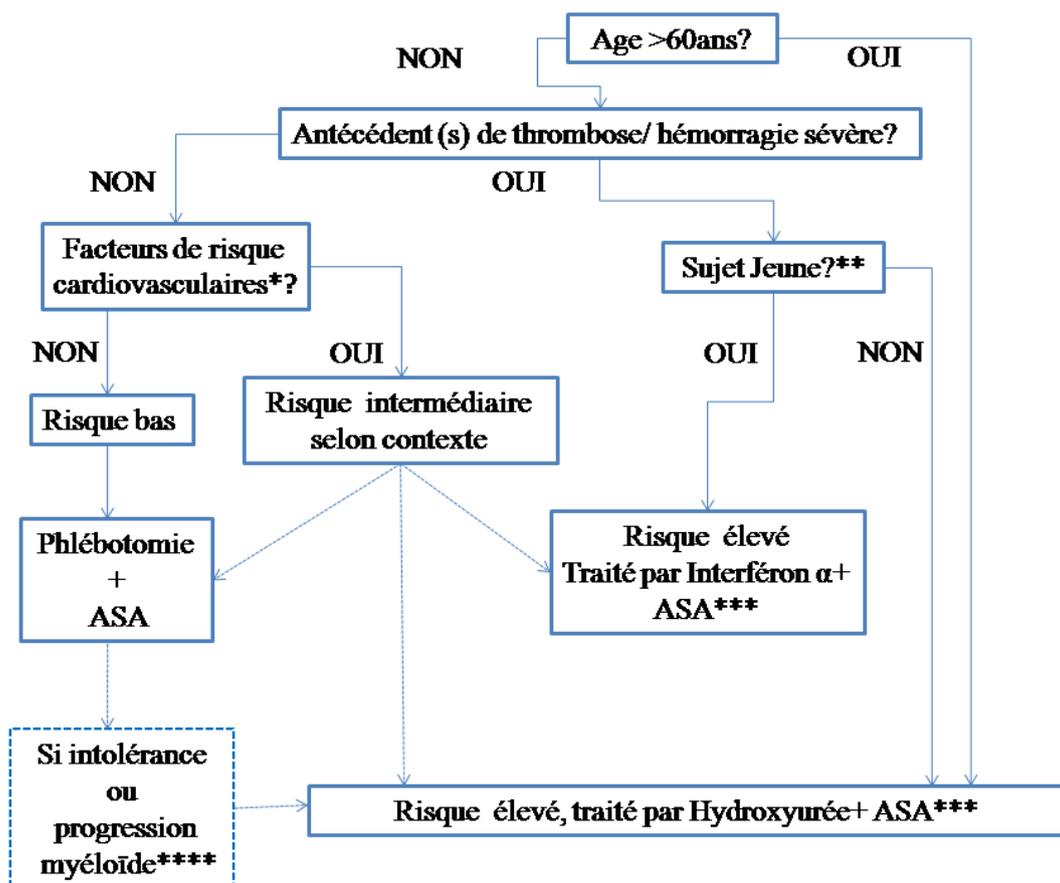


Figure 8 : Démarche thérapeutique dans la Polyglobulie de Vaquez hors grossesse. D'après (58, 158) ASA : Acide acétylsalicylique. * hypercholestérolémie, hypertension, tabagisme, diabète, obésité ** <40ans (158), 50 ans (181) ou 60 ans (182) selon les études***en première intention****progression de la splénomégalie, leucocytose, thrombocytose.

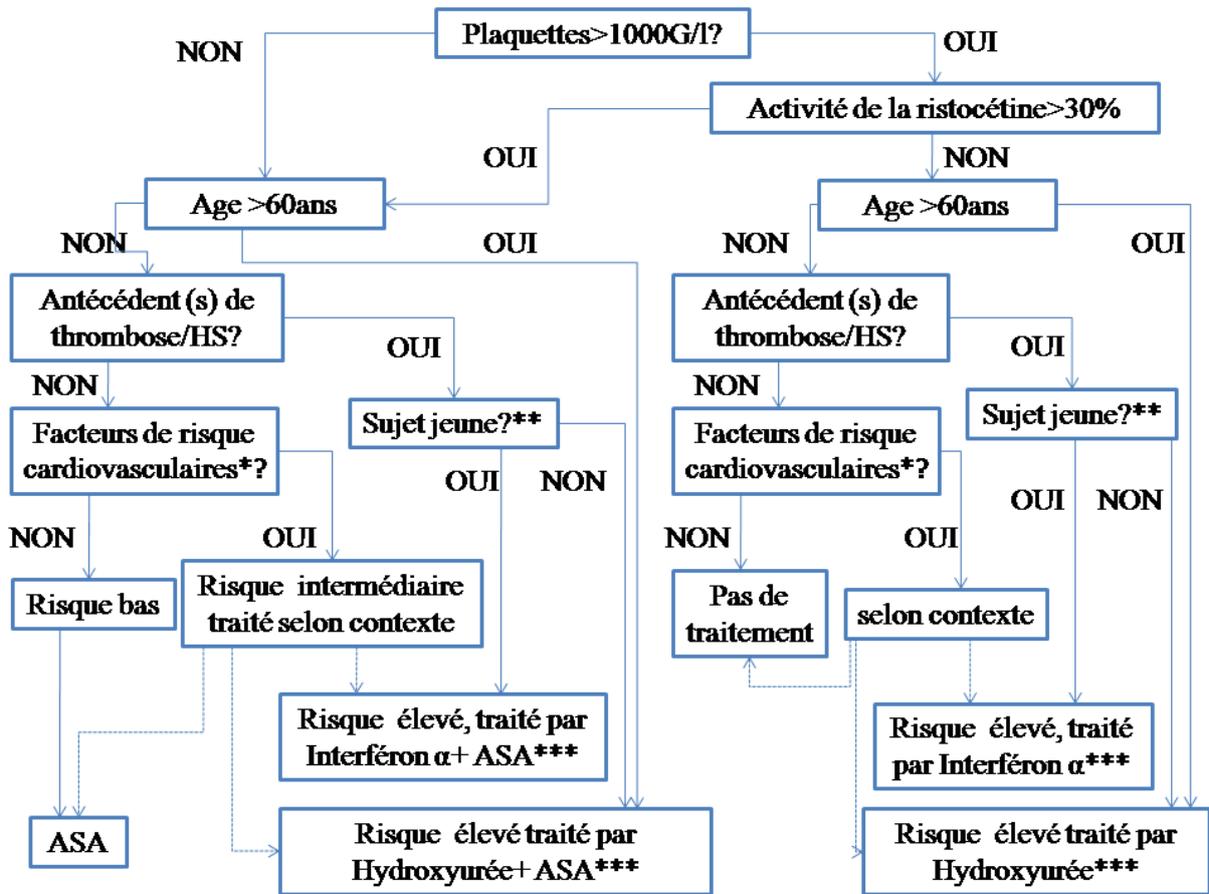


Figure 9: Démarche thérapeutique dans la Thrombocythémie Essentielle hors grossesse d'après (58, 158) ASA : Acide acétylsalicylique. HS : Hémorragie sévère * hypercholestérolémie, hypertension, tabagisme, diabète, obésité **<40ans (158); <50ans (181) ou <60 ans (182) selon les études***en première intention.

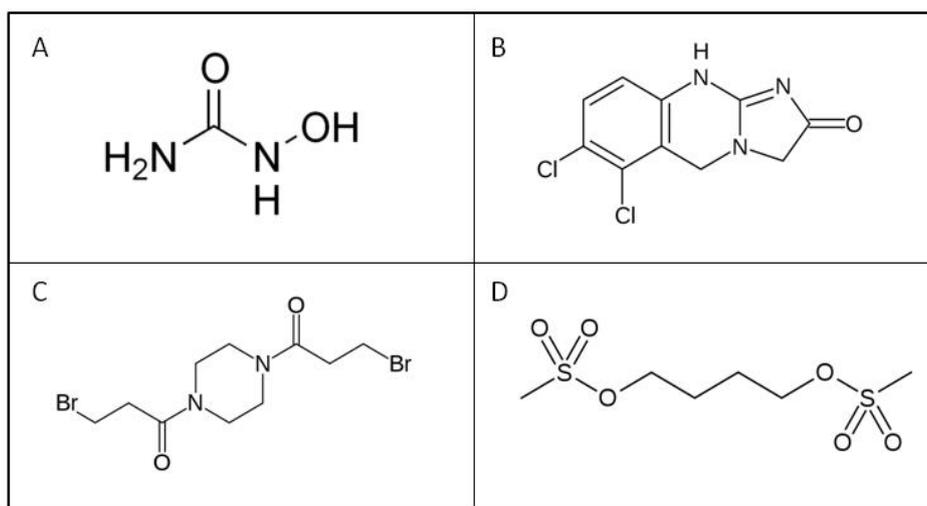


Figure 10: Formules structurales des principales molécules chimiques utilisées comme cytoréducteur dans la PV ou dans la TE. A : Hydroxyurée (Hydrea®) B : Anagrélide (Xagrid®) ; C : Pipobroman (Vercyte®) D :Busulfan (Myleran®).

4.2. Traitement de la MFP

Le traitement n'est habituellement pas curatif. La greffe est le seul traitement potentiellement curateur mais les résultats et l'âge médian des patients au diagnostic limitent les indications. La prise en charge doit être adaptée à chaque patient. Selon le risque encouru, certains sont simplement suivis sans traitement, d'autres sont traités par chimiothérapie conventionnelle, ou d'investigation (inhibiteurs de JAK2, pomalidomide...), ou sont greffés. Les patients sont donc stratifiés selon un système dynamique DIPSS-plus (Dynamic International Prognostic Scoring System-Plus) comportant 8 facteurs (Tableau 5) (183-185). D'autres scores pronostiques existent notamment le score de Lille, souvent utilisé en France. Selon le nombre de facteurs présents, le patient est classé dans l'un des 4 groupes suivants, risque bas (pas de facteurs de risque), risque intermédiaire 1 (1 facteur de risque), risque intermédiaire 2 (2 ou 3 facteurs de risque), risque élevé (≥ 4 facteurs de risque). Les moyennes de survie sont respectivement du risque bas au risque élevé de 15.4, 6.5, 2.9 et 1.3 ans (184). Des nombreuses études affinent de jour en jour la stratification des patients et ces recommandations devraient évoluer (186, 187).

Selon les risques, le traitement recommandé suit l'algorithme présenté en Figure 11. Seules les formes symptomatiques (ex : thrombocytose avec antécédents de thrombose, splénomégalie gênante...) doivent être traitées avec comme objectif l'amélioration de la qualité de vie des patients. Les formes asymptomatiques sont à surveiller. La présence d'une délétion 5q oriente vers un traitement conventionnel à base de lénalidomide avec de rares rémissions cytogénétiques décrites (188, 189).

Age > 65 ans

Hémoglobine < 100g/l

Leucocytes > 25G/l

Blastes circulants $\geq 1\%$

Symptômes suivants : perte de poids > 10% du poids par rapport à l'année précédent le diagnostic, ou fièvre inexpliquée ou sueurs nocturnes persistantes plus d'un mois

Besoins transfusionnels en concentrés érythrocytaires

Plaquettes < 100G/l

Caryotype défavorable (complexe ou au moins une anomalie suivante +8, inv(3), -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p- ou réarrangement 11q23)

Tableau 5: Facteurs pronostiques selon le DIPSS-plus d'après(184)

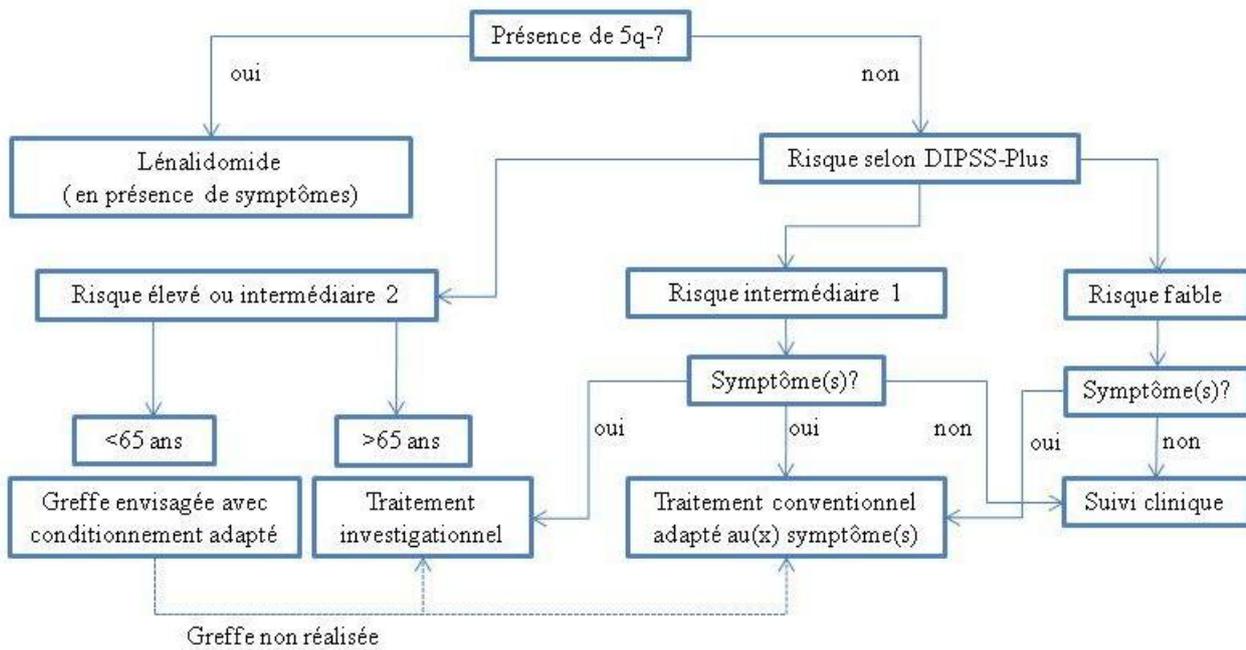


Figure 11: Algorithme de prise en charge de MFP selon (190).

4.2.1. Les traitements conventionnels

Plusieurs types de traitements peuvent être prescrits chez le patient symptomatique atteint de MFP. Cet arsenal thérapeutique permet de proposer des alternatives en cas d'inefficacité ou de contre-indications. Certains traitements vont plutôt corriger les cytopénies, d'autres vont limiter la myéloprolifération. Certaines molécules auront une action mixte.

4.2.1.1. Le traitement de l'anémie (ou des cytopénies)

Tefferi (190) recommande, en l'absence de splénomégalie associée, l'usage d'érythropoïétine recombinante en cas d'hémoglobine inférieure à 100g/l chez les patients aux besoins transfusionnels faibles voire nuls. En effet, l'EPO recombinante fonctionnerait chez 60% des patients durant la première année. Toutefois, trois critères sont prédictifs d'un résultat médiocre. Une splénomégalie avec un débord de plus de 5 cm du rebord costal semble exacerbée par l'injection d'EPO recombinante. Celle-ci est inefficace en cas d'EPO endogène >125 UI/l (191) et chez les patients ayant des besoins transfusionnels fréquents (192). Le cas échéant, plusieurs traitements sont potentiellement utilisables (corticothérapie, androgènes, thalidomide, lénalidomide...).

La corticothérapie est rapidement efficace sur les cytopénies (dans 1/3 des cas) mais s'accompagne souvent d'une cortico-dépendance nécessitant le maintien de petites doses. Elle doit être évitée notamment en cas de diabète, d'ostéoporose...

Les androgènes dont le danazol est le plus utilisé, peuvent améliorer les cytopénies (anémie dans 1/3 des cas, thrombopénie dans la moitié des cas). La toxicité du danazol notamment hépatique est réduite et réversible.

Le thalidomide est délivré sous ATU nominative en France dans la myélofibrose primitive après échec des traitements contre les cytopénies et/ou la splénomégalie. Agissant comme inhibiteur de l'angiogenèse, son efficacité a été démontrée dans environ 40% des anémies et 20% des splénomégalies (193). Puissant agent tératogène, les femmes susceptibles de procréer doivent recourir à une méthode de contraception efficace. Le thalidomide provoque le plus souvent des neuropathies périphériques survenant dans 20 à 50 % des cas chez les patients traités depuis plus de 6 mois. Le risque est augmenté chez les patients ayant une neuropathie préexistante (194). Le risque thromboembolique lié au thalidomide est potentialisé chez les patients recevant une association avec une corticothérapie. Son association avec l'EPO recombinante, décrite dans les SMD, augmenterait également l'incidence des thromboses (195). Ce risque thrombotique est également retrouvé avec le lénalidomide, dérivé du thalidomide. Une prophylaxie semble préférable chez les patients traités par ses molécules. Le lénalidomide engendre de sévères myélosuppressions ce qui restreint son utilisation (196). Au mois de mai 2011, l'AFSSAPS a publié un communiqué visant à restreindre l'utilisation du lénalidomide, suspecté de provoquer une augmentation de l'incidence des seconds cancers primitifs chez les patients l'utilisant dans le traitement du myélome multiple (197).

Lorsque l'anémie est importante ou ne répond pas à ces thérapeutiques, il est nécessaire de recourir à des transfusions sanguines phénotypées. Lorsque la splénomégalie est volumineuse, il faut tenir compte du facteur d'hémodilution dans l'appréciation du besoin transfusionnel et de l'efficacité de la transfusion (198).

4.2.1.2. Le traitement de la splénomégalie/myéloprolifération

L'hydroxyurée à doses limitées est utilisée en première intention dans les formes proliférantes. Elle réduit dans environ 50 % des cas la splénomégalie. L'anagrélide traite plus spécifiquement la thrombocytose prédominante. Le pipoproman est une alternative peu employée. Le thalidomide et le lénalidomide peuvent être prescrits dans cette indication.

La splénectomie est à envisager en cas de splénomégalie massive, symptomatique, accompagnée de cytopénies ou d'hypertension portale et après échec des traitements médicaux (199). Il s'agit d'un acte délicat permettant une amélioration des résultats (besoins transfusionnels, hypertension portale, thrombopénie...) (200, 201) mais sans réel impact sur

la survie du patient. Les complications post-opératoires sont fréquentes (30% en moyenne) et fatales dans 7% des cas (199). Elle requiert une équipe chirurgicale entraînée ainsi qu'une collaboration entre l'ensemble des médecins (chirurgiens, hématologistes...) pour gérer les complications post-opératoires souvent prévisibles (infectieuses, thrombotiques, hémorragiques...). L'intérêt de la splénectomie avant greffe reste controversé (202, 203).

4.2.2. L'allogreffe

L'allogreffe est le seul traitement potentiellement curateur. Seuls les patients relativement jeunes, sans co-morbidité importante avec une espérance de survie brève en raison de la MFP vont pouvoir être proposés à la greffe. La survie globale est d'environ 45% à 5 ans (202-204). Les complications de la greffe sont fréquentes, souvent liées à la toxicité (202). Les rechutes sont moins courantes. Les conditionnements atténués utilisant un greffon apparenté semblent réduire la mortalité (203). Mais ce fait n'est pas confirmé dans toutes les études (205). Toutefois, étant donné l'âge médian de la MFP, les conditionnements atténués semblent offrir la possibilité de greffer des sujets plus âgés. La nature du greffon ne semble pas influencer la survie (205). Le suivi quantitatif du taux de *JAK2V617F* est utilisé dans certaines études dans la prédiction de la rechute (206).

4.2.3. Les traitements récents ou investigationnels

4.2.3.1. Le pomalidomide

Cette molécule appartient à la même famille d'immunomodulateur que le thalidomide et le lénalidomide. Les études de phase 2 montrent que le pomalidomide agit sur l'anémie uniquement chez 25% des patients porteurs de la mutation *JAK2V617F* (207). Il est efficace chez 60% des patients thrombopéniques. Cependant, il n'a pas d'activité sur la réduction de la splénomégalie. Il a l'avantage d'avoir des effets indésirables bien moindres que ses analogues.

4.2.3.2. Les inhibiteurs de JAK

La prise de charge des LMC est un modèle de la réussite des traitements ciblés. Devant la fréquence de la mutation *JAK2V617F* dans les NMP Ph-, de nouveaux traitements ciblant la voie de signalisation JAK-STAT ont été développés et sont en cours d'évaluation. A ce jour, aucune molécule inhibitrice de JAK n'est capable d'induire une rémission complète ou partielle. L'activité et les effets indésirables sont différents selon les molécules qui inhibent parfois d'autres kinases telles que *FLT3*, *FGFR1*... Curieusement, la réponse aux traitements anti-JAK est indépendante du statut mutationnel *JAK2V617F* (208). Bien que de nombreuses molécules aient vu le jour, nous avons choisi de ne décrire que les effets de la molécule

INC018424 ou le Ruxolitinib. En effet, cet inhibiteur de JAK 1 et 2, est disponible sous ATU nominative en France. Les études de phase 1 et 2 réalisées chez des patients atteints de MF (MFP, MF post-PV ou TE) ont montré une réduction de plus de 50% de la taille de la rate à la palpation chez 44% des patients (208). De plus, une amélioration de la qualité de vie notamment de la fatigue, des sueurs nocturnes, du prurit et un gain de poids est observée chez la majorité des patients. Par ailleurs, 14% des patients en dépendance transfusionnelle sont devenus indépendants. Les effets indésirables potentiellement graves décrits sont principalement une myélosuppression dépendante de la dose (thrombopénies, anémies...) (190, 209). En cas d'arrêt du traitement non lié à une thrombopénie ou une neutropénie, une réduction progressive de la dose doit être envisagée du fait du risque de voir se majorer les signes généraux (sueurs nocturnes, fièvre, splénomégalie ...). Pour éviter un effet rebond des cytokines, l'utilisation des corticoïdes a été proposée lors des essais cliniques. D'autres effets indésirables d'intensité légère à modérée ont été observés (diarrhée : 5,9% ; nausées : 2,0% ; céphalées : 3,3% ; vertiges : 2,6%...). Tout comme les inhibiteurs de tyrosine kinases, des mutations pourraient rapidement diminuer l'efficacité de ces nouveaux traitements (210).

Partie 2 : Matériels et Méthodes

1. Sélection de la population

1.1. Critères d'inclusion

Les patients inclus, dans le cadre de cette étude rétrospective, proviennent de l'un des sites de l'arc alpin (CH d'Annecy, CH Chambéry, CHU Grenoble, Institut Daniel Hollard) pour lesquels au moins une analyse de culture de progéniteurs et/ou de mutation *JAK2V617F* a été réalisée(s) entre le 1^{er} janvier 2007 et le 31 décembre 2010 au laboratoire d'hématologie du CHU de Grenoble. L'inclusion s'est faite indifféremment du service prescripteur, de l'indication et/ou de l'âge du patient.

Pour les patients ayant eu une recherche de mutation *JAK2V617F* durant la période de recueil afin d'étayer un diagnostic déjà posé, les résultats de cultures de progéniteurs antérieurs à la période d'inclusion ont été intégrés.

Les résultats des statuts mutationnels en *JAK2V617F* et/ou en *JAK2* exon 12 réalisés dans d'autres laboratoires d'analyses médicales ont été intégrés aux données des patients ayant eu une culture de progéniteurs réalisée à Grenoble durant la période de recueil.

1.2. Critères d'exclusion

Par convention, les patients ayant eu plusieurs demandes de culture et/ou de *JAK2V617F* n'ont été comptabilisés qu'une seule fois. Dans les cas de répétitions de cultures de progéniteurs, seule la première analyse réalisée a été prise en compte dans l'étude statistique. Dans le cas de discordance entre les résultats de mutations *JAK2V617F* réalisés en double, le résultat positif a été retenu pour l'étude et également par les cliniciens.

Les recherches de mutation *JAK2V617F* prescrites en suivi chez des patients en post-greffe de moelle osseuse ont été exclues. Seuls les résultats de bilans en pré-greffe de ces patients ont été pris en compte.

1.3. Méthodes de recueil et données recueillies

Le recueil des données biologiques et cliniques a été fait à partir des données du logiciel d'informations Cristal-net pour les patients du CHU Grenoble et de l'institut Daniel Hollard. Pour les patients d'Annecy et de Chambéry, les données ont été récupérées sur site dans les dossiers médicaux « papiers » ainsi qu'à l'aide du logiciel Orbis pour le CH d'Annecy. Des précisions ont été parfois demandées au médecin prescripteur et/ou référant du site. Les données ont été collectées jusqu'au 10 Aout 2011. Les informations suivantes ont été récupérées : le diagnostic final retenu par le médecin, l'application des critères OMS, le dernier traitement suivi pour le NMP, la présence de complications. Les complications prises en compte ont été les suivantes : accident vasculaire thrombotique ou hémorragique, transformation en leucémie aiguë... Ces données ont été intégrées même en l'absence de liens réels de causalité.

Sur l'ensemble des 936 patients analysés, l'absence de diagnostic final porte sur un total de 54 patients (5,7%). Le diagnostic du médecin n'a pas été recueilli pour 32 patients dont 3 ayant bénéficié à la fois d'une recherche de la mutation *JAK2V617F* et d'une culture de progéniteurs et pour trois autres patients malgré la mise en évidence d'une mutation *JAK2V617F*. Vingt deux patients ne sont plus suivis dans l'arc alpin, dont 14 ayant eu des prescriptions à la fois de statut mutationnel en *JAK2V617F* et de cultures de progéniteurs.

1.4. Classification OMS

Nous avons pris comme référence la classification de l'OMS révisée en 2008 pour les comparaisons diagnostiques. En particulier, le critère majeur de polyglobulie a été considéré comme respectant les critères de l'OMS 2008 si l'hémoglobine était supérieure aux valeurs seuils imposées par cette classification en fonction du sexe ou si la masse globulaire

érythrocytaire étaient supérieure à 25% de la valeur normale calculée. L'hématocrite et/ou l'hémoglobine supérieurs au 99^{ème} percentile de la valeur de référence sont des critères qui n'ont pas été pris en compte devant la difficulté pour définir la valeur cible pour chaque laboratoire où un hémogramme a été effectué.

