



HAL
open science

Quantification de la charge allélique des mutations de CALR sur ADN et sur ARN par analyse de fragments

Olivier Mansier

► **To cite this version:**

Olivier Mansier. Quantification de la charge allélique des mutations de CALR sur ADN et sur ARN par analyse de fragments. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01108800

HAL Id: dumas-01108800

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01108800>

Submitted on 23 Jan 2015

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

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

Université de Bordeaux

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2014

N°106

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Olivier MANSIER

Né le 10 mai 1986 à RIOM

Le 22 octobre 2014 à Bordeaux

**QUANTIFICATION DE LA CHARGE ALLELIQUE DES
MUTATIONS DE *CALR* SUR ADN ET SUR ARN PAR
ANALYSE DE FRAGMENTS**

Directeur de thèse : Dr Eric LIPPERT

Jury

M. Nicolas SEVENET	PU-PH	Président
M. Noël MILPIED	PU-PH	Examinateur
M. François-Xavier MAHON	PU-PH	Examinateur
Mme Audrey BIDEET	Praticien Hospitalier	Examinatrice

Quantification de la charge allélique des mutations de *CALR* sur ADN et sur ARN par analyse de fragments

Les thrombocytémies essentielles (TE) et myélofibroses primitives (MFP) sont des syndromes myéloprolifératifs (SMP) dont les mécanismes oncogéniques restent à ce jour incomplètement compris. La découverte des mutations de *JAK2* et *MPL* a permis une avancée dans la compréhension de leur physiopathologie ainsi que leur diagnostic moléculaire. Cependant, ces mutations n'expliquent que 65 et 70% des cas de TE et MFP respectivement. La mise en évidence de mutations du gène codant pour la calréticuline (*CALR*) au cours de ces 2 maladies a apporté un 3^{ème} marqueur moléculaire expliquant plus d'un quart des cas de TE et MFP. A ce jour la seule technique décrite dans la littérature permettant une quantification de la charge allélique *CALR* est l'analyse de fragments. Toutefois, ni ses performances, ni son application à la quantification de la charge allélique sur ARN n'ont été décrites. Nous avons adapté notre technique d'analyse de fragments sur ADN à une utilisation sur ARN et comparé les résultats obtenus sur ces 2 matériels. Les charges alléliques mesurées sur ADN et sur ARN sont comparables. Nous avons par ailleurs confirmé l'absence de mutation de *CALR* au cours des leucémies myéloïdes chroniques, y compris dans les présentations hyperthrombocytaires. La comparaison des charges obtenues par analyse de fragments et par PCR digitale montre une excellente corrélation entre les 2 techniques, prouvant que l'analyse de fragments est une technique adaptée à la quantification des charges alléliques des mutations de *CALR*.

Mots clés : Syndromes myéloprolifératifs, Thrombocytémie Essentielle, Myélofibrose Primitive, Calréticuline, Analyse de fragments, Charge allélique

***CALR* mutations allelic burden quantification on DNA and RNA by fragments length analysis**

Essential thrombocytemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are myeloproliferative neoplasms the oncogenic mechanisms of which are incompletely understood. The discovery of *JAK2* and *MPL* mutations have improved the understanding of their pathophysiology and their molecular diagnosis. However, these mutations only account for 65 and 70% of ET and PMF cases respectively. Description of calreticulin (*CALR*) mutations in these 2 diseases brought a 3rd molecular marker for an additional 25% cases of ET and PMF. To this day, the only described technique allowing *CALR* mutant allelic burden evaluation is fragment length analysis. Nevertheless, neither the performances of the technique nor its applicability to *CALR* mutant allelic burden assessment on RNA have been described. We have adapted our DNA fragments length analysis for a use with RNA and compared the results obtained with these 2 nucleic acids. Allelic burdens assessed with DNA or RNA are very similar. We have confirmed the absence of *CALR* mutations in chronic myelogenous leukemia, including those with a thrombocytemic presentation. Comparison of allelic burdens obtained with fragments length analysis and digital PCR showed an excellent correlation, proving fragments length analysis is a method suited to *CALR* mutations allelic burden assessment.

Keywords : Myeloproliferative neoplasms, Essential Thrombocytemia, Primary myelofibrosis, Calreticulin, Fragments length analysis, Allelic burden

Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux

Avenue Magellan, 33600 PESSAC

Remerciements

A M. le Pr. Nicolas Sevenet : Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma reconnaissance

A M. le Pr Noël Milpied : je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de votre présence dans ce jury qui honore cette soutenance.

A M le Pr. François Xavier Mahon : merci de m'avoir accueilli dans vos laboratoires hospitalier et universitaire, de m'encourager dans ma formation et d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Mlle le Dr Audrey Bidet : je te remercie pour ta gentillesse, ta pédagogie et les connaissances que tu m'as apportées au cours de mon internat. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

A M. le Dr Eric Lippert : voilà 4 ans que tu me supportes et surtout que tu m'as donné le goût de l'Hématologie et de la Recherche. Merci pour toutes ces connaissances apportées, tes conseils avisés, ta patience et ta disponibilité sans faille.

A Marina : sans toi ce travail n'aurait pas pu être réalisé aussi rapidement. Merci pour ton aide précieuse.

A l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU : merci pour la qualité de vos enseignements et votre passion communicative pour cette belle discipline qu'est l'Hématologie.

A nos amis Clermontois : Jean, Anne-Claire, Fabien, Pierre-Yves, Léa, Philip, ... Merci pour tous ces souvenirs et bons moments passés sur les bancs de la faculté et à côté.

A mes anciens co-internes et autres amis de Bordeaux : vous avez tous contribué à faire de Bordeaux une ville où nous nous sentons bien et avons passé (et passerons encore) de bons moments. Pour cela merci.

A mes parents : merci de m'avoir soutenu tout au long de mes études. Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir (parfois au prix de certains sacrifices). Soyez assurés l'un comme l'autre de mon affectueuse gratitude.

A Amélie : tu partages ma vie depuis plus de 10 ans maintenant. Je te remercie pour ton amour, ton soutien inconditionnel, ta bonté et tes qualités (trop nombreuses pour toutes les citer) qui embellissent mon quotidien.

A Margot : dépêche toi d'arriver, on a hâte de te voir !

Table des matières

Abréviations.....
Introduction :	1
1. Les syndromes myéloprolifératifs :	1
A. Présentation clinico-biologique :	1
B. Physiopathologie :	4
C. Un nouvel acteur dans les SMP, le réticulum endoplasmique :	8
Matériel et Méthodes	21
1. Patients et matériel génétique	21
2. Recherche des mutations de <i>CALR</i>.....	21
A. Analyse de fragments sur ADN :	21
B. Analyse de fragments sur ARN :	22
C. Recherche des mutations de <i>CALR</i> par <i>Droplets Digital Polymerase Chain Reaction</i> (<i>ddPCR</i>) :	23
D. Analyse statistique	25
Résultats.....	26
1. Performances de la recherche de mutations de <i>CALR</i> par analyse de fragments sur ARN: 26	
2. Analyse de fragments sur ADN	27
3. Analyse de fragments sur ARN	31
4. Comparaison des analyses de fragments sur ADN et ARN.....	32
5. Comparaison des résultats obtenus par analyse de fragments et par <i>ddPCR</i>.....	36
Discussion.....	39
Bibliographie	44
Annexes	54
1. Critères diagnostiques de Polyglobulies de Vaquez.....	54
2. Critères diagnostiques de Thrombocytémies Essentielles	54
3. Critères diagnostiques de Myélofibroses Primitives.....	55
4. Critères diagnostiques de myélofibrose secondaire à une PV ou une TE	56
5. Recherche de mutations de <i>CALR</i> par analyse de fragments sur ADN :	57
6. Recherche de mutations de <i>CALR</i> par analyse de fragments sur ARN :	58

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ARSIA-t : Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en Couronne et Thrombocytose
AS-qPCR : PCR quantitative spécifique d'allèle
CA : Charge Allélique
CALR : Calréticuline
CBL : *Casitas B-cell lymphoma*
COP-I : *Coatomer Protein-I*
ddPCR : *Droplets Digital Polymerase Chain Reaction*
DIPSS : *Dynamic International Prognostic Scoring System*
DIPSS-plus : *Dynamic International Prognostic Scoring System - plus*
dNTP : Désoxyribonucléotides Triphosphates
EPO : Erythropoïétine
ERAD : *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*
ERp57 : *Endotelial Reticulum protein of 57 kDa*
G : Guanidine
G-CSF : *Granulocytes-Colony Stimulating Factor*
GM-CSF : *Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor*
gp130 : Glycoprotéine de 130 kDa
HRM : *High Resolution Melting*
HSP : *Heat Shock Protein*
IL-3 : Interleukine 3
IL-5 : Interleukine 5
IPSS : *International Prognostic Scoring System*
JAK2 : Janus Kinase 2
JAK2V617F : mutation V617F de JAK2
JH : *JAK Homologous*
Kd : constante de dissociation
kDa : Kilodalton
LA : Leucémie Aiguë
LCN : Leucémie Chronique à Neutrophile
LMC : Leucémie Méloïde Chronique
LMMC : Leucémie Myélomonocytaire Chronique
MFP : Myélofibrose Primitive
MS : Mastocytose Systémique
µg : Microgramme
µL : Microlitre
µM : Micromolaire
MPL : *Myeloproliferative Leukemia virus* (récepteur de la thrombopoïétine)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
pb : paires de bases
PBS : *Phosphate Buffer Saline*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

PDI : Protein Disulfide Isomerase
PI3K : *Phosphatidyl-Inositol 3 phosphate Kinase*
PNN : Polynucléaires Neutrophiles
PV : Polyglobulie de Vaquez
RE : Reticulum Endoplasmique
RNase : Ribonucléase
SHE : Syndrome Hyperéosinophilique
SMD : Syndrome Myélodysplasique
SMP : Syndrome Myéloprolifératif
SMP Ph-négatifs : SMP chromosome Philadelphie-négatifs
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
T : Thymidine
TE : Thrombocytémie Essentielle
TPO : Thrombopoïétine

Introduction :

1. Les syndromes myéloprolifératifs :

A. Présentation clinico-biologique :

Le terme « syndromes myéloprolifératifs » (SMP) introduit par William Dameshek en 1951 rassemble au sein d'un même groupe plusieurs hémopathies partageant certaines similarités cliniques et biologiques.¹ Les principaux (et plus fréquents) SMP sont la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP). La classification de l'OMS a ensuite rattaché à ce groupe d'hémopathies les Mastocytoses Systémiques (MS), les Leucémies Chroniques à Neutrophiles (LCN), les Syndromes Hyperéosinophiliques (SHE) et les Syndromes Myéloprolifératifs inclassables.²

Schématiquement, les SMP sont divisés en 2 groupes. D'un côté la LMC caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie³ résultant de la translocation t(9;22)(q34;q11).⁴ De l'autre côté, les SMP dit « Philadelphie-négatifs » (SMP-Ph négatifs) qui par opposition à la LMC ne présentent pas le transcrite de fusion BCR-ABL1 (équivalent moléculaire de la translocation t(9;22)) et dont les formes dites « typiques » rassemblent la PV, la TE et la MFP.

Les SMP sont la conséquence d'anomalies des cellules souches hématopoïétiques à l'origine d'une hypersensibilité ou d'une indépendance vis-à-vis de la régulation exercée par les cytokines.^{5,6} Ils sont caractérisés par une maturation cellulaire conservée responsable avec la prolifération cellulaire excessive d'une augmentation du taux de cellules matures ; la MFP déroge quelque peu à cette règle puisqu'il existe dans cette maladie des anomalies de maturation des mégacaryocytes. Cette myéloprolifération implique les 3 lignées myéloïdes mais prédomine sur l'une (ou 2) d'entre elles : la lignée granuleuse pour la LMC, la lignée érythroïde pour la PV, la lignée mégacaryocytaire pour la TE et les lignées mégacaryocytaire et granulocytaire pour la MFP.⁷ Il ne s'y associe pas de dysmyélopoïèse, ce qui distingue les SMP des Syndromes Myélodysplasiques (SMD) et des syndromes « frontières » SMP/SMD tels que les Leucémies Myélomonocytaires Chroniques (LMMC), les Leucémies Myélomonocytaires Juvéniles (LMMJ) ou les LMC atypiques.²

Leucémie Myéloïde Chronique

La LMC est caractérisée par une prolifération cellulaire intéressant majoritairement les lignées granuleuses. Classiquement les patients présentent une hyperleucocytose massive (médiane > 100 G/L) liée à une polynucléose neutrophile associée à une myélémie, une éosinophilie, une basophilie.^{2,8} Une thrombocytose modeste est généralement observée (médiane 430 G/L). Cependant 11% des patients présentent une thrombocytose > 1000 G/L. Une splénomégalie est détectée dans 75% des cas. Le plus souvent asymptomatique au diagnostic, des symptômes tels que des manifestations hémorragiques, des pertes de poids, sueurs ou symptômes liés à la splénomégalie peuvent parfois être observés.⁸ En l'absence de traitement, l'évolution se fait vers une transformation en Leucémie Aiguë (LA) avec décès dans les 5 ans.² Certains patients peuvent présenter des formes hyperthrombocytaires (avec une hyperleucocytose modérée) pouvant mimer une TE. A noter que les patients qui ont développé cette présentation sont presque exclusivement des femmes alors qu'une

prédominance masculine caractérise les LMC « typiques ». ⁹ Le diagnostic est bien sûr réalisé par la mise en évidence du transcrite de fusion BCR-ABL1. ¹⁰ Par ailleurs, l'histologie médullaire de ces patients correspond à celle des LMC, avec la présence notamment de mégacaryocytes de petite taille (comparativement à des mégacaryocytes normaux, d'autant plus notables par rapport aux mégacaryocytes géants observés au cours des TE) et hypolobés (le terme de mégacaryocytes « nains » est souvent employé). ^{2,9,11,12} Une légère basophilie est par ailleurs parfois rapportée. ^{9,11,13,14} La symptomatologie de ces patients consiste en des manifestations hémorragiques ou thrombotiques, des érythromélgies, se rapprochant donc plus de ce qui peut être observé lors des TE. Une splénomégalie est retrouvée moins fréquemment que dans les formes typiques (5 cas sur 20). ^{9,12,15,16} Le développement d'une LMC « classique » peut parfois s'observer dans l'évolution de la maladie. ^{9,13,16} Mais comme les LMC typiques, ces formes peuvent évoluer vers une myélofibrose ou une transformation blastique, rendant le pronostic plus mauvais que celui des TE d'où la nécessité d'identifier ces formes par la recherche du transcrite BCR-ABL1. ^{9,11} Aucune association entre cette forme et certains variants BCR-ABL1 n'a pu être mise en évidence. ¹³

Polyglobulie de Vaquez

La polyglobulie de Vaquez est caractérisée par une prolifération cellulaire portant principalement sur la lignée érythroblastique, à l'origine d'une augmentation des taux d'hématies et d'hémoglobine et de l'hématocrite. Une polynucléose neutrophile ainsi qu'une thrombocytose peuvent s'y associer, pouvant mimer une TE lorsque la polyglobulie reste modérée. L'histologie médullaire montre classiquement une prolifération des 3 lignées myéloïdes (panmyélose) portant préférentiellement sur les lignées érythroblastiques et mégacaryocytaires. ^{2,17,18} Le caractère primitif de la myéloprolifération peut être étayé par le dosage de l'érythropoïétine (dont le taux sera abaissé), ¹⁹ la mise en évidence d'une prolifération spontanée des progéniteurs (médullaires et/ou circulants) en absence de cytokine ²⁰ ou surtout par la mise en évidence de mutations de *JAK2* (voir plus bas).

Les manifestations cliniques sont essentiellement liées à l'hyperviscosité et aux anomalies vasculaires secondaires à l'augmentation de la masse sanguine. Les thromboses artérielles ou veineuses peuvent parfois révéler la maladie (12-39% des cas). ²¹ Des céphalées, vertiges et troubles de la vision ainsi que des érythromélgies et paresthésies peuvent également être présents. Toutefois le signe clinique le plus spécifique est le prurit à l'eau. Une splénomégalie (70% des cas) et une hépatomégalie (40%) sont fréquemment présentes. ^{2,17}

La PV est associée à une légère diminution de survie et surtout à une altération de la qualité de vie en lien avec les événements thromboemboliques. L'incidence des thromboses est estimée à 18 pour 1000 personnes-années, alors que celles des transformations en myélofibrose ou LA est évaluée à 5 pour 1000 patients-années (avec un délai de survenue médian de 13-14 ans). ^{21,22}

Thrombocytémie Essentielle

La Thrombocytémie Essentielle est caractérisée par une prolifération cellulaire portant essentiellement sur la lignée mégacaryocytaire. La thrombocytose est donc l'anomalie principale orientant vers une TE avec souvent une anisocytose plaquettaire. La leucocytose est généralement normale ou très légèrement augmentée, sans basophilie associée. L'histologie médullaire montre une moelle normocellulaire ou de richesse légèrement augmentée avec principalement une hyperplasie mégacaryocytaire. Les mégacaryocytes sont

classiquement de grande taille, avec un noyau hyperlobulé et un cytoplasme mature. Ils sont répartis dans la moelle, bien que parfois rassemblés en amas de petite taille et assez lâches. Outre les marqueurs moléculaires qui seront abordés plus loin, le caractère primitif de la prolifération peut également être évalué par la mise en évidence de progéniteurs mégacaryocytaires spontanés bien que cela ne fasse pas partie des critères diagnostiques définis par l'OMS.^{2,23}

Cliniquement, la TE reste généralement silencieuse, bien que parfois découverte sur des événements thromboemboliques ou hémorragiques. Des érythromélgies sont parfois observées. Une splénomégalie peut être retrouvée dans moins de la moitié des cas, les hépatomégalies étant plus rares (environ 20%).^{2,17}

La TE est le SMP dont l'évolution est la plus indolente. Les patients présentent la meilleure espérance de vie des SMP (mais celle-ci reste légèrement inférieure à celle de la population normale²⁴), et l'évolution vers la myélofibrose ou la LAM est rare (risque de 2% à 15 ans, avec une médiane de survenue de 10-15 ans). Les principaux risques sont liés aux accidents thromboemboliques ou hémorragiques. Leur incidence est évaluée à 12 pour 1000 patients-année, et celles des transformations en myélofibrose et LAM à 1,6 et 1,2 pour 1000 patients-année respectivement.^{2,17,21}

Myélofibrose Primitive

La MFP résulte d'une prolifération cellulaire portant sur les lignées mégacaryocytaire et granuleuse associée à un certain degré de fibrose médullaire ainsi qu'à des anomalies de maturation de la lignée plaquettaire. Elle est caractérisée par une évolution en 2 phases : une phase initiale dite « pré-fibrotique » puis une phase fibrotique. Trente pourcents des patients sont asymptomatiques au diagnostic, les autres pouvant présenter des symptômes altérant leur qualité de vie tels que fatigue, dyspnée, perte de poids, sueurs nocturnes, fièvre inexplicite.^{2,17} Une splénomégalie parfois massive est palpée chez 90% des patients (liée à l'hématopoïèse extramédullaire), une hépatomégalie dans 50% des cas.² Au niveau sanguin, une érythromyélie et une anisopoikilocytose avec présence de dacryocytes sont fréquentes. Une circulation de cellules blastiques est fortement associée à la maladie et constitue un facteur pronostic péjoratif si le taux excède 1% des leucocytes.²⁵ Les patients présentent généralement une anémie d'intensité variable. L'histologie médullaire montre au cours de la phase cellulaire de la maladie une hypercellularité avec une prolifération portant principalement sur les lignées mégacaryocytaire et granulocytaire tandis que la lignée érythroblastique présente une tendance à l'hypoplasie. Par ailleurs les mégacaryocytes ont tendance à se regrouper en amas au niveau des régions endostéales et des sinus vasculaires. Une dysmégacaryopoïèse est habituellement observée associant un pléomorphisme avec des variations importantes de taille, des anomalies du rapport nucléocytoplasmique (signe d'altération de leur maturation), un noyau hypolobulé et un hyperchromatisme nucléaire.¹⁷ Lors de l'évolution de la maladie vers la phase « fibrotique », une hypoplasie médullaire s'installe, le tissu hématopoïétique étant progressivement remplacé par des adipocytes et des dépôts de fibres de réticuline et de collagène apparaissent.

La médiane de survie à la phase fibrotique est estimée à 4-5,5 ans (correspondant à une réduction de l'espérance de vie de 30% environ). La MFP est donc associée au plus mauvais pronostic des SMP Ph-négatifs.^{2,21} Les causes de morbidité sont l'insuffisance médullaire, les thromboses ou hémorragies, les transformations en LAM (20% de transformation à 10 ans). Notons que la survie des MF post-TE est comparable à celle des MFP.²¹

Ces différentes données clinico-histo-biologiques ont conduit à la proposition de critères diagnostiques définis par l'OMS en 2008 détaillés en annexe.

B. Physiopathologie :

La physiopathologie des SMP reste à ce jour incomplètement comprise. Cependant, plusieurs découvertes ont permis d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes oncogéniques de ces maladies comme la reconnaissance d'une hypersignalisation des voies JAK-STAT et PI3K dans les cellules érythroïdes et myéloïdes puis la découverte des mécanismes moléculaires déclenchants.⁵

Anomalies cytogénétiques :

Le bilan diagnostique des hémopathies malignes fait souvent intervenir une étude cytogénétique, des anomalies chromosomiques pouvant expliquer l'oncogenèse de certaines hémopathies, au premier rang desquelles la LMC, mais aussi certaines leucémies aiguës (LA) ou certains syndromes myélodysplasiques (SMD).

Comme précédemment évoqué, la LMC est caractérisée par la translocation t(9;22)(q34;q11) conduisant à la génération du chromosome Philadelphie. Cette translocation aboutit à la production du transcrite de fusion BCR-ABL1 responsable de la maladie.²⁶

Au cours des PV et TE, les patients présentent rarement des anomalies cytogénétiques (respectivement 11% et 7% des patients). Les anomalies les plus fréquemment décrites sont les trisomies 8 et 9, les délétions du bras long du chromosome 20 (del(20q)) ainsi que les anomalies du chromosome 1. Ces anomalies par ailleurs non spécifiques de ces maladies (en dehors des trisomies 9 qui se voient principalement dans les PV et certaines MF *JAK2* mutées) ne sont pas associées à un impact pronostique particulier.^{27,28}

La MFP se démarque des 2 autres SMP Ph-négatifs typiques par une plus grande fréquence des anomalies chromosomiques (30-40% des patients au diagnostic), essentiellement représentées par les del20q, del13q et anomalies du chromosome 1, les trisomies 8 et 9 étant également fréquentes. A noter que le caryotype des patients présentant des MF post-PV est plus fréquemment anormal que ce qui est rapporté dans les MFP et PV (60-90% des cas) ce qui n'est pas le cas des MF post-TE (30-40%). De plus, contrairement aux PV et TE, un impact pronostique péjoratif sur la survie a été démontré pour certaines anomalies, incitant certains auteurs à intégrer ces données dans le calcul du score pronostique DIPSS-plus. De plus, un caryotype défavorable selon les critères du DIPSS-plus prédit un risque accru de transformation en LAM.²⁹

Ainsi, mis à part le chromosome Philadelphie, les différentes anomalies cytogénétiques décrites ne permettent pas d'expliquer la physiopathologie des SMP classiques.

