

ANNÉE 2013-2014

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional le 16 mai 2014,

Par Estelle LAMAR,

Née le 10 octobre 1987, à Sèvres

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Recherche des mutations de MPL dans les syndromes myéloprolifératifs : étude
rétrospective multicentrique des analyses effectuées au CHU de Brest**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard

Directeur de thèse : Madame le Professeur Valérie Ugo

Membres du jury : Madame le Docteur Aurélie Chauveau
 Monsieur le Professeur Stéphane Giraudier
 Monsieur le Docteur Jean-Christophe Ianotto

Remerciements

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard, qui me fait l'honneur de présider ce jury, et qui a eu la gentillesse de se déplacer jusqu'à Brest.

Je remercie le Professeur Valérie Ugo, qui a accepté de m'encadrer pour ma thèse. Merci pour ton aide, merci pour tout ce que tu m'as appris.

Je remercie le Docteur Aurélie Chauveau, qui m'a accueillie dans le monde inconnu de la biologie moléculaire, merci pour tes conseils et ta relecture.

Je remercie le Professeur Stéphane Giraudier de nous avoir donnés les précieux plasmides, d'avoir accepté de faire parti de ce jury et de venir jusqu'à Brest.

Je remercie le Docteur Jean-Christophe Ianotto pour sa grande gentillesse, la clarté de ses explications, merci de m'avoir initiée aux consultations d'hématologie.

Je remercie les Docteurs Françoise Boyer, Lydia Roy, Marc Porneuf, Pascal Hutin, Thierry Lamy, Alex Bellange pour leur accueil chaleureux dans leurs villes respectives et pour m'avoir permis d'utiliser les données de leurs patients.

Je remercie le Docteur Nadine Couchouren pour ses précieux conseils, ainsi que Lydie Lecucq pour son aide en biologie moléculaire.

Je tiens à remercier très chaleureusement toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Brest, en particulier le Docteur Véronique Marion pour ses explications en cytologie, le Docteur Geneviève Le Calvez pour son aide dans la réalisation d'un fameux case report, le Docteur Nathalie Kergoat pour son esprit positif, et le Docteur Hubert Galinat pour ses conseils en statistiques et ses petits gâteaux.

Je remercie le Docteur Caroline Buors pour ses explications et son soutien dans les différentes étapes de la thèse ; merci de ta gentillesse.

Je remercie tout le personnel du laboratoire d'hématologie.

Je remercie également les techniciens que j'ai croisés tout au long de mon internat, et qui m'ont beaucoup appris et notamment les techniciens de Bactériologie de Brest, de Parasitologie de Rennes, d'Hématologie à Rennes et Brest.

Je remercie le Docteur Didier Tandé, mon maître en Bactériologie, que j'admire autant le plan professionnel que personnel.

Je remercie mes co-internes acuels qui m'ont supportée pendant ce stage où ma thèse a pris une grande place. Merci à Andréas pour son soutien, et pour notre complicité, merci à Lise-Marie sa gentillesse et ses délicieux gâteaux, enfin merci aux stagiaires de M2, à Damien, mon partenaire de « galère » de biologie moléculaire, et à Fanny qui a amené beaucoup de bonne humeur au laboratoire !

Sommaire

INTRODUCTION	8
1 LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	9
1.1 GENERALITES	9
1.1.1 RAPPELS SUR L'HEMATOPOÏESE	9
1.1.2 FACTEURS DE CROISSANCE ET SIGNALISATION CELLULAIRE	10
1.1.3 LA PROTEINE KINASE JAK2	10
1.1.4 LE RECEPTEUR A LA THROMBOPOIETINE : <i>MPL</i>	11
1.2 DESCRIPTION DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	12
1.2.1 DEFINITION	12
1.2.2 PHYSIOPATHOLOGIE DES SMP CLASSIQUES	14
1.3 LES ANOMALIES MOLECULAIRES	22
1.3.1 MUTATIONS AFFECTANT LA SIGNALISATION CELLULAIRE	24
1.3.2 MUTATIONS IMPLIQUANT LA REGULATION EPIGENETIQUE	30
1.3.3 MUTATIONS DE <i>MPL</i>	31
2 OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE	35
3 PATIENTS, MATERIELS ET METHODES	35
3.1 PATIENTS	35
3.2 MATERIELS	35
3.2.1 PRELEVEMENTS	35
3.2.2 SEPARATION CELLULAIRE	36
3.2.3 EXTRACTION ET DOSAGE DE L'ADN	37
3.3 METHODES	37
3.3.1 DETECTION DES MUTATIONS <i>MPL</i> W515L/K	37
3.3.2 QUANTIFICATION DES MUTATIONS <i>MPL</i> W515L/K	39
3.3.3 TESTS STATISTIQUES	44
4 RESULTATS	44
4.1 DESCRIPTION DE LA COHORTE GLOBALE	44
4.1.1 DIAGNOSTICS DE L'ENSEMBLE DES RECHERCHES DE <i>MPL</i>	44
4.1.2 REPARTITION DES MUTATIONS DANS LA COHORTE	46
4.1.3 REPARTITION DES MUTATIONS SELON LE SMP	47
4.1.4 CARACTERISTIQUES DES SMP DE LA COHORTE	49
4.2 COMPARAISON SELON LE TYPE DE MUTATION	51
4.2.1 CARACTERISTIQUES DE LA THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE	51
4.2.2 CARACTERISTIQUES DE LA MYELOFIBROSE PRIMITIVE	52
4.3 QUANTIFICATION DE <i>MPL</i> W515L/K	53
4.3.1 GAMME DE % DE <i>MPL</i> W515L/K	53
4.3.2 QUANTIFICATION DU % <i>MPL</i> W515L/K DES PATIENTS	54
5 DISCUSSION	56
6 CONCLUSION	61
7 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62
8 ANNEXES	66

Tables des illustrations

Figure 1 : Les lignées hématopoïétiques.....	9
Figure 2 : Structure de la protéine JAK2 (16).....	10
Figure 3 : Signalisation cellulaire après fixation du TPO sur le MPL (16).....	11
Figure 4 : 1 ^{ère} description de l'entité des « syndromes myéloprolifératifs ».....	12
Figure 5 : Classifications des néoplasies myéloïdes selon l'OMS 2008 (5).....	13
Figure 6: Evolution naturelle de la LMC avant les ITK.....	14
Figure 7: Evolution naturelle de la PV.....	16
Figure 8: BOM d'une TE colorée à l'Hémalun-Eosine-Safran (HES).....	18
Figure 9: Myélogramme coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) d'une TE.....	19
Figure 10: Evolution de la TE.....	19
Figure 11: Frottis sanguin coloré au MGG d'un patient atteint de MFP.....	20
Figure 12: Coloration HES de BOM à différents grades de fibrose dans la MFP.....	21
Figure 13: Evolution de la MFP.....	22
Figure 14 : Fréquence des mutations dans la MF, la PV, et la TE (23).....	23
Figure 15: Localisation de la mutation JAK2 V617F.....	24
Figure 16: Signalisation cellulaire dérégulée en présence de la mutation JAK2 V617F (24).....	25
Figure 17 : Fréquence des mutations JAKV617F, MPL, et CALR dans la PV, la TE et la MFP (11).....	27
Figure 18 : Fréquence des 36 types de mutations de CALR (11).....	28
Figure 19: Rôle de la calréticuline (43).....	29
Figure 20: Chromatogramme illustrant les séquences des allèles MPL sauvage (i), MPL W515L (ii), et MPL W515K (iii).....	31
Figure 21 : Localisation du motif RWQFP au sein du récepteur MPL (56).....	32
Figure 22: Séparation des cellules mononucléées du sang.....	36
Figure 23: Résultat d'une PCR semi-quantitative avec deux patients MPL W515L.....	38
Figure 24 : Résultat d'une PCR semi-quantitative avec un patient au profil douteux.....	39
Figure 25: Gel d'électrophorèse révélant les fragments de MPL amplifiés.....	41
Figure 26: Courbe d'étalonnage MPL wt.....	42
Figure 27: Courbe d'étalonnage MPL W515L.....	42
Figure 28: Courbe d'étalonnage MPL W515K.....	42
Figure 29: Répartition des diagnostics non SMP (n=79).....	45
Figure 30: Répartition des diagnostics des patients avec un SMP (n=221).....	45
Figure 31: Mutations retrouvées dans la TE (n=128).....	47
Figure 32: Répartition des mutations de CALR et MPL dans les TE JAK2- (n=90) et répartition des mutations de CALR dans les TE MPL-/JAK2- (n=78).....	48
Figure 33: Mutations retrouvées dans la MFP (n=46).....	48
Figure 34: Répartition des mutations de CALR et MPL dans les MFP JAK2- (n=33) et répartition des mutations de CALR dans les MFP JAK2-/MPL- (n=26).....	49
Figure 35: Mutations retrouvées dans la MF post TE (n=15).....	49
Figure 36: Représentation du % MPL W515 dans la TE (n=13) et la MFP (n=10).....	55
Figure 37: Répartition du % de chaque allèle MPL W515L/K en fonction du SMP.....	55
Figure 38: PCR semi-quantitative représentant différents % de plasmides MPL W515K.....	54
Figure 39: PCR semi-quantitative représentant différents % de plasmides MPL W515L.....	54
Figure 40: Place de MPL dans le diagnostic de la MFP et de la TE.....	56
Figure 41: Variation du % d'allèle MPL W515 dans le suivi de 8 patients.....	60

Liste des tableaux

Tableau 1: Critères diagnostiques de la PV selon la WHO 2008	16
Tableau 2: Critères diagnostiques de la TE	18
Tableau 3 : Critères diagnostiques de la MFP	21
Tableau 4 : Prévalence de la mutation du gène MPL selon le phénotype	32
Tableau 5: Séquences des amorces et sondes utilisées par Pancrazzi pour la PCR quantitative (62)	40
Tableau 6: Séquences des nouvelles sondes choisies sur Primer3	40
Tableau 7: Composition du mix nécessaire à la quantification MPL W515L/K	43
Tableau 8: Conditions optimales pour la PCR en temps réel	43
Tableau 9: Répartition de l'ensemble des recherches de MPL selon le centre (n=326)	44
Tableau 10: Répartition des différentes mutations de MPL au sein de la cohorte (n=326)	46
Tableau 11: Répartition des mutations JAK2 V617F au sein de la cohorte (n= 326 patients)	47
Tableau 12: Répartition des mutations de CALR au sein des TE, MFP et MF post TE (n=185 patients)	47
Tableau 13: Caractéristiques clinico-biologiques des TE, MFP, et MF post TE	50
Tableau 14: Caractéristiques des patients atteints d'une TE selon le type de mutation (n=128)	51
Tableau 15: Caractéristiques des patients atteints d'une MFP selon le type de mutation (n=46)	53
Tableau 16 : Double mutation et transformation des TE en LA	59

Liste des annexes

Annexe 1 : Formulaire de consentement	66
Annexe 2 : Fiche de renseignements motivant la recherche de mutation W515	67
Annexe 3 : Recueil des informations clinico-biologiques effectué pour chaque recherche de mutation de MPL W515	68
Annexe 4a : Principe des sondes Taqman	69
Annexe 4b : Programme de la PCR en temps réel	69
Annexe 5 : Séquence de l'insert MPL dans les plasmides	70
Annexe 6 : Calcul du nombre de copies d'allèle MPL contenu dans les plasmides	71
Annexe 7: Case report à propos d'un cas : description d'une nouvelle mutation de MPL	74
Annexe 8 : Résultats de la quantification de MPL W515L/K chez 41 patients	76

Abréviations

SMP : Syndrome myéloprolifératif
PV : Polyglobulie de Vaquez
TE : Thrombocytémie essentielle
MFP : Myélofibrose primitive
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
BCR : Breaking point ClusteR
ABL : Abelson
JAK2 : Janus Kinase 2
WHO : World Health Organization
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
SMP/SMD : Syndrome myéloprolifératif/ Syndrome myélodysplasique
EPO : Erythropoïétine
TPO : Thrombopoïétine
MPL : Myéloproliferative Leukemia
MPL wt : MPL wild type
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
RAS/ MAPK : RA Sarcoma/ Mitogen Activated Protein Kinase
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire
AVC : Accident Vasculo-Cérébrale
TK : Tyrosine Kinase
ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
MGG : May-Grünwald Giemsa
HES : Hémalun Eosine Safran
RE : Réticulum endoplasmique
CBL : Casitas B-lineage Lymphoma
LNK : Lymphocyte specific adaptor protein
TET2 : TET oncogene family number 2
ASXL1 : Additional Sex-Coombs-Like 1
EZH2 : Enhancer of Zest Homolog 2
IDH : Isocitrate Deshydrogenase
DNMT3A : DNA MethylTransferase 3 alpha
UNG : Uracile N-Glycosylase
Ct : Cycle Threshold

Introduction

Les syndromes myéloprolifératifs classiques regroupent la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocyémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP). La LMC a actuellement les mécanismes moléculaires les mieux élucidés depuis la découverte en 1960 de l'anomalie chromosomique qui la caractérise : le chromosome Philadelphie. La découverte de la mutation JAK2 V617F en 2005 a été une grande avancée dans le physiopathologie des SMP BCR-ABL négatif et a permis d'identifier 95% des PV, et 50 à 60% des TE et MFP (1–4). En 2006, des mutations du récepteur de la thrombopoïétine, ou Myeloproliferative Leukemia (*MPL*), ont été identifiées dans environ 10% et 15% des TE et MPF *JAK2* non muté (5,6). Bien que la mutation du gène *MPL* ait été décrite pour la première fois dans les SMP en 2006, les premiers mutants de *MPL* construits artificiellement ont été décrits en 1996 (7), la première mutation spontanée a été retrouvée en culture cellulaire en 2002 avec la mutation W508N (équivalent de W515S chez l'homme) (8), et en 2004, la première mutation de *MPL* chez l'homme (mutation S505N) a été mise en évidence dans une TE familiale (9).

Les mutations de *JAK2* et de *MPL* font maintenant parties des critères majeurs de diagnostic des SMP non BCR-ABL d'après les recommandations de la World Health Organization (WHO) parues en 2008 (10). Plusieurs questions restent en suspens, notamment comment ces mutations peuvent être présentes dans des phénotypes différents. Une des hypothèses avancées est la corrélation entre le % d'allèle muté ou charge allélique et le phénotype.

La physiopathologie des SMP BCR-ABL négatif nécessite encore des éclaircissements. En décembre 2013, des mutations du gène *CALR*, codant pour la calréticuline, ont été identifiées dans respectivement environ 70% et 74% des TE et MFP *JAK2/MPL* non mutés (11–14).

Le but de ce travail est de caractériser les recherches de mutations de *MPL* effectuées au laboratoire d'hématologie du CHRU de Brest de février 2009 à septembre 2013, et de mettre en évidence un éventuel impact du pourcentage d'allèle *MPL* W515 sur le phénotype.

1 Les syndromes myéloprolifératifs

1.1 Généralités

1.1.1 Rappels sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui conduit à la génération continue et régulée des cellules sanguines matures à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) dans un micro-environnement spécifique. C'est un processus complexe qui a lieu dans la moelle osseuse. Il y a deux grandes lignées de cellules hématopoïétiques : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (lymphocytes). La lignée myéloïde comprend la lignée granuleuse (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, et basophiles), la lignée monocytaire (monocytes), la lignée érythroblastique (globules rouges ou hématies), et la lignée mégacaryocytaire (plaquettes). Au sein de la moelle osseuse, les CSH, qui correspondent à une population très minoritaire, sont multipotentes et capables d'auto-renouvellement. Au cours de l'embryogenèse, l'auto-renouvellement prédominant est dit « d'expansion », avec une division cellulaire symétrique : une CSH produit deux CSH. Après la naissance, l'auto-renouvellement est dit « de maintien » avec une division cellulaire asymétrique produisant une CSH et un progéniteur qui s'engagera vers la différenciation cellulaire. Le progéniteur donne naissance à un précurseur, qui à la fin du processus de maturation, devient une cellule mature. Celle-ci va quitter la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine.

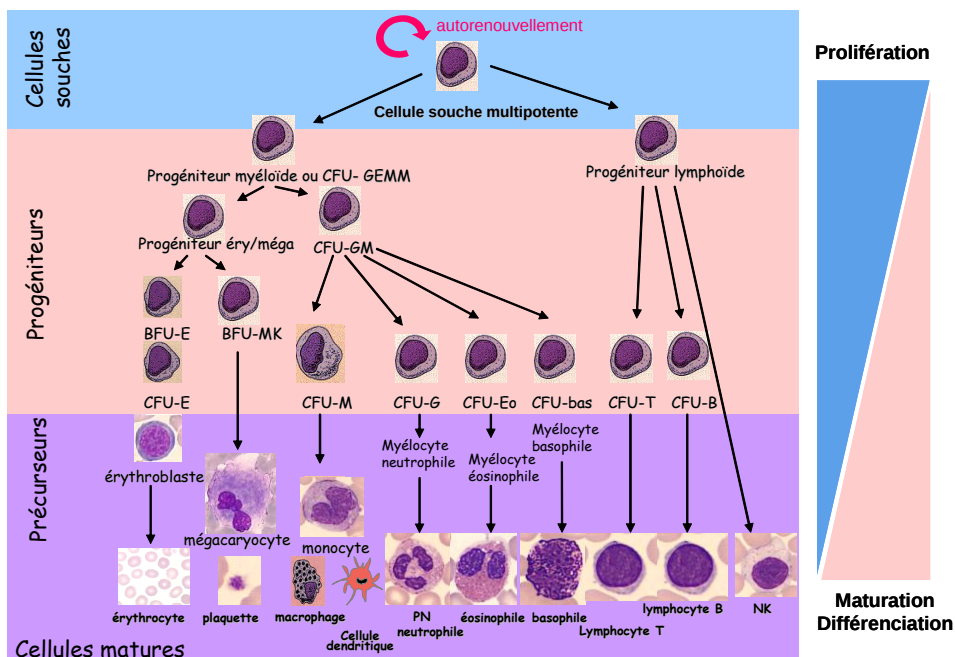


Figure 1 : Les lignées hématopoïétiques

1.1.2 Facteurs de croissance et signalisation cellulaire

La prolifération cellulaire lors de l'hématopoïèse est possible grâce à la stimulation de récepteurs par des facteurs de croissance. Les facteurs de croissance sont des glycoprotéines solubles agissant localement et dont le but est de stimuler ou d'inhiber la croissance cellulaire. Ils peuvent être produits localement au niveau du microenvironnement cellulaire ou dans des organes spécifiques comme c'est le cas pour l'érythropoïétine (EPO) produite par le rein ou la thrombopoïétine (TPO) produite par le foie. Les récepteurs aux facteurs de croissance et les cytokines peuvent être de deux types : avec une activité tyrosine kinase propre, on parle alors de récepteur tyrosine kinase, ou sans activité tyrosine kinase propre. Dans ce dernier cas, la transduction du signal est possible grâce à une protéine à activité tyrosine kinase. Les protéines kinases sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires physiologiques. De nombreuses protéines kinases ont déjà été identifiées, telles que JAK2, ABL, c-kit, PDGFR α et PDGFR β , ...

1.1.3 La protéine kinase JAK2

La famille JAK comprend quatre kinases (JAK1, 2, 3 et TYK2) qui sont attachés au domaine cytosolique du récepteur de cytokine. Les kinases JAK comprennent deux domaines homologues à l'extrémité C-terminale : un domaine actif (JH1), et un domaine pseudokinase inactif (JH2). Le domaine inactif JH2 régule négativement le domaine JH1, à activité kinase (15). A l'extrémité N-terminale, les domaines JH5-JH7 contiennent un motif FERM qui joue un rôle dans la liaison au domaine cytosolique des récepteurs de cytokines.

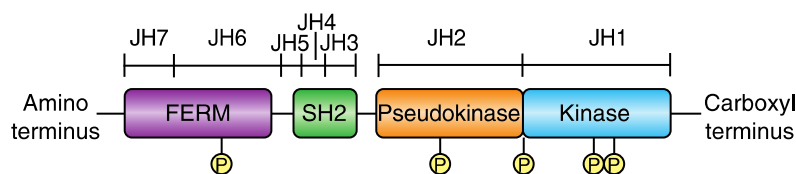


Figure 2 : Structure de la protéine JAK2 (16)

JAK2 est localisé sur le chromosome 9, à la position 9p24. Il joue un rôle central dans la signalisation des récepteurs de cytokines myéloïdes. La protéine kinase JAK2 se lie aux trois récepteurs myéloïdes : le récepteur de l'érythropoïétine (EPO-R), le récepteur de la thrombopoïétine ou myeloproliférative leukemia (TPO-R ou MPL), le récepteur du G-CSF

(G-CSF-R). Il se lie également aux récepteurs de la prolactine et des facteurs de croissance, aux récepteurs hétérodimériques (GM-CSF-R, IL3-R et IL5-R). JAK2 est un médiateur essentiel de la signalisation cellulaire des cytokines et des facteurs de croissance (15).

1.1.4 Le récepteur à la thrombopoïétine : *MPL*

Le récepteur de la thrombopoïétine (TPO) est connu depuis les années 90. Ce récepteur est fortement exprimé dans les mégacaryocytes et les plaquettes. La TPO a un rôle majeur sur toutes les phases de la mégacaryopoïèse, y compris la survie, la prolifération, et la différenciation (17–19).

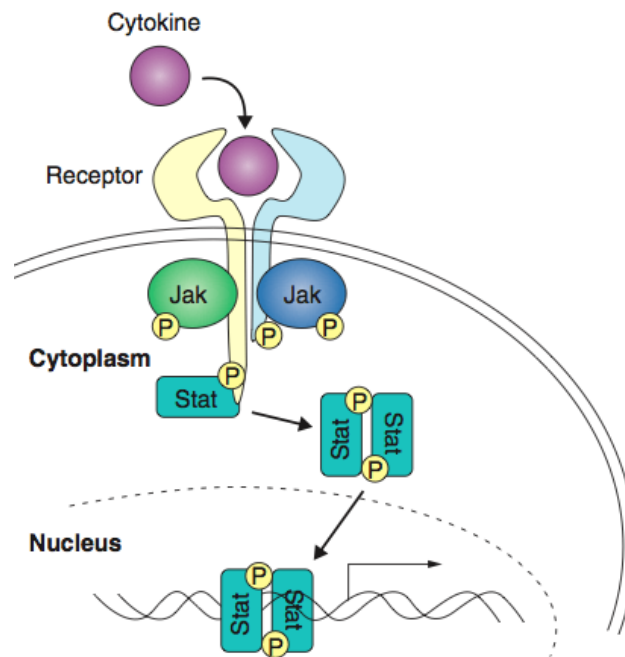


Figure 3 : Signalisation cellulaire après fixation du TPO sur le MPL (16)

Lorsque le TPO se fixe sur son récepteur (MPL), il se produit une modification conformationnelle du récepteur qui se dimérise, rapprochant ainsi deux protéines JAK2 qui vont alors être activées après phosphorylation. Le récepteur devient alors capable de fixer les protéines intracellulaires de la famille STAT (signal transducers and activators of transcription) qui seront à leur tour phosphorylées par JAK2. Les protéines STAT ainsi activées se transloquent vers le noyau où elles agiront comme des facteurs de transcription et interviendront dans la régulation de l'expression de gènes cibles notamment impliqués dans la

différenciation, la prolifération ou la survie cellulaire. En plus de la voie STAT5, d'autres voies de régulations interviennent dans la transduction du signal, dont les deux principales sont la voie RAS (Rat Sarcoma) / MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase).

1.2 Description des syndromes myéloprolifératifs

1.2.1 Définition

Le terme de « syndromes myéloprolifératifs » a été introduit pour la première fois en 1951 par William Dameshek (20). Il décrit quatre maladies différentes avec des ressemblances clinico-biologiques : la polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocythémie Essentielle (TE), la Myélofibrose Primitive (PMF), et la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC).



Figure 4 : 1^{ère} description de l'entité des « syndromes myéloprolifératifs »

Les syndromes myéloprolifératif (SMP) sont des hémopathies myéloïdes acquises caractérisées par des anomalies clonales de la cellule souche hématopoïétique. Ces anomalies clonales confèrent aux cellules tumorales une indépendance ou une hypersensibilité vis-à-vis des cytokines et un avantage de prolifération et de survie. Les SMP sont caractérisés par une prolifération médullaire excessive de cellules sanguines myéloïdes, avec peu d'anomalies de maturation, excepté dans la MFP, où des anomalies de différenciation des mégacaryocytes pourraient être responsables de la fibrose médullaire.