La présence de cultures érythrocytaires et/ ou mégacaryocytaires endogènes a été considérée comme critère mineur de la classification des PV de l'OMS 2008. L'érythropoïétine a été interprétée en fonction des valeurs normales fournies par le laboratoire exécutant.

Concernant la thrombocytémie et la myélofibrose primitive, la positivité de *JAK2V617F* a été considérée comme diagnostic d'exclusion de LMC. En effet, bien que la concomitance du chromosome Philadelphie et de la mutation *JAK2V617F* existe (211-214), le laboratoire de biologie moléculaire et parfois la cytogénétique oncogénétique, dans un souci de restriction des prescriptions, ne réalisent pas en pratique courante la recherche de bcr-abl et/ou de chromosome Philadelphie chez des patients positifs en *JAK2V617F*. De plus, la réalisation d'un caryotype et/ou une recherche du transcrite bcr-abl ont été indépendamment considérées comme permettant d'écarter une LMC.

Le myélogramme a été considéré comme nécessaire à l'exclusion d'un syndrome myélodysplasique et la biopsie ostéomédullaire à l'exclusion de la myélofibrose primitive. Les taux sériques de lactate déshydrogénase ont été interprétés en fonction des valeurs normales fournies par les laboratoires exécutants.

Une augmentation du volume splénique à l'échographie a été considérée comme critère mineur dans le myélofibrose primitive chez les sujets où la détection d'une splénomégalie à la palpation était délicate.

1.5. Caractérisation de la population globale

Sur les quatre années de recueil, 984 demandes de cultures de progéniteurs hématopoïétiques et/ou de mutations *JAK2V617F* ont été prescrites par les sites d'Annecy, Chambéry, Grenoble et de l'Institut Daniel Hollard. Trente trois analyses en doublon, en triple, voire en quadruple ont été écartées conformément aux critères d'exclusions. Seule la première analyse a été comptabilisée. De plus, quinze analyses de *JAK2V617F* prescrites dans le cadre d'un suivi de greffe de moelle osseuse n'ont pas été retenues. Cinquante quatre patients ont été perdus de vue ou le diagnostic final n'a pu être recueilli.

Notre étude a donc inclus un total de 882 patients entre 2007 et 2010 ayant bénéficié d'une exploration biologique pour suspicion de néoplasme myéloprolifératif par la recherche de la mutation *JAK2V617F* et/ou l'étude de la pousse spontanée de progéniteurs hématopoïétiques.

L'âge moyen de ces patients, quelle que soit l'indication, est de 60,07 ans avec un écart-type de 16,63 ans. Les hommes représentaient 57.82% (510/882) de la population globale. 592 patients ont eu à la fois une prescription de mutation *JAK2V617F* ainsi qu'une culture spontanée de progéniteurs sur moelle et/ou sang (Tableau 6).

	Analyse JAK2 prescrite	Analyse JAK2 non prescrite et/ non réalisée	Total
Cultures des progéniteurs réalisées	592	9	601
Cultures des progéniteurs non prescrites et/ou non réalisées	281	0	281
Total	873	9	882

Tableau 6: Caractéristiques des patients étudiés

2. Techniques utilisées

2.1. Culture spontanée de progéniteurs hématopoïétiques

2.1.1. Principe général

La culture de progéniteurs hématopoïétiques est réalisée dans l'unité fonctionnelle d'hématologie cellulaire du CHU de Grenoble sur des prélèvements médullaires et/ou sanguins frais. Le principe est de mettre en évidence une formation en l'absence de facteur de croissance hématopoïétique de progéniteurs érythroïdes (CFU-E) et/ou mégacaryocytaires (CFU-Meg). Cette formation spontanée de colonies est également appelée colonies érythroïdes ou mégacaryocytaires endogènes. Elle est le témoin de la présence de clones capables de proliférer de façon indépendante de toute stimulation (prolifération autonome) qui caractérise les syndromes ou néoplasmes myéloprolifératifs. Cette pousse spontanée est définie par rapport à une pousse en présence de facteur de croissance qui représente le contrôle interne de qualité de la culture. Ces analyses nécessitent un personnel qualifié et doivent être mises en culture dans un délai de 24 h maximum.

2.1.2. Préparation de l'échantillon sanguin

La première étape de la technique consiste à séparer les cellules mononuclées (CMN). Ainsi, le prélèvement sanguin (20 à 30 ml de sang prélevé sur tube citraté de sodium) est dilué en PBS, centrifugé afin d'éliminer les plaquettes. Par la suite, les cellules du culot sanguin dilué en PBS sont séparées en gradient de Ficoll (Lymphoprep, Life technologies, Courtaboeuf, France). L'anneau cellulaire à l'interface entre le plasma et le Ficoll contenant les cellules mononuclées est récupéré et lavé 3 fois en PBS. Un comptage cellulaire et une estimation de

la viabilité cellulaire sont réalisés en hématimètre (Fast Read, Immune systems Ltd, Angleterre) sous microscope à fluorescence après dilution en bromure d'éthidium (BET) - Acridine orange. La concentration de la suspension cellulaire est ajustée, par ajout de milieu d'Iscove (Life technologies, Courtaboeuf, France), afin d'obtenir une concentration finale de 2 000 000 CMN/ml pour les CFU-E et les CFU-Meg et à 1 000 000 CMN/ml pour les BFU-E (Figure 12).

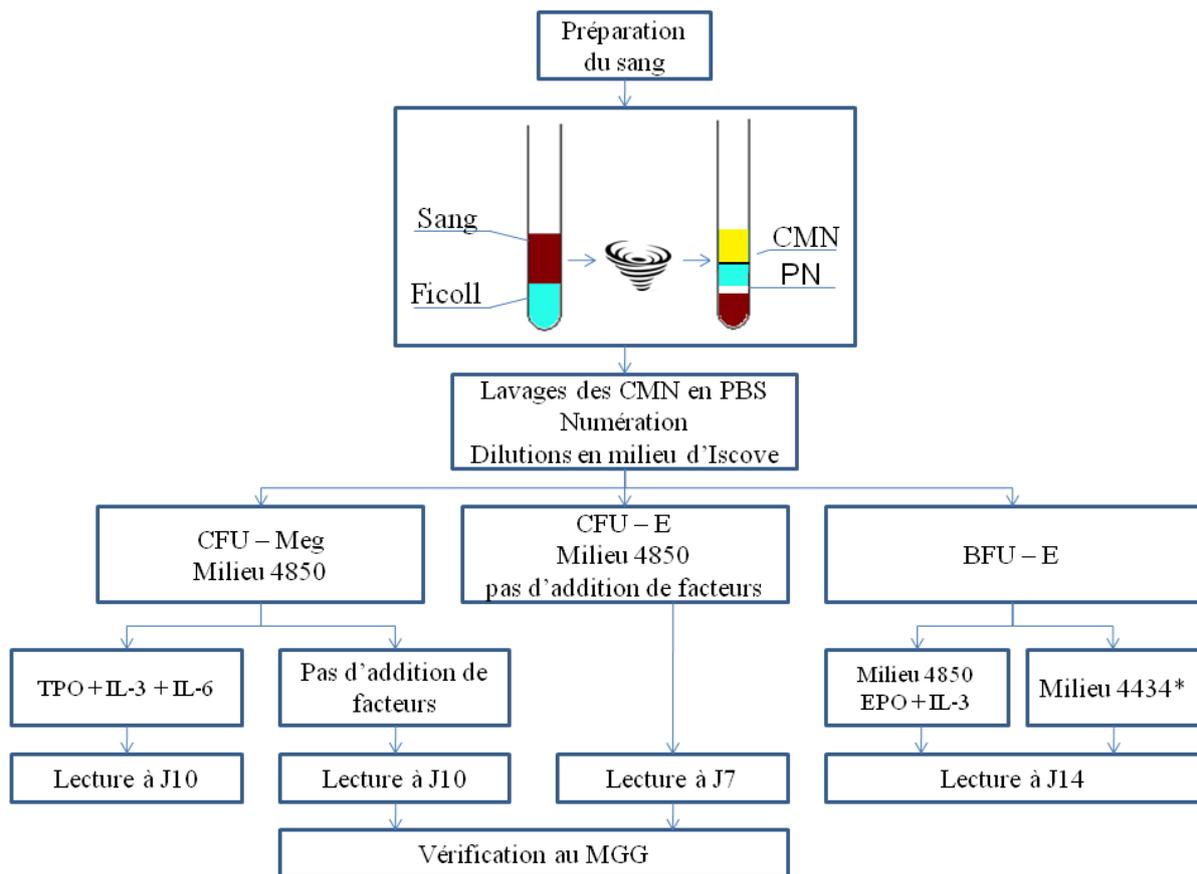


Figure 12 : Gestion d'un prélèvement sanguin pour la mise en culture de progéniteurs hématopoïétiques. CMN : Cellule MonoNucléée. PN : PolyNucléaire. CFU : Colony Forming Unit. BFU : Burst Forming Unit. Meg : Mégacaryocyte. E : Erythroïde. GM : Granuleux Macrophages. TPO : ThromboPOïétine. EPO : ErythroPOïétine. IL : InterLeukine. MGG : May Grünewald Giemsa. *Lecture simultanée des CFU-GM et BFU-E.

2.1.3. Préparation de la moelle osseuse

Pour les prélèvements de moelle osseuse (1 à 5 ml de moelle prélevée sur tube hépariné), une extraction des cellules totales (Buffy coat) précède la séparation des cellules mononuclées (Figure 13). Les cellules du Buffy coat sont numérees et ajustées à différentes concentrations selon le type de culture cellulaire (respectivement 1 000 000 /ml pour les CFU-Meg non spontanées, 250 000 et 500 000/ml pour les CFU-GM). Le même traitement de l'échantillon

est également réalisé par Ficoll mais 4 dilutions en milieu d'Iscove sont réalisées afin d'obtenir des concentrations finales de 125 000, 250 000, 500 000, et 1 000 000 CMN/ml pour les différents types cellulaires et milieux cultivés.

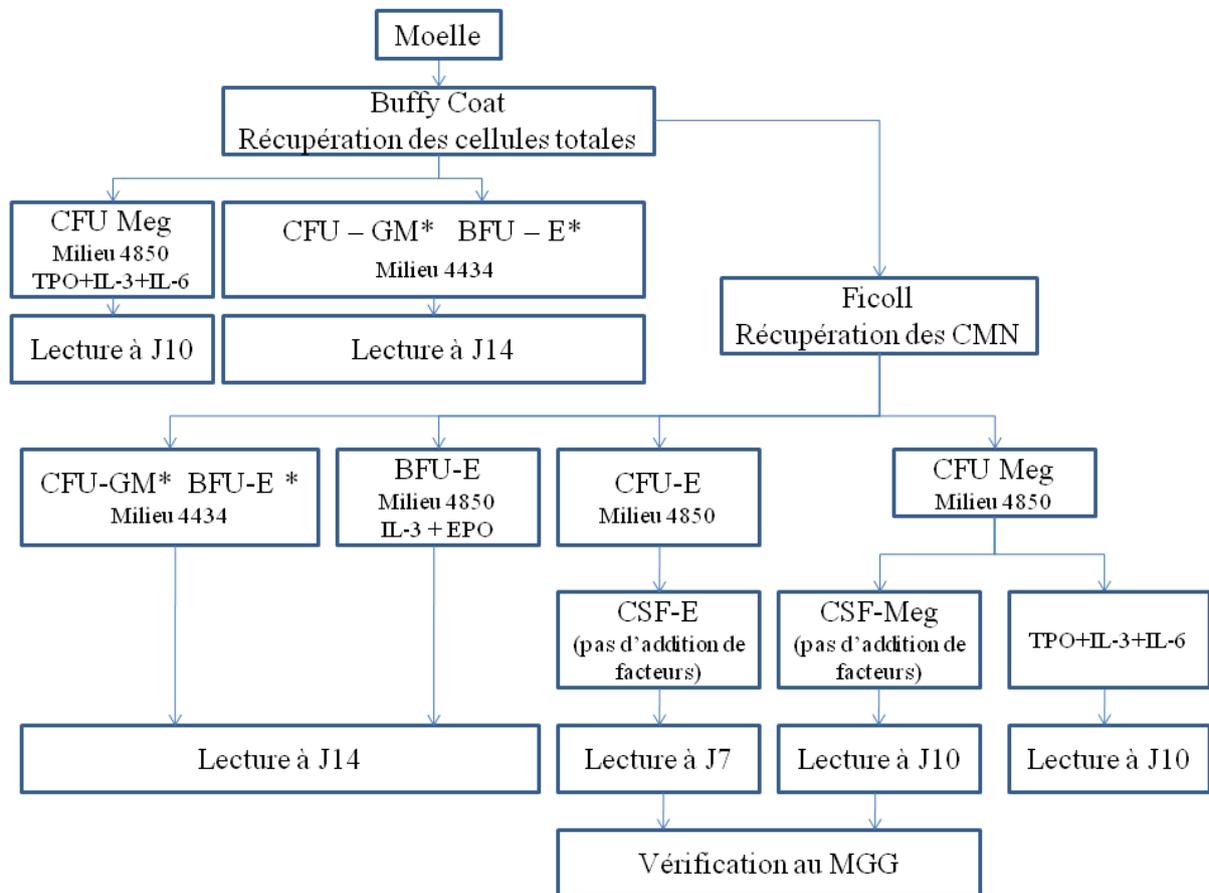


Figure 13 : Gestion d'un prélèvement de moelle pour une mise en culture de progéniteurs hématopoïétiques. *plusieurs concentrations sont mises en culture. CSF-E : Formation spontanée de colonies érythrocytaires. CSF-Meg : Formation spontanée de colonies mégacaryocytaires.

2.1.4. Mises en culture

La culture de progéniteurs est réalisée dans un milieu semi-solide, constitué de collagène (phase solide de la culture) et de milieu de croissance (phase liquide). La composition de ce milieu de croissance va définir les conditions de culture.

Pour les prélèvements de moelle, le Buffy coat (cellules totales) et les CMN sont mis en culture pour le contrôle de la pousse des BFU-E et CFU-GM, utilisant un milieu commercial enrichi en sérum et facteurs de croissance (MegaCult référence 4434, StemCell Technologies, Grenoble, France).

Pour les recherches de pousses spontanées de CFU-E et de CFU-Meg, les cellules sont mises en culture dans un milieu ne contenant pas de cytokine selon la technique de référence publiée (215, 216). Celui-ci est préparé extemporanément à partir d'un milieu commercialisé

(MegaCult référence 4850, StemCell Technologies, Grenoble, France) et une solution de collagène (StemCell Technologies, Grenoble, France). Chaque culture est réalisée en triplicat dans une boîte de 4 puits (Nunc, Roskilde, Danemark).

En parallèle, le même milieu, supplémenté en facteurs de croissance, est utilisé comme témoin de pousse des cellules mononucléées en présence de cytokines. De l'IL6, de la TPO et de l'IL3 sont ajoutées pour les cultures de contrôle des CFU-Meg, de l'IL3 et de l'EPO pour les cultures de contrôle des BFU-E. Les boîtes de cultures sont toutes incubées à l'étuve à 37°C en atmosphère humide et sous 5% de CO₂.

Cette technique est couramment utilisée depuis mars 2002 pour les BFU-E et les CFU-E et depuis avril 2003 pour les CFU-Meg. Auparavant, le laboratoire réalisait lui-même son milieu sans sérum en condition stérile à partir d'Iscove, de lipides, d'insuline, de glutamine, de transferrine, de chlorure de calcium, de pyruvate de sodium, de sérum de veau fœtal, et de β-mercaptoéthanol. L'utilisation d'un milieu commercial a permis de standardiser la technique de culture avec ou sans cytokine, améliorant la reproductibilité inter et intra laboratoires (217, 218).

2.1.5. Lectures des boîtes

La lecture des boîtes consiste après une période d'incubation déterminée à compter au microscope inversé les colonies hématopoïétiques.

Une colonie mégacaryocytaire (CFU-Meg) doit contenir au moins 3 mégacaryocytes selon les recommandations du fabricant et selon les données de la littérature (219) (Figure 14 A et B). Une colonie érythroïde, souvent reconnaissable à sa couleur rouge liée à la présence d'hémoglobine, est considérée comme BFU-E si elle compte plus de 200 érythroblastes (220). Une colonie érythroïde (CFU-E) se présente sous forme d'un amas unique, contenant 8 érythroblastes minimum et 200 érythroblastes maximum (218) (Figure 14 C et D). Les CFU-E spontanées peuvent parfois être faiblement hémoglobinisées rendant leur reconnaissance plus délicate (221).

La coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) permet une confirmation du résultat pour les pousses spontanées. Le disque de collagène est étalé et séché sur une lame de verre qui sera colorée au MGG. Cette coloration permet un examen scrupuleux des lames au microscope à immersion afin de détecter d'éventuelles colonies non vues au microscope inversé mais également vérifier l'aspect des CFU-E et CFU-Meg vu à l'état frais.

La lecture à l'état frais et le comptage s'effectuent respectivement au 7^{ème} jour pour les CFU-E, au 10^{ème} jour pour les CFU-Meg et au 14^{ème} jour pour les BFU-E et les CFU-GM après

l'incubation. Une moyenne du nombre de colonies des 3 puits est calculée et rapportée à 200000 cellules.

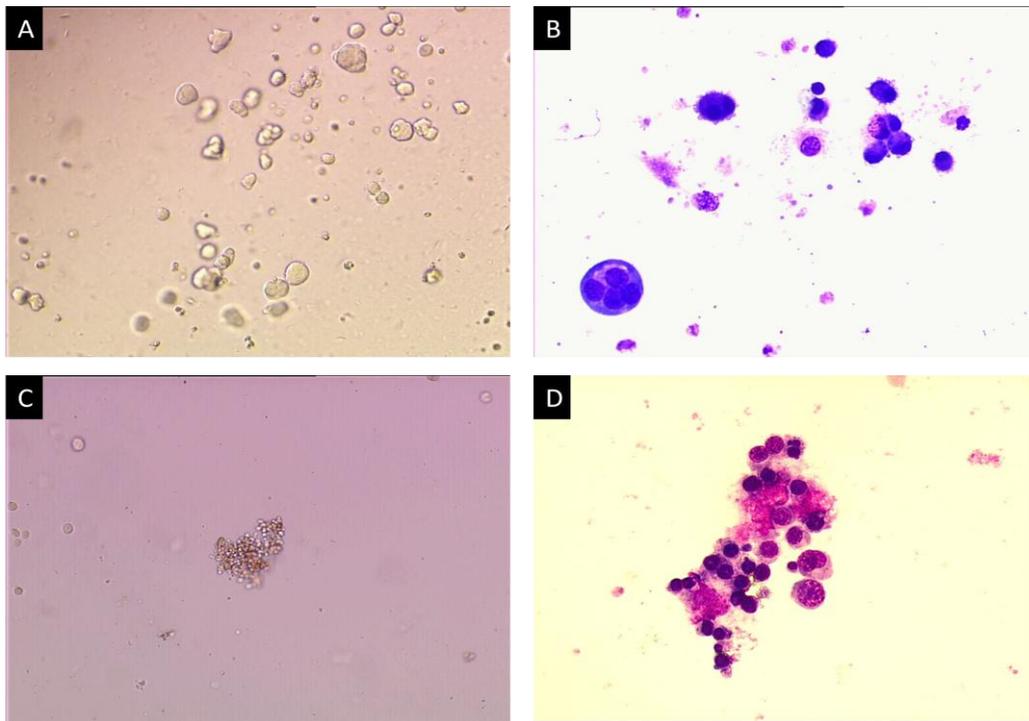


Figure 14 : Aspect microscopique des CFU-E et CFU-Meg. A : CFU-Meg à l'état frais, visible au microscope inversé objectif x40. B : CFU-Meg coloré au MGG, objectif x1000. C : CFU-E à l'état frais, visible au microscope inversé objectif x10. D : CFU-E coloré au MGG, objectif x1000.

2.2. Détection de clones mutés

2.2.1. Recherche de la mutation *JAK2V617F*

Le principe de la technique utilisée au laboratoire est une PCR qualitative de type ARMS, adaptée de la publication suivante (6). La détection de *JAK2V617F* se fait le plus souvent sur l'ADN génomique des polynucléaires neutrophiles du sang périphérique par amplification des fragments et révélation du matériel génétique. Le plus souvent, 30 ml de sang prélevé sur tube citraté sont nécessaires.

2.2.1.1. Rappel sur le principe de PCR de type Amplification Refractory Mutation System (ARMS) appliquée à la recherche de *JAK2V617F*

Cette technique de PCR, adaptée de (96), est utilisée pour identifier les mutations ponctuelles. Elle utilise 4 types d'amorces : une paire d'amorces extérieures, une amorce sens spécifique de l'allèle sauvage, une amorce anti-sens spécifique de l'allèle muté connaissant dans notre cas la mutation *JAK2G1849T* (Figure 15).

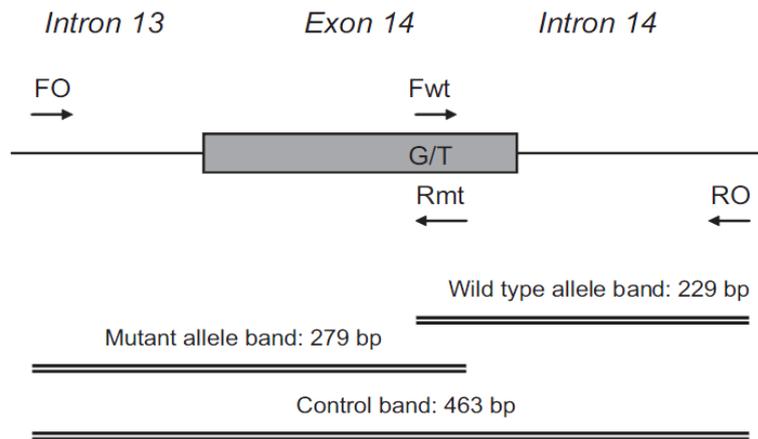


Figure 15 : Principe de la PCR ARMS selon (222). FO Amorce extérieure sens. RO Amorce extérieure anti-sens. Fwt Allèle sauvage sens. Rmt Allèle mutée anti-sens.

En cas de mutation *JAK2V617F* homozygote, les amorces extérieures et l'amorce anti-sens mutée se fixeront sur l'ADN. Cependant, l'amorce spécifique de l'allèle sauvage s'hybridera mal à l'extrémité 3', empêchant ainsi l'action de la Taq polymérase. L'amplification produira 2 types de fragments, l'un de 279 kB et le second de 463 kB correspondant aux amorces extérieures. A l'inverse, en cas d'absence de mutation *JAK2V617F*, le mésappariement entre la base à l'extrémité en 3'et l'amorce anti-sens muté gênera l'amplification. Seules les amorces extérieures et l'amorce sens sauvage se fixeront et seront répliquées. Deux types de fragments seront créés, l'un de 463 kB, l'autre correspondant à l'allèle sauvage de 229 kB. Lorsque seule une partie des cellules présente la mutation, on obtient les 3 bandes d'amplification (463, 279, 229). Les fragments sont séparés en fonction de leur taille différenciant ainsi les différents profils (Figure 16).

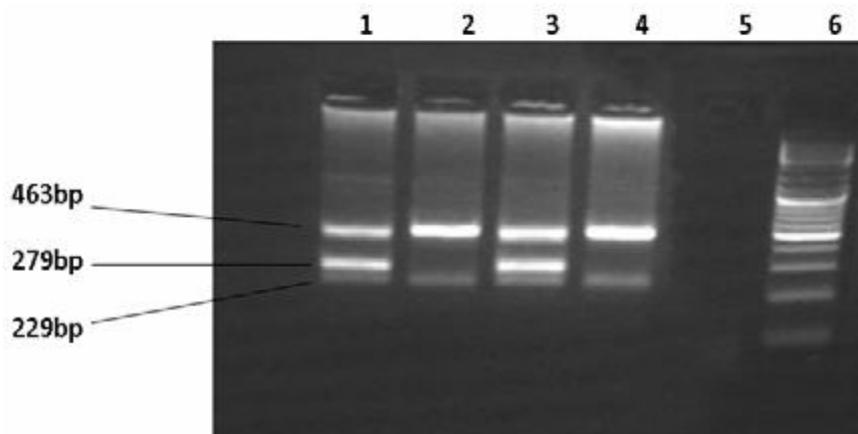


Figure 16 : Fragments d'ADN génomique sur gel d'agarose. 1 et 3 : Présence de la mutation *JAK2V617F*. 2 et 4 : Absence de mutation. 5 : Contrôle négatif de PCR. 6 : Marqueur de poids moléculaire.

2.2.1.2.Extraction de l'ADN des polynucléaires

Brièvement, après élimination du plasma et déplaquettation, une séparation en gradient de Ficoll (Lymphoprep, Life technologies, Courtaboeuf, France) permet la récupération des polynucléaires à la surface des globules rouges. Une lyse des globules rouges résiduels est effectuée par l'ajout de NH₄Cl (StemCell Technologies, Grenoble, France). Les polynucléaires extraits sont ensuite lavés et repris par du PBS puis numérés en BET- Acridine orange. Un culot sec correspondant à 2 millions de polynucléaires est conservé à -80°C. L'ADN génomique est ensuite extrait à l'aide du kit QIAamp DNA (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. La qualité et la quantité de l'ADN isolé sont déterminées par dosage sur nanodrop et sur gel d'agarose 0.8%.