Anomalies moléculaires :

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des SMP a progressé récemment par la découverte des anomalies moléculaires impliquées. L'activité constitutive des protéines de fusion BCR-ABL1 ou celles impliquant les récepteurs au *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)³⁰ ou encore les mutations du récepteur c-KIT³¹ étaient autant d'exemples de l'implication des Tyrosines Kinases dans l'oncogenèse des SMP. Toutefois, au

cours des PV, TE et MFP, aucune protéine de fusion n'a été mise en évidence. Mais l'activation des voies de signalisation, et notamment de la voie JAK2-STAT5 semblait indiquer que ces maladies comme les autres SMP étaient des « maladies des kinases ».³²

JAK2V617F

La découverte de la mutation *JAK2V617F* (Janus kinase ou *Just Another Kinase*) en 2005 par l'équipe de W Vainchenker constitue une étape marquante dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des SMP Ph-négatifs.³³⁻³⁶

La famille JAK se compose de 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ces tyrosine-kinases s'associent au domaine cytosolique des récepteurs aux cytokines. Elles présentent dans leur partie C-terminale 2 domaines homologues, le domaine JH1 (*JAK Homologous*) portant l'activité kinase et un domaine pseudokinase JH2 catalytiquement inactif, mais qui exerce une régulation négative sur l'activité kinase du domaine JH1.³⁷ A la partie N-terminale, les domaines JH5-JH7 contiennent des motifs FERM-like (Band-4.1, Ezrin, Radixin, et Moesin) permettant l'interaction avec le domaine cytosolique des récepteurs auxquels ces protéines sont associées.

Ces tyrosines kinases sont associées aux

- récepteurs homodimériques « myéloïdes » : récepteurs à
 - l'érythropoïétine (EPO) - EPO-R
 - la thrombopoïétine (TPO) - MPL ou TPO-R
 - au *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) - G-CSF-R ou CSF3R
- récepteurs à la prolactine et l'hormone de croissance
- récepteurs hétérodimériques :
 - récepteurs de la famille IL-3R partageant la chaîne commune β
 - IL-3-R
 - *Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) - GM-CSF-R
 - IL-5-R
 - récepteurs de la famille gp130
- récepteur R2 à l'interféron γ - IFN γ -R2.³⁸

La mutation *JAK2V617F* correspond à une transversion d'une guanidine (G) en Thymidine (T) en position 1849 au niveau de l'exon 14, responsable de la substitution de la valine en position 617 par une phénylalanine (figure 1).³³⁻³⁶ Or cette valine est prédite comme participant à une interface entre les domaines JH1 et JH2.³⁷ Sa substitution par une phénylalanine entraîne ainsi la perte de l'inhibition exercée par le domaine JH2 sur le domaine kinase. *JAK2V617F* est ainsi capable de déclencher un SMP via l'activation constitutive de l'activité tyrosine kinase de *JAK2* et d'une activation de STAT5 indépendamment de la liaison d'un ligand sur l'un des récepteurs auquel *JAK2* est associée (EPO-R, MPL, IL3 ou CSF3R).³⁸ Ceci conduit à une croissance cellulaire indépendante des facteurs de croissance et d'une augmentation de la survie cellulaire.³³⁻³⁵

Les mutations *JAK2V617F* sont retrouvées dans 95% des PV et dans 50-60% des cas de TE et MFP.⁷ Elles sont également détectées dans 30-50% des thromboses des veines

splanchniques^{39,40} et Anémies Réfractaires avec Sidéroblastes en couronne et Thrombocytose (ARSIA-t).⁴¹⁻⁴³ Elles ont également été décrites au cours des LMMC, des MS, des LCN et des SHE avec une fréquence bien moindre.⁴⁴⁻⁴⁶

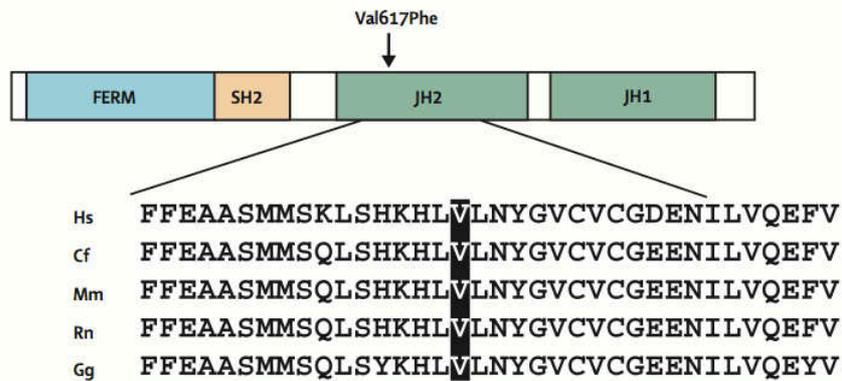


Figure 1 : Structure de la protéine JAK2 et séquence protéique au niveau de laquelle survient la mutation V617F. Les séquences alignées montrent la conservation du résidu Valine modifié par la mutation. (Baxter *et al*, Lancet 2005³⁵)

Le fait que cette mutation soit retrouvée au cours de 3 maladies de phénotype différent reste à ce jour incomplètement expliqué. L'une des hypothèses proposées est que les PV et TE seraient une même entité dont le phénotype est déterminé par la charge mutationnelle *JAK2V617F*. Un continuum entre ces maladies serait ainsi observé, certains patients présentant une TE et une mutation *JAK2V617F* pouvant évoluer vers une PV.⁴⁷ Le modèle proposé comporterait 2 étapes. L'apparition de la mutation *JAK2V617F* donnerait naissance à un clone hétérozygote prenant l'avantage sur l'hématopoïèse physiologique. Dans un second temps, une recombinaison mitotique permettrait la duplication de l'allèle muté et l'élimination de l'allèle sauvage. Le clone homozygote ainsi généré acquerrait alors un avantage prolifératif sur le clone hétérozygote et pourrait s'expander aux dépens de ce dernier (figure 2). L'acquisition de cette homozygotie associée à l'expansion du clone homozygote déterminerait ainsi le phénotype de la maladie.³³⁻³⁵

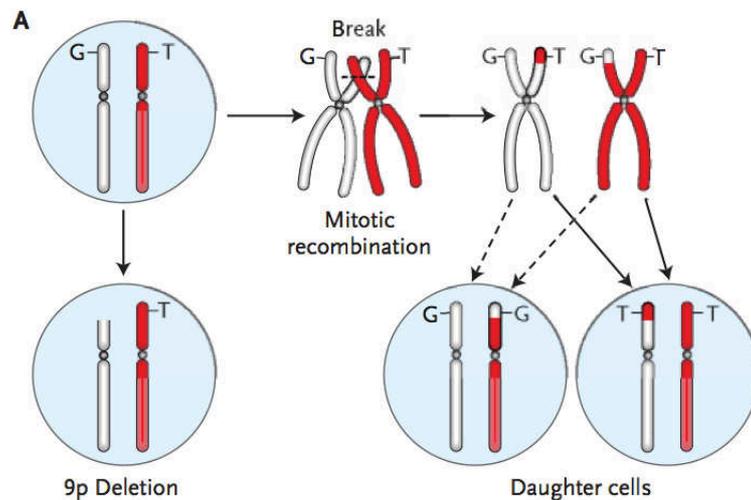


Figure 2 : Mécanisme conduisant à l'homozygotie pour l'allèle muté *JAK2V617F*. La recombinaison mitotique entre les chromosomes portant l'allèle muté et l'allèle sauvage conduit à la délétion de ce dernier et le doublement du nombre de copies du premier. (Kralovics *et al*, NEJM 2005³⁴)

Ce modèle est reflété par les charges mutationnelles chez les patients. Elles sont globalement faibles au cours des TE, plus importantes au cours des MFP et des PV et augmentent lors de la transformation des PV et TE en MF.^{34,35} Par ailleurs, des modèles murins semblent indiquer qu'une faible charge allélique *JAK2V617F* est associée à un phénotype proche de la TE tandis qu'une charge plus importante induit une maladie plus proche de la PV.^{48,49}

D'autres facteurs comme le sexe, le type de cellule dans laquelle la mutation apparaît ou encore d'autres facteurs génétiques ou épigénétiques sont également évoqués comme modulateurs du phénotype des SMP Ph-négatifs.⁵⁰

JAK2 exon 12 :

L'étude de patients atteints de PV mais ne présentant pas la mutation *JAK2V617F* a permis d'identifier d'autres mutations de *JAK2* survenant au niveau de l'exon 12 et non de l'exon 14.⁵¹ Au contraire de *JAK2V617F*, ces mutations ne surviennent qu'au cours des PV.^{51,52} Elles consistent en des mutations ponctuelles ou des insertions et/ou délétions, la plus fréquente étant la délétion N542-E543del.⁵¹⁻⁵⁶ La prévalence de ces mutations dans la PV est estimée à 1,9-4,1% des patients.^{55,57} Ainsi, *JAK2* est mutée chez virtuellement tous les patients atteints de PV, c'est pourquoi la présence d'une mutation de *JAK2* est actuellement considérée comme un critère diagnostique majeur pour cette maladie.^{2,58}

Comme *JAK2V617F* ces mutations induisent une prolifération cellulaire indépendante des cytokines consécutive à une activation de la voie JAK2-STAT5, mais avec une signalisation plus intense, expliquant peut-être pourquoi seul le phénotype polyglobulique est associé à ces anomalies.⁵¹

Cliniquement et biologiquement, ces patients présentent essentiellement une polyglobulie (isolée dans 2/3 des cas⁵⁶) parfois accompagnée d'une thrombocytose et/ou hyperleucocytose restant plus modérées qu'en cas de mutation *JAK2V617F*. Leur taux d'EPO est souvent abaissé et la culture de progéniteurs érythroïdes EPO-indépendants habituellement positive.⁵¹⁻⁵⁶ Ces patients sont généralement plus jeunes que ceux mutés *JAK2V617F*^{51,53} et présentent une polyglobulie plus importante. Leur histologie médullaire révèle généralement une moelle hypercellulaire en lien avec une hyperplasie érythroïde.^{51,54,56} Le pronostic, les complications thrombotiques et les transformations en MF ou LAM sont comparables au PV *JAK2V617F* positives.⁵⁶ Ces mutations ne semblent par ailleurs pas associées aux thromboses splanchniques.⁵³

MPL :

Découvertes dans les SMP par Pikman *et al.*, les mutations affectant le récepteur de la thrombopoïétine (TPO) –MPL- sont retrouvées au cours de 4-10,6% des MFP et 1-4,1% des TE.⁵⁹⁻⁶⁴ Ces mutations n'ont pas été identifiées dans les PV, les SMD, les LMMC ou les LAM de novo.⁶⁰ Elles surviennent au niveau de l'exon 10, et plus précisément du résidu 515 localisé à la jonction domaine cytoplasmique-domaine transmembranaire, important pour l'activation du récepteur.⁵⁹ Les 2 mutations les plus fréquentes sont les W515L et W515K. Plus rarement les mutations W515A et W515R peuvent être observées.⁶³ La mutation S505N précédemment associée aux thrombocytoses familiales^{65,66} peut également être retrouvée au cours de SMP sporadiques.⁶⁴

Les mutations *MPLW515* confèrent aux cellules qui les acquièrent une croissance

indépendante des CK, une hypersensibilité à la TPO et une activation constitutive de JAK2, STAT3, STAT5, AKT et ERK.⁵⁹ Cette signalisation reste sensible à l'action des inhibiteurs de JAK2.⁵⁹ Bien que généralement exclusives les unes des autres, les mutations de *MPL* peuvent être associées avec les mutations *JAK2V617F* (dont la charge reste généralement faible),⁶⁰⁻⁶² de même que plusieurs mutations *MPLW515* (L et K) peuvent coexister chez un même patient.^{60,62} Mais ces situations sont exceptionnelles et reflètent vraisemblablement une hétérogénéité clonale. Ces mutations peuvent être retrouvées à l'état hétérozygote ou homozygote, plus fréquemment pour la mutation W515K que la mutation W515L dans ce dernier cas.⁶⁰⁻⁶⁴ L'homozygotie *MPLW515* reste toutefois beaucoup plus rare que dans le cas de *JAK2V617F*.

L'hypothèse d'une association avec une prolifération essentiellement mégacaryocytaire peut être émise. En effet, ces patients présentent habituellement des taux d'hémoglobine moindre que les autres et une thrombocytose plus importante a été observée au cours des TE comparativement aux patients *JAK2V617F*. De plus il semble exister au niveau médullaire une hypocellularité notamment érythroïde par rapport aux patients non mutés pour *MPL*. Enfin, ces patients ne présentent pas de colonies érythroïdes endogènes contrairement aux cas mutés *JAK2V617F*.^{61,62,64,67,68}

Cliniquement, l'impact sur le risque thrombotique reste controversé (une augmentation du risque de thromboses artérielles ou veineuses a été observé dans certaines études).^{61,64} Ces mutations pourraient par ailleurs être associées à une augmentation des manifestations liées aux troubles micro-circulatoires au cours des TE.^{61,69} Aucun impact sur la survie ou le risque de transformation n'a pu être mis en évidence.^{61,64}

Autres mutations :

Les 3 types de mutations décrits précédemment ont fait la preuve de leur implication dans la physiopathologie des SMP et le développement du phénotype de la maladie, notamment par le développement de SMP dans divers modèles murins. D'autres mutations ont été décrites au cours des SMP, impliquant des gènes de l'épigénétique (*TET2*,^{70,71} *IDH1/2*,⁷²⁻⁷⁴ *EZH2*,⁷⁵⁻⁷⁷, *ASXL1*,⁷⁷⁻⁷⁹ *DNMT3A*,⁸⁰⁻⁸²), la machinerie d'épissage (*U2AF1*, *SF3B1* et *SRSF2*),⁸³⁻⁸⁵ des régulateurs de la signalisation cellulaire (*CBL*,⁸⁶⁻⁸⁸ *LNK*,⁸⁹⁻⁹¹). Des délétions d'*IKZF1*⁹² ou de *TP53*^{93,94} ont également été signalées. Toutefois, ces mutations sont également mises en évidence au cours d'autres hémopathies (notamment SMD et LA) et peuvent être associées aux mutations de *JAK2* ou *MPL*. Par ailleurs, certaines sont peu fréquentes dans les SMP et sont essentiellement associées aux formes avancées de la maladie (transformation en MF ou LA). Leur implication dans le phénotype « myéloprolifératif » reste donc peu probable.

C. Un nouvel acteur dans les SMP, le réticulum endoplasmique :

Après la découverte des mutations *JAK2V617F* et *JAK2* exon 12, la totalité des cas de PV semblaient avoir trouvé leur explication physiopathologique. Toutefois, les 30-35% des TE et MFP ne présentant ni la mutation *JAK2V617F* ni de mutation de *MPL* n'avaient pas de base moléculaire connue jusqu'à la découverte en décembre 2013 des mutations de *CALR*.

Calréticuline et physiologie du réticulum endoplasmique :

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite cellulaire constitué de tubules en connexion avec l'enveloppe nucléaire impliqué dans différents processus. En premier lieu, il est le site de synthèse des glycoprotéines sécrétées ou membranaires, mais également le siège de la synthèse de lipides et de stéroïdes ou encore un site de séquestration et de relargage du calcium.⁹⁵

La calréticuline : structure et fonctions

La calréticuline (CALR) est une protéine de 60 kDa présente à l'état soluble dans la lumière du RE. Elle est constituée de 3 domaines : un domaine globulaire N-terminal, un domaine P riche en proline et un domaine C-terminal (figure 3).

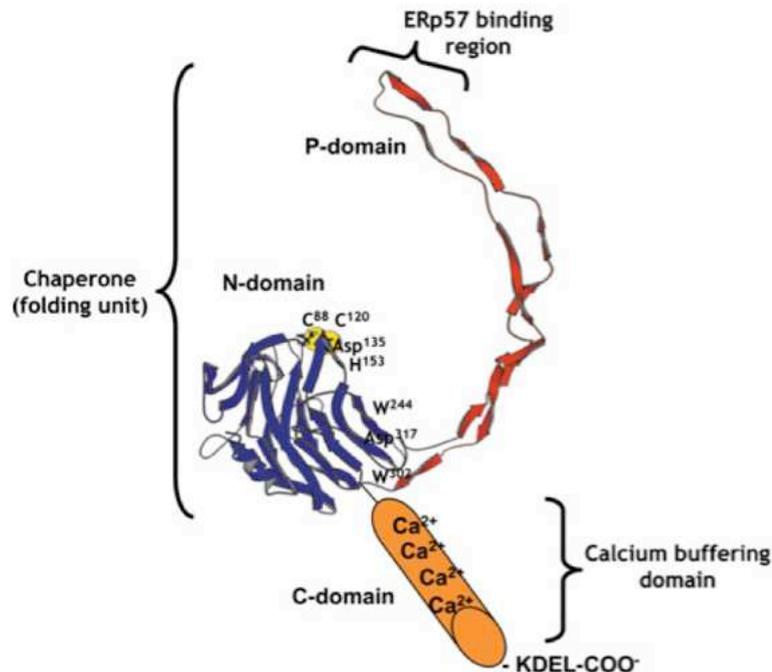


Figure 3 : Structure de la calréticuline. La protéine est constituée de 3 domaines (N, P et C) chacun impliqué dans une ou plusieurs fonction(s) de la protéine (chaperonne, liaison du calcium). (Michalak *et al*, Biochemical Journal, 2009⁹⁶)

La fonctionnalité d'une glycoprotéine ainsi que son expression nécessitent une séquence en acides aminés spécifique mais également l'acquisition d'une conformation spatiale adéquate. Cette conformation est bien sûr déterminée par sa séquence en acides aminés, mais également par les modifications co- et post-traductionnelles qu'elle peut subir, parmi lesquelles la N-glycosylation. Ce processus consiste dans un premier temps à greffer au niveau des résidus asparagine un motif de base constitué de 2 N-acétylgalactosamines, 9 mannoses et 2 glucoses (Glc₃Man₉NAcGlc₂, figure 4). Ce motif sera ensuite modifié par excision des glucoses et d'un mannose dans le RE puis modelé dans l'appareil de Golgi afin d'acquies la composition adéquate des chaînes glycosylées.

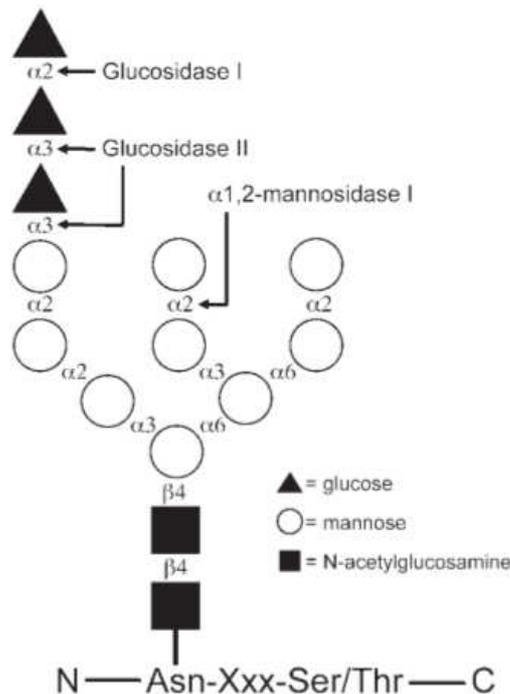


Figure 4 : Composition du motif de base des chaînes N-glycosylée. Ce motif est composé de 2 N-acétylgalactosamines, 9 mannoses, et 3 glucoses (Ellgaard et Frickel, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2003⁹⁷)

Au niveau du RE, un système de protéines chaperonnes permet aux glycoprotéines en formation d'acquies leur conformation correcte. Ces chaperonnes stabilisent les formes de conformation intermédiaire, ralentissent leur repliement afin d'éviter les agrégations et l'acquisition de mauvaises configurations. Plusieurs familles de protéines chaperonnes sont décrites parmi lesquelles les *Heat Shock Proteins* (HSP) et les Protein disulfide isomerase (PDI ou ERp57).⁹⁸ Par ailleurs un système d'assurance qualité permet de surveiller que les glycoprotéines en formation se replient correctement avant de pouvoir être exportées vers leur localisation finale. Ce système met principalement en jeu 2 lectines : la calréticuline (présente dans la lumière du RE sous forme soluble) et son homologue transmembranaire, la calnexine. En cas de conformation incorrecte, ces lectines permettent la rétention des glycopeptides en formation dans le RE afin de leur permettre de se replier correctement en prolongeant le contact avec d'autres protéines chaperonnes (figures 5 et 6). En cas d'échec du système chaperon, les peptides sont orientés vers une dégradation protéosomale via le système ERAD (figure 6).⁹⁸

La calréticuline se lie ainsi à de nombreuses glycoprotéines en cours de synthèse dans le RE. Cette liaison fait principalement intervenir le domaine globulaire N-terminal. Celui-ci permet à CALR de lier les résidus N-glycosylés des glycoprotéines avec une spécificité pour les glycopeptides portant l'oligosaccharide intermédiaire ne comportant plus qu'un seul glucose ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{NAcGlc}_2$). CALR semble également lier directement certains segments peptidiques via son domaine N. Le domaine P participerait lui aussi à la liaison des glycoprotéines.^{95,96,99}

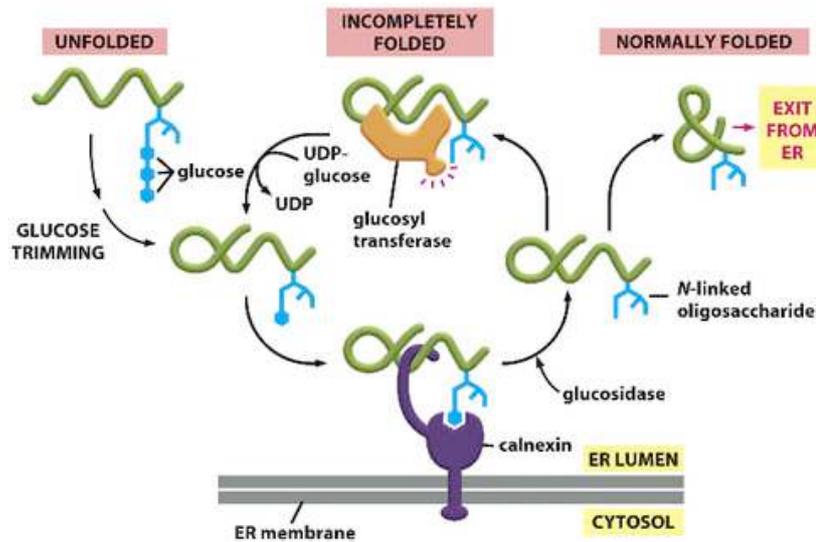


Figure 5 : Principe du système de contrôle qualité des glycoprotéines sécrétées. Les glycoprotéines en formation doivent acquérir une conformation spatiale adéquate pour pouvoir être sécrétées ou exprimées à la membrane. Tant que cette conformation n'est pas obtenue, elles sont retenue dans le réticulum endoplasmique afin de favoriser leur repliement correct (Molecular Biology of the Cell, 4th edition, Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter, New York: Garland Science; 2002).