Les SMP touchent une ou plusieurs lignées myéloïdes mais prédominent sur l'une d'entre elles: la lignée érythrocytaire pour la PV, la lignée mégacaryocytaire pour la TE, les lignées mégacaryocytaire et granuleuse pour la MFP, et la lignée granuleuse pour la LMC.

En 2001, la World Health Organization (WHO) ajoute aux SMP déjà décrits, trois nouvelles maladies; la Leucémie Chronique à Polynucléaires Neutrophiles, la Leucémie Chronique à Eosinophiles/Syndrome d'Hyperéosinophilie, et les maladies chroniques myéloprolifératives inclassables. Une nouvelle et dernière classification à ce jour a été publiée par la WHO en 2008 (21). Cette classification décrit les néoplasies myéloïdes en cinq entités qui sont rapportés dans la figure 5.

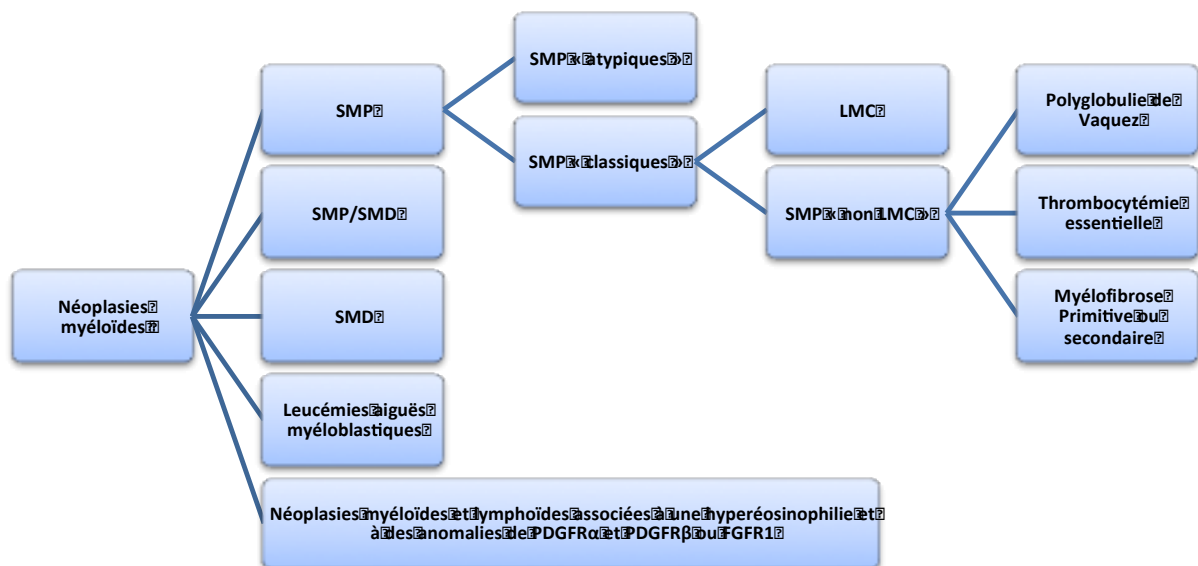


Figure 5 : Classifications des néoplasies myéloïdes selon l'OMS 2008 (5)

Cette classification inclut au sein des SMP les mastocytoses systémiques, et précise que les néoplasies lymphoïdes ou myéloïdes avec éosinophilie et anomalies du PDGFRA, PDGFRB et FGFR1 ne sont pas classés dans les SMP. Un continuum existe entre certains SMP et les syndromes myélodysplasiques (SMD), comme la Leucémie Myélo-Monocytaire Chronique (LMMC), classée dans les SMP/SMD d'après la WHO 2008.

Nous nous intéresserons dans ce travail aux autres SMP classiques.

1.2.2 Physiopathologie des SMP classiques

1.2.2.1 La Leucémie Myéloïde Chronique

La Leucémie Myéloïde Chronique provoque une hyperplasie de la lignée granuleuse avec une prolifération excessive dans la moelle, la rate, le foie, et dans le sang.

L'incidence annuelle de cette maladie est de 1-2/ 100 000 habitants, l'âge médian est de 50-60 ans, avec une légère prédominance masculine, H>F (1/1,3).

Le début de la maladie est souvent insidieux, avec une découverte fortuite sur l'hémogramme dans 50% des cas. Les symptômes ne sont pas spécifiques (fatigue, sueurs, perte de poids). Un signe clinique est particulièrement évocateur : la splénomégalie. Sur l'hémogramme, il y a une hyperleucocytose avec myélémie, et parfois une thrombocytose et une anémie. Les complications de l'hyperleucocytose et de la thrombocytose peuvent être à l'origine de la découverte de la maladie ; il peut s'agir de thromboses, ou d'hémorragie.

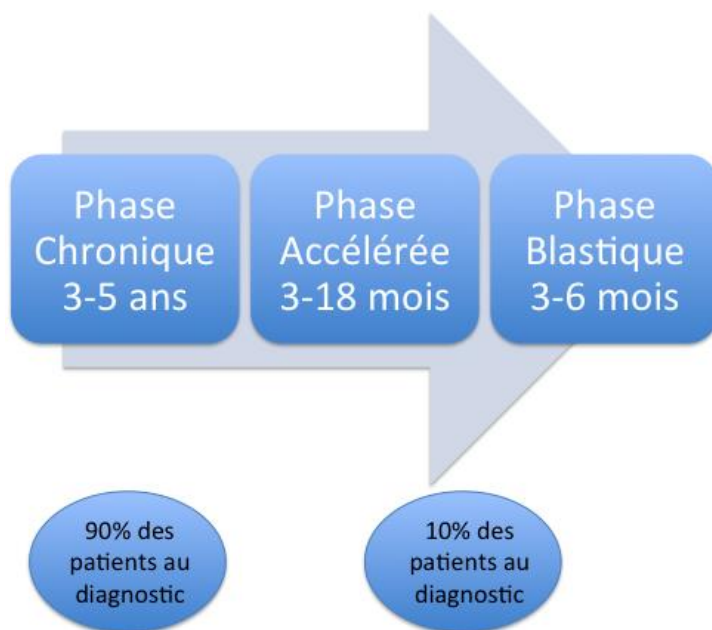


Figure 6: Evolution naturelle de la LMC avant les ITK

La LMC est aujourd'hui bien caractérisée par son anomalie génétique (chromosome Philadelphie ou par son transcrit BCR-ABL). C'est en 1960 qu'est découvert chez les patients atteints de LMC un chromosome anormal ; le chromosome Philadelphie. Ce chromosome résulte d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22, et la protéine chimérique résultante, la protéine BCR-ABL, induit une activation constitutive de la protéine

kinase ABL. Le diagnostic est aujourd'hui posé sur l'hémogramme et la présence du chromosome Philadelphie en cytogénétique, ou la présence du transcrit BCR-ABL en biologie moléculaire. Avant l'apparition de thérapeutiques ciblées, la LMC évoluait en trois étapes ; une phase chronique, une phase accélérée et une phase blastique qui menait inéluctablement au décès. La mise sur le marché en 2000 d'un traitement ciblé contre BCR-ABL, l'Imatinib ou Glivec®, a révolutionné le pronostic de la maladie et a permis de mettre ces patients en rémission. Plusieurs autres ITK ont depuis été mis sur le marché, tel que le Dasatinib, le Nilotinib, le Posatinib et le Bosutinib. Le suivi de la LMC sous traitement repose aujourd'hui sur la quantification du transcrit.

1.2.2.2 La Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez touche principalement la lignée érythrocytaire et provoque une hyperplasie de cette lignée dans la moelle, la rate, le foie et le sang.

L'incidence de la PV est de 0,7 à 2,6 / 100 000 habitants. L'âge médian est de 60 ans avec une prédominance masculine (H> F 1 à 2/1). Le diagnostic de la PV est souvent posé lors d'une découverte fortuite sur l'hémogramme avec une augmentation des globules rouge et de l'hématocrite. Les patients peuvent présenter des signes cliniques en rapport avec l'augmentation de masse sanguine, tels que des céphalées, des vertiges, des troubles visuels, des paresthésies, un prurit à l'eau, une érythrose cutanéomuqueuse. Il y a une splénomégalie dans 70% des cas et une hépatomégalie dans 40% des cas. Les thromboses veineuses ou artérielles sont des événements fréquents dans l'histoire médicale du patient et peuvent même être l'élément initiateur du diagnostic de la PV.

La maladie évolue en trois phases ; une phase pré-PV, peu ou pas symptomatique avec une polyglobulie modérée, une phase de PV avérée avec une polyglobulie significative, et enfin une phase PV avec une évolution en myélofibrose ou en leucémie aiguë secondaire.

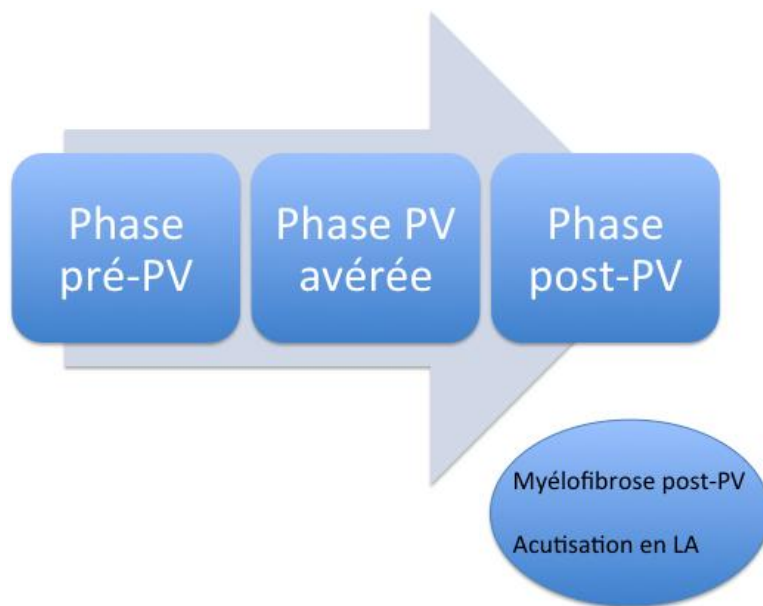


Figure 7: Evolution naturelle de la PV

La découverte en 2005 de la mutation JAK2 V617F, puis en 2007 de mutations de l'exon 12 de JAK2 ont permis d'avoir un diagnostic moléculaire dans 97% des PV. La recherche des mutations de JAK2 fait ainsi partie des critères majeurs de l'OMS 2008. En l'absence de la mutation JAK2 V617F, le Volume Globulaire Isotopique (VGI) doit être effectué afin d'affirmer la polyglobulie vraie. Toutes les causes d'érythrocytose secondaire (étiologie cardio-vasculaire, hypoxie, tumeurs du rein ou du foie, polyglobulie constitutionnelle) doivent être exclues.

Critères majeurs

1. Hémoglobine >18,5g/dL chez l'homme, >16,5g/dL chez la femme ou volume globulaire >25% de la valeur prévue
 2. Présence de la mutation JAK2 V617F ou d'une autre mutation fonctionnellement proche comme une mutation de l'exon 12 de JAK2.
-

Critères mineurs

1. Biopsie médullaire hypercellulaire pour l'âge avec prolifération des trois lignées myéloïdes.
 2. Erythropoïétine sérique basse
 3. Formation de colonies érythroïdes endogènes in vitro
-

Tableau 1: Critères diagnostiques de la PV selon la WHO 2008

Le traitement doit contrôler le risque thrombotique, contrôler les symptômes dus à la maladie et retarder l'évolution en myélofibrose ou leucémie aiguë myéloïde (22). La stratégie

thérapeutique repose sur l'utilisation d'antiagrégant plaquettaire pour prévenir des thromboses artérielles, l'utilisation de saignées chez les patients à faible risque de thrombose sans signe de myéloprolifération et enfin l'utilisation de cytoréducteurs chez les patients à haut risque thrombotique. L'hydroxyurée (Hydrea®) est le traitement cytoréducteur de première ligne dans la PV. Ce traitement est peu prescrit chez les patients jeunes à cause d'un risque de transformation leucémique. D'autres traitements sont également employés, tel que l'Interféron pegylé alfa-2a qui est utilisé chez les patientes jeunes en âge de procréer, ou en cas d'intolérance à l'Hydrea®. Le pipobroman (Vercyte®) peut également être utilisé en cas d'intolérance à l'Hydrea® chez les patients âgés.

Un inhibiteur oral de JAK1 et JAK2, le Ruxolitinib (JAKAVI®) est en étude phase 3 dans la PV. Même si nous manquons à l'heure actuelle d'études comparatives avec les autres thérapeutiques cytoréductives, le JAKAVI® ne semble pas être ce que l'Imatinib est à la LMC.

1.2.2.3 La Thrombocyémie essentielle

La Thrombocyémie Essentielle touche principalement la ligne mégacaryocytaire, et se traduit une augmentation des plaquettes de façon chronique. L'incidence de la TE est de 0,6 à 2,5/100 000 habitants par an. Il y a deux pics de fréquence, le premier chez les patients jeunes autour de 30 ans et le deuxième autour de 50-60 ans une nette prédominance féminine.

Le diagnostic est le plus souvent fortuit sur la découverte d'une thrombocytose à l'hémogramme. Des phénomènes thrombotiques et hémorragiques peuvent également être à l'origine de la découverte de la thrombocytose. On retrouve une splénomégalie dans 50% des cas ainsi qu'une hépatomégalie dans 15% des cas.

Une thrombocytose réactionnelle doit être écartée en premier lieu. La thrombocytose peut être réactionnelle à un syndrome inflammatoire, une carence martiale, elle peut être retrouvée dans les suites d'une splénectomie, d'un grand stress (accouchement prolongé, post-chirurgie, grands traumatisme), ou d'un cancer,... Les thrombocytoses dues à d'autres hémopathies doivent également être exclues. Le diagnostic de TE repose sur les quatre critères essentiels reportés dans le tableau 2.

Critères diagnostiques de la TE (OMS 2008)

1. Plaquettes >450G/L de façon prolongée
 2. Biopsie médullaire montrant une prolifération principalement de la lignée mégacaryocytaire, avec un nombre augmenté de mégacaryocytes de grande taille et matures. Absence d'augmentation significative des lignées érythroblastique et granulocytaire
 3. Absence de critères OMS pour une polyglobulie de Vaquez, myélofibrose primitive, leucémie myéloïde chronique BCR-ABL positive, un syndrome myélodysplasique ou une autre hémopathie myéloïde.
 4. Présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur clonal, ou en l'absence de JAK2 V617F, absence d'argument pour une thrombocytose réactionnelle (carence en fer, splénectomie, chirurgie, infection, inflammation, cancer, hémopathie lymphoïde).
-

Tableau 2: Critères diagnostiques de la TE

La biopsie ostéo-médullaire (BOM) retrouve une hyperplasie principalement de la lignée mégacaryocytaire avec des mégacaryocytes à noyau ramifié en bois de cerf.

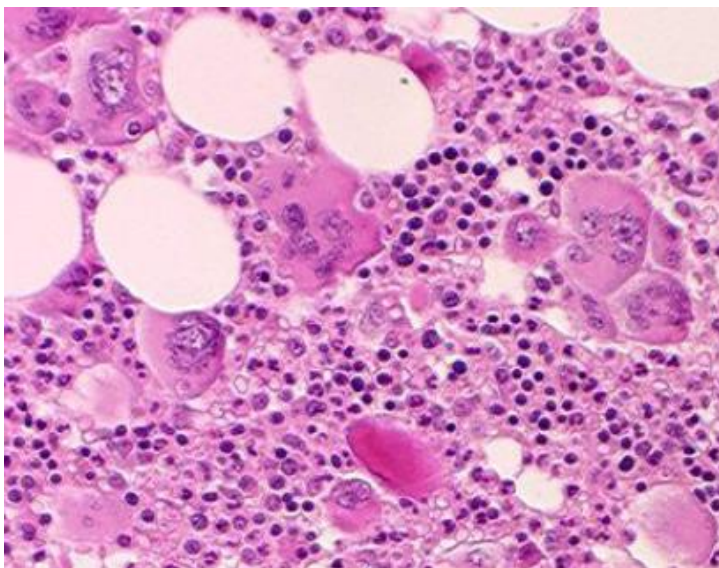


Figure 8: BOM d'une TE colorée à l'Hémalun-Eosine-Safran (HES)

Bien que le myélogramme ne soit pas dans ces quatre critères majeurs, il est bien souvent réalisé et il retrouve également une hyperplasie mégacaryocytaire avec de très grands mégacaryocytes à noyau multilobé, parfois regroupés en amas (figure 9).

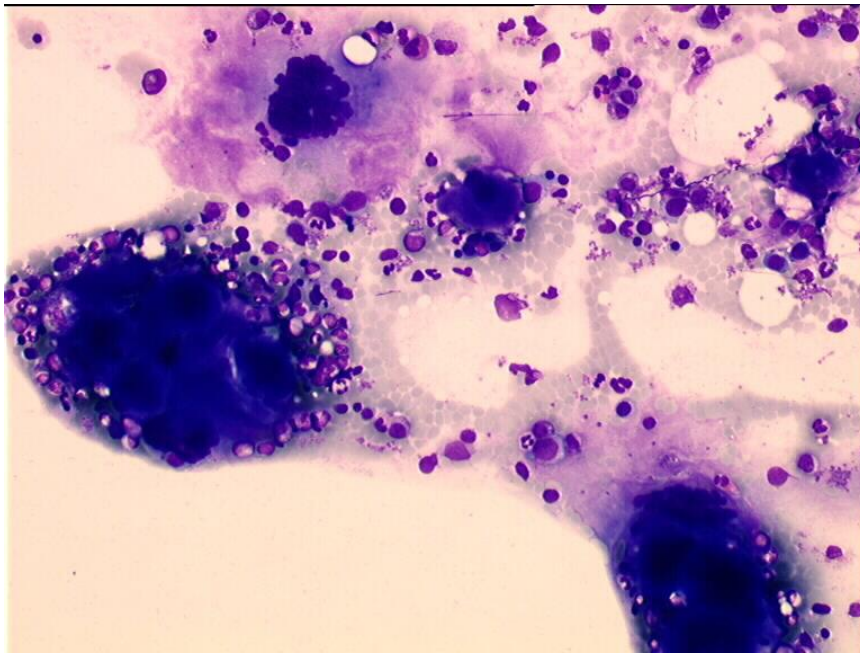


Figure 9: Myélogramme coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG) d'une TE

La mutation JAK2 V617F est retrouvée dans 60% des cas, les mutations de l'exon 9 de *CALR* dans 25% et la mutation de *MPL* dans 3 à 4% des cas.

La TE peut évoluer en PV chez 15% des patients et en myélofibrose ou leucémie aiguë secondaire chez <5% des patients.



Figure 10: Evolution de la TE

Au niveau thérapeutique, les anti-aggrégants plaquettaires préviennent des complications thrombotiques artérielles. Un traitement cytoréducteur doit être initié chez les patients à haut risque thrombotique (>60 ans ou avec antécédent vasculaire), ou dès que les plaquettes sont supérieures à 1000G/L.

L'hydroxyurée (Hydréa®) est le traitement de référence. Le Pipobroman (Vercyte®) peut également être utilisé. L'anagrélide ou Xagrid® a une AMM en traitement de seconde ligne, mais il présente des contre-indications cardiaques réduisant son utilisation. Enfin, l'interféron-alpha pegylé peut être utilisé chez les patients intolérants ou résistants à l'hydroxyurée.

1.2.2.4 La Myélofibrose Primitive

La myélofibrose primitive touche la lignée granuleuse et la lignée mégacaryocytaire, et est caractérisée par le développement d'une fibrose avec en parallèle une hématopoïèse extra-médullaire. La MFP est la forme la plus sévère des SMP classiques. C'est une affection rare, d'incidence de 0,5 à 1,5 pour 100 000 personnes/an, d'évolution chronique et insidieuse avec une mortalité élevée. La médiane d'âge au diagnostic de la MFP est de 60-70 ans, soit supérieure à la médiane d'âge des autres SMP classiques. Le diagnostic est posé devant un bilan pour asthénie, ou devant la découverte d'une splénomégalie ou plus rarement de façon fortuite. L'hémogramme est évocateur : il y a une hyperleucocytose avec myélémie, érythro-myélémie, et des dacryocytes. Ces anomalies peuvent être accompagnées d'une thrombocytose, et d'une anémie. La figure 11 illustre le frottis sanguin d'un patient atteint de MFP : on retrouve à gauche une myélémie et une érythro-myélémie, et à droite, une dysérythropoïèse avec une hématie en larme (dacryocyte), des ponctuations basophiles, un anneau de Cabot, et une anisocytose plaquettaire.

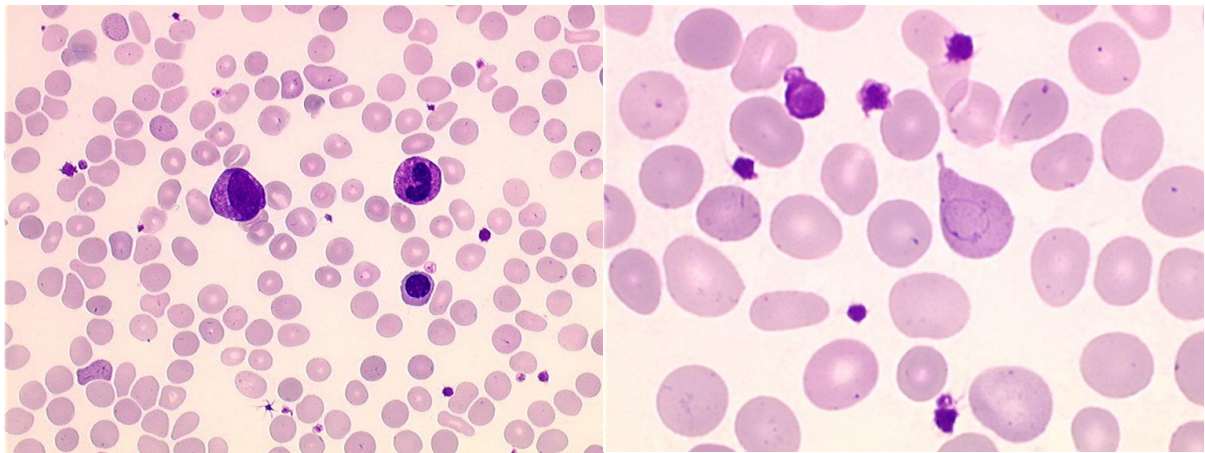


Figure 11: Frottis sanguin coloré au MGG d'un patient atteint de MFP

Les critères diagnostiques sont reportés dans le tableau 3.

Critères majeurs : les 3 sont requis

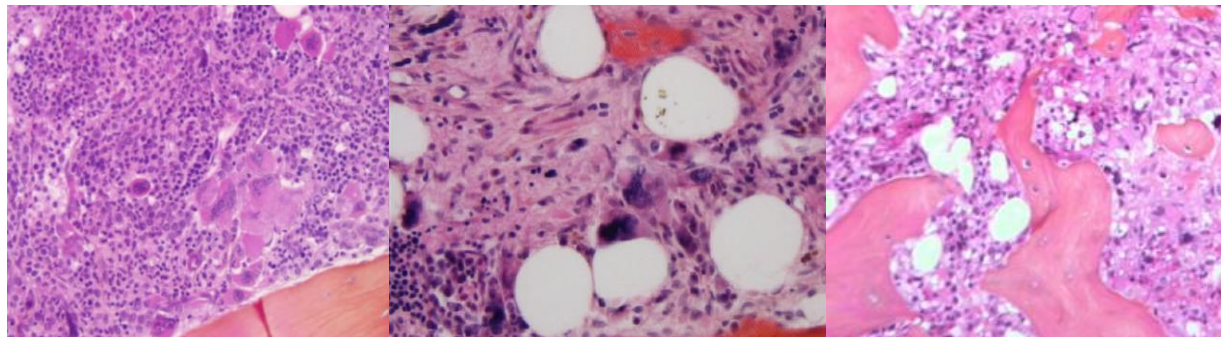
1. Prolifération et dystrophie MK, accompagnée de fibrose réticulinique et/ou collagène ou en l'absence de fibrose réticulinique significative, les anomalies MK doivent être accompagnées d'une augmentation de cellularité médullaire caractérisée par une prolifération granulocytaire et souvent une érythropoïèse diminuée (phase préfibrotique)
 2. Absence de critères OMS pour une PV, une LMC, un SMD, ou une autre hémopathie myéloïde
 3. Présence de JAK2 V617F ou autre anomalie clonale (MPL 515K/L) ou en l'absence de marqueur clonal, anomalies médullaires non liées à infection, maladie auto-immune, inflammation chronique, leucémie à tricholeucocytes, ou autre hémopathie lymphoïde, métastases, cause toxique
-

Critères mineurs: deux sont requis

1. Erythroblastes circulants
 2. LDH augmentés
 3. Anémie
 4. Splénomégalie
-

Tableau 3 : Critères diagnostiques de la MFP

La BOM est un élément clé du diagnostic : elle retrouve une fibrose médullaire dont le grade est évalué de 0 à 3 au laboratoire d'anatomopathologie (figure 12).