2.2.1.3.Amplification par PCR et révélation des fragments d'ADN

Le mix réactionnel est reconstitué à partir de tampon, de chlorure de magnésium, d'un mélange de désoxyribonucléotides et de la Taq Gold polymérase (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). L'amplification de l'ADN s'effectue durant 40 cycles selon le protocole suivant (94°C, 30s ; 58°C, 45s ; 72°C, 45s) avec le thermocycleur (Biometra, Goettingen, Allemagne). Les séquences des amorces sont présentées dans la Tableau 7. La lignée érythroleucémique HEL est utilisée comme contrôle positif de la présence de la mutation *JAK2V617F*. L'ADN de la lignée U937 sert de témoin d'absence de mutation. Un mixte contenant 0.5% d'ADN de HEL dans de l'ADN de U937 permet de définir un seuil de sensibilité de la technique estimé à 0.5%. Un blanc constitué d'eau atteste de l'absence de contamination croisée. La phase d'amplification est réalisée en doublon pour chaque patient. De plus, une PCR ciblant le gène de l'albumine est réalisée pour vérifier l'absence d'inhibiteurs.

Amorces		Séquences
Amorces extérieures	Sens	5'-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG-3'
	Anti-sens	5'-ATTGCTTTCCTTTTTTCAACAAGAT-3'
Allèle sauvage	Sens	5'GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATATG3'
Allèle mute	Anti-sens	5'-GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA-3'.
Albumine	Sens	5'TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT3'
	Anti-sens	5'CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT3'

Tableau 7: Liste des amorces utilisées pour la détection de *JAK2V617F*.

La séparation de fragments d'ADN s'effectue par électrophorèse en gel d'agarose à 3% (fabrication maison) en tampon Tris/Acétate/EDTA (TAE) 1X. Après 45 minutes de

migration à 90V, le gel est révélé dans un bain contenant du BET durant 15 minutes puis est photographié sous ultraviolets.

2.2.2. Recherche de mutations de *MPL*

La recherche de mutations de *MPL* est réalisée par analyse haute résolution des courbes de fusion (HRM) au CHU de Nîmes. L'ADN de 44 patients atteints de TE, MFP ou thrombose associée à thrombocytose ne portant pas la mutation *JAK2V617F* mais présentant une formation spontanée mégacaryocytaire a été envoyé pour étayer le diagnostic.

3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été calculées à l'aide du logiciel Statview, du logiciel Excel et du site internet (223). Le test de Mac Nemar a été utilisé pour comparer les séries appariées et le test du χ^2 pour les séries indépendantes. Le test de student a été nécessaire pour comparer les valeurs quantitatives gaussiennes (âge...). Le risque α a été fixé à 5%.

Partie 3 : Résultats

1. Différents profils de prescriptions de la mutation *JAK2V617F* et/ou de cultures de progéniteurs

Dans notre étude, les indications de prescription recensées à partir des données spécifiées sur le bon de prescription des 882 mutations de *JAK2V617F* et/ou cultures de progéniteurs analysées peuvent être classées schématiquement selon 3 groupes : manifestation(s) clinique(s) évocatrices d'un NMP, anomalie(s) de l'hémogramme, caractérisation d'une hémopathie connue hors NMP (Figure 17).

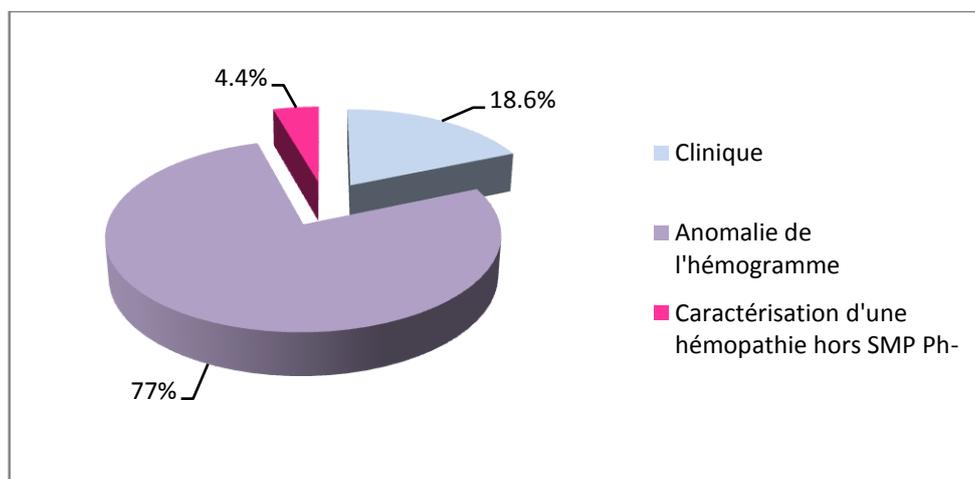


Figure 17: Indications des prescriptions de la mutation *JAK2V617F* et/ou de culture de progéniteurs.

Les manifestations cliniques, points de départ de l'exploration biologique, sont variées. Elles regroupent des signes typiques des NMP Ph- tels que l'asthénie, l'érythrealgie ou le prurit, mais également des manifestations évoquant une complication vasculaire thrombotique (thromboses veineuses profondes, embolie pulmonaire, infarctus splénique, ischémie colique, ischémie digitale, syndrome de Budd Chiari, priapisme, accident ischémique transitoire ou accident vasculaire cérébral...) ou hémorragique (explorations étiologiques d'hématome profond...), ou une splénomégalie isolée. Ces manifestations cliniques à l'origine de la prescription peuvent parfois être associées à des anomalies de l'hémogramme.

La majorité des investigations prescrites proviennent d'anomalies de l'hémogramme : polyglobulie, thrombocytose, hyperleucocytose, hyperéosinophilie, myélémie voire bicytopénie. Des manifestations cliniques caractéristiques des NMP ont pu être associées (prurit à l'eau, splénomégalie...). Trois prescriptions pour plasmocytose ont été incluses dans ce groupe ainsi que les prescriptions avec les demandes avec la seule indication « recherche de SMP ».

Certaines recherches de *JAK2V617F* ont été réalisées afin d'aider à la caractérisation d'une hémopathie hors NMP Ph- classiques, susceptibles de porter l'anomalie. En effet, la mutation *JAK2V617F* a été également décrite dans certains syndromes myélodysplasiques, dans des pathologies mixtes, néoplasmes myéloprolifératifs/ syndromes myélodysplasiques (113) ainsi que dans certaines leucémies aiguës. Les cultures de progéniteurs hématopoïétiques constituent dans ce cas une aide au diagnostic permettant d'établir le caractère prolifératif d'une hémopathie.

2. Néoplasmes myéloprolifératifs classiques Philadelphie négatif dans l'arc alpin

Dans cette étude rétrospective, 410 diagnostics des néoplasmes myéloprolifératifs classiques chromosome Philadelphie négatif ont été retenus par les médecins de l'arc alpin : 141 polyglobulies de Vaquez, 234 thrombocytémies essentielles, 32 myélofibroses primitives. Trois cas de NMP inclassable n'ont donc pas été analysés.

2.1. Cas de polyglobulie de Vaquez dans l'arc alpin

2.1.1. Informations générales sur les patients atteints de polyglobulie de Vaquez

Sur l'ensemble des 882 dossiers examinés et suivis dans l'arc alpin, 141 diagnostics de polyglobulie de Vaquez ont été retenus par les médecins.

L'âge moyen au moment de l'analyse est de 66.03 ans avec un écart-type de 14.33 ans, se dispersant entre un minimum de 21 ans et un maximum de 92 ans. Cependant, cet âge n'est

pas exactement le reflet de l'âge au moment du diagnostic. En effet, certaines recherches de *JAK2V617F* ont été effectuées rétrospectivement après la découverte de l'hémopathie afin de confirmer un diagnostic ancien déjà posé mais également à visée épidémiologique. On peut donc supposer que l'âge moyen au diagnostic est inférieur à 66.03 ans.

Dans notre population, le sex-ratio M/F, estimé à 1.56, montre une prédominance masculine. Deux cas semblent être des cas familiaux. Parmi ces 141 patients, 7.8% (soit 11/141) sont décédés sans forcément de lien de causalité directe entre la PV et le décès.

La découverte de la pathologie s'est majoritairement révélée à la suite d'anomalies de l'hémogramme. Parmi ces troubles de l'hémogramme, 5 patients avaient initialement une thrombocytose majeure associée à une faible voire une absence de polyglobulie. Seulement 12 (8.5%) diagnostics semblent avoir eu lieu après une manifestation clinique : 3 à la suite de syndromes de Budd Chiari, 4 à la suite d'ischémie digitale, 1 à la suite d'AVC, et les 4 derniers cas à la suite de thromboses veineuses d'origines diverses. Cependant, ce résultat est probablement biaisé par l'absence ou le peu de données cliniques accompagnant la prescription d'une culture et/ou d'une recherche de mutation *JAK2V617F*. Celle-ci n'est pas toujours bien détaillée. De plus, le caractère mixte des NMP (critères biologiques et cliniques) peut expliquer ce résultat.

Le Tableau 8 montre les fréquences de complications chez ces patients atteints de polyglobulie de Vaquez. Au total, 57.2% des patients atteints de PV ont présenté des complications à court ou long terme. Parmi les complications hématologiques, 3 cas (2.3%) ont eu une transformation en leucémie aiguë myéloblastique et 2 cas (1.5%) ont développé des myélofibroses post-PV et un cas a évolué en syndrome myélodysplasique. Parmi les patients ayant présentés des complications thrombotiques, deux patients sur les 3 syndromes de Budd Chiari recensés sont décédés. Huit patients n'ont plus eu de suivi dans l'un des sites de l'arc alpin ou les informations non pas été recueillies. Etant donné le mode de recueil des patients, il est difficile de rapporter ces données à une période de suivi.

La Figure 18 montre la prise en charge de patients atteints de PV. Le traitement pris en compte dans l'étude correspond à celui prescrit au moment de la dernière visite. Les 5 patients ayant eu des complications hématologiques ont été exclus du diagramme. Parmi ces patients, un cas de LAM secondaire et un cas de myélofibrose post-PV ont été greffés. Pour 5 patients, l'information n'a pas été recueillie (3.5%).

Complications	Nbre de patients (%)
Pas de complication	57 (42.8%)
Troubles de la microcirculation	6 (4.5%)
Acrosyndrome	3 (2.3%)
AIT	3 (2.3%)
Evènements thrombotiques :	59 (44.4%)
Syndromes de Budd Chiari	3 (2.3%)
Thromboses artérielles	22 (16.5%)
Embolies pulmonaires	4 (3%)
Thromboses veineuses	30 (22.6%)
Hémorragies	10 (7.5%)
Complications hématologiques :	6 (4.5%)
LAM secondaires	3 (2.3%)
SMD	1 (0.8%)
Myélofibrose post-PV	2 (1.5%)

Tableau 8 : Complications observées chez 133 patients atteints de Polyglobulie de Vaquez. Plusieurs complications peuvent être rencontrées par patient.

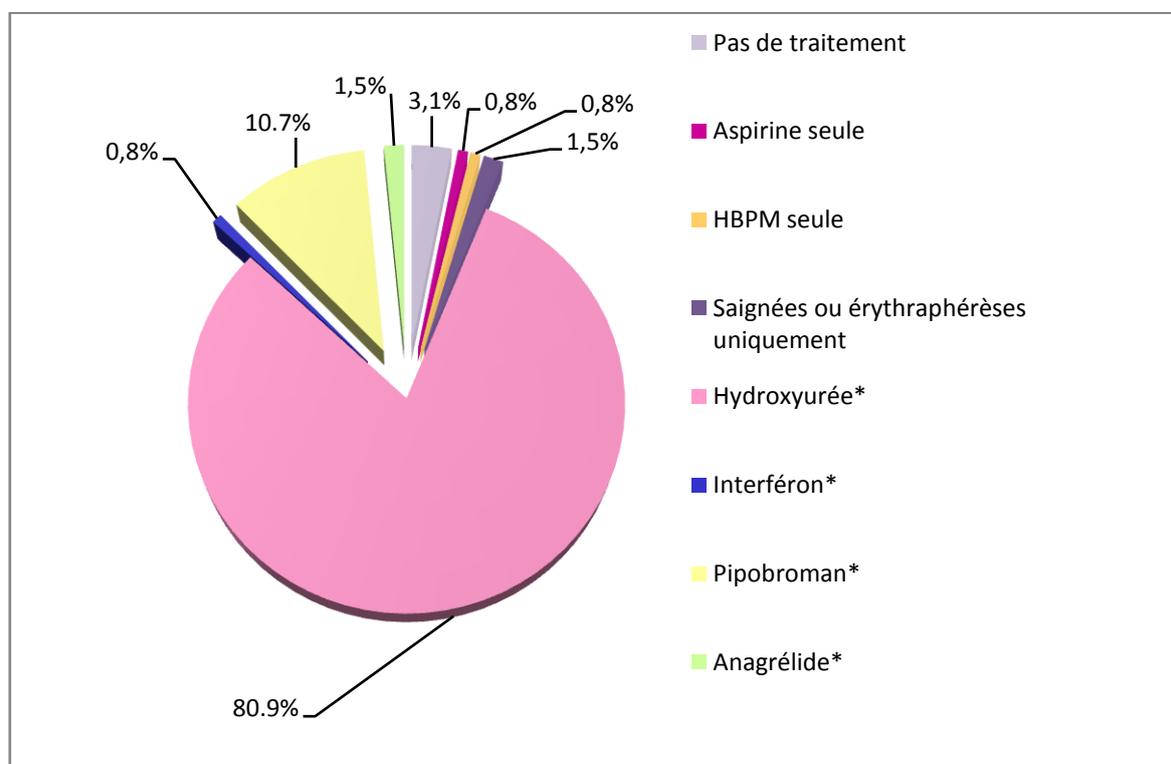


Figure 18: Prise en charge thérapeutique chez 131 patients atteints de PV.* pouvant être associés à un ou des traitements additionnels.

Le traitement par hydroxyurée (nom commercial Hydrea), traitement de référence quand une cytoréduction est indiquée, est prescrit dans 80.9% des cas. Chez les 106 patients traités par hydroxyurée, la molécule est administrée seule dans 33% des cas. L'hydroxyurée est associée à de l'aspirine à faible dose (56.7% des cas), à un autre antiagrégant plaquettaire tel que le clopidogrel (7.5%) ou à un antivitamine K (0.9%). Une trithérapie est prescrite chez 2 patients (1.9%) associant hydroxyurée, aspirine à faible dose et AVK ou HBPM au moment du recueil des données. Dans tous les cas, des saignées ou des érythrophères peuvent être réalisées en supplément si nécessaire, notamment lors de difficultés d'adaptation de la posologie en hydroxyurée. On note que chez les 106 patients traités par l'hydroxyurée, 30 (28.3%) sont âgés de moins de 60 ans.

Un traitement par pipobroman (Nom commercial Vercyte) est prescrit chez 10.7% des patients. Dans 42.8% des cas, le Vercyte est associé à un traitement antiagrégant comme l'aspirine ou le plavix. Quatre patients sur les 14 traités par pipobroman (28.6%) ont moins de 60 ans. Un patient traité par anagrélide comporte également une association avec de la mercaptopurine (nom commercial Purinethol) et de la darbepoetin alfa (nom commercial Aranesp). Une patiente âgée de 29 ans est traitée par interféron alpha pégylé. Sur la population globale des 131 patients suivis pour PV, l'aspirine ou le plavix sont prescrits à 58.8%. Les autres traitements symptomatiques notamment les antiuricémiants n'ont pas été étudiés.

2.1.2. Proportion de polyglobulies de Vaquez *JAK2V617F* positif

Sur les 141 diagnostics de PV retenus, un seul patient atteint de polyglobulie de Vaquez n'a pas eu de recherche de mutation *JAK2V617F* et a donc été exclu. La proportion de patients *JAK2V617F* mutés dans notre population globale (n=140) est de 91.43% (128/140). Le Tableau 9 montre le pourcentage de cas positifs en *JAK2V617F* selon les sites de l'arc alpin. Chez 2 patients mutés, la présence de la mutation *JAK2V617F* n'a pu être mise en évidence qu'après un second prélèvement. Pour l'un d'eux, une PCR quantitative de *JAK2V617F*, réalisée sur un échantillon négatif en PCR qualitative ARMS, a permis la détection d'un faible pourcentage de JAK2 muté.

Sites	Anancy	Chambéry	Grenoble	IDH	Total
Données					
Nombre de PV totales diagnostiquées	21	32	73	14	140
% de JAK2 dans la population PV (n=140)	90.47%	100%	87.67%	92.85%	91.43%

Tableau 9: Répartition des cas de polyglobulies de Vaquez et pourcentage de patients *JAK2V617F* mutés selon les sites.

2.1.3. Proportion de polyglobulies de Vaquez *JAK2* exon12 positif

Parmi les 12 patients étiquetés « polyglobulie de Vaquez *JAK2V617F* négatif », trois recherches de *JAK2* exon 12 ont été prescrites en routine. Un seul patient (0.7%) a présenté l'une des mutations de l'exon 12 du gène codant pour la protéine *JAK2*. Cependant, ce résultat est difficile d'interprétation devant le peu de mutations *JAK2* exon 12 recherchées. La proportion de *JAK2* positive (mutation *V617F* et exon 12) est 92.09%.

2.1.4. Application des critères de l'OMS 2008

Depuis l'apparition de la mutation *JAK2V617F* et son utilisation en routine, les critères de l'OMS 2008 ont simplifié le diagnostic de polyglobulie de Vaquez. Ainsi, le diagnostic positif de polyglobulie de Vaquez n'est plus avant tout un diagnostic d'exclusion d'une polyglobulie secondaire. Cependant, la présence de la mutation *JAK2V617F* n'est pas spécifique de la maladie de Vaquez puisqu'elle est retrouvée dans d'autres hémopathies notamment d'autres NMP Ph-. Ainsi, trois critères (cf Partie 1 2.1) doivent être présents pour affirmer le diagnostic : soit deux critères majeurs associés à un critère mineur soit un critère majeur combiné à deux critères mineurs. Parmi les 141 patients étiquetés polyglobulie de Vaquez par un clinicien, nous avons cherché à savoir si l'application des nouveaux critères de l'OMS 2008 pouvait modifier le diagnostic initial.

Sur les 141 patients, 118 dossiers ont pu être relus (vingt trois dossiers « papier » n'ont pu être consultés). 91 dossiers sur les 118 (77%) respectaient totalement les critères de l'OMS. Deux dossiers étaient difficilement classables selon les critères de l'OMS. En effet, chez ces 2 patients masculins, la présence de JAK2 ainsi qu'une pousse spontanée de progéniteurs étaient présentes. Le taux d'hémoglobine bien que supérieur à la normale ne dépassait pas le seuil de 185g/l. Le dosage de l'érythropoïétine, réalisé seulement pour l'un d'entre eux, était normal bien que dans la limite inférieure des valeurs normales. Ni le volume globulaire, ni la biopsie ostéomédullaire n'ont été réalisés.

Parmi les 25 patients ne remplissant pas les critères de l'OMS (Tableau 10), 6 ne possédaient pas la mutation *JAK2V617F* ou avaient un statut mutationnel en *JAK2V617F* inconnu. L'un d'eux (patient 24) aurait probablement du être classé en érythrocytose idiopathique devant une hémoglobine à 266g/l. Aucun des 3 critères mineurs (EPO normal, BOM ne montrant pas d'argument, absence de pousse spontanée de progéniteurs) n'apportait d'argument envers une maladie de Vaquez. De plus, une origine secondaire de la polyglobulie avait pu être exclue chez cette patiente. Dix neuf patients *JAK2V617F+* ne respectaient pas les 3 critères de l'OMS.

	Patient	Critères majeurs		Critères mineurs				Nombre de critère(s) OMS manquant(s)
		Hb>185g/l (homme) ou Hb>165g/l (femme)	Statut en exon 12 de <i>JAK2</i>	EPO	BOM	Culture de progéniteurs spontanés		
						Moelle	Sang	
<i>JAK2V617F</i> Présente	1	OUI	/	NF	NF	NF	NF	1
	2	OUI	/	NF	NF**	NF	NF	1
	3	NON*	/	NF	NF	NF	Positif	1
	4	NON*	/	NF	NF	NF	Positif	1
	5	OUI	/	NF	NF	NF	NF	1
	6	OUI	/	Normale	NF	NF	NF	1
	7	OUI	/	NF	NF	NF	NF	1
	8	OUI	/	Normale	NF	NF	NF	1
	9	OUI	/	Normale	NF	NF	NF	1
	10	NON *	/	NF	En faveur	NF	NF	1
	11	NON***	/	Normale	NF	NF	NF	2
	12	OUI	/	NF	NF**	NF	NF	1
	13	OUI	/	Normale	NF	NF	Négatif	1
	14	OUI	/	Normale	NF ^α	NF	NF	1
	15	OUI	/	NF	NF	NF	NF	1
	16	OUI	/	Normale	NF	NF	NF	1
	17	OUI ^β	/	NF	NF	NF	Négatif	1
	18	NON*	/	Elevée	NF	Négatif	Positif	1

	Patient	Critères majeurs		Critères mineurs				Nombre de critère(s) OMS manquant(s)
		Hb>185g/l (homme) ou Hb>165g/l (femme)	Statut en exon 12 de <i>JAK2</i>	EPO	BOM	Pousse de progéniteurs spontanée		
						Moelle	Sang	
<i>JAK2V617F</i> non détectée	19	OUI	NF	Normale	NF	Négatif	NF	2
	20	OUI	NF	Normale	NF	NF	Positif	1
	21	OUI	NF	Abaissée	NF	NF	Négatif	1
	22	OUI	Non muté	Elevée	NF	Positif	NF	1
	23	OUI	NF	Normale	NF	NF	Positif	1
	24	OUI	NF	Normale	Pas en faveur	Négatif	Négatif	2
<i>JAK2V617F</i> inconnue	25	OUI	NF	Normale	NF	Positif	Positif	1

Tableau 10: Récapitulatif des 25 patients diagnostiqués comme atteints de polyglobulie de Vaquez mais ne respectant pas les critères de l'OMS 2008. NF : Non fait ; BOM Biopsie ostéomédullaire ; EPO Erythropoïétine ; VG Volume Globulaire isotopique.

* Hémoglobine ne dépassant les valeurs attribuées par l'OMS, mais étant tout de même supérieure à la normale,

**BOM non réalisée mais le myélogramme est en faveur d'un NMP Ph-,

***Hb normale mais dans les valeurs hautes, VG non réalisé,

^α la BOM réalisée n'était pas interprétable, le myélogramme est en faveur d'un NMP Ph-,

^β le VG est augmenté.

2.2. Cas de thrombocytémies essentielles dans l'arc alpin

2.2.1. Informations générales des cas de thrombocytémies essentielles de l'arc alpin

Sur l'ensemble des 882 dossiers examinés et suivis dans l'arc alpin, 234 diagnostics de thrombocytémie essentielle ont été retenus par les médecins.

L'âge moyen au moment de l'analyse est de 62.2 ans avec un écart-type de 16.36 ans, se dispersant entre un minimum de 18 ans et un maximum de 94 ans. De même que pour les polyglobulies de Vaquez, certaines recherches de la mutation *JAK2V617F* ont été effectuées plusieurs années après le diagnostic initial. On peut donc supposer que l'âge moyen au diagnostic est inférieur à 62.2 ans.

Dans notre population, une prédominance féminine a été observée avec un sex-ratio M/F, estimé à 0.65. Six cas semblent être des cas familiaux. Parmi ces 234 patients, on compte 6 décès dont la cause n'est pas forcément attribuée au NMP Ph-.

La découverte de la pathologie s'est majoritairement révélée fortuitement à la suite d'anomalies de l'hémogramme sans point d'appel clinique. Seulement 6 (2.6%) diagnostics semblent avoir eu lieu après une manifestation clinique (AVC, ischémie digitale, thrombose, fausse couche à répétition). De la même manière que pour les polyglobulies de Vaquez, ce résultat est probablement biaisé par le manque de renseignements fournis lors de la prescription et par les anomalies possiblement mixtes biologiques et/ou cliniques retrouvées dans les thrombocytémies essentielles.

Des complications sont observées dans 41% (91/223) des cas à court ou long terme (Figure 19). Pour 11 patients, les informations n'ont pas été recueillies. Parmi les complications hématologiques, 7 cas (3%) ont eu une transformation en myélofibrose et 1 cas (0.4%) a eu une transformation en leucémie aiguë myéloblastique. Cette patiente atteinte de LAM a eu également 2 épisodes thrombotiques dont une thrombose portale. Les complications thrombotiques artérielles ou veineuses constituent 32.4% des complications de la TE. Les manifestations sont variées allant de l'accident thrombotique mineur de la micro-circulation (érythralgie, AIT...) à l'accident vasculaire cérébral, aux thromboses artérielles périphériques ou aux thromboses veineuses profondes se compliquant parfois d'embolie pulmonaire...