Le domaine-P en épingle constitue un site de liaison du calcium avec une forte affinité ($K_d = 1 \mu\text{M}$) mais une faible capacité. C'est également ce domaine qui permet de lier ERp57.^{95,96,99}

Le domaine C (C-terminal) comportant de nombreux résidus acides permet de lier le calcium avec une faible affinité ($K_d = 2 \text{ mM}$) mais une forte capacité. Ce domaine permet ainsi à CALR de jouer un rôle de tampon calcique. Elle participe donc à la constitution d'une réserve en calcium dans la cellule et régule ainsi la signalisation et les processus dépendants du calcium.⁹⁹

Le motif térapeptidique KDEL (Lysine, Aspartate, Glutamate, Leucine) est un motif de rétention dans le RE localisé au niveau de l'extrémité C-terminale de nombreuses protéines solubles résidentes du RE dont CALR. Il permet aux protéines emportées dans le Golgi d'être « rapatriées » dans le RE via les vésicules recouvertes par Coatomer Protein (COP)-I et ainsi de rester sur leur « site de travail ».⁹⁸

D'autres fonctions ont été décrites pour CALR, notamment un rôle dans l'immunité anti-cancéreuse ; son expression à la surface des cellules constitue en effet un signal favorisant leur phagocytose. Son implication dans l'adhésion cellulaire, la réparation des tissus entre autres est également démontrée.^{95,96}

Les mutations de calréticuline dans les SMP :

Fréquence

Les mutations de *CALR* ont initialement été décrites par 2 équipes européennes en décembre 2013.^{106,107} Elles sont essentiellement observées au cours des SMP Ph-négatifs, et plus particulièrement au cours des TE et des MFP dont elles représentent 25-30% et 20-30% des cas respectivement (devenant ainsi la 2^{ème} mutation la plus fréquente au cours de ces maladies, tableau 1).^{47,69,106-110} Cette découverte diminue à 8-10% la proportion de patients pour lesquels aucune mutation « fondatrice » n'est mise en évidence (ces cas sont maintenant désignés comme « triples négatifs »).^{106,107}

Les 2 premières publications ont également recherché ces mutations au cours d'autres hémopathies et cancers. Ces mutations n'ont pour l'instant pas été mises en évidence au cours des PV, des LMC et autres SMP.^{106,107} Nangalia *et al* avait initialement observé des mutations de *CALR* au cours de 8% des SMD¹⁰⁷, mais d'autres études semblent indiquer une fréquence plus faible de l'ordre de 0-3,4%.^{106,111-113} La fréquence des mutations de *CALR* semble également faible au cours des syndromes frontières SMP/SMD tels que les ARSIA-t (1%¹¹¹) ou les LMMC (0-3%^{107,113}). Elles n'ont par ailleurs pas été observées au cours des LAM *de novo*, des tumeurs lymphoïdes, des cancers solides.¹⁰⁷

Comme *JAK2V617F*, les mutations de *CALR* semblent également survenir au cours de certaines formes moins classiques de SMP, telles que les formes pédiatriques (0-34% des TE^{114,115}, 50% des MFP¹¹⁶) ou familiales¹¹⁷⁻¹¹⁹ ou dans les thromboses splanchniques (mais avec une fréquence beaucoup plus anecdotique que *JAK2V617F* dans ce dernier cas).^{120,121}

Conséquences des mutations :

Le gène codant *CALR* est localisé sur le bras court du chromosome 19 et est constitué de 9 exons. Les mutations de *CALR* dans les SMP surviennent exclusivement au niveau de l'exon 9. Il s'agit d'insertions et/ou délétions à l'origine d'un décalage du cadre de lecture d'une paire de base (pb). Ceci conduit à la modification du domaine C de la protéine qui devient alors basique (et donc chargé positivement) et à la perte du motif KDEL (figure 7 et 8).^{106,107}

A ce jour, au moins 51 mutations différentes sont décrites dans la littérature, les 2 mutations les plus fréquentes (c.1092_1143del, p.L367fs*46, désignée comme la mutation de type 1 et c.1154_1155insTTGTC, p.K385fs*47 désignée comme type 2) représentant 80-85% des cas (figure 9, tableau 1). La mutation de type 1 correspond à une délétion de 52 pb, conduisant au remplacement de la quasi totalité des résidus chargés négativement par des résidus chargés positivement. Elle représente 45-53% des cas totaux et est significativement plus fréquente dans les MFP que dans les TE.^{47,106,107} La mutation de type 2 correspond à une insertion de 5 pb et conduit à une modification moins importante du domaine C que la mutation de type 1. Elle représente 31,7-41% des cas.^{47,106,107} Une étude bioinformatique a confirmée l'impact moindre de la mutation de type 2 sur la structure de la protéine comparativement à la mutation de type 1.¹²² La fréquence des autres mutations ne dépasse pas 2%.^{106,107}

	TE					MFP				
	Total (%)	JAK2/MPL négatifs (%)	type 1 (%)	type 2 (%)	TN (%)	Total (%)	JAK2/MPL négatifs (%)	type 1 (%)	type 2 (%)	TN (%)
Klampfl et al¹⁰⁶	25	67	46,1	37,9	10,3	35	88	65,7	20	4,7
Nangalia et al¹⁰⁷	31,4	73,1	38,8	48	11,5	14,1	59,5	62	24,3	9,6
Rumi et al⁴⁷	24	70,1	46	38	10	-	-	-	-	-
Rotunno et al⁶⁹	15,5	48,9	22,5	28,1	16,1	-	-	-	-	-
Chi et al¹²³	8*	27*	52	28	16,1	-	-	-	-	-
Lungberg et al¹²⁴	25	-	-	-	-	32	-	-	-	-
Tefferi et al¹⁰⁸	-	-	-	-	-	25	74	78	14	8,3
Tefferi et al¹²⁵	-	-	-	-	-	27	-	80	11	-
Tefferi et al¹⁰⁹	32	-	48	35	12	-	-	-	-	-
Tefferi et al¹¹⁰	28	-	45	39	12	-	-	-	-	-
Tefferi et al¹²⁶	23,3	-	-	-	14,6	21,5	-	78,3	10,9	12,1
Guglielmelli et al¹²⁷	-	-	-	-	-	18-24	-	-	-	-
Panagiota et al¹²⁸	-	-	-	-	-	21	52	61	13	-
Trifa et al¹²⁹	28,4	61,5	62,5	37,5	15,6	-	-	-	-	-
Qiao et al¹³⁰	31	57	44,9	33,3	22,5	12,1	30,8	25**	50**	27,3
Andrikovics et al¹³¹	33	76,2	50	32	11	25	69,4	64	12	11
Chen et al¹³²	22,5	67,3	54,5	27,3	10,9	-	-	-	-	-
Shen et al¹³³	26,3	53,8	46	30	-	-	-	-	-	-
Li et al¹³⁴	-	-	-	-	-	21	43	32	64	27

Tableau 1 : Fréquence des mutations de *CALR* au cours des thrombocytémies essentielles (TE) et myélofibroses primitives (MFP). TN : triples négatifs, *cohorte de thrombocytose et non de SMP, ** Fréquences sous réserve de l'effectif de la population d'étude (n=4)

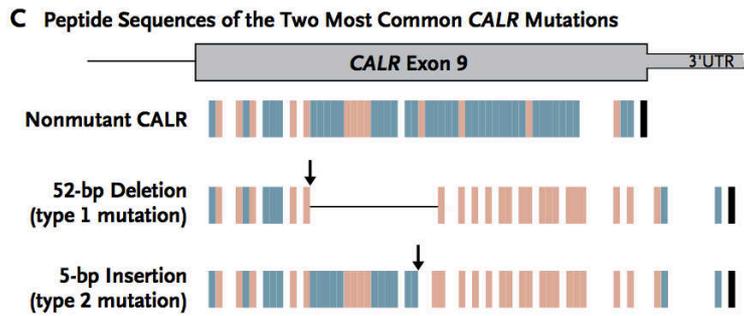


Figure 7 : Séquence peptidique des 2 mutations de CALR les plus fréquentes. Chaque barre représente un acide aminé. Les barres bleues désignent les acides aminés acides, les barres oranges les acides aminés basiques et les barres noires les codons stop. Les délétions et insertions de l'exon 9 de *CALR* conduisent à une modification importante de la charge des résidus terminaux (Klampfl *et al*, NEJM 2013¹⁰⁶).

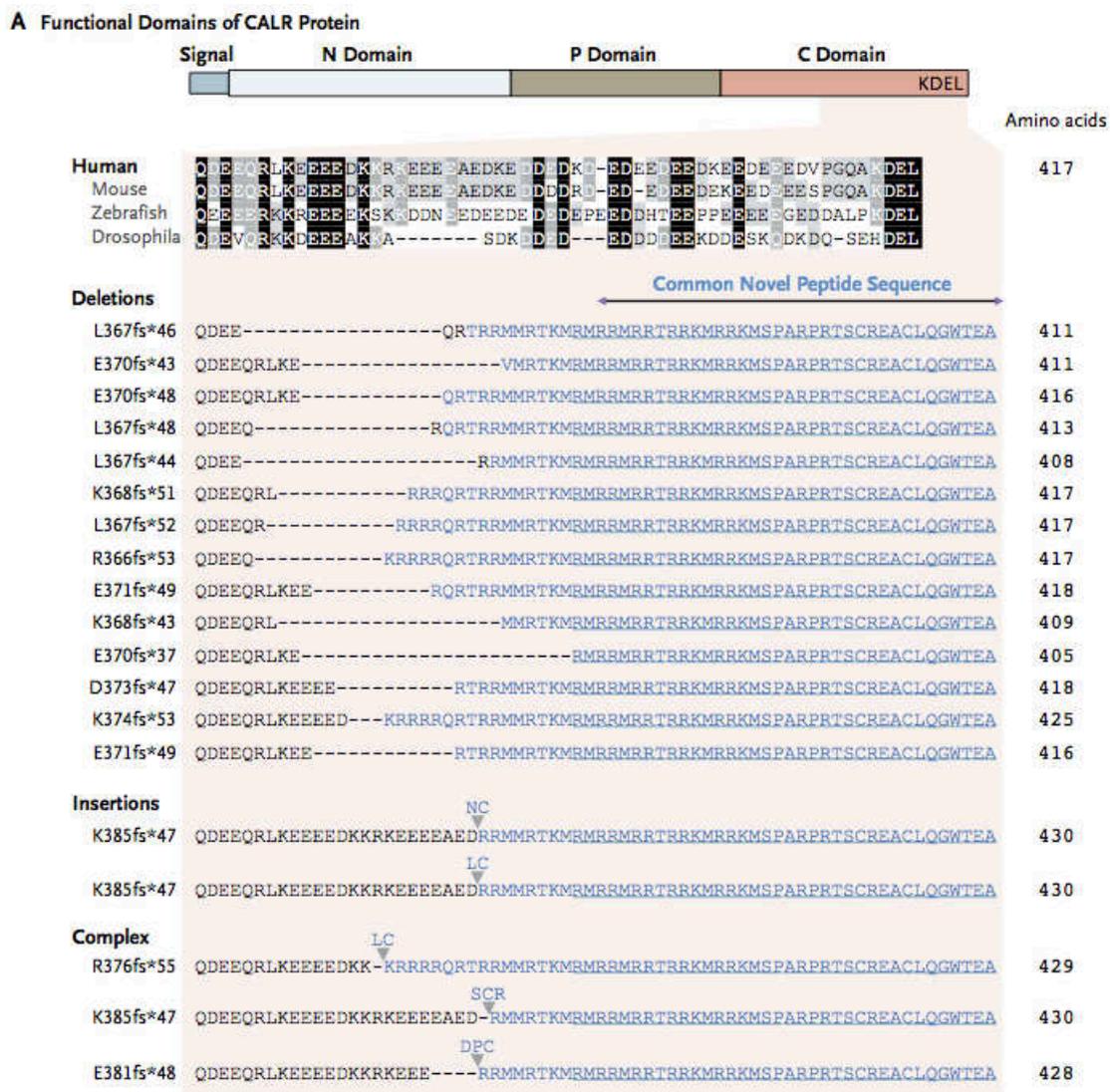


Figure 8 : Séquence peptidique de certaines mutations de CALR. Toutes les insertions et délétions conduisent au même décalage du cadre de lecture et à la génération d'une séquence commune terminale de 36 acides aminés, ainsi qu'à la perte du motif KDEL (Nangalia *et al*, NEJM 2013¹⁰⁷).

D Frequency of the 36 Mutation Types Detected in CALR

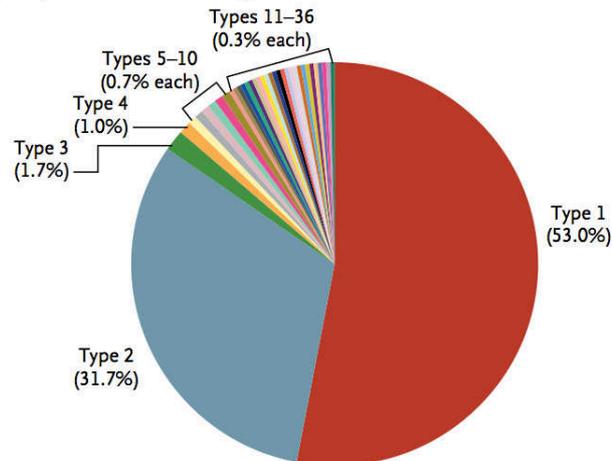


Figure 9 : Fréquence des différentes mutations de *CALR* au cours des SMP. Les 2 mutations les plus fréquentes (type 1 et type 2) représentent 80-85% des cas (Klampfl *et al*, NEJM 2013¹⁰⁶)

Comme les mutations *JAK2V617F* et *MPLW515*, les mutations de *CALR* rendent la croissance cellulaire indépendante des cytokines et stimulent une activation de *STAT5*.¹⁰⁶ Par ailleurs, la mutation est présente dans les cellules souches hématopoïétiques et apparaît précocément dans la maladie, suggérant son rôle dans l'oncogenèse des SMP, d'autant plus que la mutation est exclusive des mutations *JAK2V617F* et *MPLW515*.^{106,107} De plus, contrairement à la mutation *JAK2V617F* qui disparaît fréquemment lors des acutisations, les mutations de *CALR* semblent persister lors des transformations en LAM.¹⁰⁷ Ces mutations sont généralement retrouvées à l'état hétérozygote, mais une homozygotie est possible pour les mutations de type 2 uniquement.¹⁰⁶ L'association de mutations de *CALR* avec les mutations *JAK2V617F* et *MPLW515* ont été décrites dans d'exceptionnels cas, sans que la preuve ne puisse être faite que cette association intéresse un seul et même clone cellulaire.^{108,111,124,133}

La perte du motif KDEL suggérerait une altération de la localisation cellulaire de la protéine mutée, mais les données restent à ce jour contradictoires.^{106,107}

Particularités clinico-biologiques et pronostic

Que ce soit dans les TE ou les MFP, les mutations de *CALR* sont associées à une présentation clinico-biologique distincte et un pronostic favorable par rapport aux mutations *JAK2V617F*.

Au cours des TE, les mutations de *CALR* sont associées à un âge plus jeune et une représentation masculine plus importante par rapport aux cas mutés *JAK2V617F*.^{47,69,109} Par ailleurs, la prolifération semble plus spécifiquement atteindre la lignée mégacaryocytaire puisque les patients présentent une thrombocytose plus marquée et des taux d'hémoglobine et de leucocytes moindres que les patients mutés *JAK2V617F*.^{47,69,106,107,109,133,126} Toutefois, quelques différences pourraient distinguer les mutations de type 1 et de type 2. Les premières seraient prédominantes chez les hommes tandis que les secondes intéressent des patients plus jeunes et présentant une thrombocytose plus importante.^{110,129,131,135} En terme pronostic, les patients atteints de TE et mutés sur *CALR* ont un risque thrombotique diminué par rapport aux

patients mutés *JAK2V617F* (y compris dans les cas familiaux),^{47,69,106,109,119} mais aucune différence en terme de survie^{47,69,109,126} ou de risque de transformation n'a été mis en évidence.^{47,69,109}

Dans les MFP, les patients mutés pour *CALR* sont plus jeunes que les patients *JAK2V617F*.^{108,126} Ils présentent habituellement une leucocytose moindre, une thrombocytose plus importante ainsi qu'une moins grande fréquence d'anémie, d'hyperleucocytose et de thrombopénie par rapport aux patients *JAK2V617F*.^{106,108,126} Par ailleurs, les mutations de *CALR* ont un impact pronostique favorable dans les MFP puisque les patients mutés sur ce gène présentent une survie globale plus longue, y compris en cas d'allogreffe de moelle osseuse.^{106,108,126-128,131,136} Ce bénéfice de survie pourrait intéresser surtout les patients présentant une mutation de type 1, mais cela reste à confirmer.¹²⁵ Différentes études ont ainsi permis de déterminer que les patients triples-négatifs présentaient le pronostic le plus défavorable y compris dans les cas familiaux et en cas d'allogreffe.^{108,126,119,128}

Thérapeutique

Comme les patients présentant une mutation *JAK2V617F*, les patients mutés pour *CALR* semblent répondre aux traitements cytoréducteurs de la même manière. Ainsi, des patients traités par interféron pour une TE peuvent atteindre une réponse cytologique avec une diminution de la charge allélique *CALR*.¹³⁷ Par ailleurs, les patients atteints de MFP et traités par inhibiteur de *JAK2* semblent répondre d'une manière comparable aux patients mutés *JAK2V617F* en terme de réduction de la splénomégalie et des symptômes constitutionnels.¹³⁸

Techniques de dépistage et quantification des mutations de *CALR*

Les différentes études précédemment citées ont mis en œuvre différentes techniques pour détecter les mutations de *CALR*.

Détection sur ADN :

Séquençage : Sanger ou NGS

Les études princeps sont le résultat d'analyse d'exome entier par séquençage nouvelle génération (NGS).^{106,107} Cette technologie a permis d'identifier les mutations de *CALR*, mais également les autres mutations existant chez les patients atteints de SMP. La plupart des études ont utilisé (comme test de criblage ou de confirmation) des techniques de séquençage classique de type Sanger. Du fait de contraintes en terme de coût, de temps et d'une certaine « lourdeur » ainsi que de la faible sensibilité (pour la technique Sanger), d'autres techniques ont été utilisées pour rechercher les mutations de *CALR*.

Analyse de fragments

Cette technique est celle décrite comme méthode de criblage dans la publication de Klampfl *et al*, et utilisée par la suite dans différentes études.^{47,106,111,114} Elle consiste à réaliser une PCR « classique », si ce n'est que l'une des amorces est marquée par un fluorochrome. Les amplicons sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire afin de déterminer leur taille (figure 10).

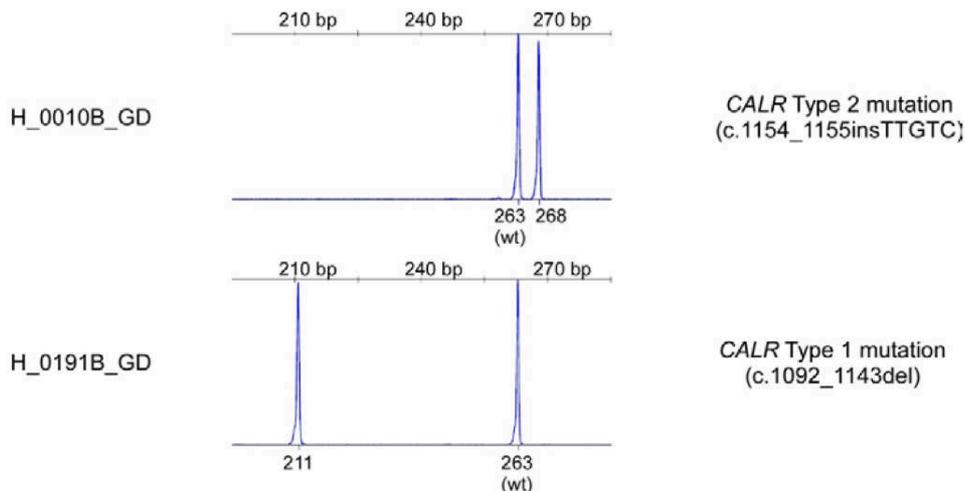


Figure 10 : Electrophorégramme d'une détection de mutations de *CALR* par analyse de fragments. Le pic correspondant au fragment de 263 pb correspond à l'amplicon de la forme sauvage, ceux correspondant aux fragments de 211 pb et 268 pb correspondent aux amplicons des formes mutées type 1 et type 2 respectivement (Klampfl *et al*, NEJM, 2014¹⁰⁶)

Autres techniques

D'autres techniques de détection sont actuellement développées dans les centres spécialisés, mais ne font actuellement pas l'objet de publication. Ces techniques incluent l'analyse de courbe de fusion de haute résolution (*High Resolution Melting* - HRM) qui consiste à analyser le profil de dénaturation des amplicons avec une résolution élevée grâce à l'utilisation d'un agent intercalant très précis. Une technique de quantification par PCR digitale est actuellement en développement au CHU de Bordeaux.