MF stade 0-1

MF stade 2-3

MF stade 3 avec
ostéosclérose

Figure 12: Coloration HES de BOM à différents grades de fibrose dans la MFP

La mutation JAK2 V617F est présente dans 50-60%, les mutations de l'exon 9 de *CALR* dans 35% des cas, et les mutations MPL W515 sont retrouvées chez 5% des patients. Le caryotype est anormal dans 30% des cas, sans anomalie cytogénétique pathognomonique.

La MFP évolue en trois étapes, une phase pré-fibrotique, une phase fibrotique, et phase terminale de leucémie aiguë.

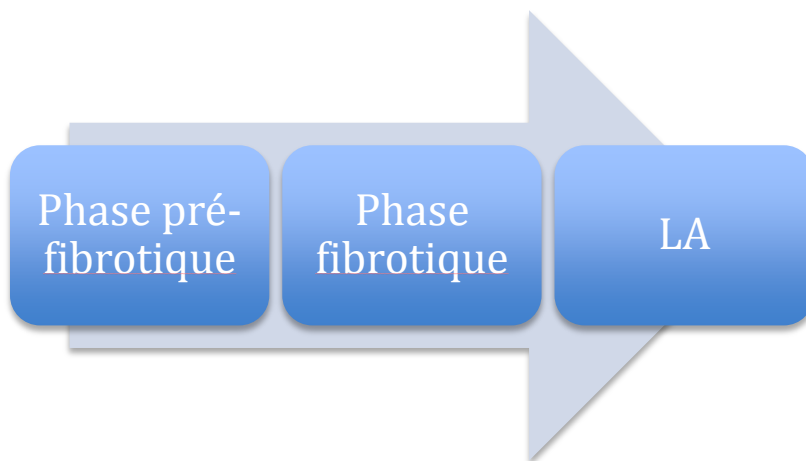


Figure 13: Evolution de la MFP

La MFP se présente initialement de manière proliférative et l'évolution se fait vers la pancytopenie et la dépendance transfusionnelle. Le risque principal est la transformation en leucémie aiguë (10 à 20% au cours de la première décade après le diagnostic). Les principales causes de décès sont les complications cardio-vasculaires (insuffisance cardiaque, embolie pulmonaire et AVC), les conséquences de l'insuffisance médullaire (anémie, infections, hémorragies), et la transformation en leucémie aiguë.

Les possibilités thérapeutiques se résument au traitement symptomatique de l'anémie (EPO, transfusions), et à l'utilisation d'un traitement cytoréducteurs lors de la phase proliférative de la maladie. L'interféron-alpha pegylé a montré son efficacité dans cette indication (23). Le Ruxolitinib (JAKAVI®) peut également être utilisé et l'allogreffe doit être discutée chez les patients jeunes.

1.3 Les anomalies moléculaires

L'avènement de la biologie moléculaire a révolutionné le diagnostic des SMP classiques. Certains SMP possèdent une anomalie génétique induisant une activation constitutive d'une protéine tyrosine kinase (TK) qui mime la signalisation intracellulaire déclenchée par les facteurs de croissance. Différentes anomalies moléculaires peuvent conduire à une dérégulation des tyrosines kinases; il peut s'agir de la formation d'une protéine chimérique à activité TK ou bien d'une mutation gain de fonction conférant à la protéine TK une activation constitutive (mutation ponctuelle, délétion, insertion)... Les mutations des tyrosines kinases ABL, JAK2, PDGFR α , PDGFR β , et c-kit sont impliquées respectivement dans la LMC, dans

les SMP classiques non LMC, dans les syndromes d'hyperéosinophilie, et dans la mastocytose. La LMC illustre parfaitement le lien de cause à effet entre l'anomalie d'une tyrosine kinase et le phénotype de la maladie. L'inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) spécifique de BCR-ABL, l'Imatinib (Glivec®), a fait régresser la maladie, et a prouvé que BCR-ABL est l'évènement oncogénique responsable de la maladie.

Nous verrons ici les anomalies moléculaires impliquées dans les SMP BCR-ABL négatif (PV, TE, et MFP). Nous pouvons les classer en trois groupes : les mutations affectant la signalisation cellulaire, les mutations jouant un rôle dans la régulation épigénétique et les mutations affectant l'épissage. Les mutations portant sur la signalisation cellulaire sont les mutations de *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *CBL* et *LNK*, et les mutations jouant un rôle dans la régulation épigénétique sont les mutations de *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH*, et *DNMT3A*. Les mutations affectant l'épissage sont *SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*. La figure présente les différentes fréquences des mutations dans les SMP classiques non BCR-ABL (24).

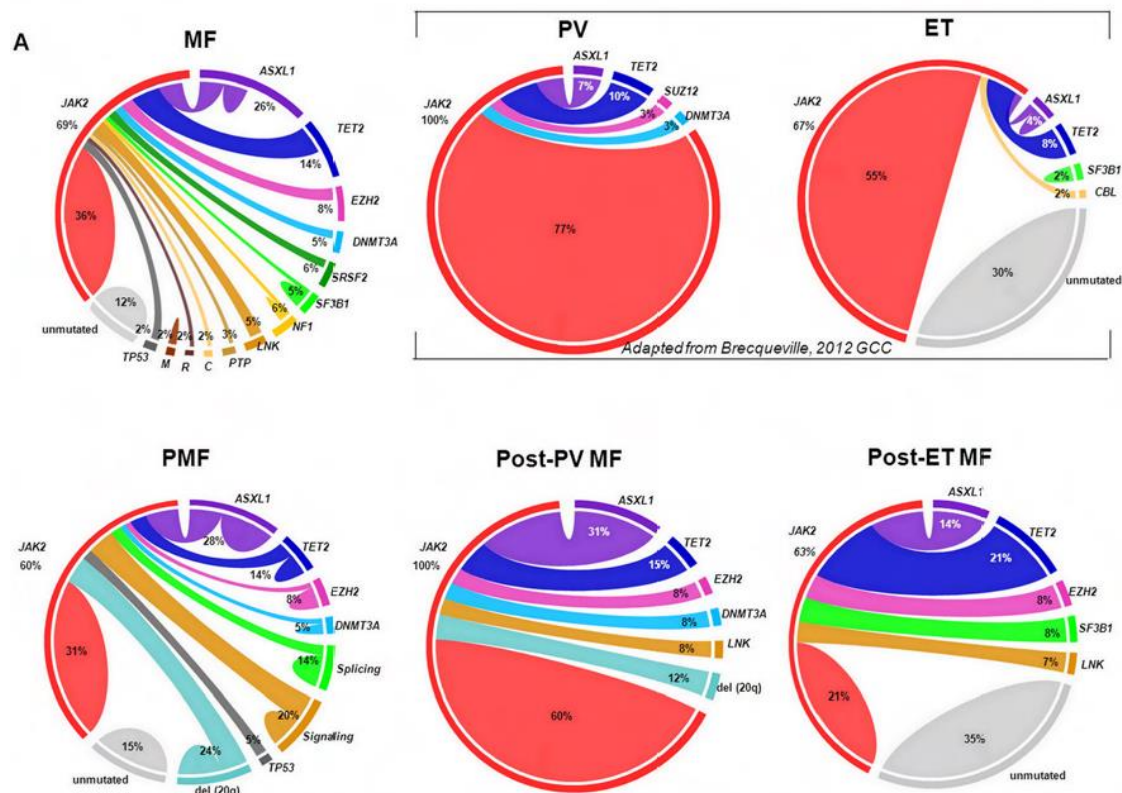


Figure 14 : Fréquence des mutations dans la MF, la PV, et la TE (24)

1.3.1 Mutations affectant la signalisation cellulaire

1.3.1.1 La mutation JAK2 V617F

1.3.1.1.1 Description

JAK2 V617F est une mutation unique, acquise et clonale du gène de la protéine à activité tyrosine kinase JAK2 (1–4). Elle résulte d’une mutation somatique de G en T en position 1849 concernant l’exon 14 et conduisant à la substitution d’une valine en phénylalanine en position 617. La mutation est située dans le domaine pseudo-kinase JH2 qui est impliqué dans la régulation négative du domaine JH1. C’est la mutation la plus fréquente des SMP BCR-ABL négatif. On peut également la retrouver dans des syndromes frontières myéloprolifératifs/ myélodysplasiques (SMP/SMD).

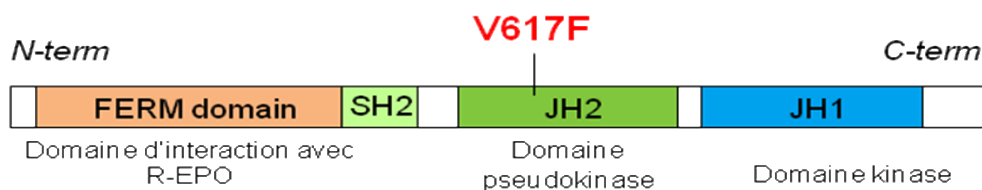


Figure 15: Localisation de la mutation JAK2 V617F

1.3.1.1.2 Effet de la mutation

La mutation JAK2 V617F prive la protéine kinase de son auto-inhibition. JAK2 s'affranchit de la présence du facteur de croissance et est alors phosphorylé de façon constitutive activant ensuite les voies de signalisation cellulaire illustrées dans la figure (JAK2-STAT5, ERK1/2 MAPK, PI3K/AKT) (1).

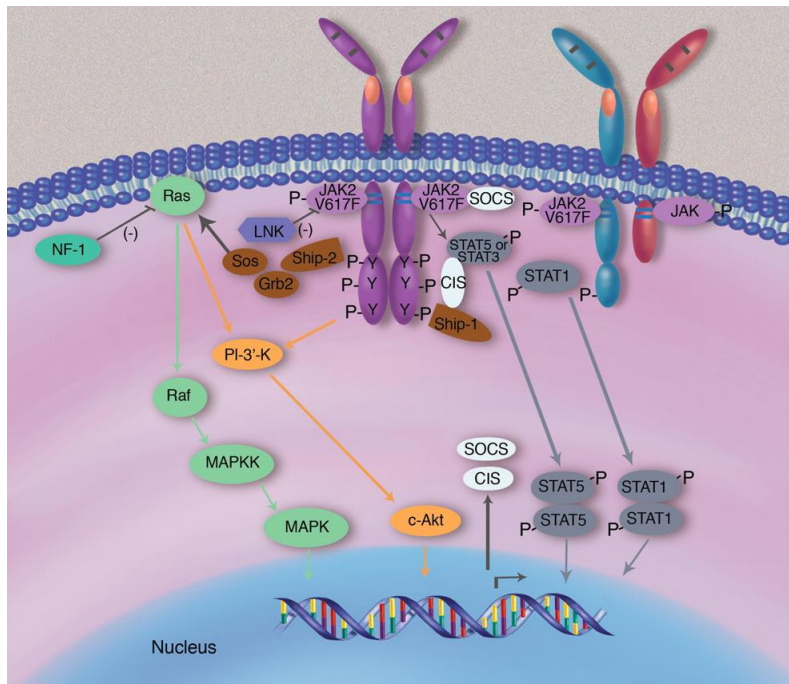


Figure 16: Signalisation cellulaire dérégulée en présence de la mutation JAK2 V617F (25)

1.3.1.1.3 Analyse fonctionnelle

La greffe médullaire de JAK2 V617F chez la souris induit un SMP en deux étapes : une phase polyglobulique, et une seconde phase de myélofibrose secondaire, rappelant l'évolution observée dans la PV humaine. Ces expériences démontrent le caractère oncogénique de JAK2 V617F.

1.3.1.1.4 Relation génotype-phénotype

Des interrogations restent cependant en suspens. En effet, même si la PV, la TE et la MFP partagent des caractéristiques communes, ce sont trois maladies bien distinctes, et il n'est pas simple de comprendre comment une mutation peut être responsable de trois phénotypes. On peut se demander si la mutation JAK2 V617F est l'événement initial des SMP ou bien l'événement secondaire. Si c'est l'événement primaire, le phénotype pourrait dépendre de la cellule hématopoïétique initiale mutée. Cette hypothèse a été rapidement réfutée car JAK2 V617F est retrouvée dans les CSH des trois SMP (26–28).

Plusieurs hypothèses ont ensuite été étudiées : la première suspecte une corrélation entre le phénotype et la proportion de l'allèle JAK2. On peut quantifier le % d'allèle muté, aussi appelé charge allélique ou « allèle burden » en calculant le ratio entre allèle muté et allèle sauvage. Un gradient d'activité kinase pourrait être à l'origine des différences de phénotype.

Des modèles murins vont dans ce sens et ont montré qu'un haut niveau d'expression de JAK2 V617F induit un SMP type PV, tandis qu'un bas niveau d'expression induit une TE (29,30). Le rôle du % de JAK2 muté est également apparu en étudiant des colonies érythroïdes. Les patients atteints de PV et de MFP ont presque toujours des clones homozygotes pour la mutation JAK2 V617F tandis que les patients atteints de TE ont le plus souvent des clones hétérozygotes. Les clones homozygotes proviennent d'une perte d'hétérozygotie (ou disomie uniparentale acquise) par recombinaison du bras court du chromosome 9 (31,32). Diverses études en cours essaient de déterminer l'impact de la charge allélique de JAK2 V617F sur le pronostic, afin de savoir notamment si la quantification de « l'allèle burden » est utile au suivi de la maladie.

La deuxième hypothèse suggère que JAK2 V617F est un événement secondaire et que cette mutation n'est pas suffisante en elle-même pour initier un SMP. Plusieurs arguments étayent cette hypothèse ; jusqu'à 50% des LA secondaires à des SMP JAK2 V617F sont JAK2 V617F négatifs (dont des patients sans traitements cytoréducteurs potentiellement mutagènes) et on retrouve dans des SMP familiaux, la coexistence de patients *JAK2* muté et de patients *JAK2* non muté (33).

La troisième hypothèse suppose que des facteurs génétiques additionnels contribuent à la diversité phénotypique du SMP. Un haplotype constitutionnel, l'haplotype 46/1 ou haplotype GGCC, associé fréquemment à la mutation de *JAK2* a été identifié. La forte liaison entre cet haplotype et la mutation de *JAK2* peut s'expliquer par deux hypothèses; soit l'haplotype 46/1 génère une instabilité génétique qui provoque une hypermutabilité, et un risque accru d'acquérir la mutation JAK2 V617F, soit la mutation JAK2 V617F se produit indépendamment de l'haplotype, et une interaction positive se produit entre l'haplotype et la mutation de *JAK2* qui fait de l'haplotype 46/1 un terrain propice (« fertile ground ») à l'acquisition d'un SMP (34–36). Le rôle de l'haplotype 46/1 n'est pas encore bien résolu et aucune corrélation avec la clinique n'a été démontrée (37).

Toutes ces hypothèses laissent encore aujourd'hui des zones d'ombre sur l'implication de cette mutation dans la PV, la TE et la MFP, et cela nécessite encore de plus amples investigations.

1.3.1.2 Mutations de JAK2 exon 12

Dans les 5% de PV JAK2 V617F négatifs, différentes mutations gain de fonction dans l'exon 12 de *JAK2* ont été retrouvées entre le domaine SH2 ET JH2 (38,39) et représentent 3% des PV. Ces mutations confèrent un gain de fonction à la protéine en modifiant la structure du domaine JH2 d'une façon très similaire à la mutation V617F. Cependant, contrairement à JAK2 V617F, les mutations de l'exon 12 ne sont pas associées à la TE, ni à la MFP, bien qu'il puisse y avoir une évolution en myélofibrose.

1.3.1.3 Mutations de *CALR*

Très récemment, l'analyse de l'exome entier a mis en évidence des mutations récurrentes au niveau de l'exon 9 du gène *CALR* dans des SMP JAK2 V617F négatif (11,12).

Ces mutations ont été retrouvées dans des TE, MFP, et dans quelques cas d'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose (ARSI-T). Les mutations de *CALR* n'ont pas été retrouvées dans la PV, ni dans d'autres hémopathies malignes, et de rares cas de doubles mutations *CALR*+/*JAK2*+ et *CALR*+/*MPL*+ ont été décrits (13). Cette découverte fait de *CALR* la deuxième mutation la plus fréquente après JAK2 V617F dans les SMP BCR-ABL négatif.

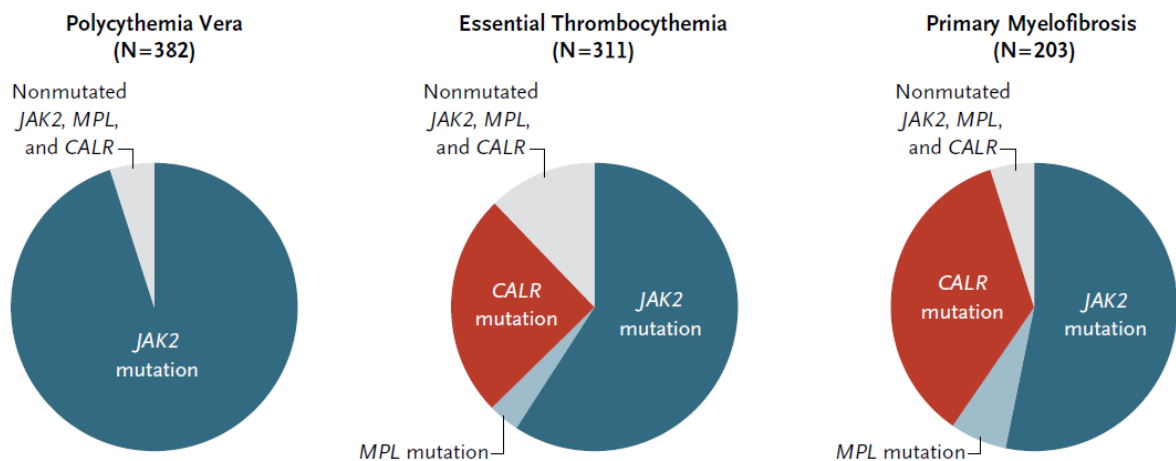


Figure 17 : Fréquence des mutations JAKV617F, MPL, et CALR dans la PV, la TE et la MFP (11)

Le gène *CALR* est localisé sur le chromosome 19 et il code pour la calréticuline. 36 types de mutations (délétions ou insertions) ont été identifiés conduisant à un décalage du cadre de lecture. Les mutations les plus fréquemment retrouvées sont la mutation de type 1 (délétion de

52 pb), et la mutation de type 2 (insertion de 5 pb). Les autres mutations ont été observées à de bien plus faibles fréquences, et beaucoup ont été détectées chez un patient seulement (11).

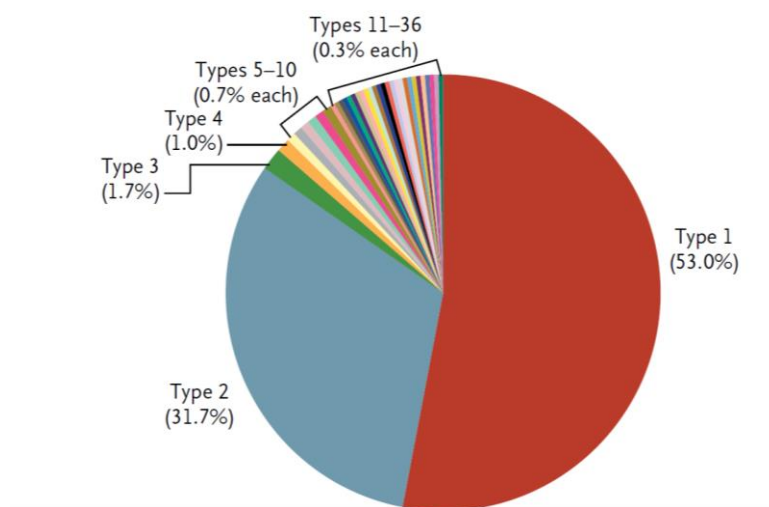


Figure 18 : Fréquence des 36 types de mutations de CALR (11)

Le décalage du cadre de lecture change l'extrémité C-terminale de la calréticuline qui devient riche en acides aminés chargés positivement contrairement à la protéine non mutée, chargée négativement. Cette différence de charge pourrait affecter la capacité de cette protéine à lier le calcium et altérer ses fonctions cellulaires. Les quatre derniers acides aminés de la calréticuline non mutée (motif KDEL) contiennent le signal de rétention du réticulum endoplasmique et sont absents de la protéine mutante. En conséquence, celle-ci pourrait avoir une localisation intracellulaire modifiée. L'analyse fonctionnelle a démontré l'indépendance et l'hypersensibilité du mutant de type 1 à l'IL3, l'activation de voie JAK/STAT5 en l'absence d'IL3, ainsi que sa sensibilité aux inhibiteurs de JAK2 (11).

La calréticuline est une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique (RE) qui a de multiples fonctions au sein et en dehors du RE (40,41). La calréticuline possède trois domaines : le domaine N-terminal hautement conservé, le domaine P et le domaine C-terminal. Comme illustré en figure 19, au sein du RE, la calréticuline a une activité de protéine chaperonne et a un rôle dans l'homéostasie calcique (40). En dehors du RE, la présence de la calréticuline dans la matrice extracellulaire est impliquée dans la réparation tissulaire (42). La calréticuline cytoplasmique pourrait avoir un impact sur l'adhésion cellulaire, la traduction, l'expression de gènes et l'export nucléaire (41,43). L'exposition à la surface de la cellule de la calréticuline joue un rôle dans l'apoptose, et est une piste

importante dans la recherche sur le cancer qui ouvre la voie à de nouvelles thérapies ciblées (41).

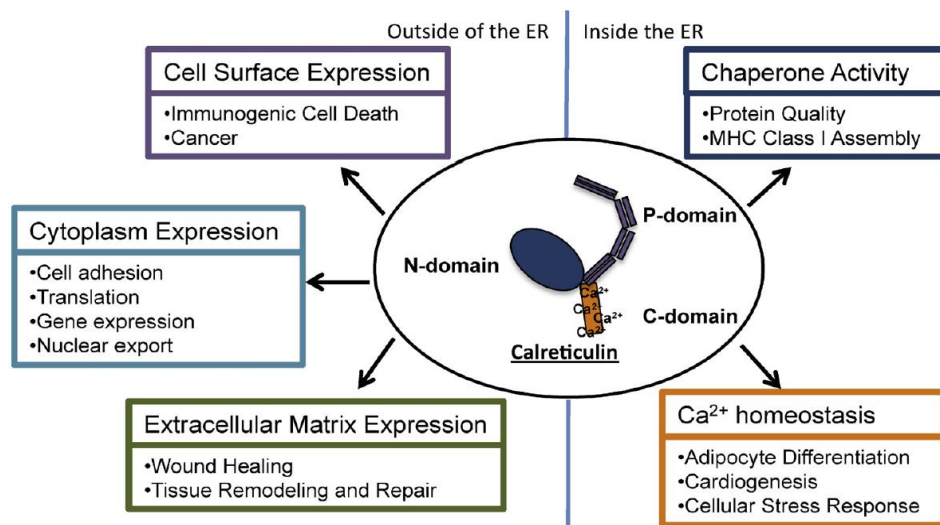


Figure 19: Rôle de la calréticuline (44)

Les patients *CALR* muté semblent avoir un phénotype moins agressif que les patients *JAK2* V617F; ils ont un risque de thrombose plus faible, un taux d'hémoglobine et de leucocytes plus bas, des plaquettes plus élevées, et une survie plus longue. La physiopathologie de ces mutations est encore mal connue et nécessite de plus grandes investigations.

1.3.1.4 Les mutations CBL, LNK

CBL et *LNK* sont des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse. Des mutations dans ces deux gènes ont été décrites dans les SMP et hémopathies myéloïdes.

