

2015-2016

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

D.E.S. d'Hématologie Clinique

La Numération des Cellules CD34+ Circulantes Permet de Différencier la Myélofibrose Primitive des Autres Néoplasies Myéloprolifératives BCR-ABL Négatives

(Circulating CD34+ Cell Count Differentiates Primary
Myelofibrosis from Other Philadelphia-Negative
Myeloproliferative Neoplasms: a Pragmatic Study)

ORVAIN Corentin

Né le 28 novembre 1985 à Granville (50)

Sous la direction de M. Franck GENEVIEVE

Membres du jury

Monsieur le Professeur Norbert IFRAH	Président
Monsieur le Docteur Franck GENEVIEVE	Directeur
Monsieur Le Professeur Philippe GUARDIOLA	Membre
Madame le Professeur Mathilde HUNAUT-BERGER	Membre
Madame le Professeur Valérie UGO	Membre

Soutenue publiquement le :
27 octobre 2016



UFR SANTÉ

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Corentin ORVAIN
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **15/09/2016**

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'C' and 'O' followed by a horizontal line.

LISTE DES ENSEIGNANTS DE L'UFR SANTÉ D'ANGERS

Directeur de l'UFR : Pr Isabelle RICHARD

Directeur adjoint de l'UFR et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric LAGARCE

Directeur du département de médecine : Pr Nicolas LEROLLE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie	Médecine
ASFAR Pierre	Réanimation	Médecine
AUBE Christophe	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
AUDRAN Maurice	Rhumatologie	Médecine
AZZOUZI Abdel Rahmène	Urologie	Médecine
BARON-HAURY Céline	Médecine générale	Médecine
BARTHELAIX Annick	Biologie cellulaire	Médecine
BATAILLE François-Régis	Hématologie ; transfusion	Médecine
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
BEAUCHET Olivier	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
BENOIT Jean-Pierre	Pharmacotechnie	Pharmacie
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
BIZOT Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique	Médecine
BONNEAU Dominique	Génétique	Médecine
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie	Médecine
BRIET Marie	Pharmacologie	Médecine
CAILLIEZ Eric	Médecine générale	Médecine
CALES Paul	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CHABASSE Dominique	Parasitologie et mycologie	Médecine
CHAPPARD Daniel	Cytologie et histologie	Médecine
CONNAN Laurent	Médecine générale	Médecine
COUTANT Régis	Pédiatrie	Médecine
COUTURIER Olivier	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie	Médecine
DARSONVAL Vincent	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
DE BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire	Médecine
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique	Médecine
DIQUET Bertrand	Pharmacologie	Médecine
DUVAL Olivier	Chimie thérapeutique	Pharmacie
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie	Médecine
ENON Bernard	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
EVEILLARD Mathieu	Bactériologie-virologie	Pharmacie
FANELLO Serge	Épidémiologie ; économie de la santé et prévention	Médecine
FAURE Sébastien	Pharmacologie physiologie	Pharmacie
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie	Médecine
FURBER Alain	Cardiologie	Médecine
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie	Médecine
GARNIER François	Médecine générale	Médecine
GARRE Jean-Bernard	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie d'adultes	Médecine
GRANRY Jean-Claude	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion	Médecine
GUILLET David	Chimie analytique	Pharmacie