Détection de la protéine mutée :

Vannucchi *et al* ont produit un anticorps dirigé spécifiquement contre les parties C-terminales des *CALR* mutées, permettant la réalisation de marquages immunohistochimiques à visée diagnostique (figure 11).¹³⁹

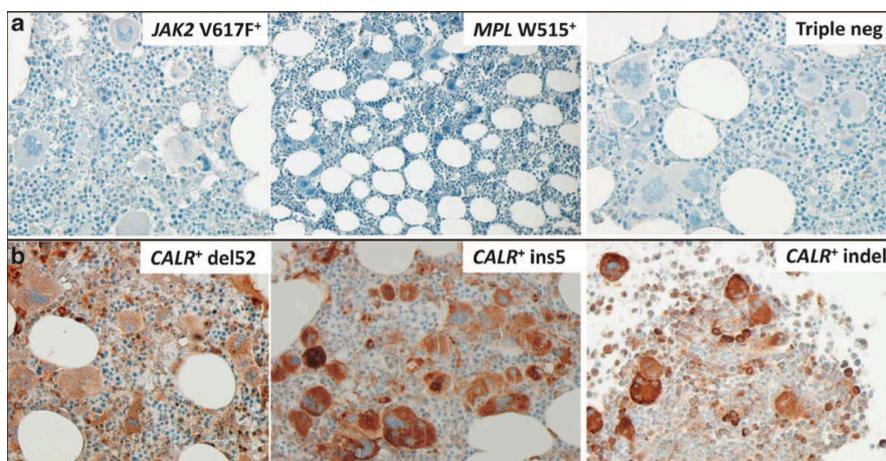


Figure 11 : Marquage immunohistochimique des protéines *CALR* mutées sur biopsies de moelle osseuse. Le marquage semble spécifique des protéines mutées, avec un marquage plus intense des mégacaryocytes comparativement aux autres lignées (Vannucchi *et al*, Leukemia 2014¹³⁹).

Détection sur ARN :

Pour le moment, aucune étude sur l'expression de *CALR* dans les SMP n'a été publiée. Différentes études ont cherché à déterminer l'intérêt de rechercher et d'évaluer la charge mutationnelle de *JAK2V617F* sur ARN.

L'une des premières études abordant cette question est celle de Kiladjian *et al* et semblait montrer un potentiel gain de sensibilité.¹⁴⁰ En utilisant une technique peu sensible (séquençage par technique Sanger), la mutation *JAK2V617F* peut parfois être retrouvée à partir de l'ARN plaquettaire sans l'être au niveau de l'ADN des polynucléaires neutrophiles. Cependant, dans cette même étude, la mutation *JAK2V617F* a également été mise en évidence au niveau de l'ADN de certains patients (PCR semi-quantitative) alors qu'elle restait indétectable sur ARN (Sanger).¹⁴⁰ La comparaison des charges mutationnelles déterminées par RT-qPCR sur ADN et sur ADNc extraits de PNN périphériques par Lippert *et al* a montré des résultats équivalents,¹⁴¹ contrairement aux résultats de Fantasia *et al*¹⁴² (figure 12). Par contre, il semblerait exister une différence de charge allélique entre ADN de PNN et ARN plaquettaire dans les TE (22% vs 42%, figure 13).^{143,144} Ceci explique probablement pourquoi dans l'étude de Kiladjian *et al*, la mutation a pu être détectée dans les plaquettes de certains patients et pas au niveau de leurs PNN.¹⁴³ Cependant, cette différence de charge mutationnelle ne semble pas impacter le taux de détection de la mutation, suggérant que le gain de sensibilité lié à l'utilisation d'ARN objectivé dans différentes études (qu'il soit d'origine plaquettaire ou leucocytaire)^{140,143,145-147} est surpassé par l'utilisation d'une technique très sensible telle que la PCR quantitative spécifique d'allèle (AS-qPCR).^{142,144}

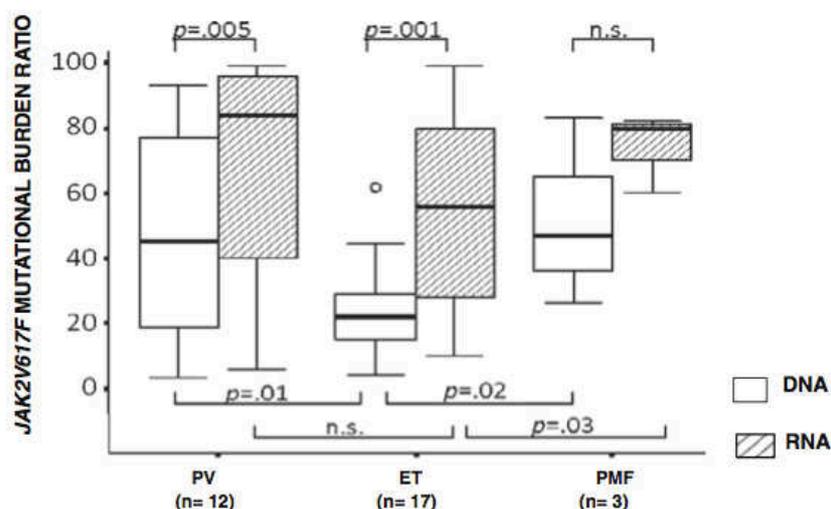


Figure 12 : Charge mutationnelle de *JAK2V617F* déterminées sur ADN et sur ARN de leucocytes (Fantasia *et al*, Ann Hem 2014¹⁴²). La charge allélique est significativement supérieure sur ARN par rapport à l'ADN au cours des PV et TE.

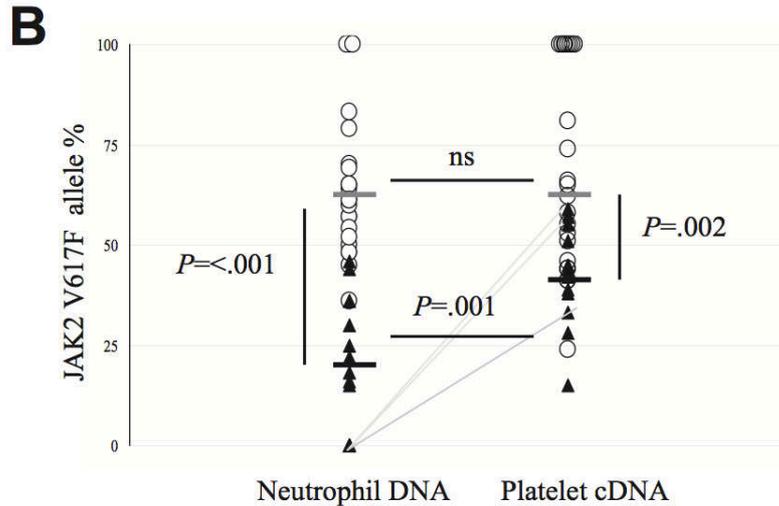


Figure 13 : Charge mutationnelle de *JAK2V617F* chez des patients atteints de TE sur ADN de PNN et sur ARN plaquettaire (Moliterno *et al*, Blood 2006).¹⁴³ La charge allélique déterminée sur ARN de plaquettes est significativement supérieure à la charge déterminée sur ADN de polynucléaires neutrophiles.

Rechercher les mutations de *JAK2* (mais aussi de *CALR*) sur ARN permet également d'évaluer l'expression du gène. En effet, le niveau d'expression de l'ARNm reflète plus fidèlement l'expression de la protéine que la charge au niveau génomique, donnant des informations probablement plus pertinentes d'un point de vue biologique. On sait notamment que dans les modèles murins, le niveau d'expression de *JAK2V617F* détermine le phénotype PV ou TE.⁴⁸ Mais à ce jour, l'influence du niveau d'expression *CALR* mutée et/ou sauvage sur le phénotype reste inconnu.

Par ailleurs, l'étude histochimique de Vannucchi *et al* semble indiquer que l'expression de *CALR* (sauvage et mutée) est plus importante dans les mégacaryocytes que dans les lignées myéloïdes ou érythroïdes. De plus, la prolifération cellulaire associée aux mutations de *CALR* semble particulièrement associée à la lignée mégacaryocytaire. Un biais de différenciation des cellules mutées vers la lignée plaquettaire pourrait faire sous-estimer la charge mutationnelle lorsque celle-ci est déterminée sur du matériel leucocytaire. C'est pourquoi disposer d'une technique de détection des mutations de *CALR* sur ARN permettrait de déterminer la charge mutationnelle sur ARN plaquettaire (ce type cellulaire ne contenant pas d'ADN nucléaire).

Enfin, d'un point de vue plus pratique, disposer d'une technique de détection des mutations de *CALR* sur ARN permettrait d'étudier le profil mutationnel de patients pour lesquels de l'ADN n'est pas disponible (notamment les patients atteints de LMC).

C'est pourquoi nous avons développé une technique d'analyse de fragments permettant de quantifier la charge allélique mutationnelle de *CALR* sur ARN. Ce travail se propose de valider cette technique, d'en comparer les résultats à ceux obtenus sur ADN et d'étudier ses performances par rapport à une technique de PCR digitale.

Matériel et Méthodes

1. Patients et matériel génétique

Les patients inclus dans cette étude ont reçu un diagnostic de SMP (TE, MFP ou LMC avec une présentation thrombocytaire) selon les critères OMS, ceux du *British Committee for Standards in Haematology*¹⁴⁸ ou à l'appréciation du clinicien. D'autres ont été explorés pour une thrombocytose sans qu'un diagnostic définitif ne soit posé. Un consentement éclairé a été signé par chacun d'eux pour le stockage et l'utilisation de matériel génétique à visée diagnostique et de recherche.

Au diagnostic ou dans le suivi, des leucocytes totaux périphériques et/ou des polynucléaires neutrophiles (PNN) périphériques ont été congelés en culots secs (pour l'obtention d'ADN génomique) et/ou en trizol (pour l'extraction d'ARN).

L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit QIAAMP blood kit mini Kit (Qiagen). Brièvement, les culots secs ont été remis en suspension dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) puis digérés par une protéase. Après ajout d'un tampon additionné d'éthanol l'ADN a été déposé dans une colonne de purification et centrifugé 1 minute à 4100g. Après 2 lavages, l'ADN a ensuite été élué dans le tampon approprié par centrifugation à 5400g pendant 1 minute. La concentration et la qualité des ADN ont ensuite été évaluées sur un Nanodrop[®] ND1000 (Thermo Scientific) avant stockage à -20°C.

Les ARN ont été extraits à partir des cellules stockées en trizol à -80°C. Après destruction des cellules par agitation 5 minutes sur Disruptor[®] (Scientific Industries) les protéines ont été précipitées puis éliminées par l'ajout d'un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique. Les ARN, récupérés au niveau de la phase aqueuse ont ensuite été précipités par de l'isopropanol puis lavés par de l'éthanol de concentration croissante. Après séchage, ils ont été repris par 10-20 µL d'eau. La concentration et la qualité des ARN ont également été évaluées sur un Nanodrop[®] ND1000 (Thermo Scientific) avant stockage à -80°C.

Les rétrotranscriptions ont été réalisées à l'aide du kit Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit (Roche). Pour ce faire, 1 µg d'ARN a été repris dans 11 µL d'eau puis mélangé avec 4 µL de tampon, 2 µL d'amorces aléatoires (« *random hexamers* »), 2 µL de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), 0,5 µL d'inhibiteurs de RNase et 0,5 µL de rétrotranscriptase. La rétrotranscription a été réalisée selon le cycle suivant : 10 min à 25°C, 60 min à 50°C, 5 min à 85°C, puis maintien à 4°C. L'ADN complémentaire (ADNc) formé a ensuite été repris dans un volume final de 50 µL d'eau avant stockage à -20°C.

2. Recherche des mutations de *CALR*

A. Analyse de fragments sur ADN :

La recherche de mutations de *CALR* par analyse de fragments sur ADN a été réalisée à partir d'ADN extrait des PNN périphériques pour l'ensemble des patients suspectés d'avoir un SMP Ph-négatif dans le cadre de la démarche diagnostique. Pour certains d'entre eux

(lorsque le matériel était disponible), cette recherche a été réalisée sur ADN extrait de leucocytes totaux périphériques afin de pouvoir comparer les techniques d'analyse de fragments sur ADN et ARN obtenus à partir des mêmes populations cellulaires.

La première étape a consisté en l'amplification d'une partie de l'exon 9 du gène *CALR*. 5 µL d'ADN dilué à 5 ng/µL ont été dilués dans 29,75 µL d'eau et mélangé avec 10 µL de tampon (Promega), du MgCl₂ (concentration finale de 3mM, Promega), des dNTP (Roche), les amorces (à une concentration finale de 0,5 µM) et 1,25U de GoTaq (Promega). Les amorces utilisées avaient les séquences suivantes :

CALR-Fg-F1 : 5'-GAGGTGTGTGCTCTGCCT-3'

CALR-Fg-R1 5'-AGAGACATTATTTGGCGCGG-3'.

Cette dernière est par ailleurs marquée en 5' par de la carboxyfluorescéine.

L'amplification a été réalisée sur un thermocycleur 2720 (Applied Biosystem) suivant le programme : 95°C pendant 2 minutes, puis 35 cycles comprenant : dénaturation à 95°C pendant 45 secondes, hybridation à 60°C pendant 1 minute, élongation à 72°C pendant 2 minutes puis 72°C pendant 5 minutes. Les fragments ont par la suite été séparés et leur taille déterminée par migration en électrophorèse capillaire. Les amplicons ont préalablement été dilués au 1/50^{ème} dans de l'eau stérile et 1 µL de cette dilution ajouté à un mélange de formamide et de ROX 500 (un marqueur de taille, 8,8 µL et 0,2 µL respectivement). La migration a été réalisée sur un séquenceur 3130 (Applied biosystem) et l'analyse à l'aide le logiciel GeneMapper version 3.3 (Applied Biosystem).

La taille théorique du fragment obtenu par amplification de *CALR* sauvage est de 298 pb. La quantification de la charge allélique (CA) a été réalisée en calculant le rapport :

$$CA = A \text{ mut} / (A \text{ WT} + A \text{ mut})$$

où A mut est l'aire sous la courbe du pic correspondant à l'allèle muté et A WT l'aire sous la courbe du pic correspondant à l'allèle sauvage.

Dans le cas d'extraction d'ADN et/ou d'ARN à partir de leucocytes totaux, une correction a été appliquée afin de pouvoir comparer les charges obtenues à celles déterminées sur matériel issu de PNN périphérique. Cette correction a consisté à diviser la charge allélique observée sur leucocytes totaux par la proportion de PNN (et de myélémie si présente) parmi les leucocytes au moment du prélèvement.

B. Analyse de fragments sur ARN :

La recherche de mutations de *CALR* sur ARN a été réalisée à partir des ARN extraits des leucocytes totaux périphériques pour l'ensemble des patients. Pour certains d'entre eux (lorsque le matériel était disponible), cette recherche a été réalisée sur ARN extrait de PNN périphériques afin de pouvoir comparer les techniques d'analyse de fragments sur ADN et ARN obtenus à partir des mêmes populations cellulaires.

La technique utilisée est comparable en tout point avec la technique sur ADN, mise à part l'armorce sens dont la séquence est la suivante : 5'- CCAACGATGAGGCATACGCT.

La taille théorique du fragment obtenu par amplification de l'ARNm de *CALR* sauvage est de 332 pb. L'intron 8 ne faisant que 83 pb, une amplification de l'ADN génomique est possible et aboutit à la formation d'un fragment de 415 pb pour *CALR* sauvage. Le calcul de la charge allélique a été réalisé de la même manière que sur ADN.

Pour les études de sensibilité les ADNc de lignées BaF3 infectées avec des lentivirus portant le gène codant pour *CALR* sauvage ou *CALR* mutée ont été utilisés après traitement par une DNase (*DNA-free*TM DNA Removal Kit, Ambion). Ces lignées étant d'origine murine, leurs ARNm de *CALR* endogènes ne sont pas amplifiés avec les amorces que nous utilisons. Elles permettent ainsi de simuler l'homozygotie pour les mutations de types 1 et 2. Afin de réaliser des dilutions, le nombre de copies de *CALR* sauvage et mutée a été déterminée par PCR digitale pour chaque ADNc (voir ci-après). Les ADNc de *CALR* mutée ont ensuite été mélangés avec de l'ADNc de *CALR* sauvage pour obtenir des dilutions au 1/8 (correspondant à une charge allélique de 12,5%), 1/16 (6,25%), 1/32 (3,125%), 1/64 (1,5625%), 1/128 (0,78125%) et 1/256 (0,390625%). Ces dilutions ont ensuite été testées en analyse de fragments et la charge allélique observée comparée à la charge théorique calculée sur le nombre de copies de chaque forme.

La reproductibilité de la technique a été évaluée en réalisant la recherche de mutation de *CALR* par analyse de fragments sur 3 produits de PCR obtenus à partir du même ADNc lors de 3 expériences différentes. La répétabilité a été évaluée en réalisant l'analyse 3 fois au cours d'une même expérience.

C. Recherche des mutations de *CALR* par *Droplets Digital Polymerase Chain Reaction* (ddPCR) :

La recherche de mutation de *CALR* par PCR digitale a été réalisée à l'aide de la technique « *Droplets Digital Polymerase Chain Reaction* » de Bio-Rad (ddPCR). Le principe est celui d'une PCR « classique », mis à part que la réaction est réalisée en microémulsion. Le matériel génétique est porté en émulsion eau/huile de sorte que statistiquement une seule molécule d'acide nucléique soit contenue dans chaque gouttelette d'eau (en réalité, chaque gouttelette contient entre 0 et x molécules). Une PCR en point final est ensuite réalisée et la fluorescence étudiée indépendamment pour chaque gouttelette par cytométrie en flux. L'étude statistique (par l'application d'une loi de Poisson) permet ensuite à partir du nombre de gouttelettes « positives » (dans lesquelles une amplification a été réalisée) et « négatives » (dans lesquelles aucune amplification n'a eu lieu) de déterminer le nombre de copies de séquence cible initialement présentes dans l'échantillon. Ceci permet une quantification absolue de la cible alors que la réaction est en point final (figure 14).

L'ADN a été dilué à une concentration de 5 ng/μL. Vingt-cinq nanogrammes (soit 5 μL de la dilution) ont été utilisés pour l'amplification. Les ADNc obtenus à partir de 1 μg d'ARN ont eux été dilués au 1/10^{ème}. Le mélange réactionnel a été réalisé à partir de 5 μL d'ADN ou ADNc dilué auxquels ont été ajoutés 1,6 μL d'eau, 11 μL de Mastermix, les amorces (concentration finale de 0,9 μM) et les sondes (une concentration finale de 0,25 μM). Les amorces et les sondes ont été créées pour détecter les mutations de type 1 et 2 exclusivement et spécifiquement. Chaque mélange réactionnel contient des amorces amplifiant une partie du gène ou de l'ARNm de *CALR* et 2 sondes, l'une spécifique de l'allèle sauvage, l'autre de l'allèle muté. Notons que les sondes spécifiques de l'allèle sauvage sont

différentes entre les techniques de détection des mutations de type 1 et de type 2. La détection de ces 2 types de mutation nécessite donc la réalisation de 2 réactions séparées.

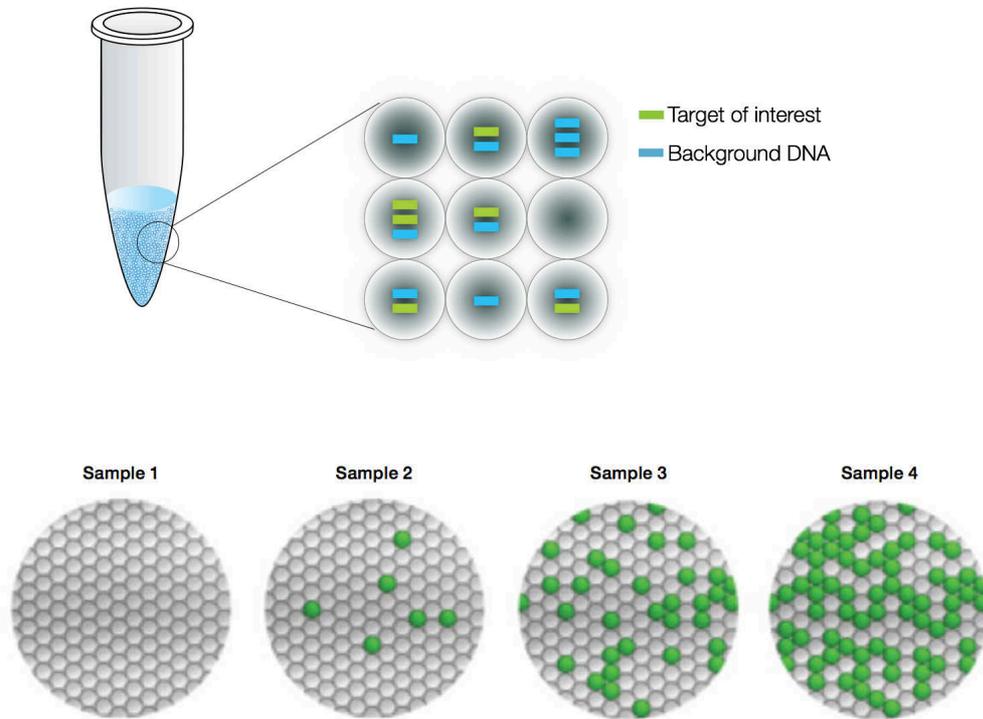


Figure 14 : Principe de la ddPCR. Une PCR en point final est réalisée en présence d'une sonde fluorescente ou d'un agent intercalant en microémulsion. Chaque gouttelette contient 0 ou x molécule d'ADN ou ADNc. La positivité de la réaction au sein de chacune de ces gouttelettes est ensuite analysée par cytométrie en flux (Bio-Rad).

La microémulsion a été réalisée à l'aide des cartouches DG8, de l'huile (Bio-Rad) et du « générateur de gouttelettes » QX100 (Bio-Rad) dans un volume final de 20µL (production de 20000 gouttelettes environ, figure 15).

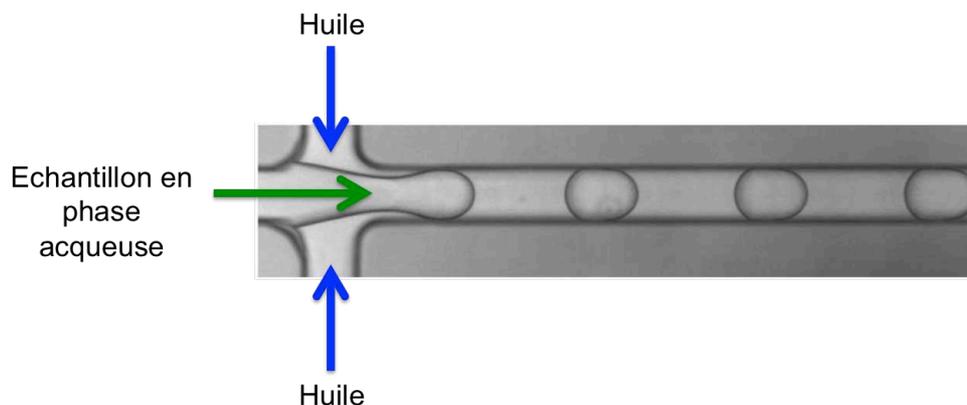


Figure 15 : Principe de la formation des gouttelettes par le QX100 pour la ddPCR. L'échantillon en phase aqueuse migre à travers un flux d'huile et forme ainsi des gouttelettes de calibre déterminé (Bio-Rad).