La protéine C-CBL est une ubiquitine-ligase qui régule négativement la transduction du signal des tyrosines kinases activées en bloquant de façon compétitive le signal et en induisant la dégradation par le protéasome des récepteurs de TK ubiquitinilés. Les mutations de *CBL* sont le plus souvent des mutations faux-sens, homozygotes à cause d'une disomie uniparentale acquise qui conduisent à une perte de la fonction normale de la protéine induisant une sensibilité excessive aux facteurs de croissance (45). Pour ces raisons, *CBL* est considéré comme un gène suppresseur de tumeur. Les mutations de *CBL* sont retrouvées dans environ 17% des LMMC, et un peu moins de 10% des MFP. Elles sont également présentes dans les leucémies aigües myéloïdes (LAM) secondaires à des SMP. C-CBL semble plutôt être

impliquée dans la progression de la maladie en myélofibrose ou en leucémie aiguë que dans la phase chronique (46).

La protéine LNK est une protéine adaptatrice qui joue un rôle important dans l'hématopoïèse en régulant négativement l'activation de la protéine JAK2 et en inhibant ainsi le signal des récepteurs à l'EPO et à la TPO. Les mutations de *LNK* entraînent ainsi une perte de fonction et provoquent une augmentation du signal TPO/MPL. *LNK* est aussi capable d'atténuer le signal induit par JAK2 V617F ou MPL W515. La perte de *LNK* accélère le développement du SMP induit par JAK2 V617F dans un modèle murin (46). La fréquence des mutations de *LNK* est faible dans les SMP (47). Ces mutations ne sont pas retrouvées en phase chronique, mais dans la phase de transformation leucémique. Cela semble être des événements tardifs dans la progression de la maladie (47,48).

1.3.2 Mutations impliquant la régulation épigénétique

Un second groupe de mutation a été identifié. Ces mutations entraînent une perte d'activité catalytique de protéines impliquées dans la régulation épigénétique, ce qui conduit à une modification de l'expression de certains gènes. Il s'agit des protéines TET2, ASXL1, EZH2, IDH, et DNMT3A. Ces mutations peuvent survenir en association avec JAK2 V617F ou MPL W515. Contrairement aux mutations déjà décrites, TET2, ASXL1, EZH2 sont retrouvées dans un large spectre de pathologies myéloïdes incluant les SMD, les SMP/SMD, et les leucémies aiguës (LA). Les mutations des gènes IDH1, IDH2, et DNMT3A ont été décrites dans les transformations leucémiques ou des LA d'emblée. Ce sont des mutations « perte de fonction » qui contribuent à la pathogenèse des SMP et d'autres hémopathies myéloïdes. Des questions restent en suspens sur la hiérarchie de ces mutations dans la pathogenèse des hémopathies myéloïdes, leur rôle potentiel comme cible thérapeutique, leur impact sur le phénotype et leur pronostic sur l'évolution (25,49). Au sein des SMP classiques, la MF apparaît comme un groupe moléculaire plus complexe que dans la TE ou la PV (24).

1.3.3 Mutations de MPL

Après la découverte de JAK2 en 2005, presque 50% des TE et MFP restaient sans diagnostic moléculaire. D'autres marqueurs moléculaires en lien avec la signalisation cellulaire ont été étudiés, tels que des récepteurs de cytokines, les autres membres de la famille *JAK* ou de la famille *STAT*, et n'ont pas retrouvé de mutations. En 2006, les récepteurs à l'*EPO*, au *G-CSF*, et *MPL* ont été séquencés chez des patients avec MFP: aucune mutation de l'*EPO-R* ni du *G-CSF-R* n'a été retrouvée (5), mais une mutation du gène *MPL* est décrite pour la première fois au niveau de l'exon 10 du gène.

1.3.3.1 Description

MPL est situé sur le chromosome 1 au locus 1p34.2. Plusieurs mutations ont été retrouvées au niveau de l'exon 10 de ce gène. La première mutation décrite est la mutation *MPL* W515L ; il s'agit d'une substitution nucléotidique au nucléotide 1544 (guanine en thymidine) qui induit un changement d'acide aminé (TGG en TTG c'est-à-dire tryptophane en leucine) au codon 515 (5) . La deuxième mutation en terme de fréquence est la mutation *MPL* W515K, qui est due à une double substitution nucléotidique (TGG en AAG c'est-à-dire tryptophane en lysine) au niveau du codon 515, et change le tryptophane en une lysine (6).

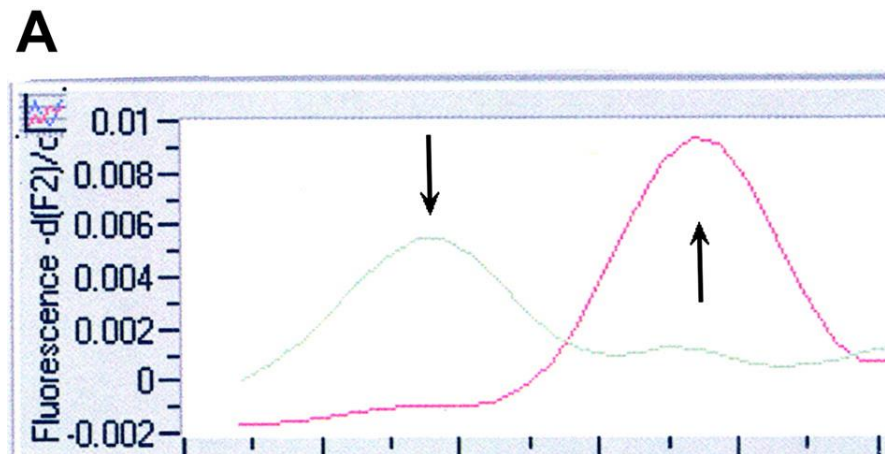


Figure 20: Chromatogramme illustrant les séquences des allèles *MPL* sauvage (i), *MPL* W515L (ii), et *MPL* W515K (iii)

Il existe d'autres mutations, plus rares, sur le même codon: W515A, W515R et W515S. Une mutation sur le même exon a été décrite, la mutation S505N d'abord dans des TE familiales (9), puis plus récemment dans TE acquises (26). Aucune mutation n'a encore été décrite en dehors de l'exon 10 (6,50–53).

1.3.3.2 Epidémiologie des mutations

Une étude sur une cohorte de 1181 patients atteints d'hémopathies myéloïdes a permis de découvrir que les mutations du gène *MPL* sont exclusivement retrouvées dans les SMP de type TE, MFP, MF ou LA secondaire à une TE, et qu'il pouvait y avoir des patients doubles mutés *MPL*+/JAK2+(6). La mutation a également déjà été identifiée dans l'ARSI-T, un syndrome frontière SMP/SMD (54). Le tableau 4 reporte la prévalence des mutations de *MPL* dans la Thrombocythémie Essentielle, la Myélofibrose Primitive, et la Myélofibrose secondaire, ainsi que dans la TE, la MFP, et la MF secondaire *JAK2*-.

	Pikman 2006	Pardanani 2006	Beer 2008 Cohorte rétrospective	Beer 2008 Cohorte PT-1	Schnittger 2009	Rumi 2013
TE		1,2%	3,4%	4,1%		4%
MFP		4,5%	5%			5%
MF secondaire						16%
TE <i>JAK2</i> -		2,9%	7,3%	8,5%	5,9%	9,9%
MFP <i>JAK2</i> -	9%	9,4%	9,5%		9,6%	13,7%
MF secondaire <i>JAK2</i> -						29,1%

Tableau 4 : Prévalence de la mutation du gène *MPL* selon le phénotype

1.3.3.3 Effet des mutations

W515 est un acide aminé clé localisé dans un motif α -hélicoïdal bipolaire unique constitué de cinq acides aminés : RWQFP, qui prévient de l'activation spontanée du récepteur. Ce motif est situé dans le domaine juxta-membranaire du récepteur *MPL*.

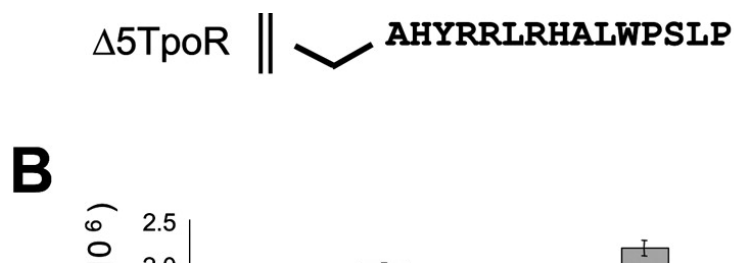


Figure 21 : Localisation du motif RWQFP au sein du récepteur *MPL* (55)

Les mutations de *MPL* au sein de ce motif provoquent une modification de la conformation spatiale du récepteur et induisent une homodimérisation, puis une autophosphorylation, et une

activation des voies JAK2, Tyk2, STAT5, (MAP) kinase. Par ailleurs, le domaine transmembranaire est également crucial dans la structure du récepteur et des mutations peuvent faciliter l'homodimérisation du récepteur et son activation.

1.3.3.4 Analyse fonctionnelle des mutations de MPL

Les mutations de *MPL* ont lieu au niveau d'un progéniteur commun lymphoïde/myéloïde (6,26). Ce sont des mutations gain de fonction qui ont un rôle dans la prolifération cellulaire en provoquant le passage en phase S du cycle cellulaire (50).

MPL W515L induit une indépendance des lignées cellulaires 32D, UT7, et Ba/F3 aux cytokines (5,50) et il y a une activation constitutive des voies de signalisation JAK/STAT incluant JAK2, STAT3, et STAT5, et des voies RAS/MAPK, et PI3K/AKT. Une molécule inhibitrice de JAK2 provoque l'inhibition de la voie JAK/STAT, et de la prolifération cellulaire induite par MPL W515L (5,50). L'étude d'un modèle murin permet d'associer avec certitude la mutation MPL W515L au SMP. Cela induit un syndrome myéloprolifératif létal, avec une thrombocytose marquée, une leucocytose, des érythroblastes sanguins, et une fibrose réticulinique médullaire. On retrouve également une hépatomégalie et une splénomégalie. Le foie et la rate ont perdu leur architecture normale et sont le lieu d'une hématopoïèse extra-médullaire avec des mégacaryocytes atypiques.

1.3.3.5 Impact clinico-biologique des mutations

Diverses études ont ensuite comparé les caractéristiques des patients *MPL* muté aux patients JAK2 V617F. Il semble que les patients porteurs d'une mutation MPL W515 sont plus âgés au diagnostic, il n'y a pas de différence clinique sur la splénomégalie, ni sur les événements thrombo-hémorragiques. Au niveau biologique, les patients MPL W515 possèdent des plaquettes plus élevés, un taux d'hémoglobine plus bas associé à une dépendance transfusionnelle plus importante (56), un taux d'EPO plus élevé, une pousse endogène mégacaryocytaire et non érythroïde, pas de différence significative sur le caryotype et au niveau de la BOM, une prolifération isolée de la lignée mégacaryocytaire (52).

La survie a été comparée pour les trois mutations (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) dans la TE et la MFP (figure 22). Il semble qu'il n'y ait pas de différence significative pour les patients porteurs de mutations de *JAK2* ou *MPL* dans ces deux SMP. Les patients *CALR*⁺ ont une meilleure survie

globale à 10 ans dans la TE par rapport aux patients *JAK2*⁺ ($p=0,04$), et une meilleure survie globale dans la MFP que les patients *JAK2*⁺ et *MPL*⁺ ($p>0,001$) (11).

1.3.3.6 Relation génotype-phénotype

La présence de la mutation *MPL* dans différents SMP suscite les mêmes interrogations que pour *JAK2* V617F.

Il semble qu'il y ait également une corrélation le pourcentage d'allèle *MPL* muté et le phénotype. Les MFP sont associés à un % de *MPL* W515 plus élevé que les TE (37,52,54,56,57). Certains ont également établi un lien entre le % d'allèle *burden* et la nature de la mutation de *MPL* ; en effet, l'allèle *MPL* W515K semble avoir un % d'allèle *burden* plus élevé que l'allèle *MPL* W515L. Une perte d'hétérozygotie au niveau du bras court du chromosome 1 est responsable du caractère homozygote des clones de *MPL* retrouvés dans la Myélofibrose Primitive (32,57,58) et est significativement liée à la fibrose médullaire (57).

La découverte de l'haplotype 46/1 préférentiellement retrouvé chez les patients porteurs de la mutation *JAK2* V617F a conduit à étudier l'ensemble de la population atteint de SMP. Il semblerait que l'haplotype 46/1 soit également significativement associé à la mutation de *MPL* (35). L'haplotype 46/1 et la mutation de *MPL* étant situés sur deux chromosomes différents, l'hypothèse d'un terrain propice à l'acquisition d'un SMP (« fertile ground ») généré par l'haplotype semble la plus probable. Cependant, la liaison entre cet haplotype et la mutation de *MPL* est encore débattue et nécessite encore d'être élucidée (59,60). Aucun haplotype n'a par ailleurs été retrouvé sur le chromosome 1 associé à la mutation de *MPL* (37).

2 Objectif du travail de thèse

La thèse est une étude rétrospective multicentrique qui s'intéresse aux 326 recherches de mutations de *MPL* effectuées au laboratoire d'hématologie du CHU de Brest du 27/02/2009 au 11/09/2013. Le but de cette étude était de colliger les données clinico-biologiques des 326 patients dans les différents centres, et de décrire l'ensemble de la cohorte ayant bénéficié d'une recherche de mutations de *MPL*. Nous voulions comparer les caractéristiques clinico-biologiques des patients *MPL* W515 à celles des patients *JAK2+* et *CALR+*, et mettre au point la quantification de l'allèle *MPL* W515L/K afin d'évaluer si la charge allélique est corrélée au phénotype.

3 Patients, matériels et méthodes

3.1 Patients

326 patients ont eu une recherche de mutations *MPL* W515L/K au laboratoire d'hématologie du CHU de Brest entre février 2009 et septembre 2013. La description de la cohorte sera plus approfondie dans les résultats. Un consentement génétique a été recueilli pour l'ensemble des patients (annexe 1). La demande de recherche de mutation *MPL* W515 est accompagnée d'une fiche de renseignements clinico-biologiques (annexe 2). Nous sommes allés dans les différents centres de l'Ouest et nous avons colligé des informations complémentaires dont le détail est reporté en annexe 3. Le diagnostic a été établi selon les critères diagnostiques établis par la WHO en 2008 (10).

3.2 Matériels

3.2.1 Prélèvements

La recherche moléculaire de mutations *MPL* W515 a été effectuée sur des prélèvements de sang (environ 20 mL requis) ou de moelle osseuse prélevés sur tubes EDTA ou bien directement sur de l'ADN préalablement extrait dans un autre centre hospitalier.

3.2.2 Séparation cellulaire

3.2.2.1 Sang total sur EDTA

La première étape consiste à réaliser une numération de formule sanguine sur automate XE 2100 du sang total prélevé sur EDTA. Une séparation cellulaire est ensuite effectuée en diluant volume à volume le sang dans une solution de Dextran 2% filtré (Sigma®). Après 45 minutes de sédimentation, les leucocytes sont prélevés dans le surnageant. Une numération leucocytaire est réalisée sur cette suspension afin de déterminer le pourcentage de polynucléaires. Si ce pourcentage est supérieur à 75%, des culots de 10 millions de cellules sont directement réalisés (culots secs et en trizol) puis conservés à -80°C. Dans les autres cas, il faut séparer les polynucléaires des autres leucocytes à l'aide d'un milieu de séparation des lymphocytes (MSL) (Ficoll®, Eurobio). On dépose alors délicatement du milieu de séparation sur la suspension cellulaire puis après 30 min de centrifugation, on obtient différentes couches de sédimentation représentées en figure 22.

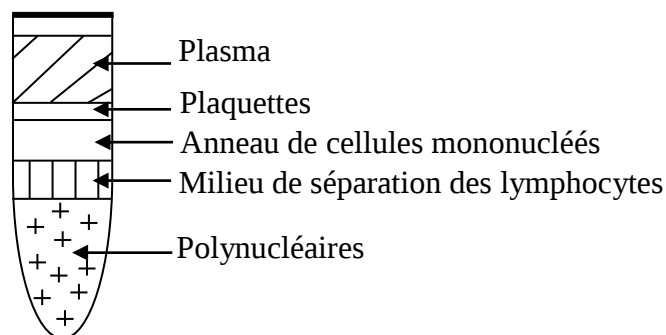


Figure 22: Séparation des cellules mononucléées du sang

Une fois la couche comportant les polynucléaires récupérée, celle-ci subit plusieurs lavages à la suite desquels on effectue de nouveau une numération cellulaire nous permettant de réaliser des culots de concentration cellulaire déterminée. Ces culots sont ensuite conservés à -80°C ou directement extraits.

3.2.2.2 Moelle osseuse sur EDTA

Les cellules mononucléées de la moelle osseuse sont séparées à l'aide d'un Ficoll. Le prélèvement est d'abord dilué au 1/2 dans une solution NaCl 0,9% puis la séparation cellulaire a lieu comme écrit précédemment.

3.2.3 Extraction et dosage de l'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée à partir des culots de polynucléaires grâce au kit « Flexigene DNA® kit » de Qiagen. Le culot de polynucléaires est remis en suspension et lysé par 1,8 mL de tampon FG1. Les échantillons sont ensuite mis en incubation avec 1,8 mL de tampon de dénaturation FG2 dilué et 18 µL de protéase Qiagen pendant 10 minutes à 65°C. L'ADN est précipité par l'addition de 3,6 mL d'isopropanol à 100% et une « méduse » d'ADN apparaît après retournement du tube. Après plusieurs centrifugations et un lavage à l'éthanol 70%, le culot est mis en suspension dans 400 µL de tampon de dissolution FG3 (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Le culot est alors mis en incubation à 65°C pendant 1 à 2 heures jusqu'à dissolution complète de l'ADN puis transvasé dans un tube Eppendorf™ et conservé à 4°C. Après quelques jours, l'ADN sera dosé par mesure de l'absorbance à 260 nm grâce au spectrophotomètre Nanodrop®. L'ADN sera ensuite dilué à 5 ng/µL afin de réaliser la PCR semi-quantitative.

3.3 Méthodes

3.3.1 Détection des mutations MPL W515L/K

Les deux mutations les plus fréquentes du gène *MPL* sont les mutations W515L et W515K, et ce sont celles recherchées en routine au laboratoire. La recherche de ces mutations a été mise au point grâce au kit Ipsogen® MPL W515L/K MutaScreen, Qiagen. Cette PCR est réalisée en double, pour la recherche de chacune des deux mutations (W515L et W515K). Il s'agit d'une PCR semi-quantitative avec chimie de type Taqman® basée sur une technique de discrimination allélique.

Cette technique fait appel à deux sondes fluorescentes différentes dont l'une est complémentaire de l'allèle sauvage (signal fluorescent VIC) et l'autre de l'allèle muté (signal fluorescent FAM). Chaque sonde Taqman® possède un reporteur situé à son extrémité 5' (fluorophore VIC ou FAM) et un quencher, situé à l'extrémité 3' (chélateur de fluorescence) (annexe 4a). Pendant l'étape d'extension de la PCR, la Taq polymérase dégrade la sonde parfaitement hybridée à la séquence cible. Le clivage de la sonde permet de séparer le fluorophore du quencher et libère ainsi une fluorescence qui sera mesurée à chaque cycle de PCR. Le type de signal fluorescent (VIC ou FAM) lu en fin de PCR est spécifique de la séquence présente dans l'échantillon. Le ratio des deux types de fluorescence FAM/VIC (muté/sauvage) permet de mettre en évidence les mutations MPL W515L/K. Comme le

montre la figure 23, les graphiques présentent la fluorescence de l'allèle muté (FAM) en fonction de la fluorescence de l'allèle sauvage (VIC). Le contrôle 100% muté émet de la fluorescence uniquement avec la sonde mutée et se situe en haut à gauche. Au contraire, les patients MPL non muté émettent de la fluorescence uniquement avec la sonde sauvage et se situent en bas à droite. Les patients MPL muté se situent entre le contrôle négatif et le contrôle positif. L'eau ne présente pas de fluorescence et se situe en bas à gauche. Le seuil de positivité correspond à de l'ADN MPL W515L/K à 1,5%, il est représenté en bas à droite du graphique et est indiqué par la flèche.

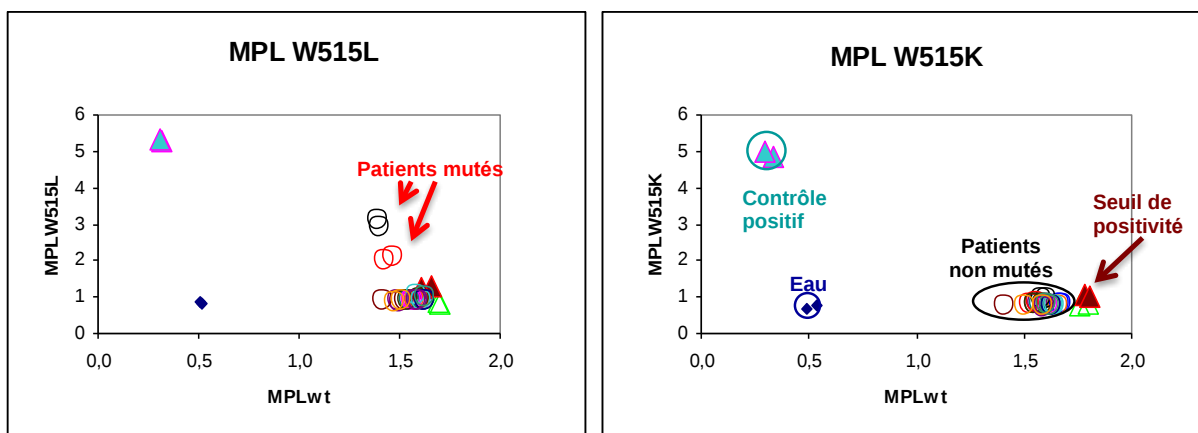


Figure 23: Résultat d'une PCR semi-quantitative avec deux patients MPL W515L

Il est possible d'avoir des cas douteux, où il n'y a pas de fluorescence avec les sondes MPL W515L/K et où la fluorescence est diminuée avec la sonde *MPL* sauvage. Les patients se situent dans ce cas en bas du graphique, et sont décalés à gauche des patients mutés. L'ADN doit alors être envoyé à séquencer pour chercher une autre mutation de *MPL*. La figure 24 illustre un exemple de profil douteux avec la PCR-semi-quantitative. L'ADN du patient a été envoyé à séquencer à l'hôpital Henri Mondor à Créteil et le séquençage a retrouvé une mutation de *MPL* complexe (del515:517 + ins(517:AAA) + mut518 C:A).

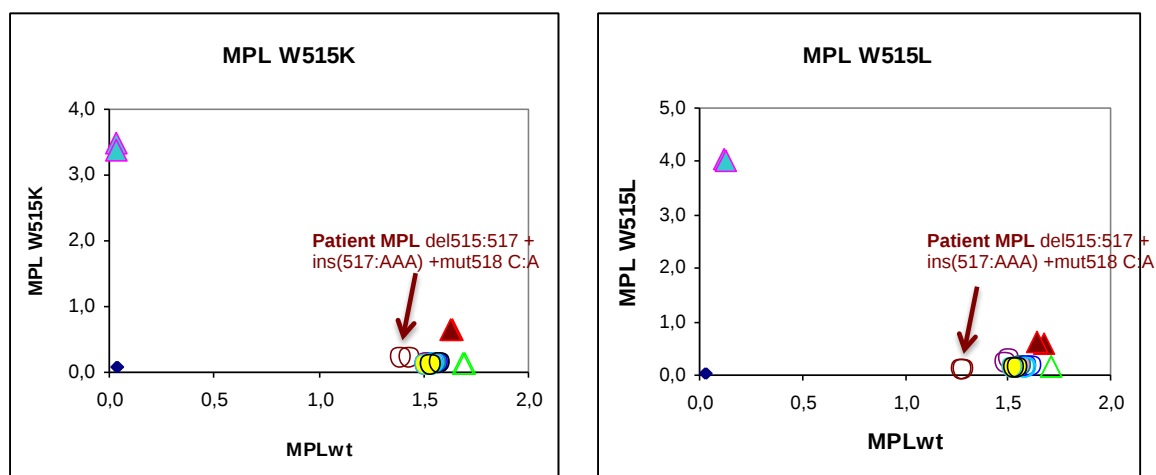


Figure 24 : Résultat d'une PCR semi-quantitative avec un patient au profil douteux

La technique semi-quantitative ne donne qu'une idée approximative du pourcentage d'allèle muté (>50% ou <50%), c'est pourquoi une technique de PCR quantitative est nécessaire pour la quantification.