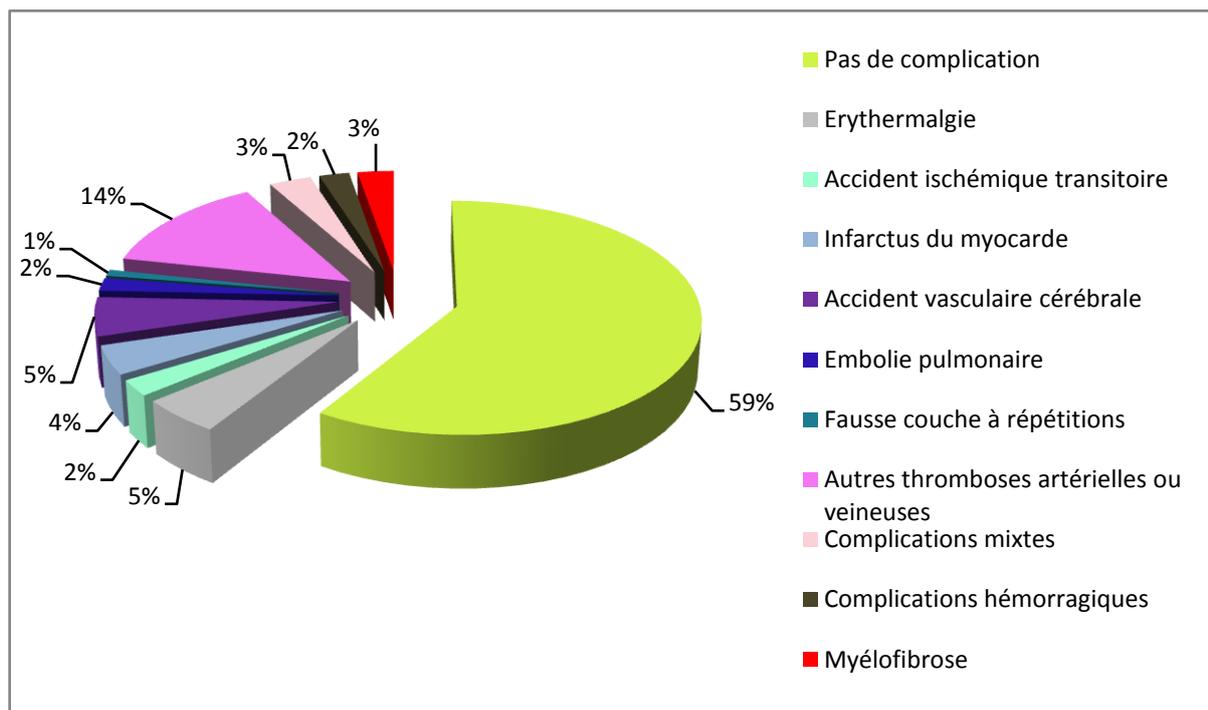


Figure 19: Complications observées à court et long terme chez les patients atteints de TE dans l'arc alpin

Dans l'étude de la prise en charge thérapeutique de patients atteints de TE, les 8 patients ayant eu des complications hématologiques ont été exclus de même que 6 patients non suivis ou dont l'information n'a pas été recueillie. Au moment de la dernière visite, 61.4% (135/220) des patients suivis ont bénéficié d'un traitement par hydroxyurée (nom commercial Hydrea) (Figure 20). La molécule est majoritairement associée à de l'aspirine à faible dose (65.7%) ou administrée seule (19.4%). Plus rarement, elle est associée avec du clopidogrel (7.5%), un antivitamin K (1.5%), au ticlopidine (0.7%), au fondaparinux (0.7%) ou en trithérapie (4.5%). 46 (34.1%) patients traités par hydroxyurée avaient moins de 60 ans. Les autres cytoréducteurs ou régulateurs de l'hématopoïèse prescrits dans notre population par ordre de fréquence l'anagrélide (ou Xagrid), le pipobroman (ou Vercyte), le busulfan (ou Myleran) ou l'interféron α respectivement 5.9%, 3.2%, 0.9% et 0.5%. De la même façon, ils peuvent être prescrits seuls ou combinés à des antiagrégants, du fondaparinux et parfois à de l'EPO recombinante. On note que 3 patients traités par pipobroman et 2 par busulfan avaient moins de 60 ans.

Sur la population globale, un antiagrégant plaquettaire est prescrit seul ou en association chez 73,2% des patients atteints de TE. Celui-ci est parfois prescrit sous une spécialité couplée une statine (hypocholestérolémiant), afin d'agir parallèlement sur ce facteur de risque cardiovasculaire. De plus, on note qu'un patient atteint de TE, d'après les critères de l'OMS

2008, est traité par saignées et par aspirine faible dose, reflétant ainsi l'étroite frontière entre les différentes formes cliniques des NMP Ph-.

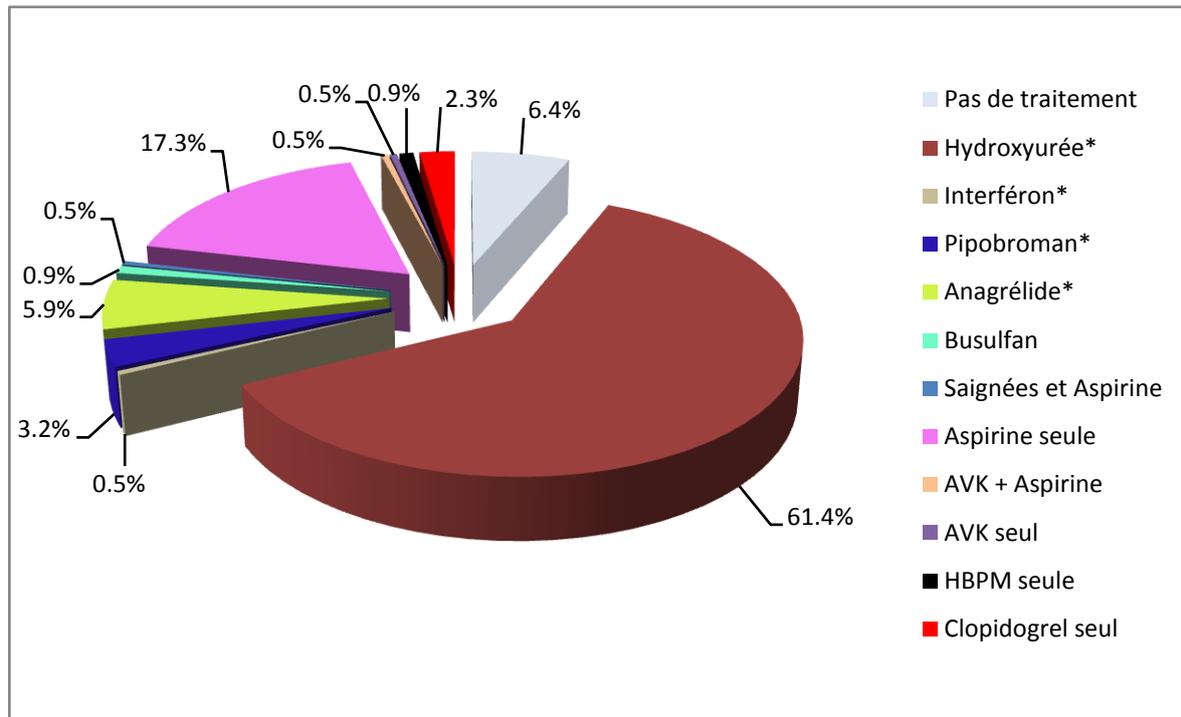


Figure 20: Prise en charge thérapeutique chez les patients atteints de TE. * pouvant être associés à un ou des traitements additionnels. AVK :Antivitamine K

2.2.2. Mutations *JAK2V617F* et *MPL* chez les patients atteints de thrombocytémie essentielle

La proportion de patients *JAK2V617F* mutés parmi les 234 TE diagnostiquées est de 68.8%. Le Tableau 11 montre la fréquence de la mutation *JAK2V617F* selon les sites de l'arc alpin. On note des disparités significatives du pourcentage de TE *JAK2V617F* mutées en fonction des sites (test de χ^2 , p value=0.02 au risque $\alpha=0.05$). Le pourcentage de TE *JAK2V617F* mutées est supérieur au CHU de Grenoble par rapport aux sites d'Annecy et de Chambéry (test de χ^2 , respectivement p value=0.05 et p value<0.01). Toutefois, il n'y a pas de différence significative entre le CHU de Grenoble et l'Institut Daniel Hollard (test de χ^2 , p value=0.37 au risque $\alpha=0.05$). Concernant les mutations de *MPL*, seules 2 recherches avaient été réalisées pour les patients diagnostiqués en TE (résultats négatifs). Afin d'étayer le diagnostic de TE *JAK2*-, 35 recherches de *MPL* ont été réalisées par HRM au CHU de Nîmes. Trois résultats n'était pas interprétables, 18 étaient négatifs. Quatorze patients ont montré une mutation de *MPL* soit 5.9% en considérant l'ensemble des TE de l'arc alpin.

	Annecey	Chambéry	IDH	Grenoble	Total
Nombre de TE diagnostiquées	37	49	35	113	234
Nombre de TE <i>JAK2V617F</i> +	22	27	24	88	161
% de TE <i>JAK2V617F</i> +	59.45%	55.1%	68.58%	77.8%	68.8%

Tableau 11 : Proportion de TE porteuses de la mutation *JAK2V617F* sur l'ensemble de l'arc alpin et selon les sites.

2.2.3. Application des critères diagnostiques de l'OMS 2008

Si la découverte de la mutation *JAK2V617F* permet d'avoir un argument en faveur du caractère clonal d'une thrombocytose essentielle, le diagnostic de TE reste, d'après la classification OMS 2008, un diagnostic d'exclusion. En effet, plusieurs troubles peuvent mimer une TE comme les thrombocytoses réactionnelles et plusieurs hémopathies telles que la MFP, la LMC, la PV plus ou moins masquée, l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose marquée (RARS-T), des SMD ainsi que les NMP inclassables (29). Ces hémopathies peuvent s'accompagner de la présence de la mutation *JAK2V617F*. Ainsi, l'utilisation en routine de la mutation *JAK2V617F* ne permet pas d'affirmer par sa présence le diagnostic de TE et les quatre critères définis par l'OMS (cf Partie 1 2.2) doivent être présents pour affirmer le diagnostic.

Sur les 234 thrombocytémies essentielles identifiées dans notre étude, 184 dossiers ont pu être consultés quant à l'application des critères de l'OMS (50 dossiers « papiers » (21.3%) n'ont pu être consultés). Sur les 184, 45 dossiers (24.5%) respectaient totalement les critères de l'OMS. Le diagnostic d'un patient était douteux (0.5%) entre une TE et une PV. La mutation *JAK2V617F* était positive. La BOM montrait une hyperplasie des 3 lignées, la culture spontanée sanguine montrait 5 colonies de progéniteurs mégacaryocytaires. Malgré ces 3 critères en faveur d'une PV, le médecin a conclu à une TE devant la normalité du volume globulaire isotopique, une hémoglobine à 170g/l, un taux d'EPO normal et des plaquettes >450G/l. Le myélogramme réalisé avait pu écarter un SMD.

Cependant, 138 (75%) patients ne remplissaient pas un ou plusieurs critères de l'OMS. Tous ces patients avaient un taux plaquettaire >450G/l, mais il manquait 1, 2 voire 3 critères dans

respectivement 6% (8/138), 94.5% (121/138), 6.5% (9/138) des cas pour conclure à une TE selon les nouveaux critères de l’OMS. En particulier, la biopsie ostéomédullaire n’a pas été réalisée chez 128 sujets étiquetés « Thrombocytémie essentielle » et n’était pas interprétable chez 2 patients. De plus, chez un patient, elle n’était pas en faveur d’une TE avec une moelle de richesse diminuée. La moyenne d’âge de ces 128 patients est de 66.09 ans avec un écart-type de 23.3 ans.

Sur l’ensemble des 184 patients, on note que la biopsie ostéomédullaire est moins effectuée chez les patients âgés (test t de Student, *p value*<0.05 au risque $\alpha=0.05$). En outre, la biopsie ostéomédullaire semble moins réalisée chez les patients porteurs de *JAK2V617F* (26.5%) par rapport à ceux où la mutation n’est pas détectée (39.2%), néanmoins le test du χ^2 montre une *p value* à 0.08 et n’est donc pas significatif au risque $\alpha=0.05$. On note parfois que l’exclusion de la myélofibrose est faite par certains cliniciens par la morphologie globulaire sur le frottis sanguin avec une demande particulière de dacryocytes, critères exclus du diagnostic OMS 2008.

Quatre patientes auraient du être classées en polyglobulie de Vaquez. En effet, bien que leur taux plaquettaire soit très au-dessus de la normale, l’hémoglobine de ces patientes était >165g/l. De plus, la mutation *JAK2V617F* était présente ainsi qu’une pousse spontanée de progéniteurs. Chez 5 patients, une exploration complémentaire aurait éventuellement du être réalisée devant un taux d’hémoglobine normale, ou élevée mais restant inférieure aux valeurs seuils de l’OMS dans la polyglobulie de Vaquez (soit <165g/l ou <185g/l) associé à un VGM microcytaire (<80fl) ou une ferritine basse. Une supplémentation en fer chez ces patients carencés entraîne parfois une augmentation d’hémoglobine conduisant à l’identification d’une polyglobulie chez un patient dont l’hyperplaquettose paraissait initialement isolée (181). En effet, la thrombocytose est présente dans >50% des PV (224) et peut être également secondaire à la carence martiale (225). Six patients présentaient une polyglobulie sans pour autant dépasser les seuils admis par l’OMS. Un volume sanguin isotopique, permet dans ces cas là de déceler une éventuelle polyglobulie masquée mais l’examen n’est pas recommandé par l’OMS. La question se pose également en cas d’érythropoïétine basse. En effet, parmi la population étudiée, 7 patients montraient à la fois une valeur de l’EPO basse et la présence de la mutation *JAK2V617F*. Bien qu’une diminution du taux sérique d’érythropoïétine est observée dans 40% des TE (disparité allant de 4 à 100% selon les études) (181) dans la littérature, son dosage ne constitue pas un argument en faveur d’une TE selon les critères de l’OMS 2008. Ainsi l’EPO diminuée associée à la mutation *JAK2V617F* constituent 2 arguments sur les 3 nécessaires au diagnostic de polyglobulie de Vaquez et nécessitent donc *a*

fortiori d'écarter une polyglobulie vraie. Cependant, le dosage de l'EPO n'est pas *a priori* recommandé pour affirmer le diagnostic de TE et écarter celui de la polyglobulie.

Dix sept (12%) patients ne respectaient pas les critères de l'OMS car aucune recherche de mutation bcr-abl ni aucun caryotype n'avaient été pratiqués. Seuls les patients où la mutation de *JAK2V617F* était non détectée, ont été susceptibles de ne pas répondre à ce critère diagnostique de l'OMS 2008 (cf Partie 2 « Matériels et méthodes »). Les formes thrombocytémiques de leucémie myéloïde chronique n'avaient donc pu être éliminées, au risque d'une thérapeutique moins efficace.

Le myélogramme permet d'écarter un syndrome myélodysplasique ou un syndrome mixte myéloprolifératif/myélodysplasique. Celui-ci n'a pas été réalisé chez 51% des patients (71/138) et a été non informatif chez 13.7% des patients (19/138). Les myélogrammes dilués peuvent être entre autres liés à la qualité du prélèvement mais également à une probable fibrose médullaire. Sur les 71 patients n'ayant pas eu de myélogramme et les 19 myélogrammes dilués, respectivement 5 et 8 patients présentaient au moins un critère mineur de l'OMS en faveur d'une myélofibrose (à savoir LDH augmentées, splénomégalie palpable ou anémie). Aucun des 13 patients avec au moins un critère mineur de MFP n'avait eu de biopsie ostéomédullaire. Quatre sur les 13 patients avaient moins de 60 ans.

2.3. Cas de myélofibroses primitives dans l'arc alpin

2.3.1. Informations générales des cas de myélofibroses primitives de l'arc alpin

Sur l'ensemble des 882 dossiers examinés et suivis dans l'arc alpin, 32 diagnostics de myélofibrose primitive (MFP) *de novo* ont été retenus par les médecins.

L'âge moyen au moment de l'analyse est de 64.33 ans avec un écart-type de 13.86 ans, se dispersant entre un minimum de 31 ans et un maximum de 84 ans. On peut donc supposer que l'âge moyen au diagnostic est inférieur à 64.33 ans. En effet, la prescription de *JAK2V617F* a parfois été réalisée après la découverte de l'hémopathie.

Dans notre population, une prédominance masculine est observée (sex ratio=2.55). 5 patients atteints de MFP (15.6%) sont décédés et seulement 16% n'ont pas présenté de complications au cours de l'évolution de leur pathologie. Le Tableau 12 montre les complications observées chez 31 patients atteints de myélofibrose. Les complications concernant une patiente atteinte également d'un lymphome non hodgkinien à grandes cellules ainsi que les complications infectieuses éventuelles n'ont pas été relevées.

Complications	Patients (effectif, pourcentage)
Leucémies aiguës	5 (16%)
Complications cardiovasculaires	4 (12.9%)
Signes biologiques (anémie, thrombopénie, bicytopénie...)	23 (74%)
Complications thromboemboliques	5 (16%)
Cachexie	3 (9.7%)
Ascite	1 (3.2%)
Pas de complication	5 (16%)
Hémochromatose secondaire	1 (3.2%)
Complications hémorragiques	1 (3.2%)

Tableau 12: Complications observées chez 31 patients atteints de myélofibrose primitive dans l'arc alpin. Les patients peuvent avoir des complications mixtes.

Le Figure 21 détaille les prescriptions des patients atteints de MFP à l'exclusion des prises en charge des transformations leucémiques. L'hydroxyurée est la thérapeutique conventionnelle administrée en première intention (48.1%). En parallèle, 5 (18.5%) patients ont subi une splénectomie. Des traitements symptomatiques ont pu être adjoints à la prise en charge tels que la transfusion, ou la prise d'EPO recombinante. Aucun des patients de l'arc alpin n'a été traité lors du dernier suivi par du lénalidomide, du thalidomide ou un inhibiteur de JAK2.

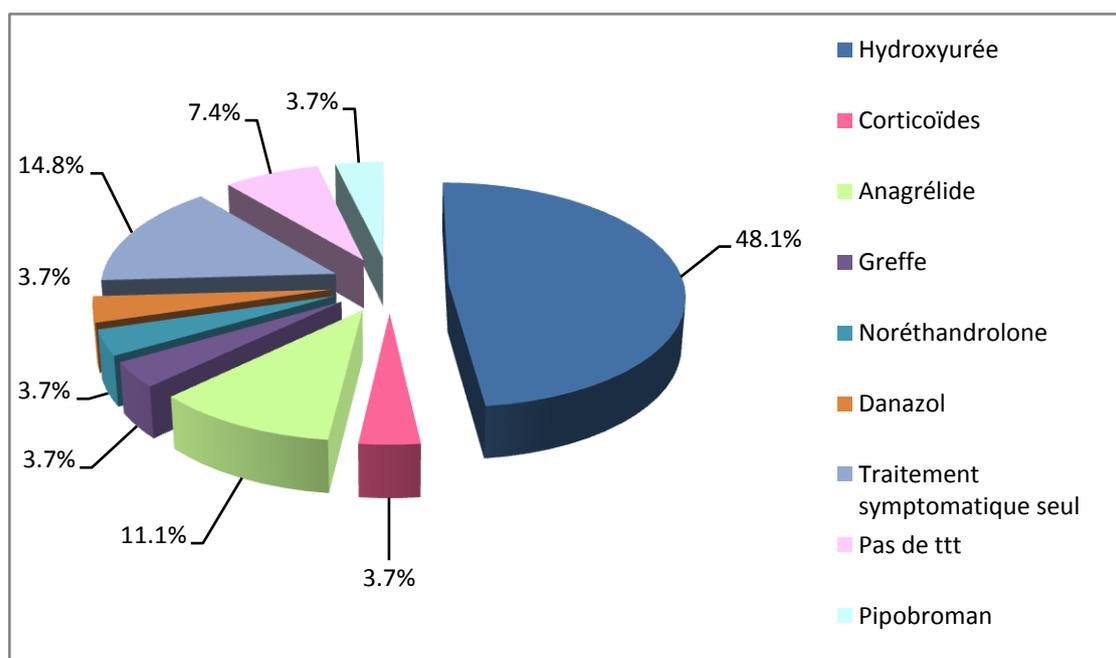


Figure 21: Prise en charge chez 27 patients atteints de MFP de l'arc alpin.

2.3.2. Cytogénétique et statut mutationnel dans les MFP de l'arc alpin

Le pourcentage de myélofibrose *JAK2V617F* mutée chez les 32 patients de l'arc alpin est de 59.4%. Les mutations de *MPL* se sont avérées négatives chez les 6 patients explorés. En complément, nous avons réalisé la recherche de mutation de *MPL* chez 4 patients atteints de MFP *JAK2*-. 3 patients sur les 4 étaient porteurs d'une mutation soit 9.4% si on considère l'ensemble des 32 MFP.

La Figure 22 montre le résultat des caryotypes réalisés dans l'arc alpin dans le cadre des myélofibroses primitives. 13% des patients n'ont pas eu de caryotype prélevé au moment du diagnostic et chez 9% des patients, le caryotype a été stocké mais n'a pas été mis en culture. Pour un patient, la ponction médullaire a été infructueuse. 14 (44%) patients atteints de myélofibrose primitive avaient un caryotype normal. Des anomalies clonales variées ont été retrouvées chez 31 % des patients dont 6 délétions 20q, 1 délétion 5q associée à une trisomie 21, 1 délétion 13q, 1 trisomie 8, 1 délétion 9q. Il est toutefois difficile de comparer les résultats de la littérature avec nos données devant le faible nombre de patients atteints de myélofibrose primitive diagnostiqués dans l'arc alpin et ayant eu un caryotype.

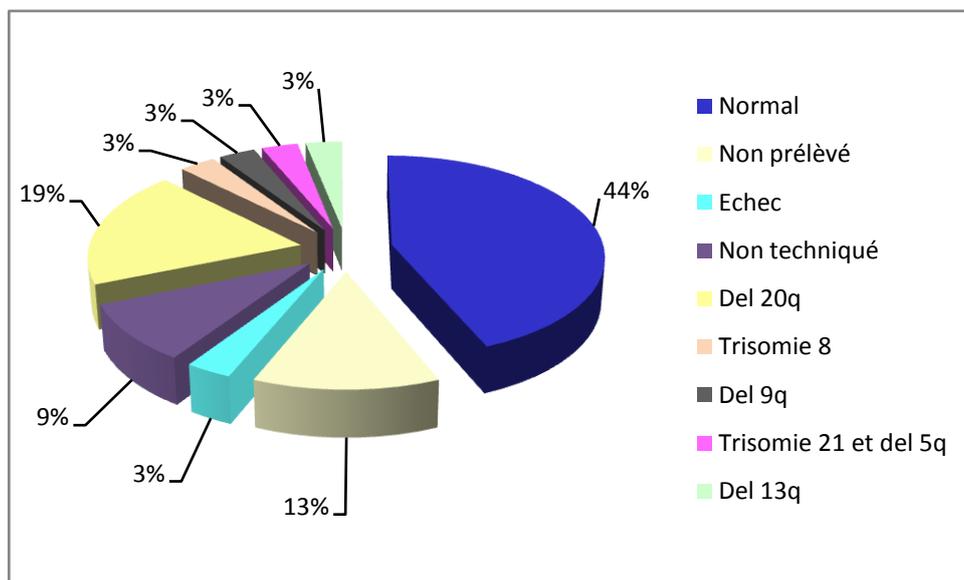


Figure 22: Etude cytogénétique des myélofibroses primitives de l'arc alpin

2.3.3. Application des critères de l'OMS 2008

Les critères de l'OMS pour affirmer une myélofibrose primitive ont été définis dans la partie bibliographique de ce mémoire. Pour 9 patients, les informations du diagnostic n'ont pas pu être récupérées (diagnostic initial hors de l'arc alpin, non consultation du dossier papier...) Vingt patients respectaient entièrement les critères de l'OMS avec en particulier la réalisation

d'une BOM. Seuls 2 patients ne respectaient pas les critères de l'OMS. Chez l'un d'eux, un traitement par AVK n'avait pas permis de réaliser la biopsie ostéomédullaire. Le second patient n'avait pas eu de recherche de bcr-abl et/ou de caryotype. Une patiente respectait les critères de l'OMS mais était peut-être une myélofibrose post-polyglobulie de Vaquez. Lors d'une intervention chirurgicale d'un thymome, un taux d'hémoglobine à 190g/l est découvert. Cependant, la polyglobulie n'est alors pas étayée. Par la suite, un lymphome à grandes cellules a été également diagnostiqué chez la patiente. Le myélogramme réalisé est un échec. Une BOM est réalisée en bilan d'extension montrant un aspect de myélofibrose. La mutation *JAK2V617F* est alors prescrite et revient positive. L'hémoglobine est alors normale, il n'y a pas de myélémie. Une splénomégalie est palpable. Le taux des LDH est élevé mais difficilement interprétable compte tenu de l'intercurrence du LNH.

3. Cas d'érythrocytoses idiopathiques

Pour certaines érythrocytoses, aucune cause étiologique n'est identifiée. Ces érythrocytoses ni primitives, ni secondaires constituent le groupe des érythrocytoses idiopathiques (EI). Dans notre étude, 19 cas ont été classés comme tels. La moyenne d'âge au moment du prélèvement est de 56.85 ans (écart-type=12.68 ans). Une forte prédominance masculine est ici observée (sex ratio=5.33). La mutation *JAK2V617F* n'a été détectée chez aucun patient. Des prurits à la balnéation, des érythroses faciales ainsi que des céphalées étaient des symptômes fréquemment retrouvés dans cette population. La prise en charge est majoritairement effectuée par saignées ou érythraphères plus ou moins associées à de l'aspirine à faible dose (78.9%). Un patient est traité par de faibles doses d'aspirine seule (5.3%). Dans 10.6% des cas, un suivi biologique est réalisé sans traitement. A noter, qu'un patient, (5.3%) tolérant mal les saignées, bénéficie d'un traitement par cytoréducteur (hydroxyurée) malgré l'absence de confirmation d'un processus clonal.

Chez ces 19 cas, nous avons recherché si les critères de l'OMS permettaient bien d'exclure une polyglobulie de Vaquez (Tableau 13). En l'absence de critères mineurs en faveur d'une maladie de Vaquez, 8 cas (42%) considérés comme érythrocytose idiopathique par les cliniciens respectaient les critères OMS infirmant la polyglobulie de Vaquez. Deux cas étaient douteux entre une érythrocytose idiopathique et une polyglobulie de Vaquez devant des discordances entre les analyses réalisées. Les mutations de l'exon12 ont été recherchées chez 7 patients et se sont toutes avérées négatives. 9 cas nécessiteraient la réalisation de l'exon 12 et/ou de critère(s) mineur(s) pour exclure formellement une polyglobulie de Vaquez.