L'amplification a ensuite été réalisée sur un thermocycleur C1000 Touch® (Bio-Rad) selon le programme suivant : dénaturation à 95°C pendant 10 minutes, puis 40 cycles comportant : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 63°C (pour la recherche de mutation de type 1) ou 64°C (pour la recherche de mutation de type 2) pendant 1 minute avant de finir par 10 minutes à 98°C.

L'acquisition a ensuite été réalisée sur le « lecteur de gouttelettes » QX200 (environ 12000-16000 gouttelettes sont lues par le système) et l'analyse réalisée à l'aide du logiciel Quantasoft® (version 1.5, Bio-Rad, figure 16).

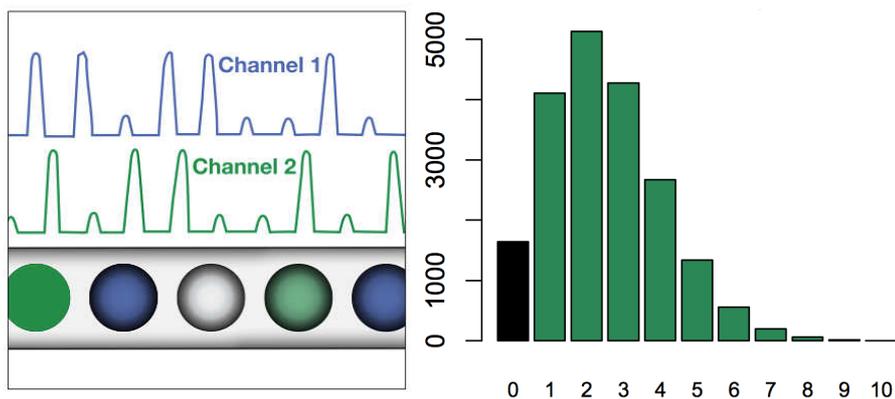


Figure 16 : Principe de la quantification par ddPCR. La fluorescence (signant la positivité de la réaction de PCR) est analysée dans 2 canaux par cytométrie de flux pour chacune des gouttelettes (gauche). La loi de Poisson permet ensuite de relier la distribution de positivité (droite) au nombre de copies présentes initialement dans l'échantillon (Bio-Rad).

Le logiciel a calculé le nombre de copies par gouttelette selon la formule :

$$\text{Concentration} = -\ln(N_{neg}/N)/V_{droplet}$$

Avec

N_{neg} le nombre de gouttelettes négatives

N le nombre total de gouttelettes analysées

$V_{droplet}$ le volume des gouttelettes (environ 1 nL théoriquement)

D. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad). La comparaison des charges alléliques entre maladies ou types de mutation a été faite à l'aide du test de Mann et Whitney, tandis que les comparaisons entre ADN et ARN et entre analyse de fragments et ddPCR ont été réalisées par le test de Wilcoxon. Les corrélations entre les analyses ont été déterminées par un test de Spearman. Dans tous les cas, la significativité a été définie par un risque $\alpha < 0,05$. Les graphiques ont été réalisés à l'aide des logiciels Excel (Microsoft) et Prism (GraphPad).

Résultats

1. Performances de la recherche de mutations de *CALR* par analyse de fragments sur ARN:

Afin d'évaluer les performances de notre technique de détection et de quantification des mutations de *CALR*, nous avons comparé les résultats obtenus lorsque l'on répète l'analyse 3 fois au cours d'une même expérience et lors de 3 expériences indépendantes. Pour l'évaluation de la répétabilité, 2 patients présentant des mutations de type 1 et de type 2 ont été testés. Les écart-types et coefficients de variation déterminés sont de 0-0,3% et de 0-1,9% pour les mutations de type 1 et de 0,2-0,7% et de 1,2-3,2% pour les mutations de type 2 respectivement (figure 17, haut). La reproductibilité de la technique déterminée sur les prélèvements de 2 patients semble plus faible, avec des écart-types de 1,8% et 2% et des CV de 13,6% et 12,8% pour les mutations de type 1 et de type 2 respectivement (figure 17, bas).

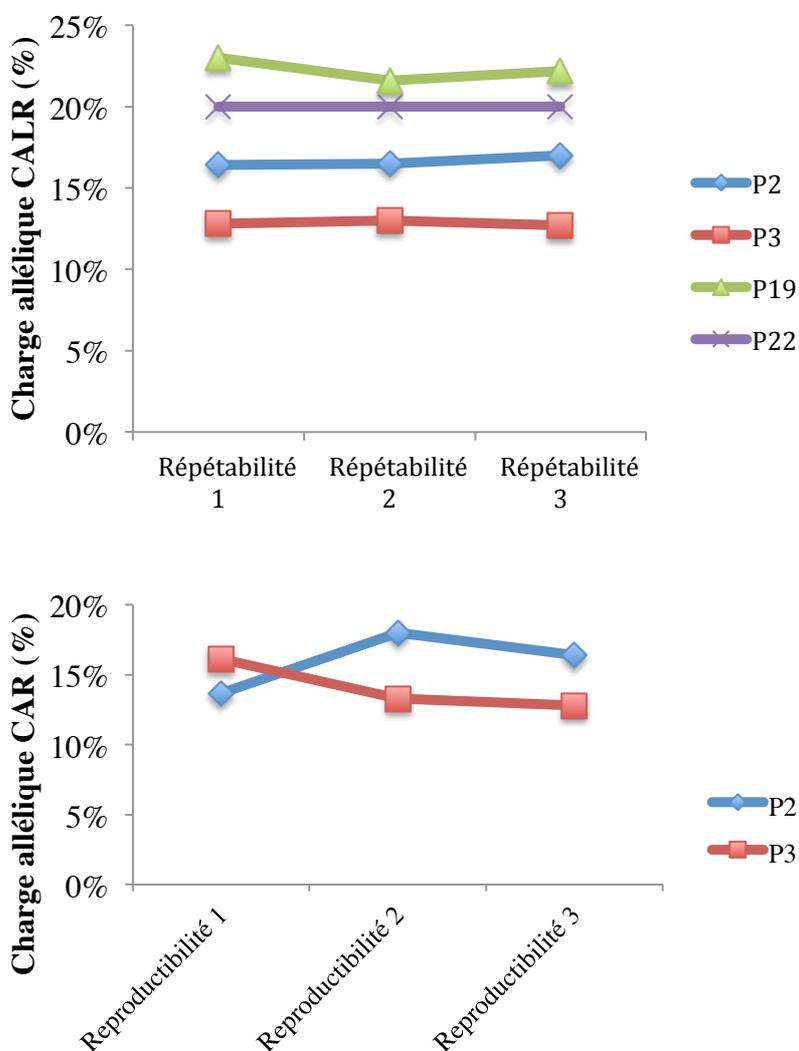


Figure 17 : Charges alléliques déterminées lors des expériences de répétabilité (haut) et de reproductibilité (bas). Les CV calculés sont de 0-3,2% et de 12,8-13,6% pour la répétabilité et la reproductibilité respectivement. Les patients P2 et P22 présentent une mutation de type 1 et les P3 et P19 une mutation de type 2.

Pour déterminer la sensibilité de notre technique, nous avons réalisé une gamme de dilution à partir d'ADNc de lignées cellulaires BaF3 modifiées pour produire de la CALR humaine sauvage ou mutée. Le nombre de copies de chaque forme a été déterminée par PCR digitale sur les ADNc issus de ces cellules afin de réaliser une gamme de dilution précise (de 1/8 à 1/256). La charge allélique a ensuite été déterminée sur cette gamme par analyse de fragments. La mutation est détectée jusqu'à la dilution 1/64, correspondant à une charge allélique de 1,56%. La sensibilité de notre technique est donc d'environ 1,5% pour les mutations de type 1 et 2 (figure 18).

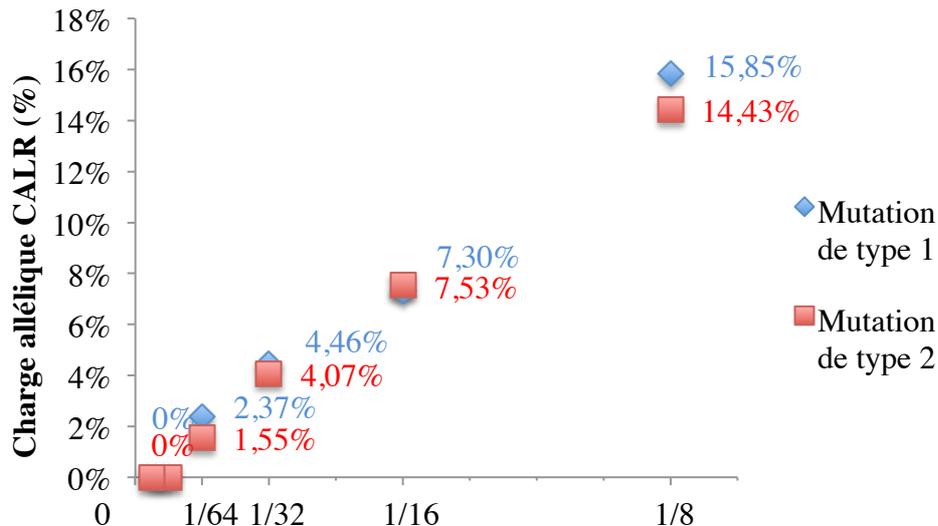


Figure 18 : Charges alléliques déterminées lors de sensibilité (bas). Les pourcentages indiqués représentent la charge allélique déterminée par analyse de fragments (en bleu pour les mutations de type 1 et en rouge pour les mutations de type 2). La sensibilité est évaluée à environ 1,5%.

2. Analyse de fragments sur ADN

Au total, la recherche de mutation de *CALR* a été réalisée sur les prélèvements de 76 patients. Vingt-huit présentaient une TE, 12 une MFP, 5 une thrombocytose d'étiologie indéterminée, 1 une MF post-TE, 1 une LMC atypique et 29 une LMC à présentation hyperthrombocytaire.

La recherche de mutation de *CALR* sur ADN a été effectuée chez 46 d'entre eux (44 sur ADN extrait de PNN périphériques, 9 sur ADN extrait de leucocytes totaux périphériques, 7 patients ayant été testés sur ces 2 matériels).

Une mutation de *CALR* a été retrouvée sur ADN chez 24 patients (20 TE, 4 MFP). Dix-huit présentaient une mutation de type 1 (14 TE, 4 MFP), 4 une mutation de type 2 (4 TE) et 2 une autre mutation (c.1101_1161del et c.1123_1137del, non référencées à ce jour) (Figure 19, Tableau 2).

	Diagnostic	<i>BCR-ABL1</i>	<i>JAK2</i>	<i>MPL</i>	<i>ADN PNN</i>	<i>ADN GB Totaux</i>	<i>ARN PNN</i>	<i>ARN GB Totaux</i>	Type de mutation
		Statut	%	Statut	Statut	Statut	Statut	Statut	
P1	TE	Négatif	1	Négatif	Positif	Positif	-	Positif	1
	TE	-	-	-	Positif	-	Positif	-	1
P2	TE	Négatif	0	-	Positif	Positif	-	Positif	1
P3	TE	Négatif	0	-	Positif	Positif	-	Positif	2
P4	TE	-	0	-	Positif	-	Positif	-	1
P5	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	2
P6	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P7	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1101_1161del
P8	MFP	-	-	-	Positif	-	-	Positif	1
P9	MFP	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P10	TE	Négatif	0	Négatif	Positif	-	Positif	-	1123_1137del
P11	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P12	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P13	MFP	-	-	-	Positif	-	-	Positif	1
P14	MFP	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P15	TE	-	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P16	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P17	TE	Négatif	0	Négatif	Positif	Positif	-	Positif	1
P18	TE	-	0,24	-	Positif	Positif	-	Positif	1
P19	TE	Négatif	0	-	Positif	Positif	-	Positif	2
P20	TE	Négatif	0	Négatif	Positif	-	-	Positif	2
P21	TE	Négatif	0	-	Positif	Positif	-	Positif	1
P22	TE	Négatif	0	-	Positif	-	-	Positif	1
P23	TE	-	0	-	-	Positif	-	Positif	1
P24	TE	-	0	-	-	Positif	-	-	1
P25	MFP	Négatif	0	W515K	Négatif	-	-	Négatif	-
P26	MFP	Négatif	0	W515L	Négatif	-	-	Négatif	-
P27	TE	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P28	TE	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P29	MFP	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P30	Thrombocytose	-	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P31	Thrombocytose	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P32	TE	Négatif	0	W515L	Négatif	-	-	Négatif	-
P33	Thrombocytose	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P34	Thrombocytose	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P35	TE	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P36	TE	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P37	MFP	Négatif	0,5	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P38	MF post-TE	Négatif	0,25	-	Négatif	-	-	Négatif	-
P39	MFP	Négatif	0	-	Négatif	-	-	Négatif	-
P40	Thrombocytose	Négatif	-	-	Négatif	-	-	Négatif	-
P41	TE	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P42	TE	Négatif	0	-	Négatif	-	-	Négatif	-
P43	MFP	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-

P44	TE	Négatif	0	W515K	Négatif	-	-	Négatif	-
P45	MFP	Négatif	0	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P46	MFP	Négatif	0,34	Négatif	Négatif	-	-	Négatif	-
P47	LMCa	Négatif	0	Négatif	-	-	-	Négatif	-
P48	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P49	LMC	Positif	0	-	-	-	-	Négatif	-
P50	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P51	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P52	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P53	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P54	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P55	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P56	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P57	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P58	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P59	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P60	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P61	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P62	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P63	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P64	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P65	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P66	LMC	Positif	0	-	-	-	-	Négatif	-
P67	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P68	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P69	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P70	LMC	Positif	0	Négatif	-	-	-	Négatif	-
P71	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P72	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P73	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P74	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P75	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-
P76	LMC	Positif	-	-	-	-	-	Négatif	-

Tableau 2 : Résultats de biologie moléculaire des patients. Les mutations de types 1 et 2 correspondent à la délétion de 52 pb (c.1092_1143del) et l'insertion de 5 pb (c.1154_1155insTTGTC) respectivement. GB : leucocytes, LMC : Leucémie Myéloïde Chronique, LMCa : Leucémie Myéloïde Chronique Atypique, MFP : Myélofibrose Primitive, MF-post-TE : Myélofibrose secondaire à une Thrombocytémie Essentielle, PNN : Polynucléaires Neutrophiles, TE : Thrombocytémie Essentielle

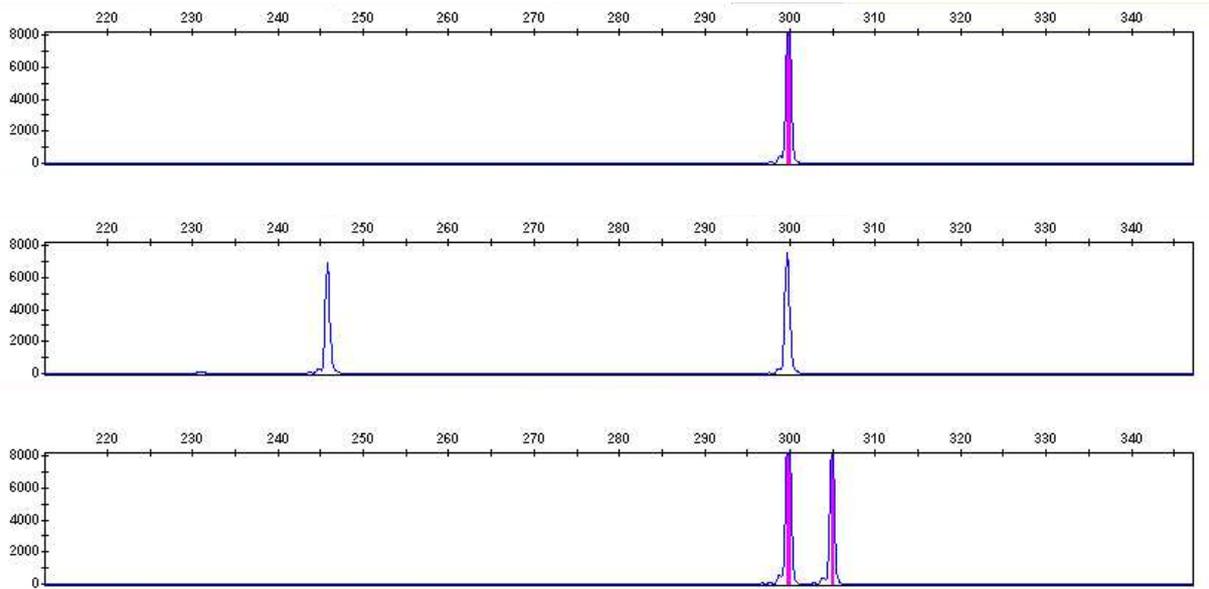


Figure 19 : Electrophorégramme correspondant à la présence de *CALR* sauvage (haut) et de mutations de *CALR* de type 1 (milieu) et de type 2 (bas) détectées par analyse de fragments sur ADN. La taille mesurée du fragment correspondant à *CALR* sauvage est de 300 pb, celle correspondant aux mutations de type 1 et 2 de 246 pb et 305 pb respectivement.

La charge mutationnelle moyenne observée sur ADN de PNN est de 44,1% (23,7-53,3%). En ne considérant que les patients non-traités au moment de l'analyse, la charge moyenne reste comparable (43,5%, 23,7-53,3%). Celle-ci est significativement supérieure dans les MFP par rapport aux TE (figure 20), que les patients soient traités (51,6% contre 42,4%, $p=0,0044$) ou non (51,6% contre 41,4%, $p=0,0044$).

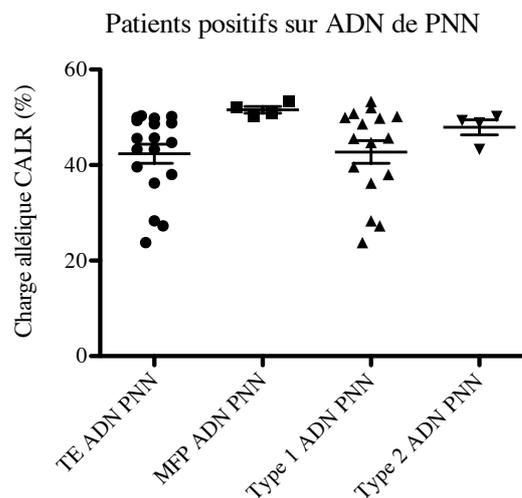


Figure 20 : Charges alléliques déterminées sur ADN de PNN en fonction de la maladie et du type de mutation. Les charges alléliques observées au cours des TE sont significativement inférieures à celles observées au cours des MFP ($p=0,0044$). Il n'existe pas de différence significative en fonction du type de mutation.

Aucune différence significative n'a été observée concernant les charges alléliques des mutations de types 1 et 2 (42,7% et 47,9% respectivement chez l'ensemble des patients, 42,3% et 47,1% chez les non-traités).

3. Analyse de fragments sur ARN

La recherche de mutation de *CALR* sur ARN a été réalisée chez 76 patients (74 sur ARN de leucocytes totaux périphériques, 3 sur ARN de PNN périphériques, 1 patient ayant été testé sur ces 2 matériels, tableau 2).

Une mutation a été détectée chez 23 d'entre eux (19 TE, 4 MFP). Dix-sept avaient une mutation de type 1 (13 TE, 4 MFP) et 4 une mutation de type 2 (4 TE) et 2 une autre mutation (c.1101_1161del et c.1123_1137del) (figure 21).

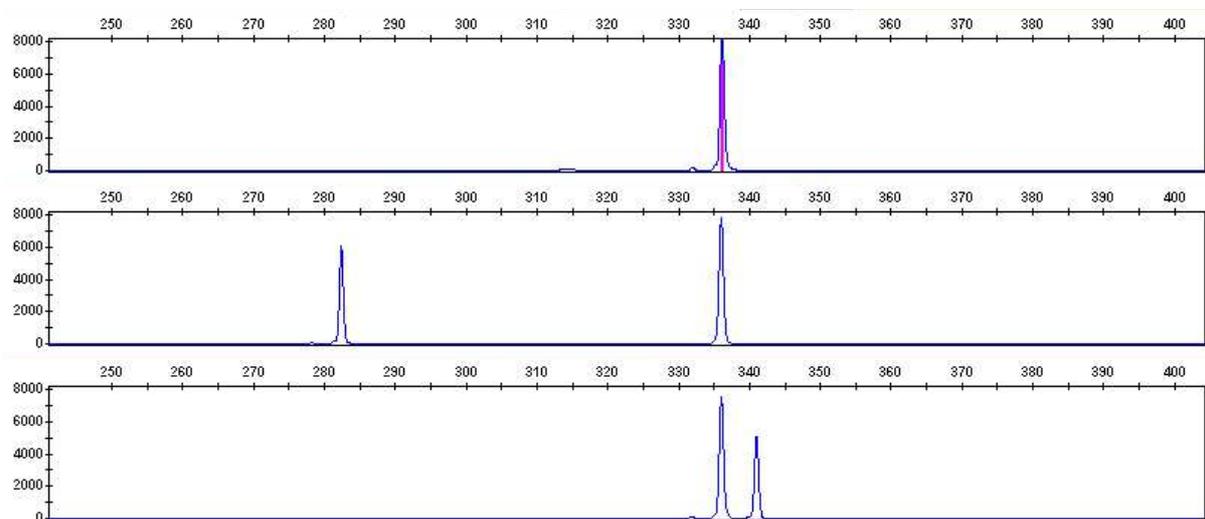


Figure 21 : Electrophorégramme correspondant à la présence de *CALR* sauvage (haut) et de mutations de *CALR* de type 1 (milieu) et de type 2 (bas) détectées par analyse de fragments sur ARN. La taille mesurée du fragment correspondant à *CALR* sauvage est de 335 pb, celle correspondant aux mutations de type 1 et 2 de 281 pb et 340 pb respectivement.

La charge mutationnelle moyenne déterminée sur ARN extraits de leucocytes totaux est de 29,9 (9,6–47,8%) pour l'ensemble des patients testés, et de 32,0% (13,7-47,7%) pour les patients non traités. Comme sur ADN, elle est significativement supérieure dans les MFP comparativement aux TE (44,7% contre 26,4%, $p=0,0048$) alors qu'aucune différence de charge allélique n'est démontrée entre mutations de type 1 et de type 2 (29,9% pour 26,5%, figure 22). Comme sur ADN, que les patients soient traités ou non, les résultats restent similaires.

On note par ailleurs une plus grande dispersion des valeurs au cours des TE par rapport aux MFP.