3.3.2 Quantification des mutations MPL W515L/K

3.3.2.1 Principe

Nous avons mis au point une PCR quantitative en temps réel avec chimie de type Taqman® grâce à une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'ADN de plasmides MPL W515L, MPL W515K, et *MPL* sauvage. Deux mix sont nécessaires pour la quantification de chaque mutation W515L et W515K de MPL ; un mix avec la sonde sauvage, dont la fluorescence FAM émise est proportionnelle au nombre de copies d'allèle sauvage, et un mix avec la sonde muté (W515L ou W515K) dont la fluorescence FAM est proportionnelle au nombre de copies d'allèle muté. Le nombre de cycles nécessaire à la détection du seuil de fluorescence, appelé Ct (Cycle threshold), est proportionnel au nombre de copies grâce à une loi logarithmique : $y = a \log(x) + b$. Les droites d'étalonnage réalisées à partir de plasmides MPL wt, MPL W515L et MPL W515K permettent donc de déduire d'un Ct d'un échantillon, un nombre de copies. Le ratio (copies *MPL* muté/copies *MPL* total) donne le % d'allèle muté.

3.3.2.2 Mise au point

3.3.2.2.1 Essais préliminaires

Nous avons initialement utilisé le design des amorces et sondes (FAM-TAMRA) choisies par Pancrazzi en 2008 (61).

PCR en temps réel/ Amorces et sondes	Séquences
Amorce MPL sens	5'-agcctggatctccttggtgac-3'
Amorce MPL antisens	5'-accgccagtctcctgcct-3'
Sonde MPL W515wt	5'-CTG-CTG-AGG-TGG-CAG-TTT-C-3'
Sonde MPL W515L	5'-CTG-CTG-AGG-TTG-CAG-TTT-C-3'
Sonde MPL W515K	5'-TGC-TGC-TGA-GGA-AGC-AGT-TTC-C-3'

Tableau 5: Séquences des amorces et sondes utilisées par Pancrazzi pour la PCR quantitative (61)

Avant de commencer la PCR quantitative, nous avons voulu vérifier en PCR classique avec migration électrophorétique sur gel que les amorces amplifiaient bien un fragment unique et de poids moléculaire correct. Nous avons choisi une température de 95° pendant 10 min, puis 45 cycles comprenant 15s à 95° et 1 min à 60°. A l'issue de la migration du gel d'électrophorèse, aucune bande n'était détectable, même après ajustement des concentrations des amorces, et modifications de la température d'élongation. Le % de GC étant élevé, différentes concentrations de DMSO ont été ajoutées et du DMSO 5% a permis de visualiser sur le gel de faibles traces au poids moléculaire attendu. Néanmoins, ce n'était pas satisfaisant, et de nouvelles amorces ont été choisies à l'aide du site internet (<http://primer3.ut.ee>).

PCR en temps réel/ Amorces	Séquences
Amorce MPL sens	5'-ccgaagtctgaccttttg-3'
Amorce MPL antisens	5'-gcattcttggttcgctctgt-3'

Tableau 6: Séquences des nouvelles sondes choisies sur Primer3

Les résultats avec les nouvelles amorces n'étaient guère plus concluants. Nous avons alors relu le protocole sur les PCR utilisant un Master Mix Taqman® (62) et nous avons découvert que l'étape initiale d'activation de l'enzyme Uracile N-Glycosylase (UNG) était indispensable. L'UNG est une enzyme permettant d'éliminer toute possibilité de contamination extérieure. Elle procède à un véritable nettoyage-décontamination en amont de

l'amplification en détruisant les produits d'amplification des PCR antérieures comprenant de l'uracile. L'étape suivante à 95°C pendant 10 min inactive cette dernière pour le reste de la PCR. Nous avons donc introduit cette étape initiale à 50°C pendant 2 minutes, et nous avons observé les fragments à un poids moléculaire correct (200 Da) sur le gel d'électrophorèse.

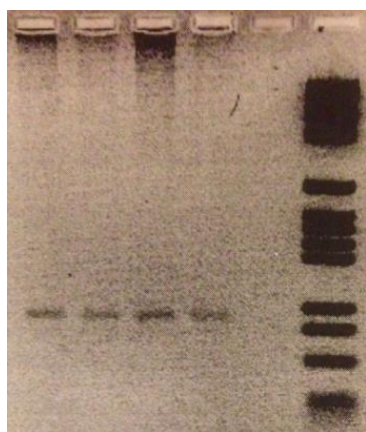


Figure 25: Gel d'électrophorèse révélant les fragments de MPL amplifiés

3.3.2.2 Gamme d'étalonnage

La quantification du pourcentage d'allèles MPL W515L et MPL W515K nécessite trois gammes d'étalonnage réalisées à l'aide de trois plasmides différents (MPL wt, MPL W515L et MPL W515K). Les plasmides ont été construits à l'hôpital Mondor (Créteil) et obtenus grâce au kit de clonage Topo2 Cloning ; l'insert de MPL ainsi que les amorces utilisées sont indiquées dans l'annexe 5. Nous avons reçu trois solutions de plasmides 100% muté et nous avons calculé le nombre de copies correspondant à la quantité de plasmides de chaque solution grâce à un exemple de calcul décrit dans l'annexe 6. Un premier essai a été réalisé en faisant des dilutions successives des solutions de plasmides dans de l'eau BM de façon à avoir de 10 à 100 000 copies de chaque plasmide. Le résultat des trois gammes à l'issue de la PCR quantitative n'a pas été concluant, puisque seuls les points contenant 10 000 et 100 000 copies étaient détectables à des Ct élevés, alors que l'ensemble des patients et témoins testés sortait à des Ct convenables (entre 25 et 30). Après vérification des calculs, nous avons réalisé de nouvelles gammes (de 100 à 1 000 000 copies) en diluant dans du tampon Tris-EDTA (TE) de qualité biologie moléculaire. Nous avons alors obtenu des droites d'étalonnage correctes, permettant de déduire à l'aide du Ct un nombre de copies *MPL* wt et *MPL* muté, et enfin de calculer un ratio : nombre de copies *MPL* muté/ nombre de copies *MPL* (muté + non muté)

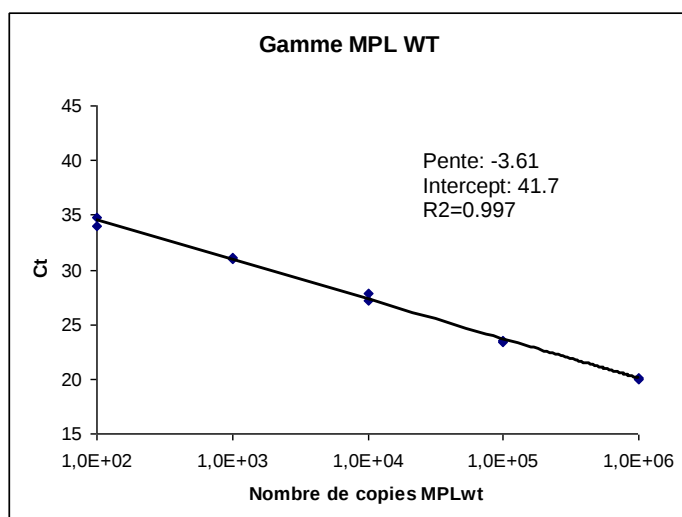


Figure 26: Courbe d'étalonnage MPL wt

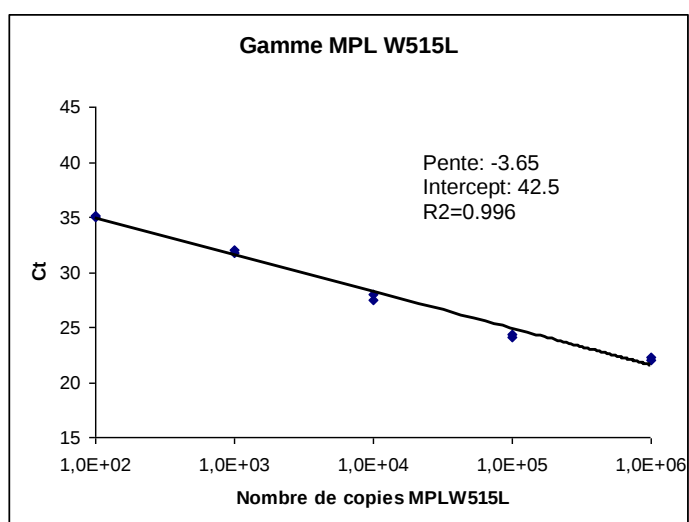


Figure 27: Courbe d'étalonnage MPL W515L

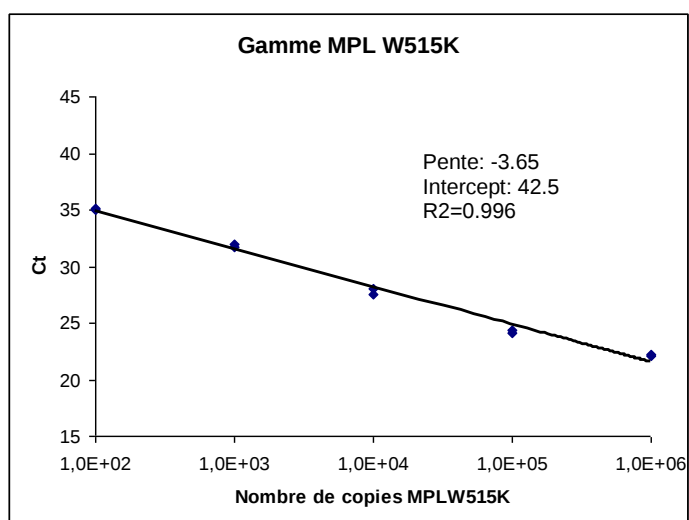


Figure 28: Courbe d'étalonnage MPL W515K

3.3.2.2.3 Echantillons testés

A chaque PCR quantitative, nous testons dans une plaque de 96 puits, de l'eau BM dont la fluorescence doit être indétectable, un contrôle positif MPL W515L/K, un contrôle négatif MPL wt, les gammes d'étalonnage réalisées à l'aides des plasmides MPL wt, W515L et W515K. Les échantillons des patients dont testés en duplicate.

3.3.2.2.4 Conditions optimales de PCR

Trois mix doivent être réalisés en fonction de la sonde marquée introduite (MPL wt, MPL W515L, et MPL W515K). Chaque mix contient du Master Mix 2X, de l'eau de qualité biologie moléculaire (BM), des amorces sens et antisens à la concentration finale de 300 μ M, et une des trois sondes marquées à la concentration finale de 200 μ M. Le mix est réalisé comme indiqué dans le tableau 8 et 5 μ L d'ADN à 5 ng/ μ L y sont ensuite ajoutés.

Composition du mix	Pour 1 réaction (μ L)
PCR Master Mix 2X	12,5
H2O BM	5,75
Amorce sens (10 μ M)	0,75
Amorce antisens (10 μ M)	0,75
Sonde MPL wt ou W515L ou W515K (20 μ M)	0,25
Total	20

Tableau 7: Composition du mix nécessaire à la quantification MPL W515L/K

Nous avons gardé les températures choisies lors de PCR classique en faisant varier uniquement la température d'hybridation/élongation de façon à choisir la température optimale pour l'hybridation spécifique de chaque sonde à sa cible. Après plusieurs essais, nous avons choisi une température d'hybridation/élongation de 62°C. Les conditions de température optimales de PCR sont énoncées dans le tableau 8. La plaque de 96 puits est ensuite placée dans le thermocycleur ABI PRISM 7300 pendant 2h.

Etapes	Incubation UNG	Activation TAQ	PCR (45 cycles)	
		polymérase	Dénaturation	Elongation
Température	50°C	95°C	95°C	62°C
Temps	2 min	10 min	15 s	1 min
Volume	25 μ L			

Tableau 8: Conditions optimales pour la PCR en temps réel

3.3.3 Tests statistiques

Les statistiques ont été réalisées grâce au logiciel MedCalc® Software. Nous avons comparé nos données quantitatives en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney, afin de s'affranchir de l'hypothèse de normalité et nous avons utilisé le test de Khi² pour comparer nos données qualitatives. Pour les plus petits effectifs, le test exact de Fisher a été utilisé.

Les résultats sont statistiquement significatifs lorsque le risque alpha (p-value) est inférieur au seuil de 0,05.

4 Résultats

4.1 Description de la cohorte globale

4.1.1 Diagnostics de l'ensemble des recherches de MPL

326 recherches de mutations de *MPL* ont été effectuées au CHU de Brest de février 2009 à septembre 2013. Les 326 recherches provenaient de 16 centres hospitaliers différents dont la répartition du nombre de patients par centre est reportée dans le tableau 9.

Centres Hospitaliers	Nombre de patients
BREST	129
ANGERS	77
ST BRIEUC	30
RENNES	21
POITIERS	16
QUIMPER	15
MORLAIX	11
LORIENT	8
LANNION	3
LE MANS	4
NANTES	3
LA ROCHE SUR YON	2
SAUMUR	4
CHOLET	1
DOUARNENEZ	1
TOURS	1
Total	326

Tableau 9: Répartition de l'ensemble des recherches de MPL selon le centre (n=326)

300 recherches sur 326 ont pu être correctement renseignées et analysables. Sur les 300 recherches renseignées, 79 patients ne possédaient pas de syndrome myéloprolifératif d'après

les critères diagnostiques de la WHO 2008. Au sein de ces patients répertoriés dans la figure 29, 43% avaient une autre hémopathie, 30% avaient une thrombocytose due à d'autres causes (syndrome inflammatoire, carence martiale, suites d'une splénectomie). Pour le reste des patients, certains ont eu une recherche de mutations de *MPL* dans un contexte de bilan de thrombose, dans un contexte de splénomégalie (infarctus splénique, insuffisance hépatocellulaire majeure) ou de splénomégalie non étiquetée, de polyglobulies secondaires (apnée du sommeil, tabagisme). Deux patients n'avaient pas assez de critères pour affirmer le diagnostic de SMP (*JAK2*, *CALR* et *MPL* non mutés) et ont été classés dans le groupe des patients non SMP.

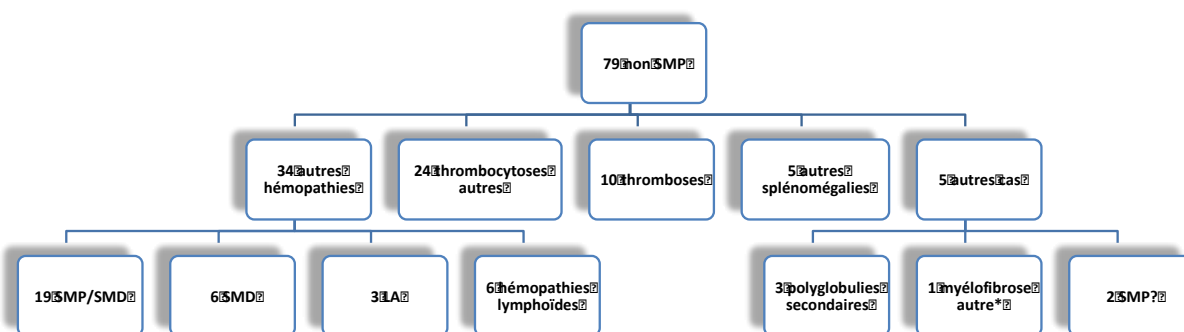


Figure 29: Répartition des diagnostics non SMP (n=79)

* Myélofibrose post polychondrite atrophiante

221 des 300 patients avec données analysables possédaient un SMP et leur diagnostic est reporté dans la figure 30.

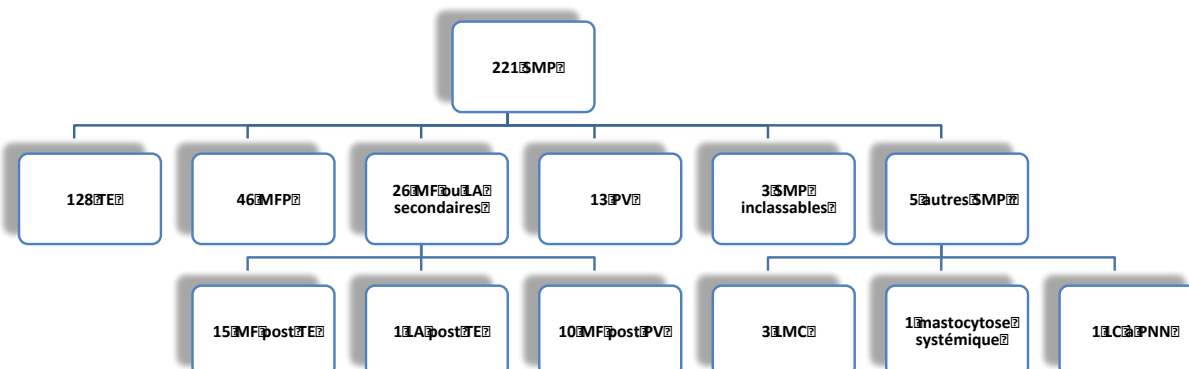


Figure 30: Répartition des diagnostics des patients avec un SMP (n=221)

4.1.2 Répartition des mutations dans la cohorte

Les mutations de *JAK2* et de *MPL* ont été recherchées sur la cohorte entière (n=326) tandis que les mutations de *CALR* ont été recherchées chez les patients porteurs d'un diagnostic de TE, de MFP et de MF post TE (n=189).

4.1.2.1 Mutations de *MPL*

22 mutations de *MPL* ont été retrouvées sur les 326 recherches effectuées, correspondant à 6.75% des patients. Quatre mutations différentes ont été mises en évidence au niveau de l'exon 10 de *MPL* dans la TE et la MFP. Ces mutations sont reportées dans le tableau 10, en fonction du diagnostic.

	TE**	MFP	Total
MPL W515L*	8	6	14
MPL W515K	4	2	6
MPL W515S	1	0	1
Autre mutation de MPL	1	0	1
Total	14	8	22

Tableau 10: Répartition des différentes mutations de *MPL* au sein de la cohorte (n=326)

*3 patients porteurs de la mutation *MPL* W515L ont une mutation *JAK2* V617F

** 6 patients atteints par une TE sont *CALR* et *MPL* W515 double muté

La cohorte des patients *MPL* muté est composée d'une majorité de mutations *MPL* W515L (63.6%), suivie de la mutation W515K (27.3%), et de la mutation W515S. Une autre mutation plus complexe de *MPL* a été décrite pour la première fois (Annexe 6), il s'agit de la mutation : del515:517 + ins(517:AAA) +mut518 C:A. Celle-ci est localisée au sein du motif RWQFP, décrit précédemment, qui est une zone charnière du récepteur ; cette mutation provoque un décalage du cadre de lecture et aboutit à une nouvelle séquence, ne permettant plus de maintenir le récepteur *MPL* à l'état inactif.

4.1.2.2 Mutation JAK2 V617F

Les 326 patients de la cohorte ont également eu une recherche de JAK2 V617F et les diagnostics sont reportés dans le tableau 11.

	TE	MFP	PV	MF post TE	MF post PV	SMP inclassables	SMP/SMD	NR*	Total
JAK2+	38	13	10	6	10	2	5	3	87

Tableau 11: Répartition des mutations JAK2 V617F au sein de la cohorte (n= 326 patients)

*NR : Cas non renseignés

4.1.2.3 Mutations de l'exon 9 de CALR

Les mutations de *CALR* ont été recherchées chez les patients atteints de TE, de MFP, et de MF post TE, ce qui représente 189 patients. 4 patients sont en attente pour être retestés.

	TE	MFP	MF post TE	Total
CALR+	47	11	6	64

Tableau 12: Répartition des mutations de CALR au sein des TE, MFP et MF post TE (n=185 patients)

4.1.3 Répartition des mutations selon le SMP

Les mutations de *MPL* sont retrouvées dans la littérature dans trois phénotypes ; la TE, la MFP, et la MF post TE. La recherche des trois mutations (*JAK2*, *CALR*, et *MPL*) a été effectuée au sein des 189 SMP comprenant 128 TE, 46 MFP et 15 MF post TE.

4.1.3.1 Mutations dans la Thrombocythémie essentielle

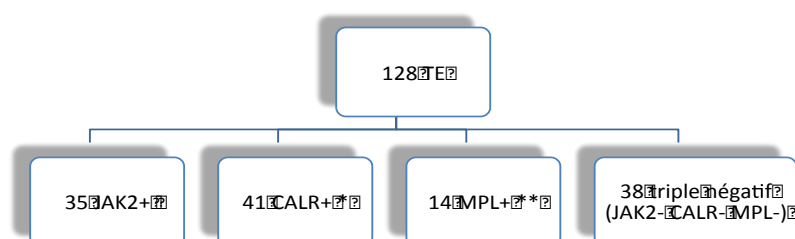


Figure 31: Mutations retrouvées dans la TE (n=128)

* dont 1 patient CALR+/JAK2+ ** dont 2 patients MPL+/JAK2+ et 6 patients MPL

Nous avons représenté dans la figure 32 la proportion des mutations de *MPL* et de *CALR* dans les Thrombocythémie essentielle *JAK2*⁻ et la proportion des mutations de *CALR* dans les Thrombocythémie essentielle *MPL*⁻/*JAK2*⁻. Deux patients *MPL*⁺/*JAK2*⁺ et un patient *CALR*⁺/*JAK2*⁺ ont été exclus de ces deux représentations. Six patients doubles mutés *MPL* ont été exclus de la représentation TE *MPL*⁻/*JAK2*⁻.

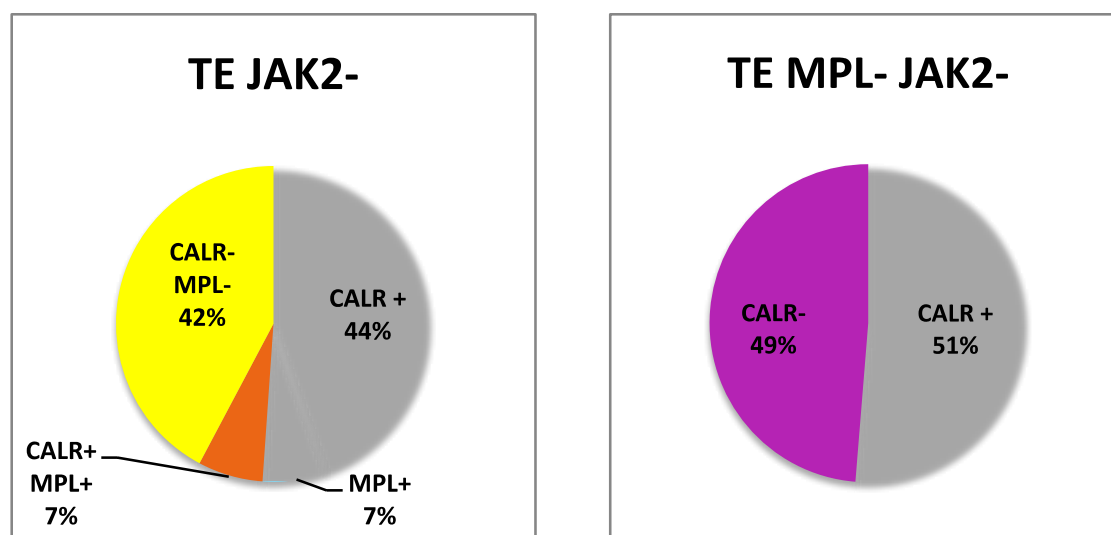


Figure 32: Répartition des mutations de *CALR* et *MPL* dans les TE *JAK2*⁻ (n=90) et répartition des mutations de *CALR* dans les TE *MPL*⁻/*JAK2*⁻ (n=78)

4.1.3.2 Mutations dans la Myélofibrose Primitive

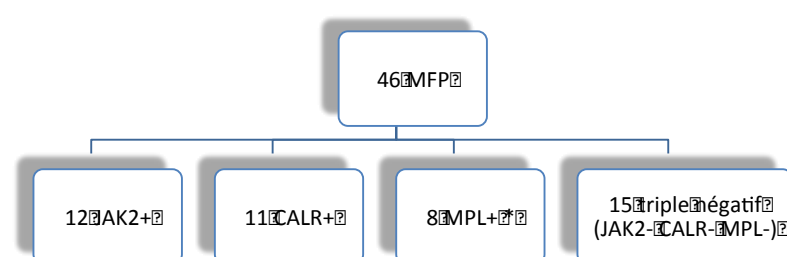


Figure 33: Mutations retrouvées dans la MFP (n=46)

* dont 1 patient *MPL*⁺/*JAK2*⁺

Nous avons représenté dans la figure 34 la proportion des mutations de *MPL* et de *CALR* dans les Myélofibrose Primitive *JAK2*⁻ et la proportion des mutations de *CALR* dans les

Myélofibrose Primitive *MPL*⁻/*JAK2*⁻. Un patient *MPL*⁺/*JAK2*⁺ a été exclu des ces deux représentations.