Patient	Critères OMS majeures en faveur d'une PV			Critères OMS mineurs en faveur d'une PV			Complications	Nombre d'arguments en faveur d'une PV	Résultat selon l'OMS
	Hémoglobine	VG	Exon 12	Culture	BOM	EPO			
1	Non*	Non	Neg	Négatif	En faveur	N	Aucunes	1	EI
2	/	Oui	NF	Positif	NF	↓**	Aucunes	2+/-3	EI/PV
3	Oui	Oui	NF	Négatif	Pas en faveur (en 1998)	↓	Thrombose	2	Selon exon 12
4	Oui	NF	NF	Positif	NF	N	?	2	Selon exon 12
5	Oui	NF	NF	Négatif	NF	N	?	1	Selon exon 12
6	/	Oui	NF	NF	↑ érythroblastique	N	Aucunes	1	Selon exon 12
7	Non*	Oui	NF	NF	NF	N	?	1	Selon critères mineurs
8	Oui	/	NF	Négatif	NF ***	↑	Aucunes	1	EI
9	/	Oui	NF	Discordance ^a	En faveur	N	Aucunes	2+/-3	EI/PV
10	Oui	/	Neg	Négatif	NF ^β	↑	Thrombose	1	EI
11	/	Oui	Neg	Négatif	NF	N	Aucunes	1	EI
12	/	Oui	NF	Négatif	NF	N	Aucunes	1	Selon exon 12
13	Oui	/	Neg	Négatif	↑ érythroblastique	N	Aucunes	1	EI
14	Oui	Oui	NF	Négatif	NF	N	Thrombose	1	Selon exon 12
15	/	Oui	NF	Positif (EEC)	↑ érythroblastique	↑	Aucunes	2	Selon exon 12
16	/	Oui	NF	Négatif	Pas en faveur	N	Aucunes	1	EI
17	/	Oui	Neg	Positif (EEC)	Non informatif	N	?	2	Selon BOM
18	Oui	Oui ^δ	Neg	Négatif	↑ érythroblastique	↑	Aucunes	1	EI
19	Non ^γ	Oui	Neg	Négatif	En faveur	N	Aucunes	2	EI

Tableau 13: Résultats des analyses réalisées afin d'exclure une polyglobulie de Vaquez. VG=Volume globulaire isotopique, Neg= Négatif, N= Normal, NF=Non Fait *Polyglobulie mais Hb<185g/l chez l'homme et <165g/l chez la femme **2 dosages ont été réalisés : l'un ↓, le second normal ***Aspect d'hyperplasie érythroblastique au myélogramme ^a2 cultures ont été réalisées : la 1^{ère} négative, la 2^{nde} positive^β Myélogramme non concordant ^δ 2 VG ont été réalisés chez le patient à 10 ans d'intervalle le 1^{er}<36ml/kg, le 2nd>36ml/kg. ^γ Polyglobulie associée à carence martiale.

4. Cas non répertoriés comme néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif.

4.1. Exclusion du diagnostic de NMP Ph-

Chez trois cent soixante dix patients, le diagnostic de NMP Ph- n'a pas été retenu. Schématiquement, ces patients peuvent être classés en 2 groupes selon le point de départ de leur investigation biologique.

4.1.1. Patients avec manifestations cliniques

Cent quarante trois recherches de *JAK2V617F* et/ou cultures de progéniteurs ont été réalisées à la suite des manifestations cliniques (thromboses, ischémie digitale, embolie pulmonaire, syndrome de Budd chiari...). Soixante dix neuf recherches de mutation *JAK2V617F* étaient associées à une demande de cultures de progéniteurs. Les cent quarante deux recherches de *JAK2V617F* (142/142) étaient négatives. Un patient n'a pas eu de *JAK2V617F*. Les mutations de *MPL* ou de l'exon 12 de *JAK2* n'ont été recherchées en routine chez aucun de ces patients.

En application des critères OMS 2008, en l'absence d'une hyperplaquettose supérieure à 450G/l, le diagnostic de thrombocyémie essentielle peut être exclu sans arrière pensée. Nous avons donc vérifié les 143 hémogrammes de patients pour lesquels le diagnostic de NMP a été exclu. Trois hémogrammes n'ont pas été trouvés dans les dossiers informatiques. Sept patients présentaient une thrombocytose au moment de la manifestation clinique. Chez trois patients, l'étiologie de la thrombocytose réactionnelle avait pu être identifiée et le traitement de sa cause avait fait régresser celle-ci. Un quatrième patient présentait un contexte inflammatoire chronique avec augmentation de la CRP et hyperferritinémie. Cependant, une régression de la thrombocytose n'avait pu être observée en l'absence de traitement étiologique efficace chez ce patient et la persistance de l'inflammation. Chez les 3 autres patients, la recherche de mutation *JAK2V617F* et la culture de progéniteurs étaient négatives. Parmi ces patients, les manifestations cliniques étaient parfois atypiques notamment un syndrome de Budd Chiari, une thrombose de la veine centrale de la rétine. L'absence de contexte inflammatoire et de carence en fer était confirmée pour 2 patients, et non recherchée pour le 3^{ème}. Pour l'un des patients, la thrombocytose était constante depuis 2005. Chez 3 patients, d'autres examens (ferritine, CRP, suivi, éventuellement BOM) auraient probablement dû être réalisés pour trouver la cause de thrombocytose réactionnelle éventuelle ou pour exclure avec certitude une TE. Nous avons pu obtenir l'ADN de 5 patients au diagnostic douteux. La

recherche de mutations de *MPL* était ininterprétable pour 2 patients, négative pour 2 autres et positive pour l'un d'eux.

En parallèle, l'observation des hémogrammes a montré une polyglobulie supérieure aux valeurs normales définies selon les sexes mais inférieure aux valeurs seuils établies par la classification OMS chez 3 patients. Les cultures de progéniteurs réalisées chez les 3 patients, sont positives chez deux d'entre eux. Pour l'un d'eux, une formation des progéniteurs érythrocytaires a été observée dans la moelle, et des colonies mégacaryocytaires dans le sang pour le second. Cependant, aucune autre exploration (VG, dosage d'EPO, exon 12...) n'a été réalisée.

4.1.2. Patients avec anomalies de l'hémogramme

Deux cent vingt sept patients présentaient des anomalies de l'hémogramme telles des polyglobulies, des thrombocytoses mais également des hyperéosinophilies, des hyperleucocytoses, des anémies, des bicytopénies pouvant être associées à une splénomégalie et d'éventuels symptômes d'hyperviscosité sanguine.

4.1.2.1. Les polyglobulies

Concernant les 157 patients explorés pour polyglobulie, 71 cas ont montré une normalisation de l'hémoglobine et/ou un VG isotopique normal sans traitement de type cytoréducteur ou saignée mais parfois avec un traitement spécifique de la cause étiologique (traitement de la tumeur rénale, réhydratation, appareillage d'un syndrome d'apnée du sommeil...). L'élimination de la polyglobulie de Vaquez semble sensée. D'autant plus, elle est associée à l'absence de mutation *JAK2V617F*.

Parmi les 86 patients chez qui la polyglobulie persistait, on comptait 12 femmes.

Sept femmes avait un taux d'hémoglobine >165g/l ou un VG>120% correspondant à un critère majeur défini par l'OMS 2008. Ainsi l'exclusion d'une PV dans ces cas nécessite soit la négativité des autres critères majeurs (*JAK2V617F* et exon 12) associée à la négativité des 2 critères mineurs (EPO, culture ou BOM) soit la négativité des 3 critères mineurs. Hors, aucune recherche de mutations de l'exon 12 de *JAK2* n'avait été réalisé chez ces patientes. Une seule patiente avait eu les 3 critères mineurs réalisés dont une BOM sans aspect typique de PV. Le dosage de l'érythropoïétine, réalisée chez ces sept femmes polyglobuliques, était normal. La culture de progéniteurs, réalisée chez 5 patientes, était négative. Ainsi, l'exclusion de la PV selon les critères de l'OMS 2008 était sous réserve de la réalisation de la recherche

de mutations de l'exon 12 de *JAK2* chez 6 patientes polyglobuliques selon l'OMS et d'un autre critère mineur chez 2 d'entre elles.

Concernant les 5 patientes polyglobuliques mais dont le taux d'hémoglobine ne dépassait pas le seuil de 165g/l, le taux d'érythropoïétine était effondré chez 2 d'entre elles. Chez ces 2 patientes, l'hémoglobine était respectivement de 160 et 163 g/l, le volume globulaire isotopique n'avait pas été réalisé. Les cultures de progéniteurs étaient négatives. Un doute peut subsister quand au diagnostic de ces 2 patientes devant un taux d'érythropoïétine subnormal et 2 critères majeurs de polyglobulie pas totalement écartés.

De la même manière chez les 74 hommes, 37 patients avaient une hémoglobine supérieure à 185g/l ou un volume globulaire isotopique supérieur à 120%. La recherche de mutations de l'exon 12 de *JAK2* a été pratiquée chez 2 patients et retrouvée négative. De plus, l'érythropoïétine normale et la culture de progéniteurs négative ont permis de conclure à une absence de NMP Ph- chez ces 2 patients. L'érythropoïétine a été dosée chez 34 patients, aucun taux inférieur à la normale n'a été observé. La BOM réalisée chez 5 patients montrait une hyperplasie érythroblastique unique ou un aspect normal de la moelle. Chez 25 patients les cultures de progéniteurs ont été réalisées. On note la présence d'une pousse spontanée de colonies de mégacaryocytes dans le sang chez l'un d'eux et de colonies érythrocytaires dans la moelle d'un autre patient polyglobulique. Ainsi au total, le diagnostic de PV a été exclu chez 6 patients selon l'OMS. Chez les autres polyglobuliques, subsistait un doute en l'absence de résultat sur la mutation exon 12 et/ ou un critère mineur (EPO, culture de progéniteurs, BOM).

Chez 37 patients masculins, l'hémoglobine observée ne dépassait pas 185g/l. L'érythropoïétine n'a pas été réalisée chez 8 patients. Trois présentaient des taux inférieurs à la normale. La culture de progéniteurs a été réalisée chez 25 patients et 2 patients présentaient une pousse des mégacaryocytes dans le sang. Chez ces 3 patients présentant un critère mineur, la mutation de l'exon 12, le volume globulaire isotopique ni la BOM n'avaient été réalisées.

4.1.2.2. Les thrombocytoses

Parmi les 49 patients explorés pour thrombocytose, tous ont eu une recherche de mutation *JAK2V617F*. Vingt six ont eu de manière simultanée une culture de progéniteurs. Le dossier complet n'a pas été consulté pour 1 patient. Pour 30 patients, les critères OMS permettent d'exclure un diagnostic de TE. En effet, les patients ont eu soit une normalisation plaquettaire

(traitement d'une carence en fer, d'une maladie auto-immune, diminution de l'inflammation après une chirurgie lourde...) soit une exploration de la moelle qui n'a pas révélé d'aspect anormal.

Pour dix huit patients, le diagnostic final selon les critères de l'OMS reste incertain. Pour 14 patients, le diagnostic de TE a été exclu sur la base de l'absence de mutation *JAK2V617F* et d'une culture négative. Par contre, aucune cause secondaire (inflammation, fer..) n'avait été identifiée. Quatre patients n'avaient pas eu de dosage de ferritine et trois patients n'avaient pas eu de marqueur de l'inflammation (CRP ou VS). De plus, en cas d'hyperplaquettose secondaire détectée, une normalisation plaquettaire doit être obtenue après traitement. En effet, l'OMS précise qu'une hyperplaquettose réactionnelle n'exclut pas une TE associée. Neuf patients n'ont pas eu de suivi à la suite de l'hypothèse réactionnelle de leur thrombocytose. Sur ces 18 patients, aucun n'a bénéficié d'une BOM malgré l'intérêt diagnostique de cet examen. Deux patients présentaient une culture positive sans mutation de *JAK2V617F*.

Les 21 patients explorés sur la base d'anomalie(s) de l'hémogramme (hyperéosinophilies, bicytopenies...) n'ont pas été étudiés quant à l'application des critères OMS.

4.2. Cas de diagnostic non posé

Pour 13 patients, le diagnostic final n'avait pas été posé à la date de fin de recueil. Le nombre de thrombocytoses sans *JAK2V617F* en suivi parmi ces cas (9/13) montre bien la difficulté pour poser un diagnostic de certitude en l'absence de test sensible et spécifique de la TE.

4.3. Mutations *JAK2V617F* et autres hémopathies

Soixante dix patients ont eu une recherche de mutation *JAK2V617F* et/ou une culture de progéniteurs hématopoïétiques afin d'écartier un NMP ou afin de caractériser leur hémopathie. Le Tableau 14 montre le résultat de la mutation *JAK2V617F* et/ou de la culture de progéniteurs. On note que 2 des 14 LMC diagnostiquées avaient des plaquettes isolées au diagnostic ou associées à une hyperleucocytose à 21G/l sans myélémie. Avant leur diagnostic, quatre syndromes lymphoprolifératifs ont été suspectés de NMP Ph- car révélés pour 2 d'entre eux par une thrombocytose, ou par une splénomégalie ou encore une hyperéosinophilie.

		Mutation <i>JAK2V617F</i>				Culture de progéniteurs hématopoïétiques			
		+(%)	-	NR	Total	+(%)	-	NR	Total
NMP	LMC	0 (0%)	11	3	14	8(100%)	0	6	14
	Mastocytose	0 (0%)	1	0	1	0 (0%)	1	0	1
	NMP éo	0	1	0	1	/	/	1	1
SMD		3(15%)	17	0	20	1(12.5%)	7	12	20
LAM et Sarcome myéloïde		1(12.5%)	6	0	7	0(0%)	2	5	7
NMP/SMD	LMMC	2(20%)	8	0	10	1(50%)	1	8	10
	RARS-T	3(75%)	1	0	4	1(25%)	3	0	4
	LMCa	0(0%)	1	0	1	0(0%)	1	0	1
	Autres	2(100%)	0	0	2	1(100%)	0	1	2
Pathologies lymphoïdes	SLP	0(0%)	4	0	4	0(0%)	1	3	4
	MM	0 (0%)	2	2	4	0(0%)	3	1	4
	LAL	0(0%)	2	0	2	/	/	2	2

Tableau 14: Récapitulatif des résultats de la mutation *JAK2V617F* et des cultures de progéniteurs en fonction des hémopathies. NMP Néoplasme myéloprolifératif ; SMD syndrome myélodysplasique ; SLP Syndrome Lymphoprolifératif ; MM Myélome multiple ; LAL Leucémie aiguë Lymphoblastique ; LAM : Leucémie aiguë myéloblastique ; LMC Leucémie Myéloïde Chronique ; LMCa Leucémie Myéloïde Chronique atypique ; RARS-T Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose marquée ; NMP éo : Néoplasme à éosinophiles, non documenté en mutations *FGFR1*, *PDGFRA*, *PDGFRB* ; NR : Non réalisé.

5. Place de la culture de progéniteurs hématopoïétiques dans le diagnostic des NMP Philadelphie négatif

5.1. Apports de la culture des progéniteurs hématopoïétiques vis-à-vis du statut mutationnel *JAK2V617F*

5.1.1. Dans la polyglobulie de Vaquez

La formation endogène de colonies érythroïdes ou mégacaryocytaires sur la moelle et/ou le sang a été recherchée chez 102 patients. La pousse spontanée des colonies hématopoïétiques est présente chez 89 patients atteints de PV soit 87.26%, indépendamment du type de prélèvement ou du type de pousse. Ce pourcentage est de 83.64%, 90.48%, 100% et 81.82% respectivement pour les sites du CHU de Grenoble, de Chambéry, d'Annecy et de l'IDH.

En outre, nous avons recherché à déterminer la concordance entre la présence d'une culture positive et la présence d'une des mutations JAK2 (*JAK2V617F* et JAK2 exon 12). 101 patients ont eu les 2 recherches. La proportion de mutation JAK2 positive et de pousses de progéniteurs hématopoïétiques dans cette population sont respectivement de 90.1% et de 87,13%. On n'observe pas de différence significative entre la capacité *in vitro* de former des colonies endogènes et la présence de mutation dans les gènes codant pour JAK2 (test de Mac Nemar pour des séries appariées, *p value*=0.60) parmi cette population.

5.1.2. Dans la thrombocytémie essentielle

La culture de progéniteurs érythrocytaires et mégacaryocytaires a été réalisée chez 190 patients sur des prélèvements de moelle et/ou sang. Une formation spontanée des colonies érythrocytaires et/ou mégacaryocytaires a été retrouvée chez 81.6% (155/190) des patients. Chez ces 190 patients, la proportion de patients *JAK2V617F* mutés est de 67.9% (129/190). La proportion de pousse des progéniteurs hématopoïétiques chez les patients atteints de TE est significativement supérieure à la proportion de patients *JAK2V617F* positif (test de Mac Nemar, *p value*<0.05 au risque $\alpha=0.05$). 41 patients (21.6%) n'ayant pas la mutation *JAK2V617F* détectée sont positifs en culture sur sang et/ou moelle. 20 patients (10.5%) atteints de TE sont négatifs à la fois en culture et en *JAK2V617F*.

5.1.3. Dans la myélofibrose primitive

La culture de progéniteurs a été réalisée chez 15 patients atteints de myélofibrose primitive. La proportion de myélofibrose JAK2 positive dans cette population est de 53.3% (8/15) tandis

que la proportion de cultures de progéniteurs positives est de 60% (9/15). Cependant, aucun test statistique n'a pu être réalisé devant les petits effectifs des discordants.

5.2. Facteurs de variabilité de la pousse endogène de progéniteurs hématopoïétiques

5.2.1. Influence du type de prélèvement

Parmi les 102 PV pour lesquelles une pousse spontanée hématopoïétique a été recherchée, 44 patients ont eu à la fois une culture sur moelle et sur sang, 16 patients uniquement sur la moelle et 42 uniquement sur le sang. Seuls les résultats des patients ayant eu les 2 types de prélèvements ont été comparés. La formation de colonies endogènes hématopoïétiques, indépendamment du type de progéniteurs observés, ne dépend pas significativement du type de prélèvement (respectivement 79.54% et 81.8% dans le sang et la moelle, test de Mac Nemar, $p\text{ value}=1$ au risque $\alpha=0.05$). Toutefois, lors d'une pousse à la fois dans la moelle et le sang, le calcul de la probabilité exacte du test de Mac Nemar montre une tendance non significative de la formation de colonies érythrocytaires supérieure dans la moelle (45.2%) par rapport au sang (22.6%) ($p\text{ value}=0.07$ au risque $\alpha=0.05$). Au contraire, on n'observe pas de différence significative de formation de progéniteurs mégacaryocytaires entre la moelle (90.3%) et le sang (100%) (Test de Mac Nemar, $p\text{ value}=0.24$ au risque $\alpha=0.05$).

Parmi les 190 patients atteints de TE ayant eu une culture de progéniteurs hématopoïétiques, 76 ont eu une recherche à la fois sur le sang et sur la moelle osseuse. La comparaison de ces 2 types de prélèvement montre une différence significative de pousse des colonies (test de Mac Nemar, $p\text{ value}<0.05$ au risque $\alpha=0.05$). En effet, 81.6% des cultures montrent une formation *in vitro* dans le sang contre 67.1% sur prélèvement de moelle osseuse.

Concernant les myélofibroses primitives, aucune analyse statistique du type de prélèvement n'a pu être réalisée devant les petits effectifs. En effet, seuls 3 patients ont eu des prélèvements à la fois dans la moelle et le sang.

5.2.2. Colonies spontanées mégacaryocytaires versus érythrocytaires

5.2.2.1. Dans la polyglobulie de Vaquez

Parmi les 102 patients atteints de PV dont la recherche de colonies spontanées hématopoïétiques a été réalisée, nous avons cherché à savoir si la formation *in vitro* de colonies spontanées était de type mégacaryocytaires ou érythroïdes ou les deux. Au total, 86 prélèvements de sang et 60 de moelle ont été réalisés. Chez les 44 patients qui ont eu les 2

prélèvements, le sang et la moelle sont positifs chez 31 patients. Le Tableau 15 montre un récapitulatif des pousses observées en fonction du prélèvement de moelle ou de sang.

Sur les 102 patients, 31.4% (32/102) montrent une pousse érythrocytaire quel que soit le type de prélèvement. Dans le sang, les progéniteurs mégacaryocytaires poussent significativement mieux que les progéniteurs érythrocytaires (respectivement 71/86 (82.5%) et 8/86 (9.3%), test de Mac Nemar, $p\text{ value}<0.05$). On remarque qu'avec les techniques utilisées, aucune pousse spontanée de progéniteurs uniquement érythrocytaires n'a été retrouvée dans le sang chez les patients atteints de polyglobulie de Vaquez. Dans la moelle, on observe 66.67% de pousses mégacaryocytaires et 48.3% de pousses érythrocytaires. Cette différence de pousses de progéniteurs est à la limite de la significativité (test de Mac Nemar, $p\text{ value}=0.06$).

Type de prélèvement	Moelle positive uniquement	Sang positif uniquement	Moelle et sang positifs		Somme
			Résultat moelle	Résultat sang	
Type de progéniteurs positifs					
CFU-Meg	3	39	17	24	83
CFU-E	6	0	3	0	9
CFU-Meg et CFU-E	9	1	11	7	28
Somme	18	40	31	31	120

Tableau 15: Répartition du type de pousses spontanées de progéniteurs hématopoïétiques en fonction du type de prélèvement chez les patients atteints de PV.

D'autre part, le Tableau 16 montre le type de pousses de progéniteurs hématopoïétiques observées en fonction du site de suivi des patients et du type de prélèvements. On note que les prélèvements positifs uniquement en progéniteurs érythroïdes, proviennent majoritairement de patients suivis au CHU de Grenoble. Parmi les cultures positives en moelle, on note que 70.37% des patients provenant du CHU de Grenoble montre une pousse en progéniteurs érythroïdes pure ou associée à une pousse en mégacaryocytes, contre 45% chez les patients provenant des autres sites (IDH, CH Chambéry, CH Annecy). Cependant le test du χ^2 ne

montre pas de différence significative de la pousse en progéniteurs érythrocytaires en fonction du site de prélèvement (p -value=0.14 au risque $\alpha=0.05$). Concernant les cultures positives dans le sang, on n'observe pas de différence significative de pousse globale de progéniteurs hématopoïétiques entre le CHU de Grenoble et les autres sites de l'arc alpin (test du χ^2 , p value=0.1 au risque $\alpha=0.05$). Toutefois, une tendance est observée et mériterait d'être approfondie.

Sites de l'arc alpin Résultats des cultures	IDH		Annecy		Grenoble		Chambéry		Somme
	M	Sg	M	Sg	M	Sg	M	Sg	
CFU-Meg	0	9	2	10	8	28	10	16	83
CFU-E	0	0	1	0	8	0	0	0	9
CFU-E et CFU-Meg	0	0	3	0	11	5	6	3	28
Cultures négatives	1	2	0	0	8	11	2	2	26
Nombre de prélèvements réalisés	1	11	6	10	35	34	18	21	146
Nombre de patients ayant eu des cultures prescrites	11		15		55		21		102

Tableau 16: Répartition du type de pousses spontanées de progéniteurs hématopoïétiques en fonction du type de prélèvement et du site de prélèvement chez les patients atteints de polyglobulie de Vaquez. M : Moelle ;Sg :Sang

5.2.2.2. Dans la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose idiopathique

La Tableau 17 montre la répartition des types de colonies responsables de la positivité *in vitro* dans la thrombocytémie essentielle en fonction du prélèvement. Les 201 prélèvements positifs ont été étudiés correspondant à 155 patients. En effet, 46 patients ont un résultat de culture positif dans la moelle et dans le sang.

Nous avons comparé les différents types de pousses selon les types de prélèvements. Concernant la moelle, une différence de pousse significative est observée (test de Mac Nemar, p value<0.05). En effet, parmi les 113 prélèvements de moelle réalisés, 57 (50.4%) étaient positifs grâce à une pousse spontanée uniquement mégacaryocytaires, 19 (16.8%) étaient liés à une pousse des composants mégacaryocytaires et érythroblastiques et 2 cas (1.77%)

montrait une formation spontanée uniquement de colonies érythroblastiques. Concernant le sang, de la même manière, les cultures positives sont liées majoritairement à une pousse de mégacaryocytes (80.4%) par rapport aux colonies érythroblastiques (8.5%) (test de Mac Nemar, $p\text{ value}<0.05$). De la même manière que pour les polyglobulies de Vaquez, avec les techniques utilisées, aucune pousse spontanée de progéniteurs érythrocytaires n'a été retrouvée dans le sang.

Nous avons sélectionné un sous groupe de 35 TE ne possédant pas la mutation *JAK2V617F* mais présentant une pousse de progéniteurs mégacaryocytaires. La proportion de mutation *MPL* dans ce sous groupe est de 40% (14/35) pour une fréquence moyenne de 3% des TE (136). Ainsi, la culture de progéniteurs pourrait permettre de cibler les recherches de mutation de *MPL*.

Concernant les myélofibroses primitives, seules des pousses mégacaryocytaires ont été observées de manière indépendante du type de prélèvements.

Type de prélèvement	Moelle positive uniquement	Sang positif uniquement	Moelle et sang positifs		Somme
			Résultat moelle	Résultat sang	
CFU-Meg	26	75	31	35	167
CFU-E	1	0	1	0	2
CFU-Meg et CFU-E	5	2	14	11	32
Somme	32	77	46	46	201

Tableau 17: Répartition du type de pousses spontanées de progéniteurs hématopoïétiques en fonction du type de prélèvement chez les patients atteints de TE

5.2.2.3. Dans les érythrocytoses idiopathiques

Parmi les 19 érythrocytoses idiopathiques, 17 patients ont eu des analyses de cultures de progéniteurs hématopoïétiques dont 11 à la fois dans la moelle et le sang, 3 uniquement dans la moelle et 3 uniquement dans le sang. 4 (23.5%) patients ont montré une pousse spontanée

dont 2 sur un prélèvement de moelle et 2 au niveau du sang. Aucune colonie érythrocytaire pure ou associée à une pousse mégacaryocytaire n'a été observée dans le sang. Au contraire, les 2 moelles positives montraient une pousse érythrocytaire pure. Au niveau de la moelle, les formations érythrocytaires étaient significativement plus importante dans la polyglobulie de Vaquez (48.3%) par rapport à l'érythrocytose idiopathique (14.3%) (test du χ^2 , p value=0.04, au risque $\alpha=0.05$).