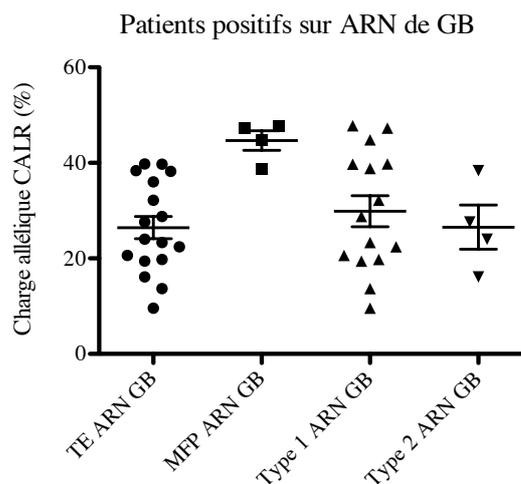


Figure 22 : Charges alléliques *CALR* déterminées sur ARN de leucocytes périphériques, en fonction de la maladie et du type de mutation. La charge observée au cours des TE est significativement inférieure à celle observée au cours des MFP ($p=0,0048$).

Aucun des patients présentant un SMP « triple négatif » (diagnostiqué suite à l'analyse sur ADN) ou explorés pour une thrombocytose non étiquetée n'a présenté de mutation de *CALR* détectable par analyse de fragments sur ARN. De même, parmi les 30 patients atteints de LMC hyperthrombocytaire, aucun ne présentait de mutation de *CALR* détectable sur ARN.

4. Comparaison des analyses de fragments sur ADN et ARN

La concordance de détection des mutations de *CALR* entre analyses de fragments effectuées sur ADN et sur ARN est de 100%. Tous les patients présentant une mutation détectable sur ADN sont déterminés comme mutés par analyse sur ARN. De la même manière, aucun des patients déterminés comme « triples négatifs » suite aux analyses sur ADN ne présente de mutation détectable par analyse de fragments sur ARN.

Globalement, les charges alléliques déterminées sur ARN de leucocytes totaux sont inférieures aux charges déterminées sur ADN de PNN (29,9% contre 44,1% respectivement, $p < 0,0001$, figure 23), soit une perte de charge moyenne 14,3%. Lorsque l'on considère uniquement les analyses sur ADN et sur ARN réalisées à la même date, les résultats restent comparables avec une pertes moyennes de charges alléliques de 11,7% (46,1% contre 34,4%, $p=0,0001$).

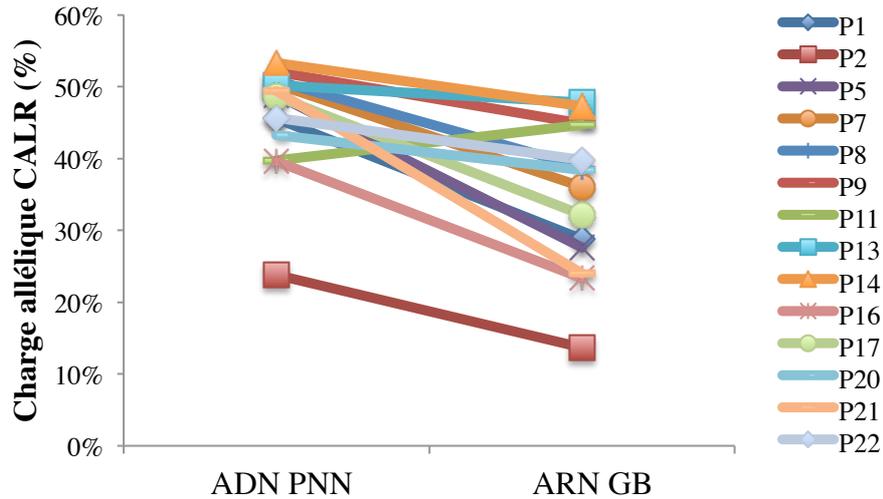


Figure 23 : Comparaison des charges alléliques *CALR* entre ADN de PNN et ARN de leucocytes totaux sur des prélèvements effectués à la même date. Les charges alléliques sont significativement inférieures sur ARN de leucocytes par rapport à celles déterminées sur ADN de PNN ($p=0,0001$).

En corrigeant la charge déterminée sur ARN de leucocytes par la polynucléose neutrophile, les charges alléliques déterminées sur ADN et sur ARN deviennent équivalentes :

- 44,1% contre 44,4% respectivement pour l'ensemble des patients ($p=0,867$) soit un gain moyen de charge négligeable de 0,1%.
- 43,4% contre 47,6% pour les non traités, $p=0,34$, gain moyen de 0,4%
- 46,1% contre 47,1% pour les non-traités à la même date, $p=0,76$, perte moyenne de 0,9% (figure 24)

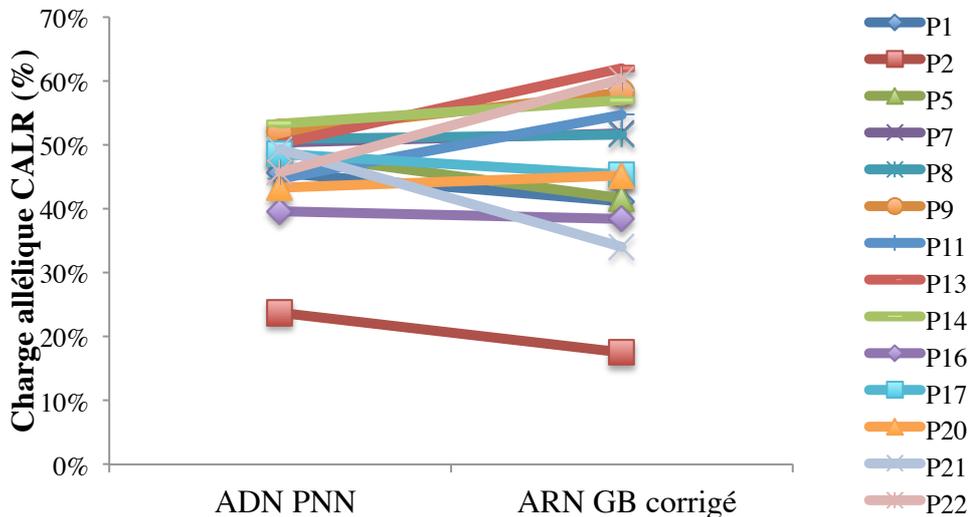


Figure 24 : Comparaison des charges alléliques *CALR* déterminées sur ADN de PNN et ARN de leucocytes totaux sur des prélèvements effectués à la même date et corrigées sur le taux de PNN. Les charges alléliques déterminées sur ARN et ainsi corrigées deviennent semblables aux charges déterminées sur ADN de PNN.

En considérant les TE, les MFP, et les mutations de type 1 et de type 2 séparément les conclusions restent identiques (figures 25 et 26).

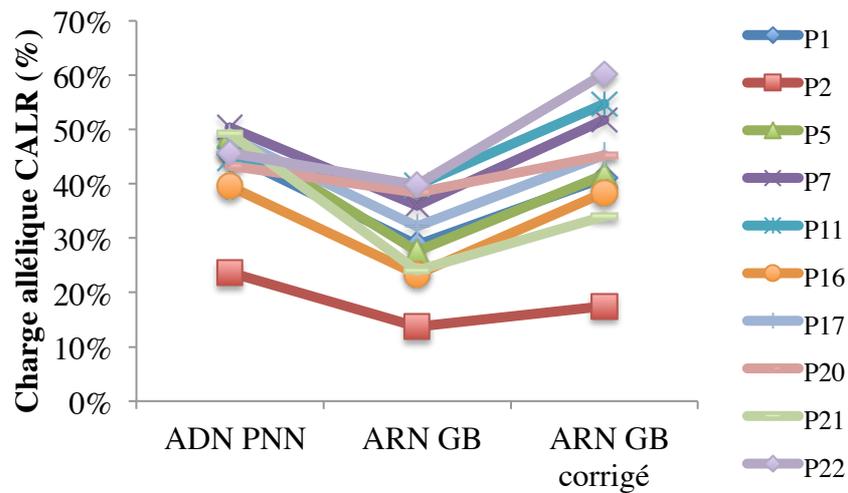


Figure 25 : Comparaison des charges alléliques *CALR* déterminées sur ADN de PNN et ARN de leucocytes dans les TE. Ces charges sont significativement plus faibles sur ARN de leucocytes par rapport à l'ADN de PNN ($p=0,002$) mais deviennent comparables lorsque l'on corrige sur le polynucléose ($p=0,625$).

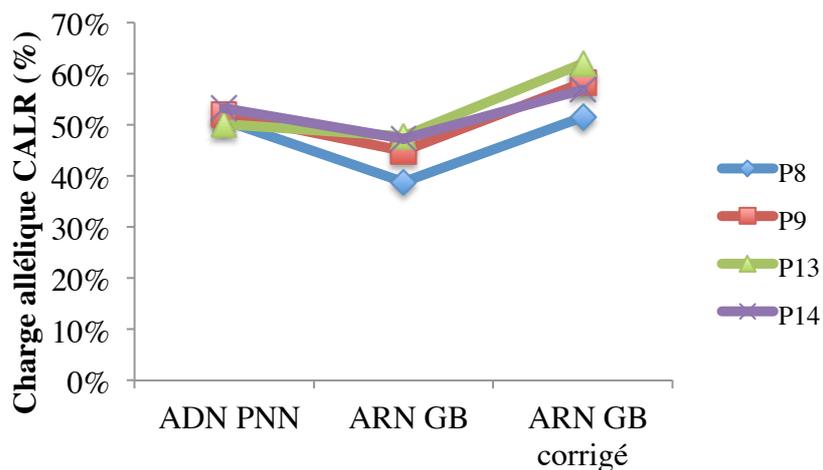


Figure 26 : Comparaison des charges alléliques *CALR* déterminées sur ADN de PNN et ARN de leucocytes dans les MFP. Ces charges ne pas sont significativement différentes sur ARN de leucocytes et sur ADN de PNN ($p=0,125$), probablement du fait du faible nombre d'échantillons analysés

Il semble exister une corrélation significative entre les charges alléliques déterminées sur ADN et sur ARN (figure 27) :

- sans correction sur la polynucléose : $r=0,6$, $p=0,023$
- avec correction sur la polynucléose : $r=0,560$, $p=0,037$

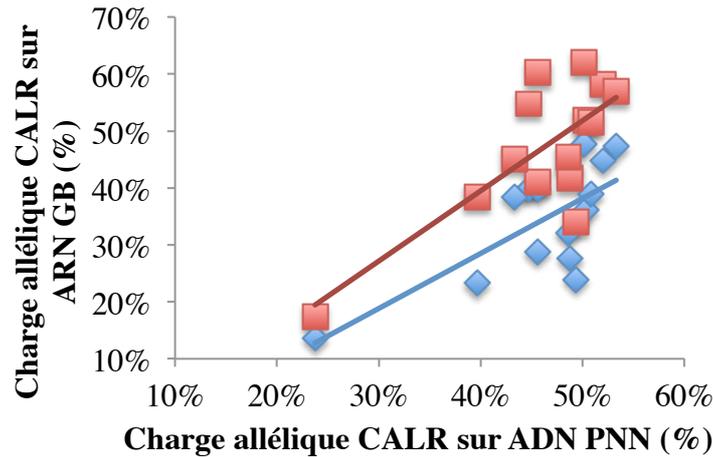


Figure 27 : corrélation entre les charges alléliques *CALR* déterminées sur ADN de PNN et sur ARN de leucocytes (GB). Il existe une corrélation significative entre les charges déterminées sur ces 2 types de matériel ($r=0,6$, $p=0,023$)

Lorsque l'on considère les TE et les MFP séparément, la significativité de cette corrélation est perdue, probablement du fait d'un trop faible nombre de prélèvement ($p=0,53$), alors que celle-ci persiste dans le cas des mutations de type 1 ($r=0,77$, $p=0,013$ sans correction, $r=0,648$, $p=0,049$ après correction sur la polynucléose).

Afin de réaliser une comparaison moins biaisée, et lorsque cela a été possible, la charge allélique de *CALR* a été déterminée sur ADN et sur ARN issus des mêmes populations cellulaires et à la même date (PNN ou leucocytes totaux). Les charges alléliques déterminées sur ADN et sur ARN de PNN sont comparables (figure 28, perte de charge moyenne sur ARN de 2,9%, $n=3$, $p=0,5$). Par contre, les charges déterminées sur ADN de leucocytes sont significativement supérieures à celles déterminées sur ARN (figure 29, perte de charge moyenne sur ARN de 4,7%, $n=5$, $p=0,0234$).

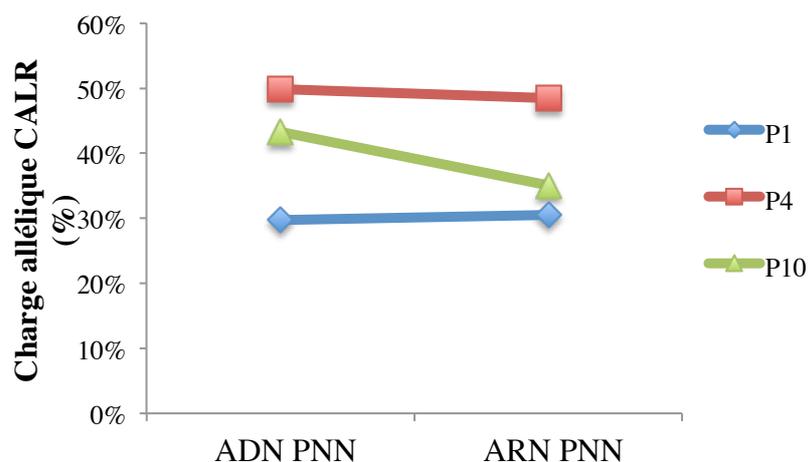


Figure 28 : Comparaison des charges mutationnelles déterminées sur ADN et ARN de PNN. Les charges déterminées sur ADN et sur ARN diffèrent en moyenne de 2,9% ($p=0,5$).

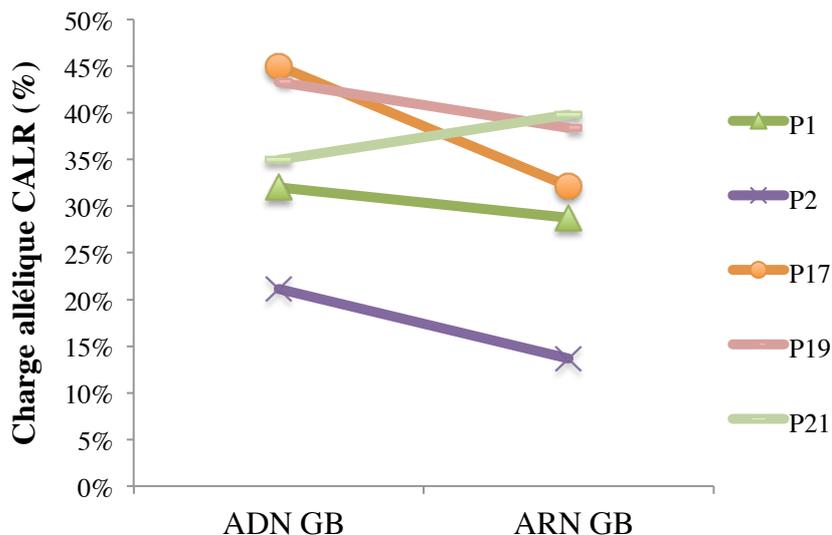


Figure 29 : Comparaison de charges mutationnelles déterminées sur ADN et ARN de leucocytes totaux. Les charges déterminées sur ARN sont significativement inférieures à celles mesurées sur ADN ($p=0,0234$)

5. Comparaison des résultats obtenus par analyse de fragments et par ddPCR

La recherche et quantification de la charge allélique *CALR* a été réalisée par ddPCR sur les prélèvements de 19 patients (15 sur ADN de PNN, 6 sur ADN de leucocytes totaux, 1 sur ARN de PNN et 12 sur ARN de leucocytes totaux). Les résultats sont comparables à ce qui a été obtenu en analyse de fragments : les charges alléliques déterminées sur leucocytes totaux sont inférieures à celles obtenues sur PNN purifiés, mais deviennent comparables après correction sur la polynucléose.

Les charges alléliques déterminées par analyse de fragments sur ADN de PNN sont significativement supérieures à celles obtenues avec la ddPCR (figure 30, gain de charge de 0,15 à 16,3%, gain de charge moyen de 4,6%, $n=16$, $p=0,0005$).

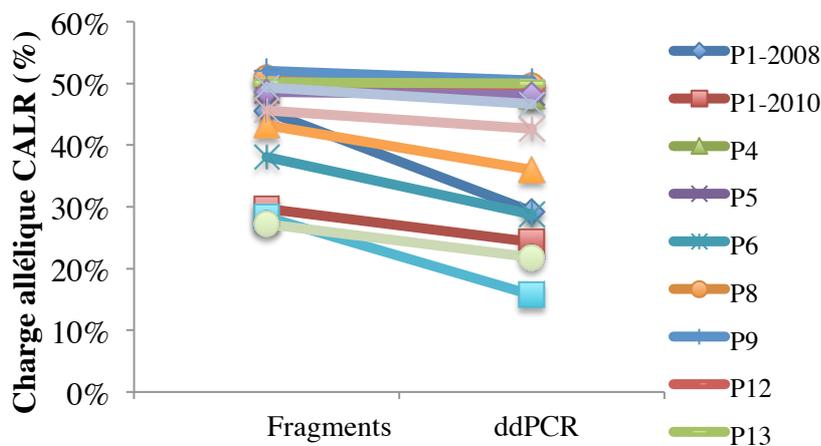


Figure 30 : Charges alléliques *CALR* déterminées par analyse de fragments et ddPCR sur ADN de PNN. Les charges obtenues par analyse de fragments sont supérieure de 4,6% en moyenne par rapport à celles obtenues par ddPCR ($p=0,0005$).

Les résultats obtenus sur ADN et sur ARN de leucocytes totaux sont comparables, avec un gain de charge moyen pour l'analyse de fragments de 5,3% et 5,4% respectivement (figure 31, sur ADN : gain de charge 2,2-9,5%, n=6, p=0,0313, sur ARN : différence de charge de -5,7 à +14%, n=11, p=0,0137).

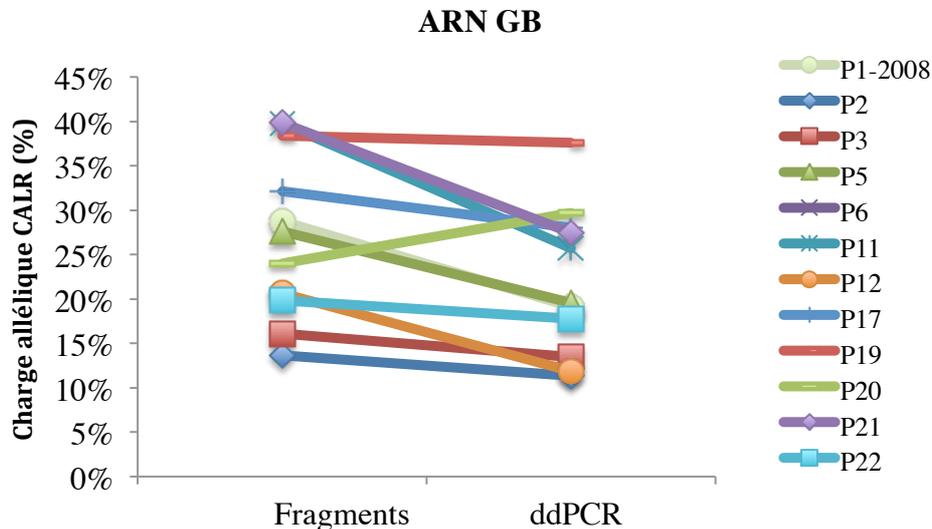


Figure 31 : Charges alléliques *CALR* déterminées par analyse de fragments et ddPCR sur ARN de leucocytes totaux. Les charges obtenues par analyse de fragments sont supérieures en moyenne de 5,4% par rapport à celles obtenues par ddPCR (p=0,0137).

Les charges déterminées sur ADN de PNN et sur ARN de leucocytes totaux par analyse de fragments et ddPCR sont corrélées de manière significative :

- sur ADN de PNN : $r=0,962$ (figure 32, n=16, $p<0,0001$)
- sur ARN de leucocytes totaux, $r=0,736$ (figure 33, n=11, $p=0,013$).