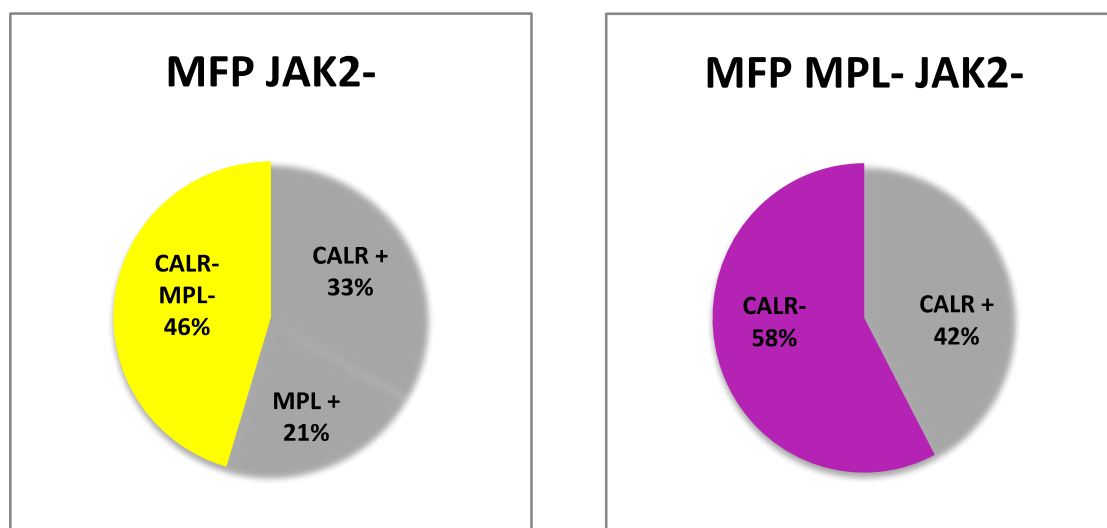


Figure 34: Répartition des mutations de CALR et MPL dans les MFP JAK2- (n=33) et répartition des mutations de CALR dans les MFP JAK2-/MPL- (n=26)

4.1.3.3 Mutations dans la Myélofibrose post Thrombocyémie Essentielle

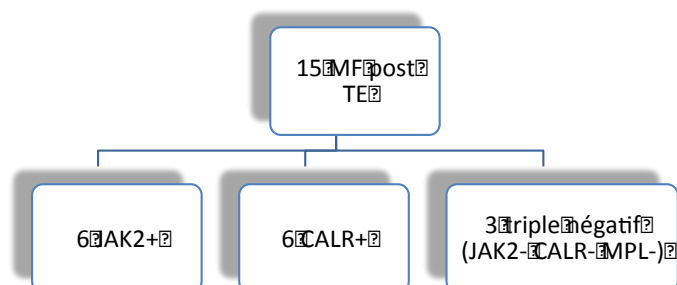


Figure 35: Mutations retrouvées dans la MF post TE (n=15)

Les patients atteints de MF post TE ne présentent pas de mutations de MPL.

4.1.4 Caractéristiques des SMP de la cohorte

Nous avons voulu caractériser l'ensemble des TE, MFP et MF post TE. Les données collectées ne sont pas exhaustives, six numérations de formule sanguine (NFS) sont manquantes (diagnostic fait dans un autre centre, ou diagnostic antérieur à 1994). On note une prédominance féminine dans la TE ($p=0,002$), et une prédominance masculine dans la MFP

($p=0,027$). Les patients atteints de TE sont plus jeunes que dans la MFP ($p=0,008$) alors qu'il n'y a pas de différence significative entre la MFP et la MF post TE ($p=0,663$). Les TE présentent un taux de plaquettes et d'hémoglobine plus élevés que dans la MFP et la MF post TE. Il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne les globules blancs. La myélémie est présente de façon plus significative dans la MFP et dans la MF post TE, et il n'y a pas d'érythromyélie dans les TE de notre cohorte.

		TE	MFP	MF post TE
Effectif	n	128	46	15
	%	67,7%	24,3%	7,9%
Age	Médiane	58	64,5	64
	Min-Max	6-89	43-85	40-77
Sexe	F/M	82/46	15/31	8/7
Hb (g/dL)	Médiane	13,5	11,5	10,2
	Min-Max	7,1-16,1	7,1-15,4	7,4-13,4
PQ (G/L)	Médiane	791	203	398,5
	Min-Max	430-2522	17-722	37-936
GB (G/L)	Médiane	8,6	8,76	7,1
	Min-Max	4,2-20	2,4-97,0	3,2-31,6
PNN (G/L)	Médiane	5,38	5,15	4,37
	Min-Max	2,41-11,55	1,33-45,57	1,71-25,75
Myélémie	nombre (%)	17/123 (13,8%)	38/45 (84,4%)	11/14 (78,6%)
Erythromyélie	nombre (%)	0	24/45 (53,3%)	7/14 (50%)
LDH élevées	nombre (%)	62/110 (43,6%)	40/44 (90,9%)	13/14 (92,9%)
Splénomégalie échographique	nombre (%)	12/125 (9,6%)	29/44 (65,9%)	9/15 (60%)
ATCD de thrombose au diagnostic	nombre (%)	23/128 (18%)	5/46 (10,9%)	5/15 (33,3%)
Thrombose post diagnostic	nombre (%)	10/120 (8,3%)	3/43 (7%)	0/14 (0%)
Evolution en LA	nombre (%)	4/121 (3,3%)	10/45 (22,2%)	4/15 (26,7%)

Tableau 13: Caractéristiques clinico-biologiques des TE, MFP, et MF post TE

4.2 Comparaison selon le type de mutation

Dans la suite des résultats, nous étudierons les patients atteints de TE et de MFP (n=174). Les patients possédant une double mutation *JAK2*+/*MPL*+ ou *CALR*+/*MPL*+ ont été classés dans le groupe *MPL* muté, et le patient *JAK2*+/*CALR*+ a été classé dans le groupe *CALR* muté.

4.2.1 Caractéristiques de la Thrombocythémie Essentielle

		<i>JAK2</i> +	<i>MPL</i> +	<i>CALR</i> +	Triple négatif
Effectif	n	35	14	41	38
	%	27,3%	10,9%	32%	29,7%
Age	Médiane	70	67	50	50,5
	Min-Max	33-88	24-89	10-82	6-85
Sexe	F/M	20/15	11/3	23/18	28/10
Hb (g/dL)	Médiane	13,9	12,6	13,8	12,7
	Min-Max	11,5-16,1	9-16,1	7,1-15,8	9,9-15,2
PQ (G/L)	Médiane	809	711,5	836	774,5
	Min-Max	505-2091	543-1692	450-2436	430-2522
GB (G/L)	Médiane	9,5	8,8	7,85	8,6
	Min-Max	5,28-20	5,6-15,29	4,3-15,4	4,2-14,3
PNN (G/L)	Médiane	6,81	5,82	4,83	5,38
	Min-Max	2,81-10,94	3,15-7,96	2,75-11,55	2,41-10,57
Myélémie	nombre (%)	3/35 (8,6%)	5/13 (38,4%)	6/39 (15,6%)	3/35 (8,6%)
LDH élevées	nombre (%)	13/28 (46,4%)	7/13 (53,3%)	18/36 (50%)	10/34 (29,4%)
Pousse BFU-E	nombre (%)	21/28 (75%)	5/9 (55,6%)	7/32 (21,9%)	8/35 (25%)
Pousse CFU-Mk	nombre (%)	25/29 (86%)	5/9 (55,6%)	23/30 (76,7%)	15/34 (44,1%)
Splénomégalie échographique	nombre (%)	1/34 (2,9%)	2/13 (15,3%)	5/40 (12,5%)	4/38 (10,5%)
ATCD de thrombose au diagnostic	nombre (%)	9/35 (25,7%)	3/14 (21,4%)	6/41 (14,6%)	5/38 (13,2%)
Thrombose post diagnostic	nombre (%)	3/32 (9,4%)	1/13 (7,7%)	1/40 (2,5%)	5/35 (14,2%)
Evolution en LAM	nombre (%)	0/32 (0%)	3/13 (23%)	1/40 (2,5%)	0/35 (0%)
Evolution en MF	nombre (%)	1/32 (3,1%)	1/13 (7,7%)	5/40 (12,5)	4/35 (11,4%)

Tableau 14: Caractéristiques des patients atteints d'une TE selon le type de mutation (n=128)

Les patients *MPL*⁺ atteints de Thrombocythémie Essentielle semblent être plus âgés que les patients *CALR*⁺ et que les patients triple négatif, mais cela est significatif uniquement pour les patients triple négatif ($p=0,043$). Les patients *JAK2*⁺ sont quant à eux plus âgés que les patients *CALR*⁺ ($p=0,0002$) et que les patients triple négatif ($p=0,0006$).

En ce qui concerne la NFS, les patients triple négatif ont un taux d'Hb significativement plus bas que les patients *JAK2*⁺ ($p=0,015$) et *CALR*⁺ ($p=0,014$). Il semble que les patients *MPL*⁺ aient un taux d'Hb plus bas que les patients *JAK2*⁺ et *CALR*⁺ mais l'effectif est trop petit pour que cela soit significatif ($p=0,072$, et $p=0,075$). Les leucocytes sont plus élevés chez les patients *JAK2*⁺ que chez les patients *CALR*⁺ ($p=0,046$). Il y a significativement plus de patients *JAK2*⁺ avec une pousse érythroïde spontanée que de patients *CALR*⁺ ou triple négatif ($p=0,0001$) mais pas que de patients *MPL*⁺ ($p=0,49$). La proportion de patients avec une pousse spontanée de progéniteurs mégacaryocytaires est supérieure chez les patients *JAK2*⁺ à celle retrouvée chez les patients triple négatif. Il y a quatre évolutions en LA dont trois au sein du groupe *MPL* muté.

Le reste des paramètres clinico-biologiques, tels que les plaquettes, les LDH, la splénomégalie échographique, les antécédents de thrombose et thrombose post-diagnostic et l'évolution en myélofibrose ne présentent pas de différence significative selon le type de mutations.

4.2.2 Caractéristiques de la Myélofibrose Primitive

Le tableau 15 présente la cohorte de patients avec Myélofibrose Primitive qui ne présente pas de différence en termes d'âge et de sexe selon les mutations. Les patients *CALR*⁺ semblent avoir un taux de plaquettes plus élevé que les patients *JAK2*⁺, *MPL*⁻, et triple négatif mais ce n'est pas significatif. Les globules blancs paraissent plus élevés avec la mutation *JAK2*⁺ qu'avec les autres mutations, mais le test de Mann-Whitney n'est pas significatif (*JAK2*⁺/*MPL* : $p=0,064$, *JAK2*⁺/*CALR*⁺ : $p=0,056$, et *JAK2*⁺/Triple négatif : $p=0,118$). Les paramètres clinico-biologiques tels que l'Hb, les LDH, la splénomégalie échographique, l'antécédent de thrombose, la thrombose post-diagnostic ne présentent pas de différence significative selon les mutations. Le petit effectif des patients avec MFP pour chaque mutation est limitant pour mettre en évidence des différences significatives.

		<i>JAK2</i> +	<i>MPL</i> +	<i>CALR</i> +	Triple négatif
Effectif	n	12	8	11	15
	%	26,1%	17,4%	23,9%	32,6%
Age	Médiane	65,5	64,5	72	62
	Min-Max	48-82	53-77	43-81	49-85
Sexe	F/M	4/8	1/7	7/4	3/12
Hb (g/dL)	Médiane	11,4	10,05	11,65	10,70
	Min-Max	7,2-15,4	7,7-13,1	8-14,9	7,1-14,6
PQ (G/L)	Médiane	267	162,5	334,5	169
	Min-Max	39-721	52-491	36-722	17-635
GB (G/L)	Médiane	22,35	7,15	7,28	7,4
	Min-Max	5,03-58,9	5,3-26,4	2,4-56,8	3,0-97,0
PNN (G/L)	Médiane	15,94	4,80	4,48	3,6
	Min-Max	2,91-23,97	2,50-8,66	1,33-27,26	1,51-45,57
Myélémie	nombre (%)	12/12 (100%)	8/8 (100%)	7/10 (70%)	11/15 (73,3%)
Erythromyélie	nombre (%)	9/12 (75%)	8/8 (100%)	3/10 (30%)	4/15 (26,7%)
LDH élevées	nombre (%)	11/11 (100%)	7/7 (100%)	11/11 (100%)	11/15 (73,3%)
Splénomégalie échographique	nombre (%)	10/12 (83,3%)	5/7 (71,4%)	7/10 (70%)	7/15 (46,7%)
ATCD de thrombose au diagnostic	nombre (%)	0/12 (0%)	2/8 (25%)	1/11 (9,1%)	2/15 (13,3%)
Thrombose post diagnostic	nombre (%)	0/10 (0%)	1/7 (14,3%)	2/11 (18,2%)	0/15 (0%)
Evolution en LA	nombre (%)	2/11 (18,2%)	1/7 (12,5%)	0/11 (0%)	7/15 (46,7%)

Tableau 15: Caractéristiques des patients atteints d'une MFP selon le type de mutation (n=46)

4.3 Quantification de MPLW515L/K

4.3.1 Gamme de % de MPL W515L/K

Nous avons réalisé une gamme de différents pourcentages (1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 100%) de plasmides MPL W515L et W515K, en diluant les plasmides *MPL* muté à 100% dans des plasmides *MPL* sauvage. Les gammes de plasmides ont été testées avec en PCR semi-quantitative et cela permet d'avoir une idée du % MPL W515L/K des patients avec la technique diagnostique.

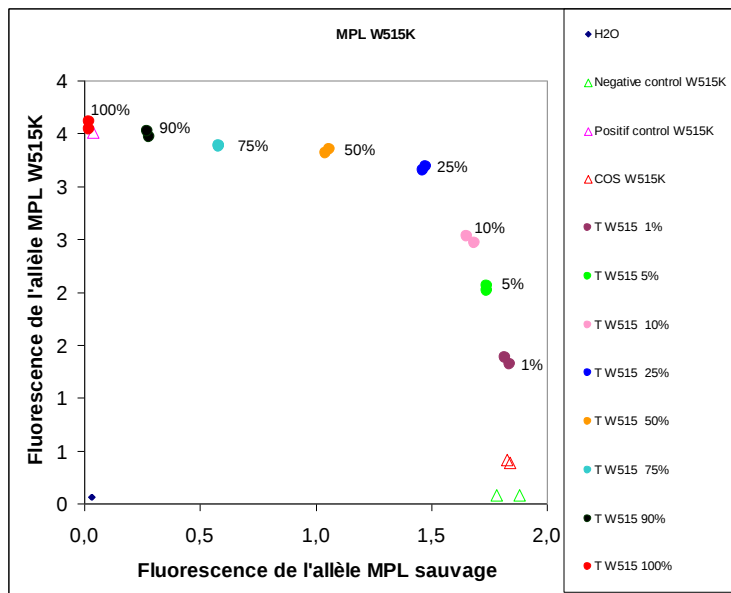


Figure 38: PCR semi-quantitative représentant différents % de plasmides MPL W515K

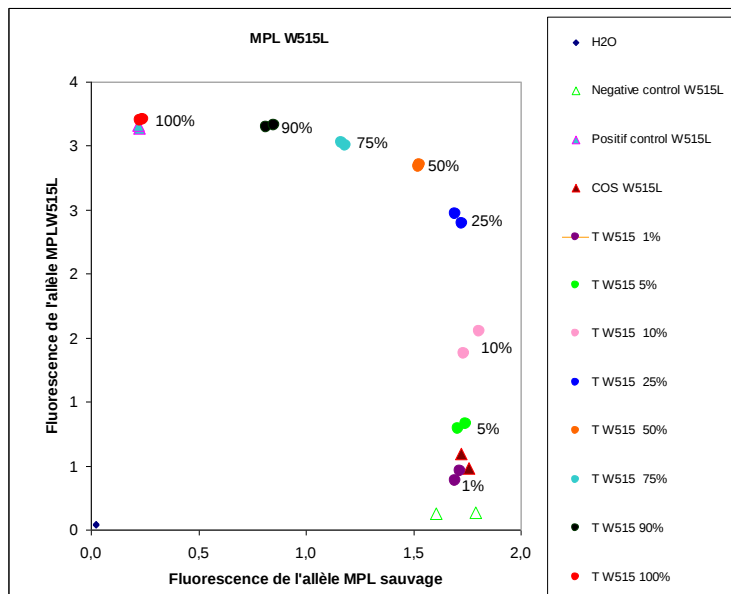


Figure 39: PCR semi-quantitative représentant différents % de plasmides MPL W515L

4.3.2 Quantification du % MPL W515L/K des patients

Nous avons quantifié le % d'allèles MPL W515L et MPL W515K détectées à Brest entre février 2009 et septembre 2013 (20 patients), et nous avons ajouté à cette cohorte trois patients MPL W515 diagnostiqués entre septembre 2013 et mars 2014. Afin d'agrandir encore notre cohorte de *MPL* muté, l'hôpital Mondor à Créteil nous a envoyé l'ADN de 24 patients MPL W515L que nous avons quantifié. Les résultats de la quantification sont reportés dans l'annexe 8.

Nous ne disposons pas encore des renseignements clinico-biologiques des patients de Créteil. Donc, la cohorte analysable de MPL W515 est constituée de 23 patients.

La quantification des allèles mutés de *MPL* montre une charge allélique significativement plus élevée dans la Myélofibrose Primitive (médiane à 48%) que dans la Thrombocythémie Essentielle (médiane à 16,1%).

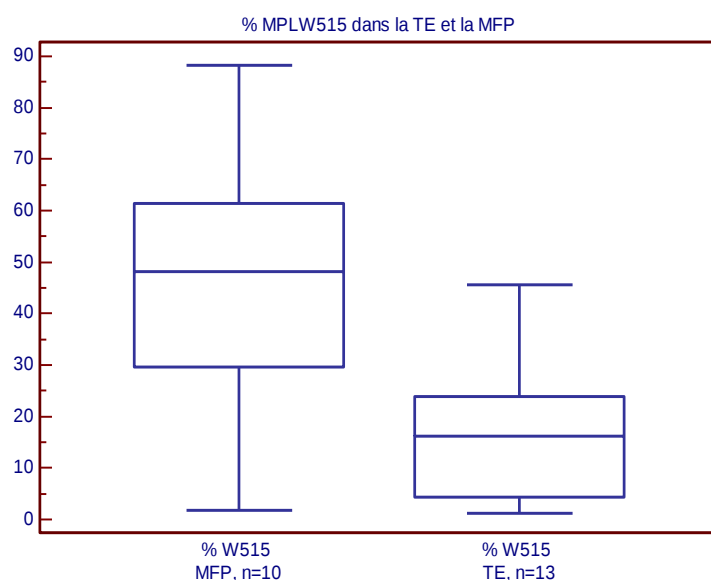


Figure 36: Représentation du % MPL W515 dans la TE (n=13) et la MFP (n=10)

Nous avons voulu regarder l'impact de chacune des deux mutations MPL W515L/K dans la TE et la MFP. Les résultats sont représentés dans la figure 37, il n'y a pas de différence significative entre ces deux mutations dans la TE et la MFP.

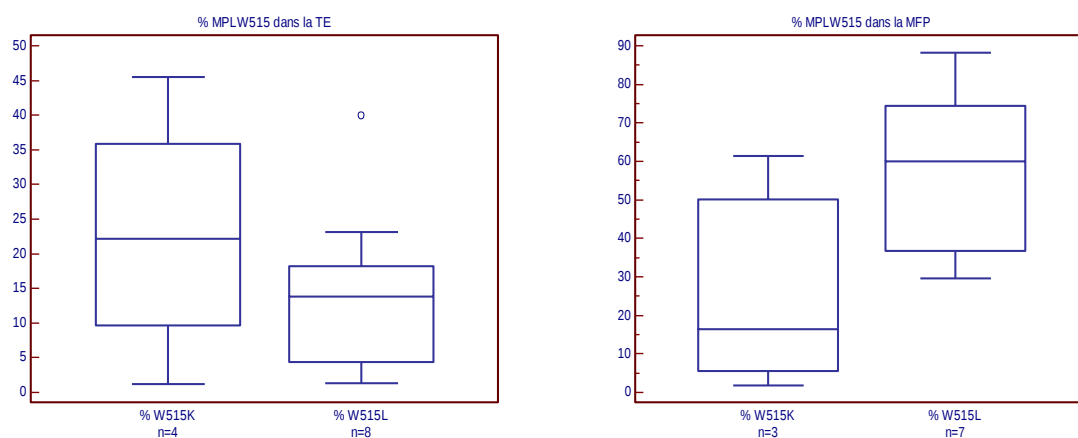


Figure 37: Répartition du % de chaque allèle MPL W515L/K en fonction du

5 Discussion

Notre étude rétrospective s'est intéressée aux 326 recherches de *MPL* effectuées de février 2009 à septembre 2013. Sur l'ensemble des demandes, très peu de fiches de renseignements étaient remplies (annexe 2). Il serait souhaitable de sensibiliser les cliniciens sur ce point non seulement pour avoir des renseignements clinico-biologiques mais aussi pour pouvoir apprécier la justesse de la prescription et éventuellement conseiller dans l'approche diagnostique. Au sein des 300 patients avec données clinico-biologiques renseignées, certaines recherches de mutation de *MPL* ont été réalisées par excès. Dans les 221 SMP, la recherche de *MPL* n'aurait pas du être réalisée dans 3 LMC, et 13 PV et 10 MF post PV. 29,7% des patients ne possédaient pas de SMP, et certaines recherches auraient également pu être évitées dans 3 LA, 6 hémopathies lymphoïdes, 7 SMD, 24 thrombocytoses réactionnelles, et discutables dans certains bilans de thrombose. En conclusion, environ 20% des recherches n'étaient pas totalement justifiées. Nous avons réalisé une proposition d'algorithme diagnostique pour la MFP et la TE ou la myélofibrose pré-fibrotique qui situe la place de la recherche de *MPL*.

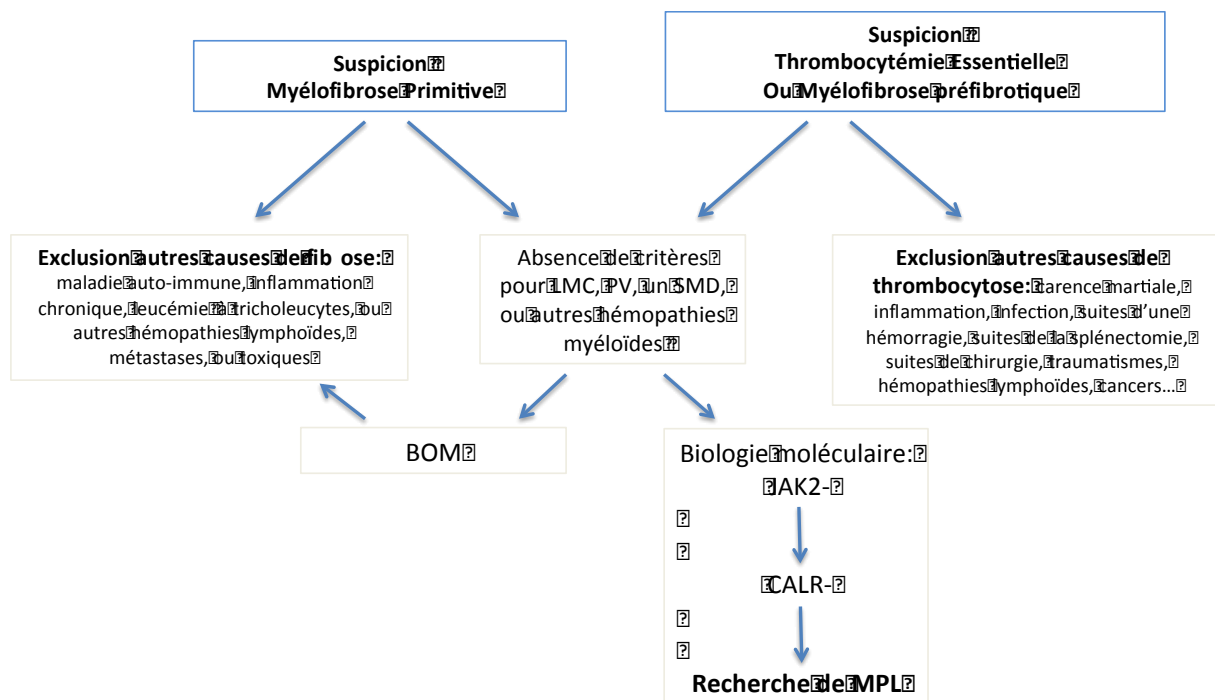


Figure 40: Place de *MPL* dans le diagnostic de la MFP et de la TE

Depuis la découverte des mutations de *CALR* en décembre 2013 (11,12), *MPL* arrive en troisième position des mutations à rechercher en biologie moléculaire dans le diagnostic de la MFP et de la TE. Elle doit être recherchée uniquement lorsqu'il n'y a pas de critères pour une LMC, une PV, ou une autre hémopathie myéloïde (SMD), et lorsque les autres causes de thrombocytose ont été exclues pour la TE. La BOM est un élément clé du diagnostic puisqu'elle permet d'exclure d'autres causes de fibrose mais aussi de différencier une MFP, d'une TE, et d'une myélofibrose pré-fibrotique. Barbui et al. (63) a souligné l'importance de faire la distinction entre la TE et la myélofibrose pré-fibrotique car cette dernière a un plus mauvais pronostic que la TE. La BOM permet également de classer le stade de fibrose, qui est un paramètre important pour évaluer le stade de la maladie.