5.2.3. Culture de progéniteurs versus diagnostic posé

Pour certains patients, une formation endogène de progéniteurs a été retrouvée positive en l'absence de diagnostic de NMP Ph-. L'analyse de ces cas a permis d'identifier 3 situations différentes : les hémopathies hors NMP Ph-, les manifestations cliniques, les anomalies de l'hémogramme.

5.2.3.1. Les hémopathies hors NMP Philadelphie négatif

En effet, la formation spontanée *in vitro* de progéniteurs hématopoïétiques n'est pas spécifique des NMP Philadelphie négatif classiques et peut s'observer dans d'autres hémopathies comme cela a déjà été décrit dans la littérature (226, 227).

Dans notre étude, 14 leucémies myéloïdes chroniques ont eu une recherche de *JAK2V617F* parmi lesquels 9 cas ont eu parallèlement une culture spontanée prescrite. 3 patients ont eu une culture à la fois dans le sang et dans la moelle. 100% des cultures ont montré une formation spontanée de progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* dans la moelle et dans le sang chez ces patients porteurs du transcrit bcr-abl. Aucune formation spontanée érythroblastique n'a été observée sur les 9 prélèvements sanguins.

De plus, parmi les néoplasmes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs, 1 de LMMC sur les 2 montrait une pousse de progéniteurs mégacaryocytaires à la fois dans le sang et dans la moelle. On note que la LMMC proliférante *in vitro* était également *JAK2V617F* positive. De plus, l'OMS 2008 définit une entité provisoire appelée anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose marquée (RARS-T) (29) comme appartenant aux néoplasmes myélodysplasiques/myéloprolifératifs. Parmi les 4 RARS-T de l'arc alpin, 3 étaient porteuses de la mutation *JAK2V617F* et une seule a montré une pousse de progéniteurs mégacaryocytaires sur la moelle osseuse. Un cas de NMP/SMD inclassable montrait la présence de la mutation *JAK2 V617F* de manière simultanée à une pousse sanguine de progéniteurs mégacaryocytaires.

Six syndromes myélodysplasiques ont eu une recherche de *JAK2V617F* associée à une recherche de progéniteurs spontanés dans la moelle et/ou le sang. La présence de la mutation *JAK2V617F* a été retrouvée chez 2 patients. Chez un patient, elle était concomitante à la pousse spontanée mégacaryocytaire sur le sang. A l'inverse, aucune pousse spontanée ni mutation *JAK2V617F* n'ont été détectée parmi les 6 autres patients.

5.2.3.2. Les accidents thrombo-emboliques

Sept patients sur les 80 patients ayant eu des cultures et une exclusion de NMP Ph- (8.75%), avec un tableau clinique d'accidents vasculaires, se caractérisaient par une culture de progéniteurs positive dans la moelle ou le sang, en l'absence de mutation *JAK2V617F*. Les manifestations cliniques étaient 2 cas d'infarctus splénique, une thrombose porte, une thrombose porte et mésentérique, 2 thromboses veineuses périphériques compliquées d'embolies pulmonaires, et une ischémie digestive. Les 2 patients positifs dans la moelle montraient des colonies érythroblastiques pures et les 5 autres patients présentaient des pousses mégacaryocytaires sanguines. Deux patients avaient une polyglobulie inférieure aux valeurs seuils définies par l'OMS. Aucune mesure du volume globulaire, ni recherche de mutation de l'exon 12, ni dosage d'érythropoïétine n'avaient été réalisés pour confirmer ces 7 faux positifs. Un patient avait une thrombocytémie associée à une CRP augmentée. L'évolution dans le temps de cette thrombocytémie n'est pas connue.

5.2.3.3. Discordance clinico-biologique

Cette situation regroupe les patients présentant une formation endogène de colonie mais pour lesquels un diagnostic de NMP, d'autres hémopathies ou d'EI n'a pas été retenu.

Quinze patients sur 153 (9.8%) avaient montré une pousse de colonies érythroblastiques et/ou mégacaryocytaires associée à une anomalie de l'hémogramme. Parmi ces patients, 8 présentaient une polyglobulie, 4 une thrombocytose, un patient présentait une bicytopénie. Sur les 4 « faux positif » de culture dans un contexte de thrombocytoses, 2 faux positif étaient confirmés devant une normalisation sans traitement des plaquettes pour l'un et une BOM réalisée qui n'était pas en faveur pour l'autre. Les 2 autres patients ne répondaient pas aux critères de l'OMS. Une carence martiale pouvait être suspectée chez l'une des patientes devant une anémie microcytaire associée à cette forte thrombocytémie à 1000G /l. Un suivi n'a pu être fait. Les deux possibilités sont un faux positif ou une TE associée à une carence martiale. La pousse spontanée sanguine était toutefois très faible avec une seule colonie de mégacaryocytes ce qui serait plus en faveur d'un faux positif du à une thrombocytémie

réactionnelle. Cependant, aucune des hypothèses ne pourra être confirmée car la patiente est à ce jour décédée. Le deuxième patient est un patient de 41 ans, de sexe masculin présentant une splénomégalie associée à une thrombocytose. La ferritine était normale et le statut inflammatoire n'est pas connu. Aucune BOM ou exploration supplémentaire n'ont été réalisées. Trois colonies mégacaryocytaires poussaient dans le sang périphérique.

Parmi les 8 patients polyglobuliques dont le diagnostic de NMP Ph- n'a pas été retenu, aucune recherche de mutations de l'exon 12 n'a été réalisée. Un patient montrait une pousse érythrocytaire dans la moelle tandis que les 7 autres montraient une pousse mégacaryocytaire dans le sang. Quatre patients avaient un très faible taux de pousse correspondant à une colonie pour 200000 CMN. Pour ces 4 patients, le dosage d'EPO était normal. Deux patients ont vu une normalisation de leur taux d'hémoglobine, les 2 autres ne dépassaient pas les seuils de l'OMS. La BOM n'avait pas été effectuée. Les arguments semblent être en faveur de faux positif sous réserve de la mutation de l'exon 12. Sur les 4 autres patients susceptibles d'être des faux positifs, 2 respectaient un critère majeur de l'OMS devant leur taux d'hémoglobine ou la mesure de leur VG. Leur taux d'érythropoïétine était normal. L'un d'eux avait bénéficié d'une BOM d'aspect non caractéristique d'une PV selon l'OMS. Ainsi de la même manière, l'ensemble des arguments semblent être en faveur de faux positif sous réserve de la mutation de l'exon 12. Les 2 patients polyglobuliques avec un taux d'hémoglobine inférieur à celui requis par l'OMS devraient également être confirmés par la recherche de mutations de l'exon 12.

La patiente, présentant une bicytopenie et dont le diagnostic de NMP Ph- n'a pas été retenu, n'a pas eu de recherche de mutation *JAK2V617F* et présentait une pousse érythrocytaire médullaire. La patiente âgée n'est plus revenue en consultation depuis l'analyse.

5.2.4. Analyses de culture de progéniteurs réalisées en doublon

La culture de progéniteurs a parfois été réalisée plusieurs fois pour un même patient à des temps différents. Vingt trois patients ont eu des cultures de progéniteurs au moins deux fois dont 5 patients en triple et deux en quadruple. Seules les analyses utilisant le même milieu de culture ont été comparées, un patient atteint de NMP a donc été exclu. Quatorze patients sont atteints de NMP et/ou NMP/SMD. Deux patients diagnostiqués comme atteints d'érythrocytose idiopathique et 6 patients comme non porteurs d'hémopathie. On note 3 discordances (21.4%) sur 15 patients atteints de NMP ou NMP/SMD et 6 discordances (40%) chez les patients non atteints de NMP Ph -. Cependant, l'incertitude de la technique ne peut

être appréciée dans cette étude en raison d'un recrutement insuffisant. De plus, les diagnostics évoqués peuvent être eux même biaisés par ses discordances. En outre, le temps écoulé entre les 2 prélèvements discordants est en moyenne de 2 ans (de 1 mois à 7 ans). Ainsi, une probable évolution de la maladie, de la clinique ou l'adjonction de traitements éventuels peuvent modifier les résultats observés entre les 2 prélèvements.

Partie 4 : Discussion et Perspectives

Huit cent quatre vingt deux patients provenant de l'arc alpin (CH d'Annecy, CH de Chambéry, CHU de Grenoble et Institut Daniel Hollard) ont eu une prescription de cultures de progéniteurs et/ou une recherche de mutation *JAK2V617F* au laboratoire d'Hématologie du CHU de Grenoble entre le 1^{er} Janvier 2007 et le 31 Décembre 2010. Parmi cette population, 410 sujets ont eu un diagnostic de NMP Ph- : 141 PV, 234 TE, 32 MFP et 3 NMP inclassables. L'âge au moment de l'analyse, le sexe, les complications potentiellement liées à la maladie, la dernière prise en charge mise en place ont été recensées. Il apparait néanmoins difficile de rapporter ces données à la période d'évaluation. En effet, certains patients ont bénéficié de la recherche de mutation *JAK2V617F* plusieurs années après leur diagnostic. De la même manière, aucune analyse de prévalence et d'incidence n'a pu être réalisée devant le biais de sélection des patients.

Dans l'arc alpin, les 141 polyglobulies de Vaquez analysées montrent une légère prédominance masculine (sex ratio M/F=1.56). L'âge moyen de notre population est de 66.03 ans mais ne correspond pas tout à fait à l'âge au moment du diagnostic. 57% des patients ont eu des complications. Les complications hématologiques touchent 4.5% des patients, avec 1.5% de myélofibroses post-PV et 3% de transformations leucémiques et/ou myélodysplasiques. Il est toutefois délicat de relier ces données à la période de suivi et aux traitements antérieurs éventuels utilisés. Quarante quatre pour cent des patients ont eu un accident thrombotique artériel ou veineux et 7.5 % un accident hémorragique sévère. L'hydroxyurée est le traitement majoritairement prescrit (80.9%) suivi du pipobroman (10.7%). L'interféron alpha pégylé, ne possédant pas l'AMM, reste peu prescrit dans cette indication (0.8%). Malgré une recommandation de prescription pour toutes les PV quel que soit le risque, seuls 58.8% des patients dans la population étudiée sont traités par antiagrégant plaquettaire. On peut noter que 34 patients sur les 120 patients traités par molécules potentiellement leucémogènes (hydroxyurée, pipobroman) avaient moins de 60 ans.

Deux cent trente quatre diagnostics de TE ont été retenus dans l'arc alpin. On note une prédominance féminine (sex ratio M/F=0.65) concordante avec les données de la littérature. Les complications thrombotiques observées touchent 32.4% des patients. L'acutisation est une complication rare (0.4%) dans notre population et 3% des patients atteints de TE ont évolué en myélofibrose post-TE. L'hydroxyurée est le traitement de référence prescrit dans 61.4% des cas. Comme pour la PV, l'interféron alpha pégylé est peu prescrit (0.5%) et 34.1%

des patients traités par hydroxyurée ont de moins 60 ans. Un traitement antiagrégant plaquettaire est prescrit dans 73.2% des cas, seul ou en association avec un cytoréducteur.

Les 32 myélofibroses primitives sont majoritairement de sexe masculin (sex ratio M/F=2.55). Une forte proportion d'acutisation en LAM (16%) et de décès (15%) est observée. L'hydroxyurée est utilisée chez 48.1 % des patients. Le pourcentage de *JAK2* mutée dans les 32 MFP de l'arc alpin est de 59.4%. En parallèle, on constate que 31 % des patients portaient au moins une anomalie caryotypique. Toutefois, les données sont peu extrapolables aux données internationales devant le petit nombre de patients atteints.

Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux différents marqueurs biologiques exploitables dans le diagnostic des NMP Ph-. Entre autres, la place de la mutation *JAK2V617F* et de la culture de progéniteurs hématopoïétiques dans l'arc alpin ont été analysées en fonction du diagnostic posé.

Dans notre population, 91.43% des patients PV sont en moyenne *JAK2V617F+*, ce qui correspond aux pourcentages moyens de la littérature. La population mutée au niveau de l'exon 12 de *JAK2* est peu représentée (0.7%, contre 1% à 5% dans la littérature). A l'inverse, le pourcentage de TE porteuse de la mutation *JAK2V617F* est de 68.8%. Cette donnée semble légèrement supérieure aux données internationales qui sont plutôt de l'ordre de 50% à 60% (95). De plus, on constate des variations significatives selon les sites. En effet, les pourcentages sont respectivement de 59.45%, 55.1%, 68.58% et 77.8% pour le CH d'Annecy, le CH de Chambéry, l'Institut Daniel Hollard et le CHU de Grenoble. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la fréquence élevée de TE *JAK2* mutées dans notre étude : des PV ont été possiblement classées à tort en TE, des TE *JAK2-* ont été écartées sans respecter les critères de l'OMS, ou la technique utilisée est très sensible.

Deux arguments sont en faveur de la première hypothèse. Dans notre population atteinte de TE, 4 patients montraient des taux d'hémoglobine supérieure au seuil défini par l'OMS. Cinq patients, présentant une carence martiale ou un VGM microcytaire associé(e) à la mutation *JAK2V617F*, n'avaient pas été supplémentés en fer.

Cependant, l'explication du pourcentage élevé de *JAK2V617F* semble mixte. En effet, chez 21 patients, un diagnostic de TE a été écarté mais restait incertain selon les critères de l'OMS et 9 patients présentant une thrombocytose sans mutation *JAK2V617F* sont en errance diagnostique. La recherche de mutation *MPL* réalisée chez 4 patients, dont le diagnostic de

NMP n'a pas été retenu, était positive pour l'un d'entre eux. La difficulté pour poser un diagnostic de TE est liée à l'absence de marqueur sensible et spécifique d'une thrombocytose clonale. La mutation *JAK2V617F* offre une aide au diagnostic de TE et permet un gain de temps dans l'affirmation du processus clonal. En l'absence de marqueur de clonalité, le diagnostic d'exclusion est délicat et plus long avec un risque de patients perdus de vue plus important. De plus, les patients, présentant une thrombocytose à l'hémogramme, ne sont pas toujours suivis par des hématologues. Par exemple, ils sont parfois pris en charge par des chirurgiens vasculaires ou des hépatogastroentérologues en cas d'ischémie digestive ou de thrombose mésentérique plus intéressés à juste titre par les complications, mettant parfois en jeu le pronostic vital, que par l'étiologie. L'état inflammatoire associé à ces manifestations cliniques peut faire penser à une thrombocytose réactionnelle. De plus, des TE ont été exclues par l'absence de mutation *JAK2V617F* associée à l'absence de culture de progéniteurs. Or dans notre population, 10.5% des TE sont négatives à la fois en *JAK2V617F* et en culture (pourcentage probablement sous estimé).

Cependant, une étude française réalisée sur la région Côte d'Or, montre également une forte proportion de TE mutée (76% *JAK2V617F*+ réalisée sur 79 TE) (8). Leurs hypothèses sont basées sur le faible nombre de TE dans leur étude ainsi que sur la performance de leur technique de détection de *JAK2V617F* (PCR allèle spécifique avec des amorces différentes de celles utilisées sur Grenoble), réalisée avant tout traitement cytoréducteur. En effet, des différences de détection de *JAK2V617F* semblent notables selon la technique utilisée (228). La purification des polynucléaires pour la recherche de la mutation augmente certainement la sensibilité de la technique de PCR utilisée à Grenoble en diminuant la dilution des polynucléaires par les cellules non mutées. Cette étape préanalytique permet certainement l'identification de TE avec de très faible charge d'allèles mutés malgré l'absence de technique de PCR quantitative.

Concernant la culture de progéniteurs hématopoïétiques, une formation endogène de colonies érythroïdes et/ou mégacaryocytaires est observée dans 87.26% (89/102) des PV, indépendamment du type de prélèvement. Toutefois, une pousse endogène de CFU-E n'est observée que dans 31.4% PV. Or, selon les critères de l'OMS, seule une formation spontanée *in vitro* de progéniteurs érythroïdes est considérée comme critère diagnostique. Dans la littérature, une formation spontanée de progéniteurs érythroïdes est décrite dans 67% à 100% des PV (181, 217, 229). Ces différentes études étaient réalisées sur relativement peu de patients (effectif de 20). De plus, peu d'études ont été réalisées depuis la découverte de

JAK2V617F et l'apparition des critères OMS 2008. Deux équipes ont montré 100% de pousses spontanées de BFU-E, cultivées en milieu composé de méthylcellulose, chez les 42 et les 22 PV analysées (230, 231). Une corrélation est également observée entre la formation de colonies endogènes érythroïdes (94.1%) et la mutation *JAK2V617F* chez 51 PV (232). Le laboratoire du CHU de Grenoble utilise une technique française standardisée appliquée par les sites français réalisant des cultures de progéniteurs (217). Le laboratoire participe à des comparaisons interlaboratoires organisées dans le cadre de programmes d'évaluation externe de la qualité depuis 1999. Les résultats de l'évaluation externe de la qualité sont surveillés et ne montrent pas de dérives par rapport aux autres centres, ce qui ne suggère pas une origine technique à cette sensibilité très moyenne. Toutefois, d'autres milieux commerciaux devront être testés afin d'optimiser la pousse de progéniteurs érythroblastiques. On peut noter qu'il n'existe pas de contrôle de qualité de pousses spontanées. A l'inverse, la pousse de colonies mégacaryocytaires observée (81.4%) dans notre population de PV semble plus importante que dans d'autres études (de 36% à 59%) (230).

Afin d'optimiser la prescription, nous nous sommes intéressés à l'influence de différents paramètres sur la pousse de progéniteurs dans la PV. Avec la technique actuellement utilisée, la moelle et le sang donnent le même résultat si on considère l'ensemble des progéniteurs hématopoïétiques (*p value*=1). Toutefois, si on s'intéresse aux colonies spontanées érythroïdes, le prélèvement de moelle semble mieux adapté que le sang, bien que la différence ne soit pas significative (*p value*=0.11). Les colonies mégacaryocytaires poussent mieux que les colonies érythroblastiques que ce soit dans le sang ou dans la moelle (respectivement *p value* = 0.05 et 0.06).

Pour les patients atteints de TE et de MFP, nous avons retrouvé une formation endogène de colonies érythroïdes ou mégacaryocytaires respectivement chez 81.6% et 53.3% des patients atteints. Plus précisément, on observe 81.1% (154/190) de pousses mégacaryocytaires sur l'ensemble des patients ayant eu une culture réalisée dans les TE et seulement 13.7% (26/190) de pousses spontanées érythrocytaires. Dans notre population de TE, quel que soit le type de prélèvement, les progéniteurs mégacaryocytaires poussent mieux que les progéniteurs érythroïdes spontanés (*p value*<0.05). Dans la littérature, le pourcentage de formation endogène de progéniteurs érythrocytaires est de 57.5% dans le TE et de 69.2% dans les MFP (232). Les progéniteurs mégacaryocytaires spontanés sont décrits dans 78% des TE dans le sang et dans 88% dans la moelle (218). Ces données confirment bien un problème technique concernant la pousse érythrocytaire. Une étude française, utilisant la technique standardisée

utilisée au CHU de Grenoble, montre 7.7% de formation *in vitro* d'EEC et 93.3% d'EMC dans les TE étudiées (25), suggérant un problème à échelle nationale. Avec la technique actuelle, le prélèvement de sang pousse significativement mieux que la moelle dans les TE (p value<0.05).

Notre étude nous a également permis de déterminer la place des différents marqueurs biologiques. Dans la PV, nous avons retrouvé une concordance entre la mutation *JAK2V617F* et la pousse spontanée de progéniteurs. A l'inverse, dans la TE, la pousse de progéniteurs hématopoïétiques se révèle être plus sensible que la mutation *JAK2V617F* (p value<0.05). Toutefois, la formation spontanée de progéniteurs sanguins notamment mégacaryocytaires a été décrite comme non spécifique car possiblement retrouvée dans les thrombocytoses réactionnelles (218). De plus, des formations spontanées de progéniteurs ont été décrites dans des cas de SMD, de LMMC, de RARS-T, de LMC et de NMP/SMD inclassables. Dans notre étude, nous avons comptabilisé les faux positifs, à l'exclusion des autres hémopathies et des érythrocytoses idiopathiques, selon le contexte clinique. Parmi les 80 patients suspects de NMP Ph- devant la découverte de manifestations cliniques, ayant eu une recherche de culture et dont le diagnostic de NMP Ph- n'a pas été retenu, 7 patients (8.75%) ont eu une culture positive (2 pousses érythroblastiques et 5 pousses mégacaryocytaires). Toutefois, un doute subsiste quant à l'exclusion de NMP Ph- chez ces patients, d'autant plus que le manque de spécificité des EEC n'est, à notre connaissance, pas décrit. Parmi les 153 patients suspects de NMP Ph- devant une perturbation de l'hémogramme, 15 (9.8%) ont montré une pousse de colonies érythroblastiques et/ou mégacaryocytaires. Sur ces 15 pousses, 2 étaient des pousses érythroblastiques médullaires et 13 étaient des pousses mégacaryocytaires sanguines. L'exclusion avec certitude de NMP Ph- était confirmée pour 2 thrombocytoses mais restait douteuse pour les autres patients.

Dans notre étude, la culture de progéniteurs hématopoïétiques a donc montré un intérêt particulier notamment dans les TE, où elle est plus sensible que *JAK2V617F*. Bien que cette analyse ne constitue pas un argument au sens de l'OMS en faveur d'une TE, nous avons montré qu'elle constitue une véritable aide à la recherche de mutations clonales telles que *MPL*. En effet, un sous groupe de thrombocytoses sélectionnées sur la présence de pousses spontanées de progéniteurs mégacaryocytaires en l'absence de la mutation *JAK2V617F*, montre une fréquence de 40.90% (18/44), comparée à une fréquence moyenne décrite de 3% dans les TE et de 15% dans les MFP. De plus, cette recherche ciblée nous a permis de prouver

le caractère clonal d'une thrombocytose chez un patient dont le diagnostic de NMP Ph- avait été écarté.

Dans notre étude, nous avons également remarqué que les critères OMS ne sont pas toujours adoptés par l'ensemble des cliniciens, hématologues et autres spécialités. En effet, respectivement 77%, 25%, 87% des patients atteints de PV, de TE ou de MFP respectaient intégralement les critères de l'OMS 2008. On remarque que la présence d'une polyglobulie associée à la présence de la mutation *JAK2V617F* n'est pas suffisante pour respecter les critères de l'OMS. En effet, d'après l'OMS, la PV doit respecter 3 critères pour être affirmée. La nécessité de ces 3 critères semble avoir pour but de pallier aux éventuelles lacunes de la mutation *JAK2V617F*. En effet, les éventuels faux positifs existent dans la population saine avec des pourcentages variables selon les études de 0.2% à 9.6% (107, 110). De plus, la présence de 3 critères permet d'assurer les éventuels problèmes de sensibilité. En effet, la technique de recherche de *JAK2V617F* n'est pas standardisée et l'étape de purification des polynucléaires n'est pas réalisée par tous les laboratoires. Des différences de sensibilités existent entre les différentes techniques (qualitative, en temps réel, pyroséquençage, sur sang total, sur les granuleux...) probablement à l'origine de la forte variation du pourcentage de PV *JAK2V617F+* (103, 228, 233). La sensibilité de la PCR ARMS, utilisée au laboratoire du CHU de Grenoble, est déterminée à partir de dilutions de lignées érythroleucémiques HEL et est estimée à 0.5%. Toutefois, la sensibilité de cette technique (PCR ARMS utilisant les mêmes amorces) a également été décrite à 2% (6). Dans notre étude, 2 patients ont montré un manque de sensibilité de la technique. Toutefois, peu de patients ont eu plusieurs fois la recherche de statut mutationnel *JAK2V617F*. Ainsi, la réalisation en parallèle d'un critère mineur (dosage de l'EPO ou culture de progéniteurs) semble être pertinente chez les patients suspectés atteints de PV.

On peut également souligner le manque de précision des critères de l'OMS concernant la définition de la polyglobulie (le premier des critères majeurs). La diversité des examens (Volume globulaire isotopique, hémoglobine avec différentes valeurs seuils, hémocrite...), pouvant répondre au premier critère majeur sans hiérarchie entre eux, peut compliquer le diagnostic. En effet, l'hémoglobine peut être faussement élevée ou abaissée selon les variations du volume plasmatique. Les valeurs seuils définies par l'OMS peuvent paraître très élevées, dépistant difficilement les formes débutantes de PV. Dans notre population, certaines PV *JAK2* mutées, ne respectant pas l'OMS, n'ont pas de taux d'hémoglobine supérieure aux valeurs seuils définies par l'OMS. Le VG reste très intéressant pour affirmer une polyglobulie

vraie (234) mais est controversé notamment pour des raisons de coût, de faisabilité et de contraintes liées à la manipulation d'isotope. Ainsi, l'OMS a ajouté d'autres arguments pouvant prouver l'augmentation de la masse globulaire érythrocytaire. L'adaptation à l'altitude de résidence, à l'âge et au sexe de la valeur seuil de l'hémoglobine permettrait certes de gagner en précision mais il n'est pas réalisé en pratique courante. Pour cela, chaque laboratoire devrait définir, par tranche d'âge et par sexe dans l'ensemble des conditions physiologiques les influençant, la valeur correspondante au 99^{ème} percentile pour l'hémoglobine et l'hématocrite à partir d'échantillons significatifs de patients. Pour éviter la réalisation d'un VG, l'OMS a ajouté une composante dynamique pour affirmer la polyglobulie (augmentation spontanée de 2g/l par rapport aux valeurs antérieures et Hb>170g/l pour les hommes et >150g/l pour les femmes). Cette composante dynamique semble pertinente mais en l'absence de dossier médical personnalisé, elle nécessite une communication étroite avec le médecin traitant, qui possède les hémogrammes antérieurs. Une proposition pour améliorer les critères de l'OMS serait d'intégrer l'aspect caractéristique de la BOM des PV porteuses de mutation de l'exon 12 de *JAK2* (premier critère mineur) où l'on ne retrouve pas d'hyperplasie des 3 lignées.