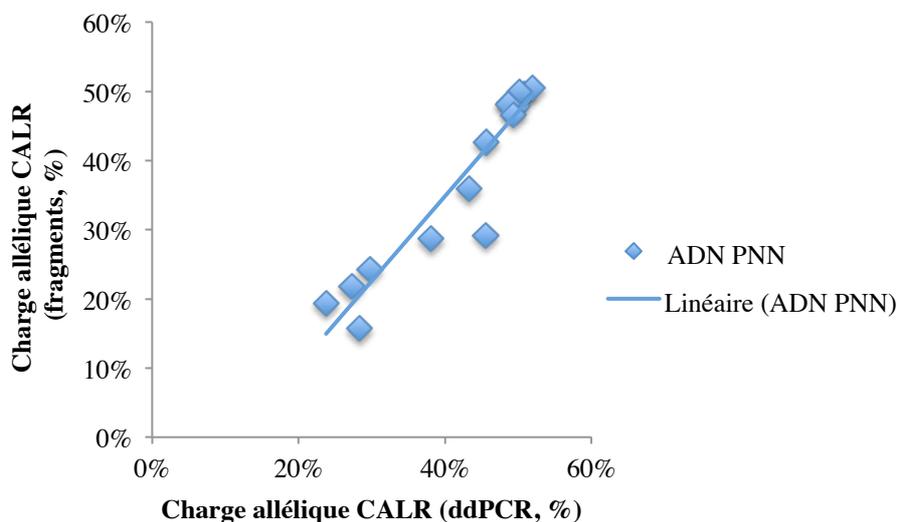


Figure 32 : corrélation des charges alléliques *CALR* déterminées par analyse de fragments et ddPCR sur ADN de PNN. Les charges mesurées par les 2 techniques sont significativement corrélées ($r=0,962$ $p<0,0001$)

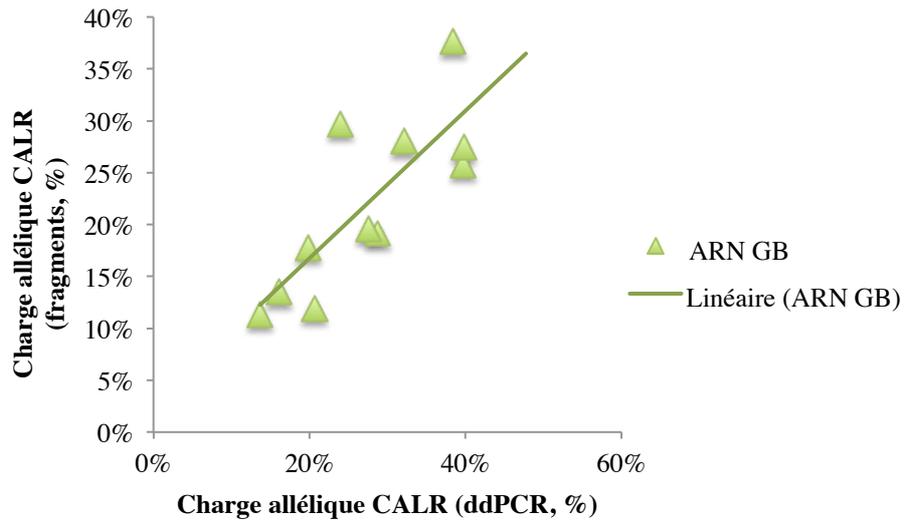


Figure 33 : corrélation des charges alléliques *CALR* déterminées par analyse de fragments et ddPCR sur ARN de leucocytes totaux. Les charges obtenues par les 2 techniques sont significativement corrélées ($r=0,736$, $p=0,013$)

Discussion

Au cours de cette étude, nous avons étudié et comparé les charges alléliques déterminées sur ADN et sur ARN à l'aide de 2 techniques, l'analyse de fragments et la PCR digitale. La première chose qui nous a frappé est l'homogénéité des valeurs obtenues. En effet, 16/22 patients (73%) ont une charge allélique comprise entre 40 et 54% lorsque celle-ci est déterminée à partir de l'ADN de PNN périphériques. Lorsque cette charge est déterminée sur ARN de leucocytes périphériques, le même constat peut être fait, 13/21 patients (62%) présentant une charge corrigée sur la polynucléose comprise entre 40 et 65%. Ceci contraste fortement avec la grande dispersion des charges alléliques *JAK2V617F*.¹⁴¹ En effet, au diagnostic d'une PV, les patients peuvent présenter une charge allélique de 1 (seuil classiquement admis pour définir la positivité) à 100% (médiane 33%, 1-100%).^{57,149} Au diagnostic des TE, les charges alléliques *JAK2V617F* ont une valeur médiane moindre (9%) et une dispersion moins importante par rapport aux PV mais encore supérieure à ce que l'on observe pour les mutations de *CALR* (1-39%).^{57,149} Les MFP présentent habituellement une charge mutationnelle *JAK2V617F* importante mais avec des valeurs très hétérogènes (médiane 54-66%, 5-100%).^{57,149} Cette valeur de 50% suggère une clonalité complète de l'hématopoïèse en cas de mutation de *CALR*. L'ensemble des cellules myéloïdes présenterait ainsi un allèle *CALR* sauvage et un allèle *CALR* muté, contrairement à ce qu'on peut observer lors des mutations *JAK2V617F* associées à un mélange de cellules normales, de cellules hétérozygotes et de cellules homozygotes pour l'allèle muté.¹⁵⁰ Une analyse moléculaire sur colonies serait nécessaire pour l'affirmer, mais cette notion a déjà été avancée sur des études de clonalité par HUMARA (Human Androgen Receptor Assay) et XCIP (X-chromosome Inactivation Pattern) qui ont montré une plus grande clonalité dans les SMP mutés sur *CALR* comparativement aux cas *JAK2V617F*.^{115,151} Ceci pourrait être lié à une répression de l'hématopoïèse normale. Par ailleurs, cela suggérerait pour les mutations de *CALR* un rôle systématique de 1^{er} événement déclencheur des SMP, contrairement aux mutations *JAK2V617F* qui peuvent apparaître plus tardivement dans l'évolution.^{38,124,152}

Une 2^{ème} conclusion de cette étude est la différence de charge observée entre les TE et les MFP. La charge moyenne est plus importante au cours des MFP par rapport aux TE. Ceci concorde avec les résultats précédemment publiés^{47,135} et résulte d'une plus grande dispersion des charges au cours des TE comparativement aux MFP. En effet, contrairement aux 4 patients atteints de MFP qui présentent une charge comprise entre 50,2 et 53,3% sur ADN de PNN, les patients présentant une TE peuvent présenter une charge allélique plus faible (comprise entre 23 et 50% dans notre série). Cependant, 12/18 patients (67%) atteints de TE ont une charge supérieure à 40%. La question de savoir si le tiers des patients présentant une charge plus faible représente un groupe à part (au niveau clinico-biologique comme cela a été avancé par Andrikovics *et al*¹³¹ ou en terme pronostique) nécessite une cohorte plus importante que celle testée pour cette étude. Tout ceci soulève la question de la relation entre la charge allélique et le phénotype de la maladie. Cette notion est maintenant bien documentée pour les mutations *JAK2V617F*, notamment sur la base des modèles murins montrant que les faibles charges *JAK2V617F* induisent un phénotype thrombocytemique et les charges les plus fortes une maladie plus proche de la PV.^{48,49} On sait par ailleurs qu'au sein d'une même entité, la charge mutationnelle de *JAK2V617F* semble influencer différents paramètres. Au cours des PV et des TE, les patients homozygotes présentent une myéloprolifération plus importante (leucocytose, érythrocytose plus importantes, splénomégalie plus fréquente), une thrombocytose souvent moindre que les hétérozygotes.^{149,57,153-155} Au cours des TE, les patients homozygotes semblent par ailleurs avoir un risque thrombotique majoré,^{34,57,153} tandis qu'au cours des PV, ce sur-risque semble associé uniquement aux plus fortes charges

alléliques.^{156,157} Par ailleurs, le risque de transformation en MF est également majoré chez les patients homozygotes, contrairement au risque d'acutisation.^{34,57,153,158} Pour ce qui est des MFP, les données sont controversées. Certaines études indiquent un impact pronostique négatif des mutations *JAK2V617F*¹⁵⁹ non retrouvé par d'autres.^{160,161} Deux études semblent elles indiquer que ce sont les faibles charges de *JAK2* qui seraient associées à un pronostic défavorable.^{154,162} Ces « effets-doses » reste encore à démontrer dans le cas des mutations de *CALR*.

Certaines données semblent indiquer que le type de mutation de *CALR* pourrait influencer le phénotype et/ou le pronostic de la maladie.^{135,125,110} Dans notre série, nous n'avons pas observé de différence de charge allélique entre les mutations de type 1 et de type 2. Andrikovics *et al* ont noté une charge allélique plus importante pour les mutations de type 1 comparativement aux mutations de type 2.¹³¹ Cependant, les acides nucléiques utilisés dans cette étude provenaient de leucocytes totaux périphériques ou médullaires sans prise en compte des paramètres de la numération qui pourraient influencer la charge allélique mesurée. Ces données restent donc à confirmer sur une série plus importante.

La technique de détection des mutations de *CALR* utilisée au CHU de Bordeaux montre des performances très satisfaisantes. La sensibilité de 1,5% validée à partir de la quantification du nombre de copies par ddPCR correspond à la sensibilité déclarée par d'autres équipes^{123,163} et observée pour d'autres analyses utilisant cette technique (recherche de mutations de *Flt3* et *NPM* notamment). Disposer d'une technique aussi sensible semble toutefois superflu dans le cadre de la démarche diagnostique, les patients ne présentant classiquement pas de charge inférieure à 10%, y compris lorsque l'on extrait les acides nucléiques des leucocytes totaux. Disposer d'une technique sensible permet toutefois d'optimiser les chances diagnostiques et de ne pas méconnaître de patient présentant la mutation comme cela serait possible avec des techniques de type Sanger.¹⁴¹ Par contre, l'utilisation d'une technique sensible peut revêtir une importance capitale dans certaines situations, et plus particulièrement chez les patients traités. En effet, on sait que les traitements cytoréducteurs (hydroxyurée et surtout interféron) sont susceptibles de diminuer la charge allélique *JAK2V617F*.^{164,165} Un suivi des patients traités par interféron suggère qu'une diminution de la charge mutationnelle *CALR* peut être observée.¹³⁷ Cependant, la technique utilisée dans cette étude n'était ni quantitative ni sensible (séquençage de type Sanger). Un suivi par analyse de fragments semblerait plus approprié dans ce cas particulier. Bien que la cohorte présentée ici soit très réduite, elle confirme que la charge de patients sous traitement cytoréducteur peut diminuer (sous hydroxyurée par exemple, comme les patients P1 – baisse de 10-15% en 2 ans et demi – P6-baisse de 21% en 3 ans ou P24 – baisse de 10% en 16 mois). Une autre situation qui pourrait nécessiter un suivi de la charge mutationnelle *CALR* par une technique sensible est celle des allogreffes dans le cadre des MFP.¹⁶³ En effet, un chimérisme donneur de 100% est associé à une diminution de la charge allélique *CALR* à un niveau inférieur à 1%. Or en ce qui concerne les mutations *JAK2V617F*, la disparition de la mutation est associée à une diminution du risque de rechute.¹⁶⁶ On peut imaginer que la situation est la même pour les mutations de *CALR* et que la non-détection de la mutation pourrait constituer un élément pronostique favorable. Ceci nécessite toutefois de disposer d'une technique de détection suffisamment sensible.

La question des faibles charges mutationnelles a récemment été étudiée dans le cas des mutations *JAK2V617F*. Si les techniques actuelles permettent de détecter des taux de 0,1%,^{141,149} le seuil de positivité classiquement admis est de 1%, Or les patients présentant une faible charge *JAK2V617F* (comprise entre 0,1 et 2%) et une TE ou une MF (spectre de

pathologie correspondant à celui des mutations de *CALR*) peuvent parfois être considérés comme présentant un SMP.¹⁶⁷ Cette problématique n'a pas été abordée à ce jour pour les mutations de *CALR* mais pourrait apparaître lorsque l'utilisation de techniques sensibles (comme notre ddPCR dont la sensibilité sur ADN est estimée à 0,1%) deviendra plus large.

Une corrélation significative a été observée entre les charges mutationnelles déterminées sur ADN de PNN et sur ARN de leucocytes totaux. Le coefficient de corrélation calculé peut sembler faible (0,6), ce qui pourrait être lié à la double source de variabilité que sont les différences de populations cellulaires et de type d'acide nucléique. Une étude sur un plus grand nombre d'échantillons d'ADN et ARN obtenus à partir des mêmes fractions cellulaires serait nécessaire pour déterminer la force réelle de la corrélation entre les charges alléliques déterminées sur ADN et sur ARN (le faible nombre d'échantillons disponibles pour notre étude ne permettant pas d'établir une relation significative). On peut cependant imaginer que la corrélation des charges obtenues entre ADN de PNN et ARN de leucocytes reflète comme pour les mutations *JAK2V617F* à la fois une bonne corrélation des charges alléliques déterminées sur PNN et leucocytes totaux¹⁶⁸ et sur ADN et ARN.^{48,141}

La perte de charge allélique *CALR* entre PNN et leucocytes totaux est de 11,7% en moyenne dans notre étude. Ceci est assez comparable aux 15% observés pour les mutations *JAK2V617F*,¹⁶⁸ ce qui laisse suggérer que les mutations de *CALR* peuvent être présentes dans les mêmes populations cellulaires que *JAK2V617F*, à savoir les granulocytes, les monocytes, les plaquettes, ainsi que les lymphocytes B et NK.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Néanmoins, la diminution de charge allélique observée entre ADN et ARN de leucocytes totaux pourrait être liée à des différences de niveau d'expression de l'une ou l'autre des formes entre les différentes lignées cellulaires portant la mutation.

La charge allélique déterminée sur ARN de leucocytes totaux corrigée sur la polynucléose étant en moyenne de 44,4%, il est probable qu'à l'inverse des mutations de *JAK2* les mutations de *CALR* s'accompagnent d'une altération très modeste sinon nulle de l'expression de la protéine sauvage. Notamment, plusieurs études ont retrouvé une diminution du taux d'ARNm *JAK2* sauvage en cas de mutation *JAK2V617F*.^{48,141,142} Le déséquilibre d'expression entre les 2 formes permettrait ainsi de compenser l'activité inhibitrice qu'exerce la protéine sauvage sur la protéine mutée.^{33,172} Si l'absence de déséquilibre d'expression se confirme pour les mutations de *CALR*, ceci pourrait suggérer que la protéine *CALR* sauvage n'impacte pas l'activité oncogénique de la protéine mutée. Par ailleurs, l'impact d'un traitement cytoréducteur sur l'expression de l'un ou l'autre des allèles de *CALR* ne semble pas majeur puisque les charges alléliques mesurées sur ADN et ARN restent comparables chez les patients traités.

La quantification de la charge allélique *CALR* par analyse de fragments donne des résultats bien corrélés avec ceux obtenus par ddPCR (surtout sur ADN et y compris chez les patients traités). On note cependant une surestimation systémique proche de 5%, que ce soit sur ADN ou sur ARN. Sur ADN de PNN, cette surestimation semble plus importante pour les charges alléliques les plus faibles, ce qui n'est pas le cas pour les charges déterminées sur ARN de leucocytes totaux. Les raisons de cette surestimation restent inconnues pour le moment mais il est possible que l'utilisation d'une technique en point final aboutisse à un plateau d'amplification de la forme sauvage. La sous-estimation de la quantification de cette forme participerait ainsi à une surestimation de la charge allélique. Réaliser une PCR avec un nombre de cycles d'amplification moins important pourrait limiter ce phénomène.

Le gain de sensibilité lié à l'utilisation d'ARN au lieu de l'ADN que l'on aurait pu espérer

devant les résultats de différentes études portant sur les mutations *JAK2V617F*^{140,143,145-147} n'a pas été confirmé pour notre technique (on note même des charges alléliques moindres sur ARN comparativement à l'ADN obtenus de leucocytes totaux périphériques). Il en ressort une concordance de 100% dans la détection des mutations chez les patients : tous les patients pour lesquels une mutation a été mise en évidence sur ADN présentent une mutation détectable sur ARN. Inversement, les patients déterminés comme « triples négatifs » après analyse sur ADN ne présentent pas de mutation détectable sur ARN. Une plus grande dispersion des valeurs obtenues sur ARN comparativement à l'ADN est par ailleurs observée. Ceci pourrait résulter d'un artéfact technique lié à la plus grande fragilité des ARN (sensibilité aux RNAses). On peut également imaginer que la composition cellulaire de départ participe également à cette dispersion. En effet, les lysat de leucocytes totaux contiennent des monocytes, des lymphocytes et des plaquettes qui présentent probablement des niveaux d'expression de *CALR* (sauvage et/ou mutés) différents des PNN. L'utilisation d'ARN présente cependant 2 intérêts. Le premier est d'abord scientifique. Vannucchi *et al* ont déterminé que l'expression de *CALR* (sauvage ou mutée) dans les cellules hématopoïétiques se faisait préférentiellement au niveau mégacaryocytaire.¹³⁹ Ceci concorde avec l'association de ces mutations avec un phénotype orienté vers une prolifération spécifique du compartiment mégacaryocytaire. L'hypothèse de l'existence d'un clone plaquettaire plus important (voir unique) peut légitimement être émise. Afin de tester cette possibilité, l'évaluation de la charge mutationnelle *CALR* sur ARN plaquettaire est donc nécessaire, et notre technique par analyse de fragments semble parfaitement adaptée pour cela. Le 2^{ème} intérêt est plus pratique. Disposer d'une technique de détection sur ARN permet de cribler des patients pour lesquels de l'ADN génomique n'est pas disponible, comme c'est le cas pour beaucoup de patients atteints de LMC. Nous avons ainsi pu déterminer que dans les LMC, y compris dans les formes à présentation thrombocytaire, les mutations de *CALR* étaient au moins rares sinon absentes.

L'évolution des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) est à l'origine d'une réflexion sur l'établissement de panels de gènes pour lesquels des mutations pourraient être recherchées de manière plus systématique chez les patients pour lesquels un SMP est suspecté. Nul doute que les mutations de *CALR* feront partie de tels panels. Actuellement, certaines difficultés bioinformatiques rendent l'utilisation du NGS relativement complexe et peu appropriée à une utilisation en routine. En effet, la présence de séquences répétitives à proximité des régions de délétions et insertions au niveau du gène *CALR* génère des erreurs d'alignement pouvant nécessiter une analyse manuelle comme dans l'étude de Klampfl *et al*.¹⁰⁶ Ceci explique par ailleurs la découverte « tardive » de ces mutations. Il est probable que lorsque les données moléculaires détermineront précisément la prise en charge thérapeutique des patients atteints de SMP, la détermination du statut mutationnel pour certains (voir l'ensemble) des gènes évoqués précédemment sera nécessaire et posera le séquençage par NGS comme la technique la plus adaptée. Ceci n'est cependant encore d'actualité. En revanche, les études d'exome voire de génome entier semblent particulièrement indiquées chez les patients « triple-négatifs » afin de rechercher l'anomalie causale dans ces cas.

Si l'on considère le surcoût représenté par la PCR digitale (environ 85 euros pour la ddPCR contre 32 pour l'analyse de fragments) la plus grande précision n'apparaît pas suffisante pour recommander cette technique en pratique courante pour le diagnostic des patients atteints de SMP. La ddPCR pourrait par contre se révéler supérieure et indiquée pour le suivi des patients traités, notamment ceux bénéficiant d'une allogreffe de moelle osseuse. En pratique courante, l'utilisation d'ADN plutôt que de l'ARN semble préférable puisque les 2 matériels fournissent

des résultats équivalents et que ce premier est plus stable. Enfin, la recherche de mutation de *CALR* sur leucocytes totaux périphériques (dont la préparation est plus simple) plutôt que sur PNN semble possible, la perte de charge observée étant compensée par la sensibilité suffisante des techniques d'analyse de fragments et de ddPCR. Cependant, la lecture des séquences pour caractériser la mutation est rendue plus aisée par les plus fortes charges alléliques.

Bibliographie

1. DAMESHEK, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* **6**, 372–375 (1951).
2. Swerdlow, S. H., International Agency for Research on Cancer & World Health Organization. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. (International Agency for Research on Cancer, 2008).
3. Nowell, P. C. & Hungerford, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **25**, 85–109 (1960).
4. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
5. Campbell, P. J. & Green, A. R. The Myeloproliferative Disorders. *New England Journal of Medicine* **355**, 2452–2466 (2006).
6. Delhommeau, F. *et al.* Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2939–2953 (2006).
7. Tefferi, A., Skoda, R. & Vardiman, J. W. Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 627–637 (2009).
8. Savage, D. G., Szydlo, R. M. & Goldman, J. M. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br. J. Haematol.* **96**, 111–116 (1997).
9. Michiels, J. J. *et al.* Philadelphia (Ph) chromosome-positive thrombocythemia without features of chronic myeloid leukemia in peripheral blood: natural history and diagnostic differentiation from Ph-negative essential thrombocythemia. *Ann. Hematol.* **83**, 504–512 (2004).
10. Blickstein, D. *et al.* BCR-ABL transcripts in bone marrow aspirates of Philadelphia-negative essential thrombocytopenia patients: clinical presentation. *Blood* **90**, 2768–2771 (1997).
11. LeBrun, D. P. *et al.* Essential thrombocythemia with the Philadelphia chromosome and BCR-ABL gene rearrangement. An entity distinct from chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-negative essential thrombocythemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **54**, 21–25 (1991).
12. Girodon, F. *et al.* Philadelphia chromosome-positive thrombocythemia without features of chronic myeloid leukemia (CML) in peripheral blood. *Ann. Hematol.* **84**, 409–410 (2005).
13. Emilia, G. *et al.* Chronic myeloid leukemia with thrombocytopenic onset may be associated with different BCR/ABL variant transcripts. *Cancer Genet. Cytogenet.* **101**, 75–77 (1998).
14. Damaj, G. *et al.* Typical essential thrombocythaemia does not express bcr-abelson fusion transcript. *Br. J. Haematol.* **116**, 812–816 (2002).
15. Marasca, R. *et al.* Might essential thrombocythemia carry Ph anomaly? *Blood* **91**, 3084–3085 (1998).
16. Rice, L. & Popat, U. Every case of essential thrombocythemia should be tested for the Philadelphia chromosome. *Am. J. Hematol.* **78**, 71–73 (2005).
17. Thiele, J. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disease. *Am. J. Clin. Pathol.* **132**, 261–280 (2009).

18. Thiele, J. & Kvasnicka, H. M. A critical reappraisal of the WHO classification of the chronic myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* **47**, 381–396 (2006).
19. Mossuz, P. *et al.* Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica* **89**, 1194–1198 (2004).
20. Dobo, I. *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.* **5**, 161–167 (2004).
21. Cervantes, F., Passamonti, F. & Barosi, G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* **22**, 905–914 (2008).
22. Passamonti, F. *et al.* Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am. J. Med.* **117**, 755–761 (2004).
23. Dobo, I. *et al.* A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* **89**, 1207–1212 (2004).
24. Hultcrantz, M. *et al.* Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *J. Clin. Oncol.* **30**, 2995–3001 (2012).
25. Cervantes, F. *et al.* New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* **113**, 2895–2901 (2009).
26. Daley, G. Q., Van Etten, R. A. & Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**, 824–830 (1990).
27. Gangat, N. *et al.* Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *Eur. J. Haematol.* **80**, 197–200 (2008).
28. Gangat, N. *et al.* Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia: prevalence and prognostic significance. *Eur. J. Haematol.* **83**, 17–21 (2009).
29. Gangat, N. *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.* **29**, 392–397 (2011).
30. Gotlib, J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2014 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am. J. Hematol.* **89**, 325–337 (2014).
31. Tefferi, A., Verstovsek, S. & Pardanani, A. How we diagnose and treat WHO-defined systemic mastocytosis in adults. *Haematologica* **93**, 6–9 (2008).
32. Ugo, V. *et al.* Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **32**, 179–187 (2004).
33. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
34. Kralovics, R. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779–1790 (2005).
35. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054–1061 (2005).
36. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387–397 (2005).
37. Saharinen, P. & Silvennoinen, O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-

- inducible activation of signal transduction. *J. Biol. Chem.* **277**, 47954–47963 (2002).
38. Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S. N. & Bernard, O. A. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 1723–1735 (2011).
 39. Kiladjian, J.-J. *et al.* The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* **111**, 4922–4929 (2008).
 40. Smalberg, J. H. *et al.* Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* **120**, 4921–4928 (2012).
 41. Renneville, A. *et al.* High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia* **20**, 2067–2070 (2006).
 42. Steensma, D. P. *et al.* MPL W515 and JAK2 V617 mutation analysis in patients with refractory anemia with ringed sideroblasts and an elevated platelet count. *Haematologica* **91**, ECR57 (2006).
 43. Wang, S. A. *et al.* Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia* **20**, 1641–1644 (2006).
 44. Jelinek, J. *et al.* JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood* **106**, 3370–3373 (2005).
 45. Jones, A. V. *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* **106**, 2162–2168 (2005).
 46. Steensma, D. P. *et al.* The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both ‘atypical’ myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* **106**, 1207–1209 (2005).
 47. Rumi, E. *et al.* JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* (2013). doi:10.1182/blood-2013-11-539098
 48. Tiedt, R. *et al.* Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* **111**, 3931–3940 (2008).
 49. Akada, H. *et al.* Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* **115**, 3589–3597 (2010).
 50. James, C. The JAK2V617F mutation in polycythemia vera and other myeloproliferative disorders: one mutation for three diseases? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 69–75 (2008). doi:10.1182/asheducation-2008.1.69
 51. Scott, L. M. *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 459–468 (2007).
 52. Pietra, D. *et al.* Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* **111**, 1686–1689 (2008).
 53. Kouroupi, E. *et al.* Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. *Br. J. Haematol.* **142**, 676–679 (2008).
 54. Percy, M. J. *et al.* The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* **92**, 1607–1614 (2007).
 55. Williams, D. M., Kim, A. H., Rogers, O., Spivak, J. L. & Moliterno, A. R. Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Exp. Hematol.* **35**, 1641–1646 (2007).