La répartition des mutations de *JAK2*, *CALR*, et *MPL* dans notre cohorte n'est pas représentative des TE et MFP décrites dans la littérature puisque les TE et MFP ici ont été sélectionnées. En effet, la recherche des mutations de *MPL* s'est effectuée principalement sur des SMP *JAK2* non muté. Les mutations de *MPL* correspondent dans la littérature à environ 10% des TE *JAK2*-, et 15% des les MFP *JAK2*-. Or, la fréquence des mutations de *MPL* dans notre cohorte est légèrement supérieure à celle de la littérature avec 14% dans les TE *JAK2*-, et 21% des MFP *JAK2*- (figure 32). D'après les premières publications sur les mutations de l'exon 9 de *CALR* dans les SMP, la fréquence de ces mutations est d'environ 67% dans les TE *JAK2*-/MPL- et d'environ 75% des MFP *JAK2*-/MPL- (11,12,14). Rotunno et al. décrit une fréquence plus faible de 49% dans les TE *JAK2*-/MPL- (64). La fréquence des mutations *CALR* est moins importante que ce qui a déjà été décrit puisque cela représente 51% des TE *JAK2*-/MPL- et 42% des MFP *JAK2*-/MPL- (figure 34). La découverte des mutations de *CALR* a permis de limiter considérablement le nombre de patients restant sans marqueur moléculaire ou « triple négatif » dans la Thrombocytemie essentielle et la Myélofibrose Primitive. Seuls 10% des TE et 8% des MFP sont sans marqueur moléculaire (11,12). Il y a une proportion plus importante de patients « triple négatif » dans notre cohorte (29,7% dans la TE et 32,6% dans la MFP) du fait de la sélection de patients majoritairement *JAK2* non muté.

La plupart des mutations de *MPL* de notre cohorte se situe sur le codon 515 (20/22 mutations) avec une nette prédominance de la mutation *MPL* W515L (63,6%) suivi de la mutation W515K (27,3%), et de la mutation W515S. Une mutation (del 515:517 + ins(517:AAA)

+mut518 C:A) a été décrite et rapportée pour la première fois ; celle-ci aboutit à une nouvelle séquence par décalage du cadre de lecture. La perte de trois acides aminés au sein du motif clé de *MPL* modifie la conformation du récepteur et celui-ci s'active de façon constitutive.

Nous avons identifié plusieurs doubles mutations. Trois patients sont *MPL*+/*JAK2*+. La coexistence de ces deux mutations a déjà été rapporté dans la littérature (6,56). Six doubles mutations *MPL* ont été retrouvées dans des TE et aucune n'a été décrite dans la MFP dans notre cohorte. Un test exact de Fisher a été réalisé mais l'effectif est trop petit pour affirmer un lien entre la présence de ces deux mutations et le diagnostic de TE ($p=0,051$). Enfin, un patient atteint de TE possède une double mutation *CALR*+/*JAK2*+. Cette double mutation a déjà été décrite dans une MFP (13). Nous avons remarqué que les patients *MPL*+/*JAK2*+ et *CALR*+/*JAK2*+ possèdent un faible % « d'allèle burden » *JAK2* V617F.

En ce qui concerne la comparaison des paramètres clinico-biologiques au sein des trois mutations et des patients triple négatif, nous avons retrouvé certaines similitudes avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature. La taille de l'effectif a parfois été un facteur limitant pour mettre en évidence des différences significatives entre les mutations, notamment pour la mutation *MPL*. Dans la TE (tableau 14), il n'y a pas de différences significatives entre les patients *MPL*+ et *JAK2*+. L'Hb semble plus basse chez les patients *MPL*+ mais ce n'est pas significatif ($p=0,072$). Contrairement à ce que retrouve la littérature (52), les plaquettes sont plus élevées chez les patients *JAK2*+ mais ce n'est pas non plus significatif ($p=0,268$), et il n'y a pas de différence au niveau des antécédents de thrombose et thromboses post diagnostic. Une autre différence avec ce qui a déjà été décrit est la présence de pousse érythroïde spontanée au sein des patients *MPL*+ (52). En ce qui concerne les patients *MPL*+ et *CALR*+, il semble y avoir des différences mais elles ne sont pas significatives. Les patients *CALR*+ semblent être plus jeunes ($p=0,053$), avec un taux d'Hb plus bas ($p=0,076$), et des plaquettes plus basses ($p=0,285$). Les patients *CALR*+ sont significativement plus jeunes que les patients *JAK2*+ ($p=0,0002$) avec un taux d'Hb plus bas ($p=0,015$) et des leucocytes plus bas ($p=0,046$). La proportion de patients avec une pousse érythroïde spontanée est plus importante chez les patients *JAK2*+ ($p=0,0001$). Il est difficile dans cette étude rétrospective de comparer l'évolution en myélofibrose et en LA au sein des groupes de mutations car les patients ont des dates de diagnostic différentes. Néanmoins, nous avons remarqué que dans les trois évolutions en LA du groupe des TE *MPL*+ (tableau 14), les patients ont en réalité une double mutation ; 2 patients sont *CALR*+/*MPL*+ et un patient est *JAK2*+/*MPL*+. La médiane du temps entre le diagnostic de TE et la transformation en LA est de 6,6 ans (min-max : 5,8-9,2 ans).

	TE non transformée	LA post TE	Total
<i>MPL</i> +/ <i>CALR</i> +	4	2	6
<i>MPL</i> +/ <i>JAK2</i> +	1	1	2
<i>CALR</i> +/ <i>JAK2</i> +	1	0	1
Patients non double muté	118	1	119
Total	124	4	128

Tableau 16 : Double mutation et transformation des TE en LA

Le tableau 16 détaille la répartition des patients « double muté » et des patients non double muté au sein des TE non transformée et des LA post TE. La présence de ces doubles mutations et la transformation en LA paraît liée d'après un test exact de Fisher ($p=0,0009$) et pourrait être l'objet d'une étude plus approfondie. En ce qui concerne la Myélofibrose Primitive, le faible effectif des patients pour chaque mutation ne permet pas de mettre en évidence des différences significatives.

Nous avons mis au point une PCR quantitative afin de pouvoir quantifier le % d'allèle *MPL* muté et de regarder s'il était corrélé au diagnostic. Cette technique ne peut en aucun cas être une technique diagnostique comme l'est la PCR semi-quantitative réalisée au laboratoire grâce au kit *MPL* Mutascreen. En effet, la PCR quantitative permet de mettre en évidence uniquement les mutations de *MPL* recherchées (*MPL* W515L et *MPL* W515K). Le patient avec une délétion du codon 515 n'était pas détectable avec la PCR quantitative. L'intérêt du kit diagnostique est non seulement de faire le diagnostic des deux mutations les plus fréquentes (*MPL* W515L/K) mais aussi de repérer les profils atypiques, qu'on envoie à séquencer dans un deuxième temps à l'hôpital Henri Mondor à Créteil. Par ailleurs, une autre raison de ne pas utiliser la PCR quantitative en test diagnostique est qu'elle peut être faussement positive lorsqu'il s'agit d'une autre mutation sur le même codon (*MPL* W515A, W515R, W515S). Nous avons testé notre cas *MPL* W515S et nous avons retrouvé un % d'allèle muté pour les deux allèles (*MPL* W515L et *MPL* W515K). Nous avons essayé de tester notre sensibilité à l'aide d'une gamme de différents pourcentages d'allèles *MPL* W515L/K pour voir quel était le % minimal détecté. Le % minimal détecté est de 2% pour la mutation W515K et de 5% pour la mutation W515L avec la réserve que les dilutions soient suffisamment précises.

Dans cette étude, la charge allélique va de 1,20% à 95,1%, et il est significativement plus élevé dans la MFP que dans la TE (37,57). Un biais est cependant à prendre en compte, inhérent à cette étude rétrospective, c'est que l'ADN utilisé dans la quantification ne date pas toujours du diagnostic. Nous avons donc comparé des % de *MPL* muté correspondant à une

population hétérogène avec principalement de l'ADN en date du diagnostic mais aussi certains prélevés lors du suivi. Contrairement à la littérature, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les % d'allèle W515K et W515L, et cela est peut-être du à la petite taille de notre effectif de *MPL* muté (37,52,53,56). Seul Rumi et al. ne retrouve pas de différence significative entre ces deux mutations (57).

Nous avons réussi à quantifier des ADN de huit patients prélevés à deux temps différents pour observer un éventuel impact du % *MPL* sur l'évolution de la maladie. La figure 40 présente la variation de la charge allélique des deux « dosages » d'allèles mutés. Un des patients augmente sa charge allélique (variation de + 50,5%) et d'après nos données clinico-biologiques, le patient a une LAM post TE lors du deuxième prélèvement.

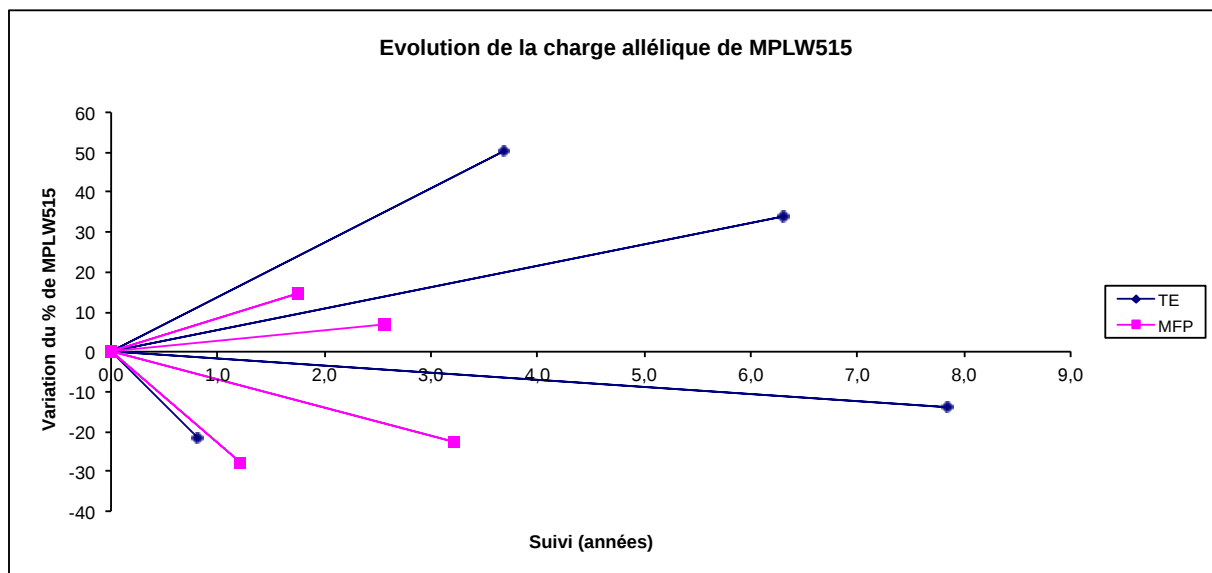


Figure 41: Variation du % d'allèle *MPL* W515 dans le suivi de 8 patients

6 Conclusion

Dans la stratégie diagnostique des syndromes myéloprolifératifs, la recherche des mutations de *MPL* a été récemment rétrogradée de la 2^{ème} à la 3^{ème} position après la recherche de la mutation *JAK2* V617F et des mutations de *CALR*. La recherche des mutations de *MPL* est tout de même intéressante puisque qu'elle permet d'identifier un marqueur moléculaire chez 3-4% des cas de Thrombocythémie Essentielle et 5% des cas de Myélofibrose Primitive. Dans notre cohorte, il reste 38 patients TE "triple négatif" (29,7%) et 15 patients MFP "triple négatif" (32,6%) ce qui est une proportion plus importante que celles retrouvées dans la littérature du fait de la sélection de notre cohorte composée de SMP majoritairement *JAK2* non muté.

La présence de doubles mutations *MPL*+/*CALR*+ et *MPL*+/*JAK2*+ chez des patients ayant développé une Leucémie Aiguë secondaire à une Thrombocythémie Essentielle n'a pas été décrit dans la littérature à notre connaissance. Il serait intéressant de connaître le statut des trois mutations (*JAK2*, *CALR*, et *MPL*) chez tous les patients ayant une LA secondaire à une TE ou une MFP afin de démontrer un lien entre la double mutation et l'évolution plus précoce du syndrome myéloprolifératif. La quantification du % *MPL* muté nous a permis de mettre en évidence une relation entre la charge allélique et le phénotype. Nous allons élargir la cohorte de patients *MPL* muté avec les patients de l'hôpital Henri Mondor et nous pourrions discuter de l'intérêt d'un suivi de la charge allélique de *MPL* W515. L'objectif serait de voir si le pourcentage de *MPL* W515 est corrélé à l'évolution du syndrome myéloprolifératif. Si tel était le cas, la quantification de *MPL* W515 pourrait être un marqueur dans le suivi de la maladie.

7 Références bibliographiques

1. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 27 mars 2005;434(7037):1144- 1148.
2. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. avr 2005;7(4):387- 397.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 19 mars 2005;365(9464):1054- 1061.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 28 avr 2005;352(17):1779- 1790.
5. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
6. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 15 nov 2006;108(10):3472- 3476.
7. Onishi M, Mui AL, Morikawa Y, Cho L, Kinoshita S, Nolan GP, et al. Identification of an oncogenic form of the thrombopoietin receptor MPL using retrovirus-mediated gene transfer. *Blood*. 1996;88(4):1399- 406.
8. Abe M, Suzuki K, Inagaki O, Sassa S, Shikama H. A novel MPL point mutation resulting in thrombopoietin-independent activation. *Leukemia*. 18 oct 2002;16(8):1500- 1506.
9. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, 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*. 1 juin 2004;103(11):4198- 4200.
10. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937- 951.
11. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 19 déc 2013;369(25):2379- 2390.
12. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 19 déc 2013;369(25):2391 - 2405.
13. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* [Internet]. 9 janv 2014 [cité 12 janv 2014]; Disponible sur: <http://www.nature.com.gate2.inist.fr/leu/journal/vaop/naam/abs/leu20143a.html>
14. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* [Internet]. 23 déc 2013 [cité 20 avr 2014]; Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-11-539098>
15. 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*. 12 juin 2002;277(49):47954- 47963.

16. Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VET 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol.* 2004;5(12):253.
17. Debili N, Wendling F, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, Hunt P, et al. The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood.* 1995;86(7):2516- 25.
18. Kaushansky K, Broudy VC, Lin N, Jorgensen MJ, McCarty J, Fox N, et al. Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development. *Proc Natl Acad Sci.* 1995;92(8):3234- 8.
19. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood.* 1996;87(12):4998- 5005.
20. Dameshek W. Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes. *Blood.* 4 janv 1951;6(4):372- 375.
21. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms. *Cancer.* 2009;115(17):3842- 7.
22. Passamonti F. How I treat polycythemia vera. *Blood.* 18 mai 2012;120(2):275- 284.
23. Ianotto J-C, Boyer-Perrard F, Gyan E, Laribi K, Cony-Makhoul P, Demory J-L, et al. Efficacy and safety of pegylated-interferon α -2a in myelofibrosis: a study by the FIM and GEM French cooperative groups. *Br J Haematol.* 2013;162(6):783- 91.
24. Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Adelaide J, et al. Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica.* 30 août 2013;99(1):37- 45.
25. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 7 juin 2011;118(7):1723- 1735.
26. Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood.* 15 nov 2007;110(10):3735- 3743.
27. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Masse A, Godin I, Couedic J-PL, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 1 janv 2007;109(1):71- 77.
28. James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood.* 8 juill 2008;112(6):2429- 2438.
29. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood.* 15 avr 2008;111(8):3931- 3940.
30. Shide K, Shimoda HK, Kumano T, Karube K, Kameda T, Takenaka K, et al. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK.* janv 2008;22(1):87- 95.
31. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol.* 2002;30(3):229- 36.
32. O'Keefe C, McDevitt MA, Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood.* 8 avr 2010;115(14):2731- 2739.
33. Bellanne-Chantelot C. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood.* 1 juill 2006;108(1):346- 352.
34. Olcaydu D, Harutyunyan A, Jäger R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 15 mars 2009;41(4):450- 454.

35. Jones AV, Chase A, Silver RT, Oscier D, Zoi K, Wang YL, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 15 mars 2009;41(4):446- 449.
36. Kilpivaara O, Mukherjee S, Schram AM, Wadleigh M, Mullally A, Ebert BL, et al. A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet.* 15 mars 2009;41(4):455- 459.
37. Jones AV, Campbell PJ, Beer PA, Schnittger S, Vannucchi AM, Zoi K, et al. The JAK2 46/1 haplotype predisposes to MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 19 mars 2010;115(22):4517- 4523.
38. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 1 févr 2007;356(5):459- 468.
39. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theodorides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood.* 1 févr 2008;111(3):1686- 1689.
40. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 1 févr 2009;417(3):651.
41. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor S-M, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* 25 nov 2009;24(3):665- 683.
42. Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA, et al. Calreticulin Enhances Porcine Wound Repair by Diverse Biological Effects. *Am J Pathol.* sept 2008;173(3):610- 630.
43. Shaffer KL, Sharma A, Snapp EL, Hegde RS. Regulation of Protein Compartmentalization Expands the Diversity of Protein Function. *Dev Cell.* oct 2005;9(4):545- 554.
44. Wang W-A, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* juin 2012;44(6):842- 846.
45. Neoplasms M. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle.* 2010;9(6):1051- 6.
46. Bersenev A, Wu C, Balcerek J, Jing J, Kundu M, Blobel GA, et al. Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest.* 1 juin 2010;120(6):2058- 2069.
47. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 19 avr 2010;116(6):988- 992.
48. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia.* 2010;24(10):1713- 8.
49. Vannucchi AM, Biamonte F. Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* [Internet]. 1 janv 2011 [cité 25 juill 2013]; Disponible sur: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2011.052068>
50. Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia.* 5 juin 2008;22(8):1557- 1566.
51. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, et al. Clinical utility of routine *MPL* exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol.* avr 2010;149(2):250- 257.
52. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood.* 26 févr

2008;112(1):141- 149.

53. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Burklee D, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*. 1 janv 2009;94(1):141- 144.
54. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Dengler R, Kröber A, Kern W, et al. Detection of an MPLW515 mutation in a case with features of both essential thrombocythemia and refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocytosis. *Leukemia*. févr 2008;22(2):453- 455.
55. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 1 mars 2006;107(5):1864- 1871.
56. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl^{W515L/K} mutation. *Br J Haematol*. mai 2007;137(3):244- 247.
57. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 23 mai 2013;121(21):4388- 4395.
58. Rumi E, Harutyunyan A, Elena C, Pietra D, Klampfl T, Bagienski K, et al. Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasm. *Am J Hematol*. déc 2011;86(12):974- 979.
59. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, Gangat N, Caramazza D, Siragusa S, et al. MPL mutation effect on JAK2 46/1 haplotype frequency in JAK2V617F-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010;24(4):859- 60.
60. Pietra D, Casetti I, Da Vià MC, Elena C, Milanesi C, Rumi E. JAK2 GGCC haplotype in MPL mutated myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol*. juill 2012;87(7):746- 747.
61. Pancrazzi A, Guglielmelli P, Ponziani V, Bergamaschi G, Bosi A, Barosi G, et al. A Sensitive Detection Method for MPLW515L or MPLW515K Mutation in Chronic Myeloproliferative Disorders with Locked Nucleic Acid-Modified Probes and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J Mol Diagn*. sept 2008;10(5):435- 441.
62. Johnston J, DiNardo J. *Econometric methods*. N Y. 1972;19(7):22.
63. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. *J Clin Oncol*. 10 août 2011;29(23):3179- 3184.
64. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of Calreticulin Mutations on Clinical and Hematological Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia. *Blood* [Internet]. 26 déc 2013 [cité 20 avr 2014]; Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2013-11-538983>

8 Annexes

Annexe 1 : Formulaire de consentement



Consentement du patient à la conservation et à l'utilisation d'échantillons biologiques ou tissulaires à des fins de recherche incluant éventuellement examen des caractéristiques génétiques

Madame, Monsieur,

Nous avons réalisé (ou nous allons réaliser) un/des prélèvement(s) biologique(s) et/ou tissulaire(s).

Ce(s) prélèvement(s) sont nécessaires pour le diagnostic de votre maladie et pour adapter le traitement qui vous sera proposé.

Au cas où le(s) prélèvement(s) ne serai(en)t pas utilisé(s) en totalité pour établir le diagnostic, nous conserverons les échantillons restants.

Une partie de ces échantillons sera conservée pour une éventuelle utilisation dans le cadre de votre traitement.

Une autre partie pourra, sauf opposition de votre part, être utilisée pour la recherche médicale ou scientifique, dans le respect de la confidentialité. Cette recherche peut nécessiter un examen des caractéristiques génétiques du prélèvement en relation avec votre maladie. Un tel examen nécessite votre accord, que vous pouvez exprimer en signant le présent document.

Les échantillons seront conservés au pôle Biologie - Pathologie du CHRU de BREST dont le responsable est le Dr Jean-Pierre Codet. Pour toute question vous pouvez joindre le Pr Valérie Ugo, responsable du CRB Santé de Brest, et en charge des conservations d'échantillons au pôle Biologie-Pathologie. Secrétariat : 02 98 34 70 33.

Votre accord est révoquant à tout moment. Vous pouvez, dans ce cas écrire au Pôle Biologie Pathologie - CHU Brest – Bd Tanguy Prigent – 29609 Brest Cedex.

Date de délivrance de l'information :	Accord exprimé : o OUI o NON
Le médecin :	Identité du patient (Etiquette) : ou NOM Prénom Date de naissance
Service :	
N° de téléphone :	
Signature du médecin:	Signature du patient :

Conformément à la loi (art.16-1 et 16-6 du code civil), ces prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial, ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

Les données médicales associées aux prélèvements seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition conformément à la loi.

Les informations portées sur ce document sont confidentielles et couvertes par le secret médical. A aucun moment, les données personnelles qui y figurent n'apparaîtront lors de la publication des résultats des travaux de recherche

Un exemplaire de ce document signé par le patient est conservé dans le dossier médical, un double est remis au patient et une copie est transmise au pôle Biologie-Pathologie où seront conservés les échantillons.