Dans le diagnostic de myélofibrose primitive, l'intérêt de la LDH (critère mineur d'après l'OMS) semble également discuté, car l'enzyme est possiblement positive dans les PV et les TE (235). Bien que définis selon un consensus d'experts et de membres du comité consultatif clinique (CAC) (29), les critères de l'OMS sont également controversés notamment sur la distinction entre la TE et le stade préfibrotique de MFP, différenciable uniquement sur la BOM (45). Dans notre étude, la BOM n'a pas été réalisée chez 69% des TE. L'âge avancé du patient restreint la réalisation de cet examen délicat et douloureux ($p \text{ value} < 0.05$). La présence de la mutation *JAK2V617F* montre la même tendance bien qu'à la limite de la significativité ($p \text{ value} = 0.07$). Toutefois, la BOM offre plusieurs avantages. Lorsque la mutation *JAK2V617F* est absente et que les causes secondaires de thrombocytose sont exclues, elle permet de donner un argument histologique pour poser le diagnostic. En effet, bien que de nombreuses mutations aient été décrites (Partie 1), celles-ci ne sont pas réalisées en routine et le diagnostic de TE reste un diagnostic d'exclusion (thrombocytoses réactionnelles, MFP...). En outre, la BOM permet d'écarter une MFP, quel que soit le statut mutationnel *JAK2V617F*. En effet, il est bien précisé que les critères mineurs définis par l'OMS peuvent être discrets. Ainsi, seule la BOM permettra de différencier la TE de la MFP, notamment au stade préfibrotique. La BOM au diagnostic permet également de fournir une base pour une

éventuelle comparaison en cas d'évolution. On comprend toutefois la réticence de certains cliniciens notamment en cas de traitement antiagrégant plaquettaire et/ou d'anti-coagulant. De plus, l'interprétation demande des compétences particulières en anatomo-pathologie médullaire. Par exemple, il semble indispensable de connaître les différences (subtiles) sur l'entité « myélofibrose au stade préfibrotique ». Certains hématologues réticents à l'OMS appliquent les critères de BCSH (British Committee for Standards in Haematology) (156, 236). Ainsi, ils se passent de BOM en présence d'une thrombocytose avec mutation *JAK2V617F* et réserves ferriques normales (VGM, ferritine) associées à l'absence des 5 critères suivants (anémie non expliquée, splénomégalie palpable >5cm, symptômes constitutionnels, érythromyélocytose, aspect de dysplasie sur le sang). Il appartient donc aux cliniciens en collaboration avec l'ensemble des spécialistes (anatomopathologistes, biologistes...) de décider de la démarche à adopter en tenant compte également de l'âge du patient et des possibilités thérapeutiques.

Une autre question se pose quant à la démarche à suivre devant les sujets présentant des manifestations vasculaires. La recherche du statut mutationnel en *JAK2V617F* ne fait pas partie des recommandations de la maladie thromboembolique veineuse (237). Elle doit être réservée au patient présentant un hémogramme suggestif ou dans les bilans étiologiques de thromboses veineuses dites de sites « inhabituels » (système nerveux central, thrombose porte...) (24, 238). En effet, la prévalence de la mutation *JAK2V617F* de l'ordre de 50% (45% à 58% selon les études) dans les syndromes de Budd Chiari et d'approximativement 35% dans les thromboses portes (53, 55, 56). Dans les thromboses veineuses de sites peu communs, la mutation de *JAK2V617F* peut être réalisée même si l'hémogramme ne présente pas d'anomalies. Le diagnostic de ces formes inapparentes, occultes ou latentes (24, 57) semblent d'autant plus important que ces patients appartiennent à la catégorie des risques élevés. Concernant les bilans de d'infarctus cérébraux ou d'accidents ischémiques transitoires, la recherche de mutation *JAK2V617F* est recommandée chez le sujet jeune en troisième intention par la Société Française de Neuro-Vasculaire (239).

L'intégration de l'ensemble de ces données clinico-biologiques nous a permis de proposer 3 algorithmes afin d'aider au diagnostic. Les 2 premiers concernent la prise en charge biologique de patients présumés atteints de polyglobulie ou de thrombocytose, sans manifestations cliniques. En effet, en vue d'un développement prochain de la recherche de statut mutationnel de l'exon 12 de *JAK2* au CHU de Grenoble et dans ce contexte d'efficience des dépenses de santé, il semble nécessaire de définir des conditions d'utilisations notamment

pour les NMP Ph-, pathologies chroniques diagnostiquées par des médecins dont la spécialité n'est pas toujours l'hématologie .

Le troisième correspond aux patients ayant présentés des manifestations vasculaires inhabituelles (type syndrome de Budd Chiari...). Dans ces cas là, il peut s'agir de PV ou de TE ou rarement de MFP (240). Il semble intéressant de rappeler qu'un taux d'EPO élevé n'exclut pas une PV en cas de syndrome de Budd Chiari. En effet, chez l'adulte, bien que l'EPO soit physiologiquement synthétisée par le rein, une petite quantité est fabriquée par les hépatocytes. En cas de syndrome de Budd Chiari, la nécrose hépatique serait à l'origine d'un relargage d'EPO (233). Dans ce cas là, le dosage de l'EPO apparaît peu discriminant.

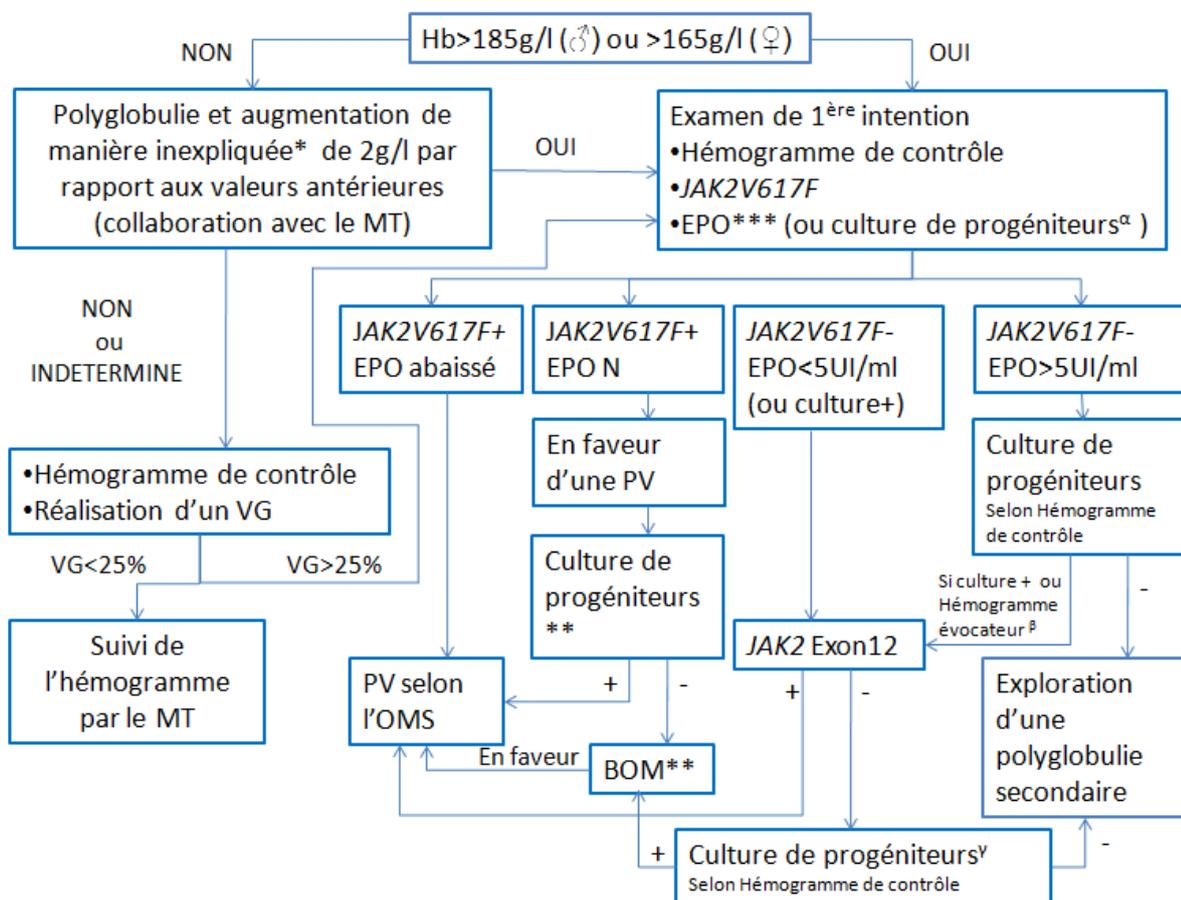


Figure 23 : Démarche diagnostique proposée devant la suspicion d'une polyglobulie de Vaquez. Hb : Hémoglobine. VG : Volume Globulaire isotopique. MT : Médecin Traitant.

*excluant prise médicamenteuse (EPO recombinante, supplément en fer...)

**facultatif

***à distance d'un événement thrombotique hépatique ou rénal

^α si polyglobulie découverte à la suite de thrombose hépatique ou rénal

^β Hb très élevée, Pq et GB normaux.

^γ si non réalisée au préalable

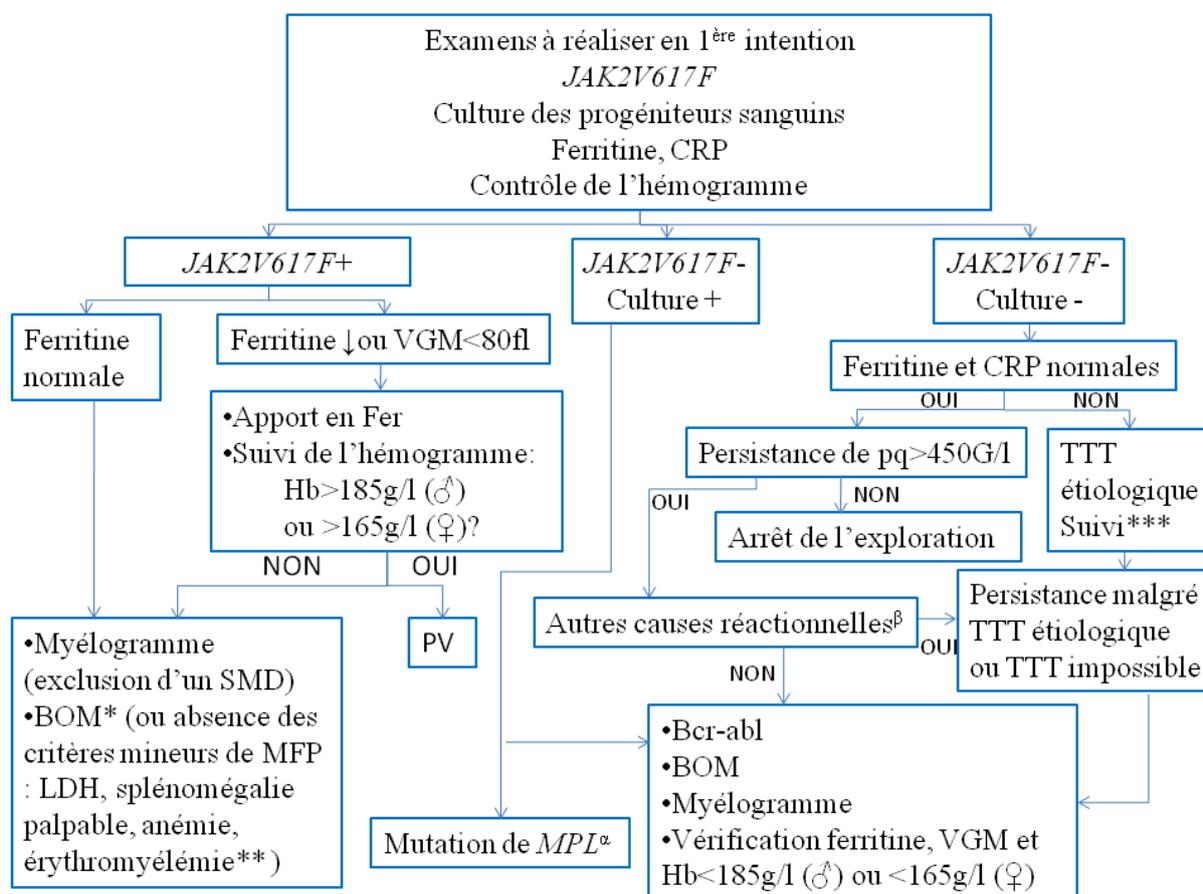


Figure 24 : Proposition d'une démarche diagnostique devant une thrombocytose.

Pq : Plaquette. TTT : TraitemenT. SMD : Syndrome MyéloDysplasique.

* Réalisation de la BOM selon les critères de l'OMS 2008 après concertation avec l'anapathologiste.

** Après concertation avec le biologiste.

***Collaboration avec le médecin traitant.

^α si culture spontanée mégacaryocytaire positive.

^β Antécédent de splénectomie, intervention chirurgicale récente, « collagénose », cancer métastatique, syndrome lymphoprolifératif.

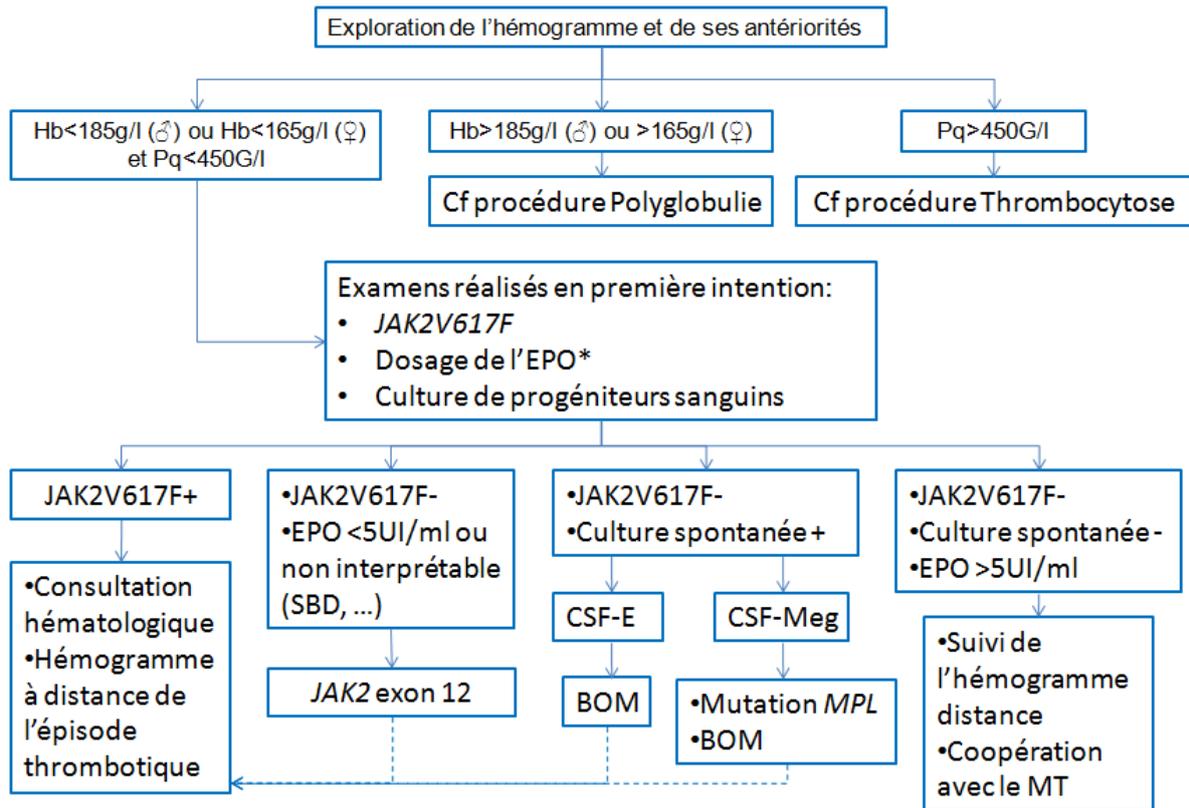


Figure 25 : Proposition de démarche diagnostique devant une manifestation vasculaire atypique (thrombose mésentérique...).

CSF : Formation Spontanée de Colonies. MT Médecin Traitant. SBD : Syndrome de Budd Chiari.

Thèse soutenue par : Julie Mondet

Titre : Caractérisation clinique et biologique d'une population de l'arc alpin présumée atteinte d'un néoplasme myéloprolifératif Philadelphie négatif : apport respectif des différents marqueurs biologiques.

Les néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif (NMP Ph-) sont des hémopathies clonales de la cellule souche hématopoïétique, caractérisées par la prolifération autonome d'une ou plusieurs lignées myéloïdes (granuleuse, érythroblastique ou mégacaryocytaire) sans blocage de maturation ni signe de myélodysplasie. Les NMP Ph- comptent principalement 3 entités clinicobiologiques : la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), et la myélofibrose primitive (MFP) qui se caractérisent respectivement par une augmentation significative de la masse sanguine, des plaquettes ou de la fibrose médullaire. En 2005, une mutation somatique acquise du gène codant pour la tyrosine kinase JAK2 a été décrite dans les NMP Ph- par 4 groupes scientifiques indépendants. Cette mutation ponctuelle (G1849T) responsable de la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 617 (*JAK2V617F*), entraîne une activation constitutive de JAK2 responsable de la prolifération autonome des progéniteurs hématopoïétiques. Elle est présente dans près de 90% des PV, et approximativement 50% des TE et des MFP. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a rapidement intégré la mutation *JAK2V617F* et d'autres anomalies moléculaires (*MPL*, *JAK2* exon 12..) dans les critères diagnostiques des NMP Ph- parmi des techniques plus anciennes comme la culture de progéniteurs hématopoïétiques, la biopsie ostéoméduleuse (BOM) ou le dosage de l'érythropoïétine.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude rétrospective des résultats de 882 cultures de progéniteurs et/ou de recherches de la mutation *JAK2V617F* prescrits pour des patients suivis dans l'un des 4 sites de l'arc alpin (CH d'Annecy et de Chambéry, CHU de Grenoble, Institut Daniel Hollard) entre le 1^{er} Janvier 2007 et le 31 Décembre 2010. Ce recensement nous a permis d'établir les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de la population de NMP Ph- de l'arc alpin et de redéfinir l'intérêt diagnostique des différents marqueurs biologiques.

La fréquence de *JAK2V617F* a été établie chez 410 patients NMP Ph- (141 PV, 234 TE, 32 MFP et 3 NMP indéterminé), ainsi que dans l'ensemble de la population étudiée (n=873). Dans les PV, une corrélation significative entre la mutation *JAK2V617F* et la pousse de progéniteurs a été observée. A l'inverse dans les TE, la pousse des progéniteurs

hématopoïétiques s'est révélée plus sensible que la mutation *JAK2V617F* (respectivement 81.6%, 67.9%, p value<0.05). De plus, l'intérêt respectif de l'analyse des progéniteurs érythroïdes ou mégacaryocytaires, du sang ou de la moelle, a pu être précisé en fonction du diagnostic présumé.

Sur le plan clinique, nous avons montré que l'application des critères de l'OMS 2008 pouvait faire discuter le diagnostic initial de certains patients et redéfinir la place des analyses complémentaires (BOM, recherche des mutations de *MPL* et de l'exon 12 de *JAK2*, EPO) dans la stratégie d'investigation. Nous avons pu ainsi sélectionner un sous groupe de 44 patients, avec thrombocytose sans mutation *JAK2V617F* mais présentant une pousse spontanée de progéniteurs mégacaryocytaires, pour lequel la recherche de mutations de *MPL* était positive dans 40.90% des cas (18/44), comparée à une fréquence moyenne décrite de 3% dans les TE et de 15% dans les MFP. De la même façon, l'intérêt diagnostique des mutations de l'exon 12 de *JAK2* chez les patients polyglobulies *JAK2V617F* négatif a été confirmé. Enfin, l'intégration de l'ensemble de ces résultats biologiques et cliniques nous a permis de définir un algorithme de prescription biologique pour le diagnostic des patients avec suspicion de NMP Ph-.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

A Grenoble, le 10 Octobre 2011

Professeur Christophe RIBUOT



Professeur Pascal MOSSUZ

A rectangular blue ink stamp from the C.H.U. de Grenoble. The text reads "C.H.U. de GRENOBLE", "Pôle Biologie", "UM Hématologie Cellulaire", and "Pr MOSSUZ Pascal". A handwritten signature in blue ink is written over the stamp.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Références

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951 Apr;6(4):372-5.
2. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):14-22.
3. Vizmanos JL, Ormazabal C, Larrayoz MJ, Cross NC, Calasanz MJ. JAK2 V617F mutation in classic chronic myeloproliferative diseases: a report on a series of 349 patients. *Leukemia*. 2006 Mar;20(3):534-5.
4. Smith CA, Fan G. The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Hum Pathol*. 2008 Jun;39(6):795-810.
5. Moliterno AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3913-5.
6. Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2162-8.
7. Johansson P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost*. 2006 Apr;32(3):171-3.
8. Girodon F, Bonicelli G, Schaeffer C, Mounier M, Carillo S, Lafon I, et al. Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocythemia related to new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):865-9.
9. Ma X, Vanasse G, Cartmel B, Wang Y, Selinger HA. Prevalence of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2008 May;83(5):359-62.
10. Ruggeri M, Tosetto A, Frezzato M, Rodeghiero F. The rate of progression to polycythemia vera or essential thrombocythemia in patients with erythrocytosis or thrombocytosis. *Ann Intern Med*. 2003 Sep 16;139(6):470-5.
11. SFH. Polyglobulie primitive ou maladie de Vaquez. *Hématologie*. 2007 Sep-Oct;13(5):331-4.
12. Stein BL, Williams DM, Wang NY, Rogers O, Isaacs MA, Pemmaraju N, et al. Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2010 Jul;95(7):1090-7.
13. Johansson P, Kutti J, Andreasson B, Safai-Kutti S, Vilen L, Wedel H, et al. Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med*. 2004 Aug;256(2):161-5.
14. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol*. 1997 Nov;15(4):173-89.
15. Najean Y, Rain JD, Billotey C. Epidemiological data in polycythaemia vera: a study of 842 cases. *Hematol Cell Ther*. 1998 Aug;40(4):159-65.
16. Passamonti F, Malabarba L, Orlandi E, Barate C, Canevari A, Brusamolino E, et al. Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia. *Haematologica*. 2003 Jan;88(1):13-8.
17. Berlin NI. Diagnosis and classification of the polycythemias. *Semin Hematol*. 1975 Oct;12(4):339-51.
18. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia. *Ann Intern Med*. 1995 Nov 1;123(9):656-64.
19. Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J. World Health Organization of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2001.
20. Aufaure, S, Oliver, M L, Baptiste, N. Thrombocytémie, carence martiale sans anémie : le concept d'une polyglobulie primitive masquée. *La revue de gériatrie*. 1999 May;24(5):355-60.

21. Bénéton N, Saiag P. Stratégie diagnostique devant un prurit. *Médecine thérapeutique*. 2000 Mar;6(3):222-30.
22. Gerlini G, Prignano F, Pimpinelli N. Acute leucocytoclastic vasculitis and aquagenic pruritus long preceding polycythemia rubra vera. *Eur J Dermatol*. 2002 May-Jun;12(3):270-1.
23. Lamy T, Devillers A, Bernard M, Moisan A, Grulois I, Drenou B, et al. Inapparent polycythemia vera: an unrecognized diagnosis. *Am J Med*. 1997 Jan;102(1):14-20.
24. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, Za T, Farina G, Chiusolo P, et al. Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost*. 2007 Apr;5(4):708-14.
25. Boissinot M, Lippert E, Girodon F, Dobo I, Fouassier M, Masliah C, et al. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3223-4.
26. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004 Nov 15;117(10):755-61.
27. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2008 May;22(5):905-14.
28. Lengfelder E, Hochhaus A, Kronawitter U, Hoche D, Queisser W, Jahn-Eder M, et al. Should a platelet limit of $600 \times 10^9/l$ be used as a diagnostic criterion in essential thrombocythaemia? An analysis of the natural course including early stages. *Br J Haematol*. 1998 Jan;100(1):15-23.
29. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937-51.
30. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S, et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):68-76.
31. Jensen MK, de Nully Brown P, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur J Haematol*. 2000 Aug;65(2):132-9.
32. Teofili L, Foa R, Giona F, Larocca LM. Childhood polycythemia vera and essential thrombocythemia: does their pathogenesis overlap with that of adult patients? *Haematologica*. 2008 Feb;93(2):169-72.
33. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res*. 2007 Jun;31(6):737-40.
34. Maynadie M, Girodon F, Manivet-Janoray I, Mounier M, Mugneret F, Bailly F, et al. Twenty-five years of epidemiological recording on myeloid malignancies: data from the specialized registry of hematologic malignancies of Cote d'Or (Burgundy, France). *Haematologica*. 2011 Jan;96(1):55-61.
35. Woodliff HJ, Dougan L. Myelofibrosis in Western Australia: an epidemiological study of 29 cases. *Med J Aust*. 1976 Apr 10;1(15):523-5.
36. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):45-52.
37. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*. 1999 May;61(1):10-5.
38. Ridell B, Carneskog J, Wedel H, Vilen L, Hogh Dufva I, Mellqvist UH, et al. Incidence of chronic myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden 1983-1992. *Eur J Haematol*. 2000 Oct;65(4):267-71.

39. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):986-93.
40. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol*. 2005 Nov 20;23(33):8520-30.
41. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood*. 1978 Feb;51(2):189-94.
42. Le Bousse-Kerdiles M, Praloran V, Martyre M. La splénomégalie myéloïde : De données récentes à un modèle physiopathologique. *Hématologie*. 2002 May-Jun;8:187-96.
43. Florena AM, Tripodo C, Iannitto E, Porcasi R, Ingrao S, Franco V. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):911-9.
44. Gianelli U, Vener C, Raviele PR, Moro A, Savi F, Annaloro C, et al. Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology. *Leuk Lymphoma*. 2006 Sep;47(9):1774-81.
45. Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, Buck G, Wheatley K, East CL, et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):60-70.
46. Brousseau M, Parot-Schinkel E, Moles MP, Boyer F, Hunault M, Rousset MC. Practical application and clinical impact of the WHO histopathological criteria on bone marrow biopsy for the diagnosis of essential thrombocythemia versus prefibrotic primary myelofibrosis. *Histopathology*. 2010 May;56(6):758-67.
47. Thiele J, Kvasnicka HM, Mullauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*. 2011 May 26;117(21):5710-8.
48. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 10;29(23):3179-84.
49. Landolfi R, Di Gennaro L, Falanga A. Thrombosis in myeloproliferative disorders: pathogenetic facts and speculation. *Leukemia*. 2008 Nov;22(11):2020-8.
50. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2224-32.
51. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 1990 Mar;8(3):556-62.
52. Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, Schwager SM, Tefferi A. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. *Haematologica*. 2010 Oct;95(10):1788-91.
53. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FW, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008 May 15;111(10):4922-9.
54. Plessier A, Valla DC. Budd-Chiari syndrome. *Semin Liver Dis*. 2008 Aug;28(3):259-69.
55. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, Westwood NB, Milojkovic D, Thanigaikumar M, et al. Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology*. 2006 Jun;130(7):2031-8.
56. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, Gianelli U, Fabris F, Reati R, et al. Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology*. 2006 Dec;44(6):1528-34.
57. Goulding C, Uttenthal B, Foroni L, Duke V, Traore A, Kottaridis P, et al. The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation identifies clinically latent myeloproliferative disorders in patients presenting with hepatic or portal vein thrombosis. *Int J Lab Hematol*. 2008 Oct;30(5):415-9.
58. Harrison CN. Platelets and thrombosis in myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005:409-15.

59. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet*. 1978 Dec 9;2(8102):1219-22.
60. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2446-52.
61. Carobbio A, Antonioli E, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Delaini F, Guerini V, et al. Leukocytosis and risk stratification assessment in essential thrombocythemia. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 1;26(16):2732-6.
62. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):840-6.
63. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2005 Feb;128(3):275-90.
64. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Finazzi G, Budde U, van Vliet HH. The paradox of platelet activation and impaired function: platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Semin Thromb Hemost*. 2006 Sep;32(6):589-604.
65. Vannucchi AM. Diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematol J*. 2011 Jun;5(1):255-63.
66. Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, Lynn A, Pierce S, Zhou L, et al. Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 20;27(33):5587-93.
67. Mesa RA. Assessing new therapies and their overall impact in myelofibrosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010:115-21.
68. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*. 2008 Nov;93(11):1645-51.
69. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc*. 2006 Feb;81(2):159-66.
70. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Talarn C, Gomez M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia following essential thrombocythaemia: actuarial probability, presenting characteristics and evolution in a series of 195 patients. *Br J Haematol*. 2002 Sep;118(3):786-90.
71. Crisa E, Venturino E, Passera R, Prina M, Schinco P, Borchiellini A, et al. A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkylating drugs. *Ann Hematol*. 2010 Jul;89(7):691-9.
72. Sébahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. Rueil-Malmaison: Arnette, 2005.
73. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 20;29(6):761-70.
74. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Elena C, Castagnola C, Zappasodi P, et al. Blast phase of essential thrombocythemia: A single center study. *Am J Hematol*. 2009 Oct;84(10):641-4.
75. Passamonti F, Rumi E, Elena C, Arcaini L, Merli M, Pascutto C, et al. Incidence of leukaemia in patients with primary myelofibrosis and RBC-transfusion-dependence. *Br J Haematol*. 2010 Sep;150(6):719-21.
76. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, Capnist G, Chisesi T, Finelli C, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2664-70.
77. Randi ML, Fabris F, Girolami A. Leukemia and myelodysplasia effect of multiple cytotoxic therapy in essential thrombocythemia. *Leuk Lymphoma*. 2000 Apr;37(3-4):379-85.

78. Finazzi G, Ruggeri M, Rodeghiero F, Barbui T. Efficacy and safety of long-term use of hydroxyurea in young patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3749.
79. Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL, Demory JL, Caulier MT, Wattel E, et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion. *Blood*. 1998 Jan 15;91(2):616-22.
80. Nielsen I, Hasselbalch HC. Acute leukemia and myelodysplasia in patients with a Philadelphia chromosome negative chronic myeloproliferative disorder treated with hydroxyurea alone or with hydroxyurea after busulphan. *Am J Hematol*. 2003 Sep;74(1):26-31.
81. de Montalembert M, Brousse V, Elie C, Bernaudin F, Shi J, Landais P. Long-term hydroxyurea treatment in children with sickle cell disease: tolerance and clinical outcomes. *Haematologica*. 2006 Jan;91(1):125-8.
82. Finazzi G, Barbui T. How I treat patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5104-11.
83. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2891-900.
84. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. *Eur J Haematol*. 2009 May;82(5):329-38.
85. Gangat N, Strand J, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Pardanani A, et al. Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *Eur J Haematol*. 2008 Mar;80(3):197-200.
86. Bench AJ, Cross NC, Huntly BJ, Nacheva EP, Green AR. Myeloproliferative disorders. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Sep;14(3):531-51.
87. Gangat N, Tefferi A, Thanarajasingam G, Patnaik M, Schwager S, Ketterling R, et al. Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur J Haematol*. 2009 Jul;83(1):17-21.
88. Reilly JT. Pathogenetic insight and prognostic information from standard and molecular cytogenetic studies in the BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs). *Leukemia*. 2008 Oct;22(10):1818-27.
89. Tefferi A, Skoda R, Vardiman JW. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Nov;6(11):627-37.
90. Passamonti F, Maffioli M, Caramazza D, Cazzola M. Myeloproliferative neoplasms: from JAK2 mutations discovery to JAK2 inhibitor therapies. *Oncotarget*. 2011 Jun;2(6):485-90.
91. Ricci C, Spinelli O, Salmoiraghi S, Finazzi G, Carobbio A, Rambaldi A. ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2011 Sep 19:Available on line.
92. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
93. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387-97.
94. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.
95. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-61.
96. Staerk J, Kallin A, Royer Y, Diaconu CC, Dusa A, Demoulin JB, et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol Biol (Paris)*. 2007 Mar;55(2):88-91.
97. Ihle JN, Gilliland DG. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev*. 2007 Feb;17(1):8-14.

98. Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2435-7.
99. Dupont S, Masse A, James C, Teyssandier I, Lecluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1013-21.
100. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2452-66.
101. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA. *Biologie moléculaire de la cellule: De Boeck*, 2005.
102. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia. *Br J Haematol*. 2005 Oct;131(2):166-71.
103. Verstovsek S, Silver RT, Cross NC, Tefferi A. JAK2V617F mutational frequency in polycythemia vera: 100%, >90%, less? *Leukemia*. 2006 Nov;20(11):2067.
104. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1128-38.
105. Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau JL, et al. JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia*. 2010 May;24(5):1069-73.
106. Grunebach F, Bross-Bach U, Kanz L, Brossart P. Detection of a new JAK2 D620E mutation in addition to V617F in a patient with polycythemia vera. *Leukemia*. 2006 Dec;20(12):2210-1.
107. Sidon P, El Housni H, Dessars B, Heimann P. The JAK2V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia*. 2006 Sep;20(9):1622.
108. Nielsen C, Birgens HS, Nordestgaard BG, Kjaer L, Bojesen SE. The JAK2 V617F somatic mutation, mortality and cancer risk in the general population. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):450-3.
109. Xu X, Zhang Q, Luo J, Xing S, Li Q, Krantz SB, et al. JAK2(V617F): Prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):339-42.
110. Martinaud C, Brisou P, Mozziconacci MJ. Is the JAK2(V617F) mutation detectable in healthy volunteers? *Am J Hematol*. 2010 Apr;85(4):287-8.
111. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, Loh ML, Beran M, Stoffregen E, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3377-9.
112. Frohling S, Lipka DB, Kayser S, Scholl C, Schlenk RF, Dohner H, et al. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1242-3.
113. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, Powell HL, McClure RF, Levine RL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1207-9.
114. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2173-81.
115. Lim KH, Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Patnaik M, Butterfield JH, et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood*. 2009 Jun 4;113(23):5727-36.
116. Hellstrom-Lindberg E, Cazzola M. The role of JAK2 mutations in RARS and other MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:52-9.
117. Remacha AF, Nomdedeu JF, Puget G, Estivill C, Sarda MP, Canals C, et al. Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 2006 May;91(5):719-20.
118. Ceesay MM, Lea NC, Ingram W, Westwood NB, Gaken J, Mohamedali A, et al. The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia*. 2006 Nov;20(11):2060-1.

119. Schmitt-Graeff AH, Teo SS, Olschewski M, Schaub F, Haxelmans S, Kirn A, et al. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 2008 Jan;93(1):34-40.
120. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459-68.
121. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010 Sep;24(9):1574-9.
122. Percy MJ, Beer PA, Campbell G, Dekker AW, Green AR, Oscier D, et al. Novel exon 12 mutations in the HIF2A gene associated with erythrocytosis. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5400-2.
123. Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. *Am J Hematol*. 2011 Aug;86(8):668-76.
124. Ormazabal C, Hurtado C, Aranaz P, Erquiaga I, Garcia-Delgado M, Calasanz MJ, et al. Low frequency of JAK2 exon 12 mutations in classic and atypical CMPDs. *Leuk Res*. 2008 Sep;32(9):1485-7.
125. Butcher CM, Hahn U, To LB, Gecz J, Wilkins EJ, Scott HS, et al. Two novel JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythaemia vera patients. *Leukemia*. 2008 Apr;22(4):870-3.
126. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Hanson CA, Tefferi A. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):1960-3.
127. Li S, Kralovics R, De Libero G, Theocharides A, Gisslinger H, Skoda RC. Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3863-6.
128. Lakey MA, Pardanani A, Hoyer JD, Nguyen PL, Lasho TL, Tefferi A, et al. Bone marrow morphologic features in polycythemia vera with JAK2 exon 12 mutations. *Am J Clin Pathol*. 2010 Jun;133(6):942-8.
129. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2813-6.
130. Ugo V, Tondeur S, Menot ML, Bonnin N, Le Gac G, Tonetti C, et al. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS One*. 2010 Jan;5(1):e8893.
131. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 3;101(31):11444-7.
132. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270.
133. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernandez A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, et al. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2010 Apr;149(2):250-7.
134. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1864-71.
135. Pardanani A, Guglielmelli P, Lasho TL, Pancrazzi A, Finke CM, Vannucchi AM, et al. Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia*. 2011 Jun 21; ([published online ahead of print June 21,2011]):doi: 10.1038/leu.2011.161.
136. Ruan GR, Jiang B, Li LD, Niu JH, Li JL, Xie M, et al. MPL W515L/K mutations in 343 Chinese adults with JAK2V617F mutation-negative chronic myeloproliferative disorders detected by a newly developed RQ-PCR based on TaqMan MGB probes. *Hematol Oncol*. 2010 Mar;28(1):33-9.

137. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6.
138. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):141-9.
139. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Aug 12;116(6):988-92.
140. Gery S, Cao Q, Gueller S, Xing H, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol*. 2009 Jun;85(6):957-65.
141. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2010 Sep 16;363(12):1189-90.
142. Ha JS, Jeon DS. Possible new LNK mutations in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*. 2011 Oct;86(10):866-8.
143. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*. 2010 Oct;24(10):1713-8.
144. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):423-34.
145. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*. 2011 Aug 15;10(16):2662-8.
146. Abdel-Wahab O. Genetics of the myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol*. 2011 Mar;18(2):117-23.
147. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009 May;23(5):905-11.
148. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009 May 28;360(22):2289-301.
149. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009 Jul;23(7):1343-5.
150. Langemeijer SM, Jansen JH, Hooijer J, van Hoogen P, Stevens-Linders E, Massop M, et al. TET2 mutations in childhood leukemia. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):189-92.
151. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia*. 2009 May;23(5):900-4.
152. Abdel-Wahab O, Manshoury T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*. 2010 Jan 15;70(2):447-52.
153. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010 Aug;42(8):722-6.
154. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, Wadleigh M, Lasho T, Heguy A, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 Jul;25(7):1200-2.
155. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Jun 7;118(7).
156. Beer PA, Erber WN, Campbell PJ, Green AR. How I treat essential thrombocythemia. *Blood*. 2011 Feb 3;117(5):1472-82.
157. Vannucchi AM. Diagnosis and treatment of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Hematology Education: Annual congress of the European Hematology Association*. 2011;5(1):255-63.

158. Tefferi A. Annual Clinical Updates in Hematological Malignancies: a continuing medical education series: polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2011 Mar;86(3):292-301.
159. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):114-24.
160. Alvarez-Larran A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Perez-Andreu V, Hernandez-Boluda JC, et al. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1205-10; quiz 387.
161. Di Nisio M, Barbui T, Di Gennaro L, Borrelli G, Finazzi G, Landolfi R, et al. The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br J Haematol*. 2007 Jan;136(2):249-59.
162. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4272-90.
163. Tatarsky I, Sharon R. Management of polycythemia vera with hydroxyurea. *Semin Hematol*. 1997 Jan;34(1):24-8.
164. West WO. Hydroxyurea in the treatment of polycythemia vera: a prospective study of 100 patients over a 20-year period. *South Med J*. 1987 Mar;80(3):323-7.
165. Kiladjian JJ, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain JD. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 10;29(29):3907-13.
166. Spivak JL. An inconvenient truth. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2727-8.
167. Martyre MC. Critical review of pathogenetic mechanisms in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Curr Hematol Rep*. 2003 May;2(3):257-63.
168. Quintas-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, Luthra R, Estrov Z, Pierce S, et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5418-24.
169. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3065-72.
170. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch H, et al. A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythaemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *Br J Haematol*. 2010 Mar;148(6):961-3.
171. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4829-33.
172. Solberg LA, Jr., Tefferi A, Oles KJ, Tarach JS, Pettitt RM, Forstrom LA, et al. The effects of anagrelide on human megakaryocytopoiesis. *Br J Haematol*. 1997 Oct;99(1):174-80.
173. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, et al. Hydroxyurea compared with anagrelide in high-risk essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2005 Jul 7;353(1):33-45.
174. Vidal Le dictionnaire du Vidal ed. Paris, 2011.
175. Michiels JJ, van Genderen PJ, Lindemans J, van Vliet HH. Erythromelalgic, thrombotic and hemorrhagic manifestations in 50 cases of thrombocythemia. *Leuk Lymphoma*. 1996 Sep;22 Suppl 1:47-56.
176. Diehn F, Tefferi A. Pruritus in polycythaemia vera: prevalence, laboratory correlates and management. *Br J Haematol*. 2001 Dec;115(3):619-21.
177. Tefferi A, Fonseca R. Selective serotonin reuptake inhibitors are effective in the treatment of polycythemia vera-associated pruritus. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2627.
178. Baldo A, Sammarco E, Plaitano R, Martinelli V, Monfrecola. Narrowband (TL-01) ultraviolet B phototherapy for pruritus in polycythaemia vera. *Br J Dermatol*. 2002 Nov;147(5):979-81.
179. Lengfelder E, Berger U, Hehlmann R. Interferon alpha in the treatment of polycythemia vera. *Ann Hematol*. 2000 Mar;79(3):103-9.

180. Pardanani A, Tefferi A. Targeting myeloproliferative neoplasms with JAK inhibitors. *Curr Opin Hematol*. 2011 Mar;18(2):105-10.
181. Guilhot F. *Les syndromes myéloprolifératifs*. Paris: John Libbey Eurotext, 2008.
182. Harrison C. Rethinking disease definitions and therapeutic strategies in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010:129-34.
183. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):82-8.
184. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):392-7.
185. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2895-901.
186. Tefferi A, Jimma T, Gangat N, Vaidya R, Begna KH, Hanson CA, et al. Predictors of greater than 80% two-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically-annotated patients. *Blood*. 2011 Aug 31.
187. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1356-63.
188. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, Hanson CA. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1827-8.
189. Santana-Davila R, Tefferi A, Holtan SG, Ketterling RP, Dewald GW, Knudson RA, et al. Primary myelofibrosis is the most frequent myeloproliferative neoplasm associated with del(5q): clinicopathologic comparison of del(5q)-positive and -negative cases. *Leuk Res*. 2008 Dec;32(12):1927-30.
190. Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2011 Mar 31;117(13):3494-504.
191. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, Sureda A, Torreadell M, Montserrat E. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *Br J Haematol*. 2004 Nov;127(4):399-403.
192. Huang J, Tefferi A. Erythropoiesis stimulating agents have limited therapeutic activity in transfusion-dependent patients with primary myelofibrosis regardless of serum erythropoietin level. *Eur J Haematol*. 2009 Aug;83(2):154-5.
193. Weinkove R, Reilly JT, McMullin MF, Curtin NJ, Radia D, Harrison CN. Low-dose thalidomide in myelofibrosis. *Haematologica*. 2008 Jul;93(7):1100-1.
194. Durupt F, Coutet J, Salles B, Penaud J, Durupt S. Thalidomide en 2005 : mise au point et utilisation pratique. *Journal de pharmacie clinique*. 2005 juillet-août-septembre; 24(3):145-57.
195. Steurer M, Sudmeier I, Stauder R, Gastl G. Thromboembolic events in patients with myelodysplastic syndrome receiving thalidomide in combination with darbepoietin-alpha. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(1):101-3.
196. Mesa RA, Yao X, Cripe LD, Li CY, Litzow M, Paietta E, et al. Lenalidomide and prednisone for myelofibrosis: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) phase 2 trial E4903. *Blood*. 2010 Nov 25;116(22):4436-8.
197. Site internet <http://www.afsaps.fr/Infos-de-securite/Lettres-aux-professionnels-de-sante/Revlimid-R-lenalidomide-et-risque-potentiel-de-seconds-cancers-primitifs-Lettre-aux-professionnels-de-sante>
Consulté oct 2011.
198. Rochant H, Barosi G, Benbassat I, Brière J, Demory JL, Dupriez B, et al. Myélofibrose primitive. *Hématologie*. 1997 May-Jun;3(3):270-80.

199. Mesa RA. How I treat symptomatic splenomegaly in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2009 May 28;113(22):5394-400.
200. Barugola G, Cavallini A, Lipari G, Armatura G, Mantovani W, Baggio E. The role of splenectomy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Minerva Chir*. 2010 Dec;65(6):619-25.
201. Mesa RA, Nagorney DS, Schwager S, Allred J, Tefferi A. Palliative goals, patient selection, and perioperative platelet management: outcomes and lessons from 3 decades of splenectomy for myelofibrosis with myeloid metaplasia at the Mayo Clinic. *Cancer*. 2006 Jul 15;107(2):361-70.
202. Robin M, Tabrizi R, Mohty M, Furst S, Michallet M, Bay JO, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: a report of the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire (SFGM-TC). *Br J Haematol*. 2011 Feb;152(3):331-9.
203. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ, et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Mar;16(3):358-67.
204. Bacigalupo A, Soraru M, Dominiotto A, Pozzi S, Geroldi S, Van Lint MT, et al. Allogeneic hemopoietic SCT for patients with primary myelofibrosis: a predictive transplant score based on transfusion requirement, spleen size and donor type. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Mar;45(3):458-63.
205. Patriarca F, Bacigalupo A, Sperotto A, Isola M, Soldano F, Bruno B, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: the 20-year experience of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2008 Oct;93(10):1514-22.
206. Kroger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhauser M, et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*. 2007 Feb 1;109(3):1316-21.
207. Begna KH, Mesa RA, Pardanani A, Hogan WJ, Litzow MR, McClure RF, et al. A phase-2 trial of low-dose pomalidomide in myelofibrosis. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):301-4.
208. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, et al. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010 Sep 16;363(12):1117-27.
209. Pardanani A, Vannucchi AM, Passamonti F, Cervantes F, Barbui T, Tefferi A. JAK inhibitor therapy for myelofibrosis: critical assessment of value and limitations. *Leukemia*. 2011 Feb;25(2):218-25.
210. Deshpande A, Reddy MM, Schade GO, Ray A, Chowdary TK, Griffin JD, et al. Kinase domain mutations confer resistance to novel inhibitors targeting JAK2V617F in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011 Sep 16:Available online.
211. Bornhauser M, Mohr B, Oelschlaegel U, Bornhauser P, Jacki S, Ehninger G, et al. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1824-6.
212. Hussein K, Bock O, Seegers A, Flasshove M, Henneke F, Buesche G, et al. Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a chronic myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood*. 2007 May 1;109(9):4106-7.
213. Busche G, Hussein K, Bock O, Kreipe H. Insights into JAK2-V617F mutation in CML. *Lancet Oncol*. 2007 Oct;8(10):863-4.
214. Inami M, Yamaguchi H, Hasegawa S, Mitamura Y, Kosaka F, Kobayashi A, et al. Analysis of the exon 12 and 14 mutations of the JAK2 gene in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):216.
215. Lanotte M. Terminal differentiation of hemopoietic cell clones cultured in tridimensional collagen matrix: in situ cell morphology and enzyme histochemistry analysis. *Biol Cell*. 1984;50(2):107-20.
216. Berthier R, Valiron O, Schweitzer A, Marguerie G. Serum-free medium allows the optimal growth of human megakaryocyte progenitors compared with human plasma supplemented cultures: role of TGF beta. *Stem Cells*. 1993 Mar;11(2):120-9.

217. Dobo I, Donnard M, Girodon F, Mossuz P, Boiret N, Boukhari R, et al. Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assays performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol J*. 2004;5(2):161-7.
218. Dobo I, Boiret N, Lippert E, Girodon F, Mossuz P, Donnard M, et al. A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2004 Oct;89(10):1207-12.
219. Vemuri MC. *Stem Cell Assays*. Totowa: Humana Press, 2008.
220. Lanza RP, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, et al. *Essentials of Stem Cell Biology*. London: Academic Press, 2009.
221. Nissen-Druey C, Tichelli A, Meyer-Monard S. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol*. 2005;113(1):5-96.
222. Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn*. 2007 Apr;9(2):272-6.
223. Site internet <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/macnemar>. Consulté Aou-Oct 2011.
224. Tefferi A, Solberg LA, Silverstein MN. A clinical update in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2000 Aug 1;109(2):141-9.
225. Schafer AI. Thrombocytosis. *N Engl J Med*. 2004 Mar 18;350(12):1211-9.
226. Reid CD. The significance of endogenous erythroid colonies (EEC) in haematological disorders. *Blood Rev*. 1987 Jun;1(2):133-40.
227. Sokol L, Caceres G, Rocha K, Stockero KJ, Dewald DW, List AF. JAK2(V617F) mutation in myelodysplastic syndrome (MDS) with del(5q) arises in genetically discordant clones. *Leuk Res*. 2010 Jun;34(6):821-3.
228. Veneri D, Capuzzo E, de Matteis G, Franchini M, Baritono E, Benati M, et al. Comparison of JAK2V617F mutation assessment employing different molecular diagnostic techniques. *Blood Transfus*. 2009 Jul;7(3):204-9.
229. Kralovics R, Buser AS, Teo SS, Coers J, Tichelli A, van der Maas AP, et al. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1869-71.
230. Mustjoki S, Borze I, Lasho TL, Alitalo R, Pardanani A, Knuutila S, et al. JAK2V617F mutation and spontaneous megakaryocytic or erythroid colony formation in patients with essential thrombocythaemia (ET) or polycythaemia vera (PV). *Leuk Res*. 2009 Jan;33(1):54-9.
231. Goertler PS, Steimle C, Marz E, Johansson PL, Andreasson B, Griesshammer M, et al. The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2862-4.
232. Bellosillo B, Besses C, Florensa L, Sole F, Serrano S. JAK2 V617F mutation, PRV-1 overexpression and endogenous erythroid colony formation show different coexpression patterns among Ph-negative chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006 Apr;20(4):736-7.
233. Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn*. 2006 Sep;8(4):397-411; quiz 526.
234. Cassinat B, Laguillier C, Gardin C, de Beco V, Burcheri S, Fenaux P, et al. Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass? *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):452-3.
235. Beer PA, Campbell PJ, Green AR. Comparison of different criteria for the diagnosis of primary myelofibrosis reveals limited clinical utility for measurement of serum lactate dehydrogenase. *Haematologica*. 2010 Nov;95(11):1960-3.
236. Harrison CN, Bareford D, Butt N, Campbell P, Conneally E, Drummond M, et al. Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. *Br J Haematol*. 2010 May;149(3):352-75.

237. Pernod G, Biron-Andreani C, Morange PE, Boehlen F, Constans J, Couturaud F, et al. [When to test for thrombophilia?]. *Rev Prat*. 2009 Oct 20;59(8):1044-6.
238. Remacha AF, Estivill C, Sarda MP, Mateo J, Souto JC, Canals C, et al. The V617F mutation of JAK2 is very uncommon in patients with thrombosis. *Haematologica*. 2007 Feb;92(2):285-6.
239. Rouanet F, Sibon I, Goizet C, Renou P, Meissner W. [Etiological assessment of cerebral infarct in the young. Proposals from the working group of the French Neuro-vascular Society (December 2008)]. *Rev Neurol (Paris)*. 2009 Dec;165 Spec No 4:F283-8.
240. Cervantes F, Barosi G, Hernandez-Boluda JC, Marchetti M, Montserrat E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in adult individuals 30 years old or younger: presenting features, evolution and survival. *Eur J Haematol*. 2001 May;66(5):324-7.