56. Passamonti, F. *et al.* Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* **117**, 2813–2816 (2011).
57. Passamonti, F. *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* **24**, 1574–1579 (2010).
58. Tefferi, A. *et al.* Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* **110**, 1092–1097 (2007).
59. Pikman, Y. *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* **3**, e270 (2006).
60. Pardanani, A. D. *et al.* MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* **108**, 3472–3476 (2006).
61. Vannucchi, A. M. *et al.* Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* **112**, 844–847 (2008).
62. Guglielmelli, P. *et al.* Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br. J. Haematol.* **137**, 244–247 (2007).
63. Schnittger, S. *et al.* Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica* **94**, 141–144 (2009).
64. Beer, P. A. *et al.* MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* **112**, 141–149 (2008).
65. Ding, J. *et al.* Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* **103**, 4198–4200 (2004).
66. Liu, K. *et al.* Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica* **94**, 1368–1374 (2009).
67. Chaligné, R. *et al.* Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* **110**, 3735–3743 (2007).
68. Pardanani, A. *et al.* Extending Jak2V617F and MplW515 mutation analysis to single hematopoietic colonies and B and T lymphocytes. *Stem Cells* **25**, 2358–2362 (2007).
69. Rotunno, G. *et al.* Impact of Calreticulin Mutations on Clinical and Hematological Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia. *Blood* (2013). doi:10.1182/blood-2013-11-538983
70. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289–2301 (2009).
71. Tefferi, A. *et al.* TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* **23**, 905–911 (2009).
72. Green, A. & Beer, P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **362**, 369–370 (2010).
73. Pardanani, A. *et al.* IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **24**, 1146–1151 (2010).
74. Tefferi, A. *et al.* IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* **24**, 1302–1309 (2010).
75. Ernst, T. *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet.* **42**, 722–726 (2010).

76. Guglielmelli, P. *et al.* EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* **118**, 5227–5234 (2011).
77. Abdel-Wahab, O. *et al.* Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25**, 1200–1202 (2011).
78. Gelsi-Boyer, V. *et al.* Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol* **5**, 12 (2012).
79. Stein, B. L. *et al.* Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica* **96**, 1462–1469 (2011).
80. Stegelmann, F. *et al.* DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25**, 1217–1219 (2011).
81. Abdel-Wahab, O. *et al.* DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25**, 1219–1220 (2011).
82. Brecqueville, M. *et al.* Rare mutations in DNMT3A in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes. *Blood Cancer J* **1**, e18 (2011).
83. Lasho, T. L. *et al.* SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood* **120**, 4168–4171 (2012).
84. Lasho, T. L. *et al.* SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia* **26**, 1135–1137 (2012).
85. Tefferi, A. *et al.* U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are strongly associated with anemia and thrombocytopenia despite clustering with JAK2V617F and normal karyotype. *Leukemia* **28**, 431–433 (2014).
86. Grand, F. H. *et al.* Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**, 6182–6192 (2009).
87. Schnittger, S. *et al.* Use of CBL exon 8 and 9 mutations in diagnosis of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative disorders: an analysis of 636 cases. *Haematologica* **97**, 1890–1894 (2012).
88. Aranaz, P. *et al.* CBL mutations in myeloproliferative neoplasms are also found in the gene's proline-rich domain and in patients with the V617F/JAK2. *Haematologica* **97**, 1234–1241 (2012).
89. Gery, S. *et al.* Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 957–965 (2009).
90. Lasho, T. L., Pardanani, A. & Tefferi, A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1189–1190 (2010).
91. Pardanani, A. *et al.* LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* **24**, 1713–1718 (2010).
92. Jäger, R. *et al.* Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **24**, 1290–1298 (2010).
93. Beer, P. A. *et al.* Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* **115**, 2891–2900 (2010).
94. Harutyunyan, A., Klampfl, T., Cazzola, M. & Kralovics, R. p53 Lesions in Leukemic Transformation. *New England Journal of Medicine* **364**, 488–490 (2011).
95. Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M. & Opas, M. in *International Review of Cytology*

245, 91–121 (Elsevier, 2005).

96. Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. & Opas, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal* **417**, 651 (2009).
97. Ellgaard, L. & Frickel, E.-M. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem. Biophys.* **39**, 223–247 (2003).
98. Ellgaard, L. & Helenius, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181–191 (2003).
99. Williams, D. B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* **119**, 615–623 (2006).
100. Gold, L. I. *et al.* Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* **24**, 665–683 (2010).
101. Zamanian, M., Veerakumarasivam, A., Abdullah, S. & Rosli, R. Calreticulin and Cancer. *Pathology & Oncology Research* **19**, 149–154 (2013).
102. Chao, M. P. *et al.* Calreticulin Is the Dominant Pro-Phagocytic Signal on Multiple Human Cancers and Is Counterbalanced by CD47. *Science Translational Medicine* **2**, 63ra94–63ra94 (2010).
103. Pang, W. W. *et al.* Hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 3011–3016 (2013).
104. Helbling, D. CFBF-SMMHC is correlated with increased calreticulin expression and suppresses the granulocytic differentiation factor CEBPA in AML with inv(16). *Blood* **106**, 1369–1375 (2005).
105. Helbling, D. *et al.* The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EVI1 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 13312–13317 (2004).
106. Klampfl, T. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379–2390 (2013).
107. Nangalia, J. *et al.* Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391–2405 (2013).
108. Tefferi, A. *et al.* CALR vs JAK2 vs MPL mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.3
109. Tefferi, A. *et al.* Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.148
110. Tefferi, A. *et al.* Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am. J. Hematol.* **89**, E121–124 (2014).
111. Broséus, J. *et al.* Low rate of calreticulin mutations in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.49
112. Patnaik, M. M. *et al.* CALR mutations are infrequent in WHO-defined refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia* **28**, 1370–1371 (2014).
113. Hou, H.-A., Kuo, Y.-Y., Chou, W.-C., Chen, P.-H. & Tien, H.-F. Calreticulin mutation was rarely detected in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.71
114. Langabeer, S. E., Haslam, K. & McMahon, C. CALR mutations are rare in childhood essential thrombocythemia. *Pediatr Blood Cancer* **61**, 1523 (2014).
115. Giona, F. *et al.* CALR mutations in patients with essential thrombocythemia diagnosed in childhood and adolescence. *Blood* **123**, 3677–3679 (2014).

116. An, W. *et al.* CALR mutation screening in pediatric primary myelofibrosis. *Pediatr Blood Cancer* (2014). doi:10.1002/pbc.25211
117. Lundberg, P. *et al.* Somatic mutations in calreticulin can be found in pedigrees with familial predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Blood* **123**, 2744–2745 (2014).
118. Maffioli, M. *et al.* Looking for CALR mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **28**, 1357–1360 (2014).
119. Rumi, E. *et al.* CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* **123**, 2416–2419 (2014).
120. Turon, F. *et al.* Role of calreticulin mutations in the etiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *J. Hepatol.* (2014). doi:10.1016/j.jhep.2014.08.032
121. Haslam, K. & Langabeer, S. E. Incidence of CALR mutations in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br. J. Haematol.* (2014). doi:10.1111/bjh.13121
122. Eder-Azanza, L. *et al.* Bioinformatic analyses of CALR mutations in myeloproliferative neoplasms support a role in signaling. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.190
123. Chi, J. *et al.* Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia* **28**, 1152–1154 (2014).
124. Lundberg, P. *et al.* Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **123**, 2220–2228 (2014).
125. Tefferi, A. *et al.* Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* **28**, 1568–1570 (2014).
126. Tefferi, A. *et al.* Long-term survival and blast transformation in molecularly-annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Blood* (2014). doi:10.1182/blood-2014-05-579136
127. Guglielmelli, P. *et al.* The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.76
128. Panagiota, V. *et al.* Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.66
129. Trifa, A. P. *et al.* CALR versus JAK2 mutated essential thrombocythaemia - a report on 141 patients. *Br. J. Haematol.* (2014). doi:10.1111/bjh.13076
130. Qiao, C. *et al.* Clinical importance of different calreticulin gene mutation types in wildtype JAK2 essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. *Haematologica* (2014). doi:10.3324/haematol.2014.109199
131. Andrikovics, H. *et al.* Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* **99**, 1184–1190 (2014).
132. Chen, C.-C. *et al.* Frequencies, clinical characteristics, and outcome of somatic CALR mutations in JAK2-unmutated essential thrombocythemia. *Ann. Hematol.* (2014). doi:10.1007/s00277-014-2151-8
133. Shen, H. *et al.* CALR and ASXL1 mutation analysis in 190 patients with essential thrombocythemia. *Leuk. Lymphoma* 1–9 (2014). doi:10.3109/10428194.2014.939963
134. Li, B. *et al.* Calreticulin mutations in Chinese with primary myelofibrosis. *Haematologica* (2014). doi:10.3324/haematol.2014.109249
135. Cabagnols, X. *et al.* Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.270

136. Tefferi, A. *et al.* CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* **28**, 1494–1500 (2014).
137. Cassinat, B., Verger, E. & Kiladjian, J.-J. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 188–189 (2014).
138. Passamonti, F., Caramazza, D. & Maffioli, M. JAK inhibitor in CALR-mutant myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1168–1169 (2014).
139. Vannucchi, A. M. *et al.* Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia* (2014). doi:10.1038/leu.2014.100
140. Kiladjian, J.-J. *et al.* Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia* **20**, 1181–1183 (2006).
141. Lippert, E. *et al.* The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* **108**, 1865–1867 (2006).
142. Fantasia, F. *et al.* A highly specific q-RT-PCR assay to address the relevance of the JAK2WT and JAK2V617F expression levels and control genes in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Ann. Hematol.* **93**, 609–616 (2014).
143. Moliterno, A. R., Williams, D. M., Rogers, O. & Spivak, J. L. Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression. *Blood* **108**, 3913–3915 (2006).
144. Bellosillo, B. *et al.* A higher JAK2 V617F-mutated clone is observed in platelets than in granulocytes from essential thrombocythemia patients, but not in patients with polycythemia vera and primary myelofibrosis. *Leukemia* **21**, 1331–1332 (2007).
145. Zhao, R. *et al.* Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem.* **280**, 22788–22792 (2005).
146. Vannucchi, A. M., Pancrazzi, A., Bogani, C., Antonioli, E. & Guglielmelli, P. A quantitative assay for JAK2(V617F) mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. *Leukemia* **20**, 1055–1060 (2006).
147. Toyama, K. *et al.* JAK2-V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from patients with chronic myeloproliferative disorders: advantage of studying platelets. *Br. J. Haematol.* **139**, 64–69 (2007).
148. Harrison, C. N. *et al.* Guideline for investigation and management of adults and children presenting with a thrombocytosis. *Br. J. Haematol.* **149**, 352–375 (2010).
149. Larsen, T. S., Pallisgaard, N., Møller, M. B. & Hasselbalch, H. C. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. *Eur. J. Haematol.* **79**, 508–515 (2007).
150. Godfrey, A. L. *et al.* JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood* **120**, 2704–2707 (2012).
151. Allen, C., Lambert, J. R., Linch, D. C. & Gale, R. E. X-chromosome inactivation analysis reveals a difference in the biology of ET patients with JAK2 and CALR mutations. *Blood* (2014). doi:10.1182/blood-2014-06-580183
152. Kralovics, R. *et al.* Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* **108**, 1377–1380 (2006).
153. Vannucchi, A. M. *et al.* Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* **110**, 840–846 (2007).

154. Tefferi, A. *et al.* Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* **22**, 756–761 (2008).
155. Guglielmelli, P. *et al.* Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* **114**, 1477–1483 (2009).
156. Vannucchi, A. M. *et al.* Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* **21**, 1952–1959 (2007).
157. Carobbio, A. *et al.* JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **37**, 1016–1021 (2009).
158. Vannucchi, A. M., Pieri, L. & Guglielmelli, P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. *Ther Adv Hematol* **2**, 21–32 (2011).
159. Campbell, P. J. *et al.* V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* **107**, 2098–2100 (2006).
160. Tefferi, A. *et al.* The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br. J. Haematol.* **131**, 320–328 (2005).
161. Barosi, G. *et al.* JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* **110**, 4030–4036 (2007).
162. Guglielmelli, P. *et al.* Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* **114**, 1477–1483 (2009).
163. Haslam, K., Langabeer, S. E., Molloy, K., McMullin, M. F. & Conneally, E. Assessment of CALR mutations in myelofibrosis patients, post-allogeneic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* **166**, 800–802 (2014).
164. Kiladjian, J.-J. *et al.* Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* **112**, 3065–3072 (2008).
165. Girodon, F. *et al.* Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy. *Haematologica* **93**, 1723–1727 (2008).
166. Alchalby, H. *et al.* Impact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* **116**, 3572–3581 (2010).
167. Lippert, E. *et al.* Clinical and biological characterization of patients with low (0.1–2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. *Haematologica* **99**, e98–101 (2014).
168. Hermouet, S. *et al.* Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of JAK2(V617F). *Leukemia* **21**, 1128–1130 (2007).
169. Delhommeau, F. *et al.* Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* **109**, 71–77 (2007).
170. Ishii, T., Bruno, E., Hoffman, R. & Xu, M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood* **108**, 3128–3134 (2006).
171. Li, S. *et al.* Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* **111**, 3863–3866 (2008).

172. Kim, H.-R. *et al.* Allelic expression imbalance of JAK2 V617F mutation in BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *PLoS ONE* **8**, e52518 (2013).

Annexes

1. Critères diagnostiques de Polyglobulies de Vaquez

Majeurs	A1	Hb>185g/L (hommes), >165g/L (femmes) ou augmentation du volume globulaire isotopique > 25% de la valeur prédictive
	A2	Présence de <i>JAK2V617F</i> ou d'une autre mutation fonctionnelle similaire telle que <i>JAK2</i> exon 12
Mineurs	B1	Hypercellularité à la biopsie médullaire, compte tenu de l'âge, avec hyperplasie des trois lignées (panmyélose) : érythroïde, granuleuse et mégacaryocytaire
	B2	Diminution de l'érythropoïétine endogène
	B3	Croissance spontanée des colonies érythroïdes <i>in vitro</i> en absence d'érythropoïétine

Le diagnostic de Polyglobulie de Vaquez requiert A1 + A2 et un critère mineur B ou A1 et 2 critères mineurs B

2. Critères diagnostiques de Thrombocytémies Essentielles

1	Numération plaquettaire > 450 G/L
2	Mutation <i>JAK2V617F</i> présente ou autre marqueur de clonalité
3	Exclusion de PV, myélofibrose primaire, leucémie myéloïde chronique, syndrome myélodysplasique ou autre néoplasie myéloïde
4	Exclusion d'une thrombocytose secondaire
5	A la biopsie osseuse, prolifération essentiellement de la lignée mégacaryocytaire avec présence d'éléments mûrs, de grande taille Absence d'augmentation significative ou d'anomalies de maturation de l'érythropoïèse ou de la granulopoïèse

Le diagnostic de TE requiert 1 + 2 + 3 ou 1 + 3 - 5

3. Critères diagnostiques de Myélofibroses Primitives

	A1	Prolifération de mégacaryocytes atypiques avec une fibrose réticulinique ou collagénique ou en absence de fibrose réticulinique significative, altérations des mégacaryocytes + hypercellularité médullaire avec hyperplasie granuleuse et souvent érythropoïèse diminuée (<i>maladie en phase cellulaire préfibrotique</i>)
Majeurs	A2	Exclusion de PV, LMC, syndrome myélodysplasique ou autre néoplasie myéloïde
	A3	Présence de la mutation <i>JAK2V617F</i> ou d'un autre marqueur clonal (par ex. <i>MPLW515K/L</i>) ou En absence de marqueur de clonalité, exclusion d'une fibrose de la moelle osseuse ou d'altérations secondaires à une infection, une maladie autoimmune ou un autre processus inflammatoire chronique, à une leucémie à tricholeucocytes ou autre néoplasie lymphoïde, à un cancer métastatique ou encore à une myélopathie (chronique) toxique
Mineurs	B1	Erythromyélie
	B2	Augmentation des LDH sériques
	B3	Anémie
	B4	Splénomégalie

Le diagnostic de MFP requiert les 3 critères majeurs et 2 critères mineurs.

4. Critères diagnostiques de myélofibrose secondaire à une PV ou une TE

	Post-PV	Post-TE
	Diagnostic préalable de PV	Diagnostic préalable de TE
Majeurs	Fibrose médullaire de grade 2-3 (0-3) ou 3-4 (0-4)	Fibrose médullaire de grade 2-3 (0-3) ou 3-4 (0-4)
	Anémie ou perte de la dépendance en phlébotomie ou traitement cytoréducteur pour maintenir l'érythrocytose	Anémie ou diminution du taux d'hémoglobine de plus de 20 g/L
	Leucoérythroblastose	Leucoérythroblastose
Mineurs	Augmentation de la splénomégalie (> 5cm à la palpation) ou apparition d'une splénomégalie palpable	Augmentation de la splénomégalie (> 5cm à la palpation) ou apparition d'une splénomégalie palpable
	Apparition d'au moins un des 3 symptômes : perte de poids > 10% en 6 mois, sueurs nocturnes, fièvre inexplicquée (>37,5°C).	Apparition d'au moins un des 3 symptômes : perte de poids > 10% en 6 mois, sueurs nocturnes, fièvre inexplicquée (>37,5°C).
		Augmentations des LDH

Le diagnostic de MF secondaire nécessite 2 critères majeurs + 2 critères mineurs.

5. Recherche de mutations de *CALR* par analyse de fragments sur ADN :

GTC AAGTCTGGCACCATCTTTGACAACCTCCTCATCACCAACGATGAGGCATACGCTGAGGAGTTTGGCA
ACGAGACGTGGGGCGTAACAAAGgtgaggcctggtcctggtcctgatgtcggggcgggcagggctggcagggggcaaggcc
ctgaggtgtgtgctctgctgcagGCAGCAGAGAAACAAATGAAGGACAAACAGGACGAGGAGCAGAGGCTTAA
GGAGGAGGAAGAAGACAAGAAACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGAGGACAAGGAGGATGATGAGGA
CAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGACAAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGATGTCCCCGGCCAG
GCCAAGGACGAGCTGTAGAGAGGCCTGCCTCCAGGGCTGGACTGAGGCCTGAGCGCTCCTGCCGCAGA
GCTGGCCGCGCAAATAATGTCTCTGTGAGACTCGAGAACTTTCATTTTTTCCAGGCTGGTTCCGATTTG
GGGTGGATTTTGGTTTTGTTCCCTCCTCCACTCTCCCCACCCCTCCCCGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTA
AACTGGTATTTTATCTTTGATTCTCCTTCAGCCCTCACCCCTGGTTCTCATCTTTCTTGATCAACATCTTTTCT
TGCCTCTGTCCCCTTCTCTCATCTCTTAGCTCCCCTCC

Séquence nucléotidique d'une partie de l'exon 8, de l'intron 8 et de l'exon 9 de *CALR*.

En minuscule : l'intron 8

En majuscule : les exons 8 et 9

Barre turquoise : amorce sens

Barre rouge : amorce anti-sens

En rose : les 52 pb délétées dans la mutation de type 1

En orange : les 2 bases entre lesquelles les 5 pb de la mutation de type 2 sont insérées (TTGTC).

Les tailles théoriques des fragments correspondant aux amplicons des formes sauvage, mutée type 1 et mutée type 2 de *CALR* sont 300 pb, 248 pb et 305 pb respectivement.

6. Recherche de mutations de *CALR* par analyse de fragments sur ARN :

GTCAAGTCTGGCACCATCTTTGACAACCTCCTCATCACCAACGATGAGGCATACGCTGAGGAGTTTGCA
ACGAGACGTGGGGCGTAACAAAGgtgaggcctggtcctggtcctgatgtcggggcgggcagggctggcagggggcaaggcc
ctgaggtgtgtcctcctgcagGCAGCAGAGAAACAAATGAAGGACAAACAGGACGAGGAGCAGAGGCTTAA
GGAGGAGGAAGAAGACAAGAAACGCAAAGAGGAGGAGGAGGCAGAGGACAAGGAGGATGATGAGGA
CAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGACAAGGAGGAAGATGAGGAGGAAGATGTCCCCGGCCAG
GCCAAGGACGAGCTGTAGAGAGGCCTGCCTCCAGGGCTGGACTGAGGCCTGAGCGCTCCTGCCGCAGA
GCTGGCCGCGCCAAATAATGTCTCTGTGAGACTCGAGAACTTTCATTTTTTCCAGGCTGGTTCGGATTTG
GGGTGGATTTGGTTTTGTTCCCTCCTCCACTCTCCCCACCCCTCCCCGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTA
AACTGGTATTTTATCTTTGATTCTCCTCAGCCCTCACCCCTGGTTCTCATCTTTCTTGATCAACATCTTTCT
TGCCTCTGTCCCCTTCTCTCATCTCTTAGCTCCCCTCC

Séquence nucléotidique d'une partie de l'exon 8, de l'intron 8 et de l'exon 9 de *CALR*.

En minuscule : l'intron 8

En majuscule : les exons 8 et 9

Barre turquoise : amorce sens

Barre rouge : amorce anti-sens

En rose : les 52pb délétées dans la mutation de type 1

En orange : les 2 bases entre lesquelles les 5 pb de la mutation de type 2 sont insérées (TTGTC).

Les tailles théoriques des fragments correspondant aux amplicons des formes sauvage, mutée type 1 et mutée type 2 de *CALR* sont 332 pb, 280 pb et 337 pb respectivement.