Annexe 2 : Fiche de renseignements motivant la recherche de mutation W515



v3 – 20/01/2012

Recherche de mutation 515 du gène MPL

FICHE DE RENSEIGNEMENTS

(joindre une prescription / ordonnance) 20 ml de sang sur EDTA

IDENTIFICATION PATIENT

NOM – Prénom :
Date de naissance :

Sexe: M F

IDENTIFICATION PRESCRIPTEUR

Nom du prescripteur :
Nom du centre/hôpital :
Ville :

Date de la demande (jj/mm/aaaa) :

CONTEXTE CLINIQUE

Suspicion de: TE Myélofibrose autre :

DONNEES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES AU DIAGNOSTIC

Date du diagnostic :

Hémogramme du diagnostic

Hémoglobine g/dL :

Hématocrite % :

VGM fl :

Leucocytes totaux G/L :

Polynucléaires neutrophiles G/L :

Myélémie (%) :

Plaquettes G/L :

Erythroblastes circulants : oui non inconnu

Dacryocytes : oui non inconnu

Splénomégalie clinique: oui non inconnu Si oui, débord splénique (cm) :

Splénomégalie échographique: oui non inconnu Si oui, taille rate (cm) :

Antécédents familiaux de SMP: oui non inconnu

EPO sérique au diagnostic : basse normale élevée inconnu

Culture des progéniteurs hématopoïétiques : fait (rouges) fait (mégas)
non fait inconnu

Résultats cultures Pousse autonome rouge Pousse autonome méga
Pas de pousse autonome Non contributif résultat inconnu

Biopsie médullaire: non faite non contributif (ou échec)
Si faite : compatible SMP non compatible SMP
Diagnostic envisagé à la BM : myélofibrose primitive TE Autre

Caryotype: fait non fait inconnu Si fait, résultat :

JAK2 V617F : négatif positif Si positif, % si quantifié :

Date de la recherche :

Ville/Laboratoire dans laquelle a été pratiquée la recherche :

Consentement pour analyse moléculaire signé ou formulaire de non opposition remis au patient :
oui (joindre une copie avec la prescription) non

CHU de Brest – Laboratoire d'Hématologie -Bd Tanguy Prigent - 29200 BREST
Tel Secrétariat : 02 98 34 70 33 ou 02 98 14 51 51 - Fax: 02 98 14 51 48 valerie.ugo@chu-brest.fr

Annexe 3 : Recueil des informations clinico-biologiques effectué pour chaque recherche de mutation de MPL W515

Recueil des renseignements des patients ayant eu une recherche de mutation 515 du gène MPL

Identification patient

NOM – Prénom – Sexe- Date de naissance

Identification prescripteur

Nom du prescripteur / Date de la demande (jj/mm/aaaa)/ Nom du centre (hôpital)/ Ville

Consentement biologique moléculaire

1 : Au diagnostic

- **Date du diagnostic**

- **Indication de la demande**

- **Données biologiques :**

NFS au diagnostic : Hb, VGM, Ht, Pq, GB, PNN, myélémie, érythroblastes, dacryocytes

Biologie moléculaire : JAKV617F, exon12, bcr-abl, MPL

BOM

Myélogramme

Caryotype

VGI

LDH

CD34

EPO

Cultures progéniteurs érythrocytaires et mégacaryocytaires

Exclusion thrombocytose réactionnelle

Bilan de thrombophilie

- **Données cliniques**

Splénomégalie (clinique ET échographique)

Signes d'hyperviscosité ? Erythrose faciale ? Prurit ? Erythromélgie ?

Signes liés à l'hyperviscosité : si oui, lesquels ? Signes généraux ?

Thrombose, si oui, thr artérielle ou veineuse ? Quel type et quand ?

Commentaires cliniques : comorbidités (HTA, cancer, autres pathologies à signaler)

Traitement en cours : antiaggrégant ? Chimiothérapie ? Allogreffé ?

2. Evolution

Transformation hématologique ?

Date des dernières nouvelles

NFS

Splénomégalie et autres éléments cliniques

Thrombose post diagnostic

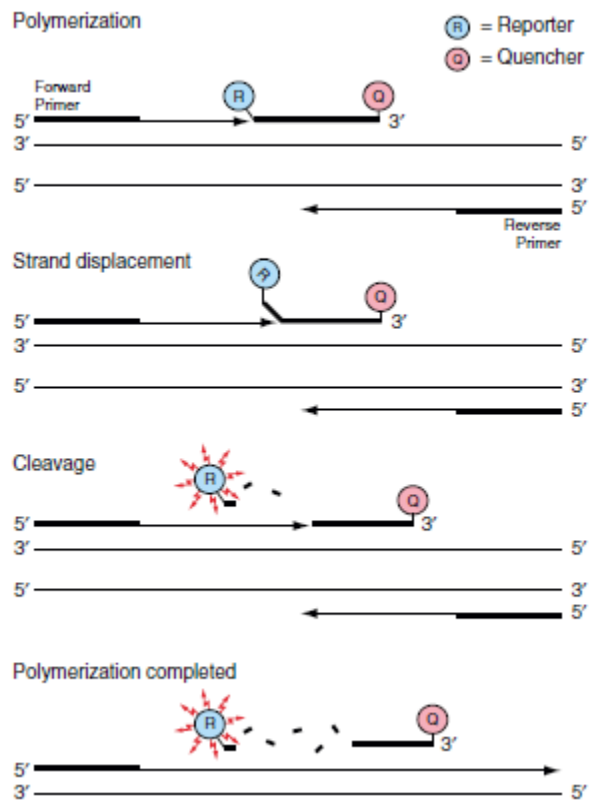
CD34

(Myélo, caryotype, BOM)

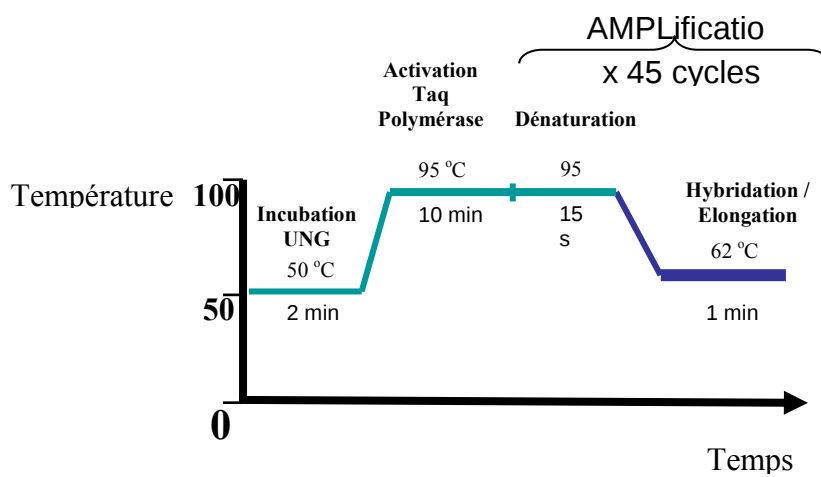
Traitement actuel

Décès? Si oui, date et cause du décès ?

Annexe 4a : Principe des sondes Taqman



Annexe 4b : Programme de la PCR en temps réel



Annexe 5 : Séquence de l'insert MPL dans les plasmides

MPL échantillons internationaux design Carole

07/2010

gaggctctgtgtctcaggaggtgggcctggcacgtttctctcgggcagagcgtgatcccgt
tagggagaggctctcggtagggcgctctatcctggtgctgggaagcgtgttttctgceg
gtggggctctttgtgggaatctccgaccgcctggggattcggagctgcaggatttgggtc
aaacagacgctgggctatcgaagccccgacgcgggcacccgacgcttctttgctcagg
tgcctggagccgcctctcggggcccgaggagggaccctggagctgcgcccgcgatctcgt
accgtttacagctgcgcgccaggctcaacggccccacctaaccaaggtccctggagctcgt
ggtcggacccaactagggtggagaccgccaccgagaccggtgaggcaagccccggccgca
ccaaagccgcacagcgcctgcgccagggactgggcgcgggtgcgagtgggggcggggctc
ggagagggggcgaggcgccggggcgccgagagggggcggggccctgacctgcggggccgacgg
ctgcgcaggtgccgcagtgcccagggggcgccgagggggcggggcccagagtaggggctggc
tgatgagggcggggctccggccccgggtggggccgaagtctgacctttttgtctcctagc
ctggatctccttggtgaccgctctgcacttagtgctgggcctcagcgcctcctgggcct
gctgctgctgaggtggcagtttctgcacactacaggtaccgcccccgccaggcaggaga
ctggcggtggaccaggtggagccgaaggcctgtaaacaggcattcttggttcgctctgtg
acccagatctccgtccaccgcccgtgcgcacctacggcttcgccacttctctgcacgtca

couple 1

primers sens : MPLex9-10DnaS1

gcacgcttctttgctcagg

Primer anti sens : MPLex9-10DnaAS1

Cgcacctacggcttcgccactt

Taille : 670 bp

couple2

primers sens : MPLex9-10DnaS2

caccgcacgcttctttgctcagg

Primer anti sens : MPLex9-10DnaAS2

Gatctccgtccaccgcccgtg

Taille : 650 bp

Annexe 6 : Calcul du nombre de copies d'allèle MPL contenu dans les plasmides

Example: Creating a Standard Curve with a Plasmid DNA Template²

Background

Prepare a standard curve in which the cloned β -actin sequence is present at 300,000 copies, 30,000 copies, 3,000 copies, 300 copies and 30 copies. The plasmid size is 15,000 bp. The stock of plasmid DNA was determined to be 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ by spectrophotometric analysis. The PCR reactions are set-up such that 5 μL of plasmid DNA are pipetted into each PCR reaction.

Step 1

Calculate the mass of a single plasmid molecule.

Insert the plasmid size value into the formula below (see page 8 for derivation of this formula):

$$m = \left[n \right] \left[\frac{1.096 \text{e-}21 \text{ g}}{\text{bp}} \right] \quad \text{where: } n = \text{plasmid size (bp)}$$

$m = \text{mass}$
 $\text{e-}21 = \times 10^{-21}$

Note: Use the size of the entire plasmid (plasmid + insert) in the calculation above instead of the size of the insert alone.

$$\text{Mass of one plasmid molecule} = \left[\frac{15,000 \text{ bp}}{\text{bp}} \right] \left[\frac{1.096 \text{e-}21 \text{ g}}{\text{bp}} \right] = 1.64 \text{e-}17 \text{ g}$$

Step 2

Calculate the mass of plasmid containing the copy #s of interest, that is 300,000 to 30 copies.

$$\text{Copy \# of interest} \times \text{mass of single plasmid} = \text{mass of plasmid DNA needed}$$

For example, mass of plasmid DNA containing 300,000 copies of β -actin sequence is as follows.

$$\left[\frac{1.64 \text{e-}17 \text{ g}}{\text{copy}} \right] \left[300,000 \text{ copies} \right] = 4.92 \text{e-}12 \text{ g}$$

The following table presents the calculated plasmid masses needed to achieve the copy numbers of interest.

Copy #		Mass of plasmid DNA (g)
300,000	$\times 1.64 \text{e-}17 \text{ g}$	4.92e-12
30,000		4.92e-13
3,000		4.92e-14
300		4.92e-15
30		4.92e-16

Step 3

Calculate the concentrations of plasmid DNA needed to achieve the copy#s of interest. Divide the mass needed (calculated in Step 2) by the volume to be pipetted into each reaction.

In this example, 5 μ L of plasmid DNA solution is pipetted into each PCR reaction. Calculate the concentration of gDNA needed to achieve the required masses of gDNA.

Copy #	Mass of plasmid DNA needed (g)	+ 5 μ L	Final concentration of plasmid DNA (g/ μ L)
300,000	4.92e-12		9.84e-13
30,000	4.92e-13		9.84e-14
3,000	4.92e-14		9.84e-15
300	4.92e-15		9.84e-16
30	4.92e-16		9.84e-17

Step 4

Prepare a serial dilution of the plasmid DNA.

Cloned sequences are highly concentrated in purified plasmid DNA stocks. A series of serial dilutions must be performed to achieve a working stock of plasmid DNA for quantitative PCR applications. The table on page 7 shows that the first 3 dilutions (each 1:100) were prepared so that the plasmid would be at a workable concentration, that is 2e-12 grams/ μ L or 1.32e5 copies/ μ L.

Once the plasmid is at a workable concentration, use the following formula to calculate the volume needed to prepare the 300,000 copy standard dilution (Dilution #4).

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Dilution #4

(see table below for C_1 , C_2 , V_1 and V_2 values)

$$\left[\frac{2\text{e-}12 \text{ g}}{\mu\text{L}} \right] \left[V_1 \right] = \left[\frac{9.84\text{e-}13 \text{ g}}{\mu\text{L}} \right] \left[100 \mu\text{L} \right]$$

$$V_1 = 49.2 \mu\text{L}$$

$$\text{Volume of diluent} = 100 \mu\text{L} - 49.2 \mu\text{L} = 50.8 \mu\text{L}$$

To achieve the final volume of 100 μ L, add 49.2 μ L of stock gDNA to 50.8 μ L of diluent.

Note: The diluent can be sterile 1X TE (1mM Tris, 0.1mM EDTA, pH8.0) or sterile, nuclease-free H₂O.³

Dilutions 5 to 8 were calculated using the same types of calculations as Dilution #4 above.

Dilution #	Source of plasmid DNA for dilution	Initial conc. (grams/ μ L) C₁	Volume of plasmid DNA (μ L) V₁	Volume of diluent (μ L)	Final Volume (μ L) V₂	Final conc. in (g/ μ l) C₂	Resulting copy # of β -actin sequence / 5 μ l
1	stock	2e-06	10 μ l	990 μ l	1000 μ l	2e-08	N/A
2	Dilution 1	2e-08	10 μ l	990 μ l	1000 μ l	2e-10	N/A
3	Dilution 2	2e-10	10 μ l	990 μ l	1000 μ l	2e-12	N/A
4	Dilution 3	2e-12	49.2 μ l	50.8 μ l	100 μ l	9.84e-13	300,000
5	Dilution 4	9.84e-13	10 μ l	90 μ l	100 μ l	9.84e-14	30,000
6	Dilution 5	9.84e-14	10 μ l	90 μ l	100 μ l	9.84e-15	3,000
7	Dilution 6	9.84e-15	10 μ l	90 μ l	100 μ l	9.84e-16	300
8	Dilution 7	9.84e-16	10 μ l	90 μ l	100 μ l	9.84e-17	30

In the example above, dilutions 4 to 8 would be used for the quantitative PCR application.

Derivation of DNA Mass Formula

$$m = \left[n \right] \left[\frac{1.096e-21 \text{ g}}{\text{bp}} \right]$$

The formula above was derived as follows

$$m = \left[n \right] \left[\frac{1 \cancel{\text{mole}}}{6.023e23 \text{ molecules (bp)}} \right] \left[\frac{660 \text{ g}}{\cancel{\text{mole}}} \right] = \left[n \right] \left[\frac{1.096e-21 \text{ g}}{\text{bp}} \right]$$

where:

n = DNA size (bp)

m = mass

Avogadro's number = 6.023e23 molecules / 1 mole

Average MW of a double-stranded DNA molecule = 660 g/mole

Annexe 7: Case report à propos d'un cas : description d'une nouvelle mutation de MPL

Essential thrombocythaemia (ET) and primitive myelofibrosis (PMF) belong to myeloproliferative neoplasms (MPNs). In 2006, thrombopoietin receptor mutations, or MPL, have been identified in ET and PMF. Here, we describe a novel mutation in MPL, a del 515:517 + ins(517:AAA) + mut518 C:A exon 10 MPL. This deletion occurs in the juxtamembrane domain, at a key position in the exon 10 of MPL gene conferring a spontaneous activation of the MPL.

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal disorders with an initial hit in the hematopoietic stem cell (HSCs), which confers them an independence or hypersensitivity from normal cytokine regulation. In 2005, the discovery of Jak2V617F gain of function mutation in the bcr-abl negative myeloproliferative neoplasm (MPNs) has revolutionized the MPN classification, and diagnosis criteria's (2,4,10,64,65). The Jak2V617F mutation has been found in 95% of polycythaemia vera (PV), 50-70% of essential thrombocythaemia (ET), 40-50% of primitive myelofibrosis (PMF) and in some cases of atypical MPN (2,4,64,65). Since then, other clonal markers have been searched to explain Jak2V617F negative MPNs. In 2006, mutations within exon 10 of MPL, which encodes the receptor for thrombopoietin, have been described in 3-4% of ET and in 4-8% of PMF but not in PV (66-70). A minority of patients have both the JAK2V617F and MPL mutations. (68-71). Among mutations described, there are five different mutations that affect a tryptophan residue at position 515; W515L, W515K, W515A, W515R, and W515S (66,68,69,71). Another mutation was identified, described first in familial ET, the S505N causing MPL dimerization and activation. (69). W515L and W515K are the most frequent mutations. The 515 amino acid is located in a stretch of 5 amino acids (RWQFP), which play a major role in the cytosolic conformation of MPL and prevent spontaneous activation of the receptor. Mutations of W or R are sufficient to activate the receptor (55).

We report a novel MPL mutation in a 68 years old woman. She presented in 2011 a chronic thrombocytosis with a platelet count at 559 G/L and hemoglobin and white blood cells normal. There was no case of essential thrombocytemia in her family. During the 2-year follow-up period, she always had a high count of platelets. A secondary thrombocytosis was refuted. The patient was in good conditions, without splenomegaly either clinically or after echographic examination. There was no spontaneous growth of erythroid progenitors but a low growth of megakaryocytic progenitors. Regarding molecular biology, BCR-ABL and JAK2V617F returned negative. In the context of chronic thrombocytosis JAK2V617F negative, exon 10 of MPL was studied. We searched MPLW515L and W515K mutations with Taqman allelic discrimination assay. The results were equivocal (Figure 1), showing a decreased fluorescence compared to the non-mutated allele, and showing no fluorescence for MPLW515L and MPLW515K. Further exploration was pursued with the sequencing of exon 10 MPL on a bone marrow sample. It revealed a new mutation: del 515:517 + ins(517:AAA) + mut518 C:A. This abnormalities lead to a neo-sequence with a loss of reading frame. The neo-sequence corresponds to a portion of the MPL precursor. The loss of the three amino acids at a key position may change the MPL conformation and activity and implies a spontaneous activation of the receptor. The diagnosis of ET was confirmed thanks to molecular biology. To our knowledge, it is the first time this mutation is described.

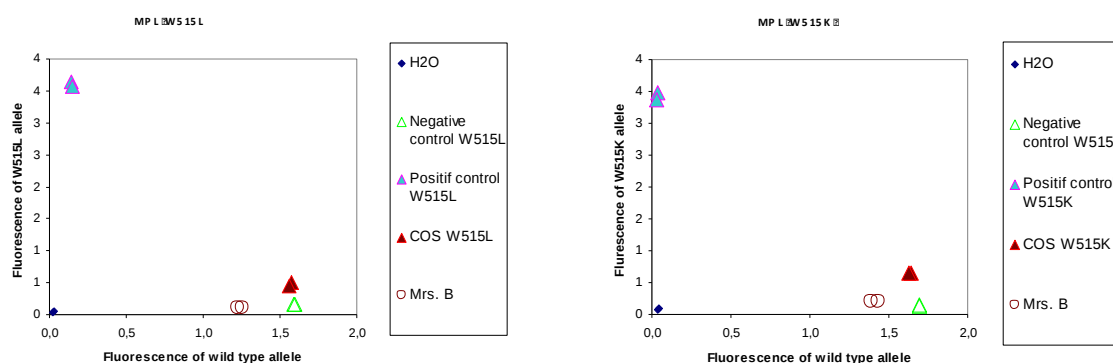


Figure 1: Decrease of fluorescence of the wild type MPL allele

1. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 27 mars 2005;434(7037):1144–1148.
2. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. avr 2005;7(4):387–397.
3. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet*. 19;365(9464):1054–1061.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 28 avr 2005;352(17):1779–1790.
5. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937–951.
6. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 15 nov 2006;108(10):3472–3476.
7. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
8. Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 15 nov 2007;110(10):3735–3743.
9. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood*. 26 févr 2008;112(1):141–149.
10. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2 juin 2008;112(3):844–847.
11. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Beelen D, Bojko P, Bürkle D, et al. Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*. janv 2009;94(1):141–144.
12. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 1 mars 2006;107(5):1864–1871.

Annexe 8 : Résultats de la quantification de MPL W515L/K chez 41 patients

NOM codé	PRENOM codé	Sexe	CENTRE	Diagnostic	W515L	% W515L	W515K	% W515K
FRI	YV	F	ANGERS	PMF	oui	36,7	non	na
VIV	GE	M	ANGERS	PMF	oui	61,1	non	na
GIR	CH	M	ANGERS	PMF	oui	74,4	non	na
BOR	LU	F	ANGERS	TE	non	na	oui	1,2
BOU	RO	M	ANGERS	PMF	non	na	oui	61,3
MIG	CH	M	ANGERS	PMF	non	na	oui	1,8
ALI	MA	M	ANGERS	PMF	oui		non	na
MEN	AL	F	BREST	TE	oui	12,9	non	na
BED	CE	F	BREST	TE	oui	13,8	non	na
LAC	CAT	F	BREST	TE	oui	16,1	non	na
LEG	BE	M	BREST	PMF	oui	29,6	non	na
OLL	JE	M	BREST	PMF	oui	59	non	na
MAR	CH	M	BREST	PMF	oui	88,2	non	na
DEV	JE	F	BREST	TE	non	na	oui	45,5
ROB	MI	M	BREST	PMF	non	na	oui	16,4
VAU	GE	F	BREST	TE	non	na	oui	26,2
PIN	HE	F	CRETEIL		oui	2,68	non	na
BRA	AL	M	CRETEIL		oui	59,08	non	na
LES	RE	F	CRETEIL		oui	49,03	non	na
FOR	BRO	F	CRETEIL		oui	21,35	non	na
AYD	AR		CRETEIL		oui	34,11	non	na
BIN	AN	F	CRETEIL		oui	51,98	non	na
RON	PI	F	CRETEIL		oui	5,55	non	na
TAC	JO	F	CRETEIL		oui	29,02	non	na
DEM	SI	F	CRETEIL		oui	33,21	non	na
ROC	BE	M	CRETEIL		oui	89,61	non	na
PIN	JA	F	CRETEIL		oui	60,02	non	na
L-C	9/10		CRETEIL		oui	14,79	non	na
PAR	MO	M	CRETEIL		oui	36,65	non	na
DOU	JE	M	CRETEIL		oui	18,42	non	na
JUR	MI	F	CRETEIL		oui	44,7	non	na
DIO	JA	M	CRETEIL		oui	66,82	non	na
FER	IS	F	CRETEIL		oui	60,01	non	na
ELK	YA		CRETEIL		oui	81,28	non	na
SIM	NA	F	NANTES	TE	oui	4,8	non	na
LAH	PA	M	NANTES	MFP	oui	37,14	non	na
BEI	BE	F	NANTES	TE	oui	39,9	non	na
MA	BRO	F	POITIERS	TE	oui	1,3	non	na
LAV	JE	M	RENNES	TE	oui	3	non	na
BOU	JE	M	RENNES	TE	oui	23,1	non	na
COU	MA	M	RENNES	TE	non	na	oui	18,2
LER	JU	F	ST BRIEUC	TE	oui	16,5	non	na
DAR	LO	F	St MALO	TE	oui		non	na

Nom - Prénom : Lamar Estelle

Titre de la thèse :

Recherche des mutations de MPL dans les syndromes myéloprolifératifs : étude rétrospective multicentrique des analyses effectuées au CHU de Brest

Résumé de la thèse :

Les mutations de MPL sont rares et retrouvées principalement dans deux syndromes myéloprolifératifs: 3% des cas de Thrombocytemie Essentielle et 5% des cas de Myélofibrose Primitive. Nous avons réalisé une étude rétrospective multicentrique portant sur les 326 recherches de mutations de MPL effectuées au CHU de Brest entre février 2009 et septembre 2013. Le but principal de l'étude était de décrire les phénotypes des patients mutés et non mutés et de mettre au point la quantification des allèles mutés MPLW515L/K. Nous avons retrouvé une corrélation entre le % MPL et le phénotype, avec un plus fort % MPL dans les Myélofibrose Primitive que dans les Thrombocytemie Essentielle.

MOTS CLÉS :

MPL

QUANTIFICATION

% MPL W515

SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS,

THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE

MYELOFIBROSE PRIMITIVE

JURY

PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur Jean-Marie Bard
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Madame le Professeur Valérie Ugo
Faculté de Médecine de Brest

Monsieur le Docteur Jean-Christophe Ianotto
Faculté de Médecine de Brest

Madame le Docteur Aurélie Chauveau
Faculté de Médecine de Brest

Monsieur le Professeur Stéphane Giraudier
Faculté de Médecine de Paris-Est-Créteil

**Adresse de l'auteur : 9 avenue du maréchal de Lattre de Tassigny, 92100
Boulogne**