HAMY Antoine	Chirurgie générale	Médecine
HUEZ Jean-François	Médecine générale	Médecine
HUNAUULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion	Médecine
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion	Médecine
JARDEL Alain	Physiologie	Pharmacie
JEANNIN Pascale	Immunologie	Médecine
JOLY-GUILLOU Marie-Laure	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie	Médecine
LAGARCE Frédéric	Biopharmacie	Pharmacie
LARCHER Gérard	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation	Médecine
LAUMONIER Frédéric	Chirurgie infantile	Médecine
LEFTHERIOTIS Georges	Physiologie	Médecine
LEGRAND Erick	Rhumatologie	Médecine
LERMITE Emilie	Chirurgie générale	Médecine
LEROLLE Nicolas	Réanimation	Médecine
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
MARCHAIS Véronique	Bactériologie-virologie	Pharmacie
MARTIN Ludovic	Dermato-vénéréologie	Médecine
MENEI Philippe	Neurochirurgie	Médecine
MERCAT Alain	Réanimation	Médecine
MERCIER Philippe	Anatomie	Médecine
MILEA Dan	Ophthalmologie	Médecine
PAPON Nicolas	Parasitologie mycologie	Pharmacie
PASSIRANI Catherine	Chimie générale	Pharmacie
PELLIER Isabelle	Pédiatrie	Médecine
PICHARD Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales	Médecine
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire	Médecine
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile	Médecine
PROCACCIO Vincent	Génétique	Médecine
PRUNIER Fabrice	Cardiologie	Médecine
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
RICHOMME Pascal	Pharmacognosie	Pharmacie
RODIEN Patrice	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROHMER Vincent	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques	Médecine
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail	Médecine
ROUGE-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROUSSEAU Pascal	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique	Médecine
ROUSSELET M.-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique ; médecine d'urgence	Médecine
SAINT-ANDRE Jean-Paul	Anatomie et cytologie pathologiques	Médecine
SAULNIER Patrick	Biophysique pharmaceutique et biostatistique	Pharmacie
SENTILHES Loïc	Gynécologie-obstétrique	Médecine
SERAPHIN Denis	Chimie organique	Pharmacie
SUBRA Jean-François	Néphrologie	Médecine
UGO Valérie	Hématologie ; transfusion	Médecine
URBAN Thierry	Pneumologie	Médecine
VENIER Marie-Claire	Pharmacotechnie	Pharmacie
VERNY Christophe	Neurologie	Médecine
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
ZAHAR Jean-Ralph	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
ZANDECKI Marc	Hématologie ; transfusion	Médecine

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANNAIX Véronique	Biochimie et biologie moléculaires	Pharmacie
ANNWEILER Cédric	Gériatrie et biologie du vieillissement	Médecine
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie	Médecine
BAGLIN Isabelle	Pharmaco-chimie	Pharmacie
BASTIAT Guillaume	Biophysique et biostatistique	Pharmacie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie	Médecine
BELIZNA Cristina	Médecine interne	Médecine
BELLANGER William	Médecine générale	Médecine
BENOIT Jacqueline	Pharmacologie et pharmacocinétique	Pharmacie
BIGOT Pierre	Urologie	Médecine
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion	Médecine
BOISARD Séverine	Chimie analytique	Pharmacie
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie	Médecine
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie	Médecine
CASSEREAU Julien	Neurologie	Médecine
CHEVAILLER Alain	Immunologie	Médecine
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire	Médecine
CLERE Nicolas	Pharmacologie	Pharmacie
CRONIER Patrick	Chirurgie orthopédique et traumatologique	Médecine
DE CASABIANCA Catherine	Médecine générale	Médecine
DERBRE Séverine	Pharmacognosie	Pharmacie
DESHAYES Caroline	Bactériologie virologie	Pharmacie
DINOMAS Mickaël	Médecine physique et de réadaptation	Médecine
DUCANCELLE Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
FERRE Marc	Biologie moléculaire	Médecine
FLEURY Maxime	Immunologie	Pharmacie
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie	Médecine
HELESBEUX Jean-Jacques	Chimie organique	Pharmacie
HINDRE François	Biophysique	Médecine
JEANGUILLAUME Christian	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé	Médecine
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière	Médecine
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire	Médecine
LANDREAU Anne	Botanique	Pharmacie
LE RAY-RICHOMME Anne-Marie	Valorisation des substances naturelles	Pharmacie
LEPELTIER Elise	Chimie générale Nanovectorisation	Pharmacie
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire	Médecine
LIBOUBAN Hélène	Histologie	Médecine
MALLET Sabine	Chimie Analytique et bromatologie	Pharmacie
MAROT Agnès	Parasitologie et mycologie médicale	Pharmacie
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction	Médecine
MESLIER Nicole	Physiologie	Médecine
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie	Médecine
NAIL BILLAUD Sandrine	Immunologie	Pharmacie
PAPON Xavier	Anatomie	Médecine
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et imagerie médicale	Médecine
PECH Brigitte	Pharmacotechnie	Pharmacie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie	Médecine
PETIT Audrey	Médecine et santé au travail	Médecine
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie	Médecine
PRUNIER Delphine	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine
RIOU Jérémie	Biostatistique	Pharmacie
ROGER Emilie	Pharmacotechnie	Pharmacie
SCHINKOWITZ Andréas	Pharmacognosie	Pharmacie
SIMARD Gilles	Biochimie et biologie moléculaire	Médecine

TANGUY-SCHMIDT Aline
TRICAUD Anne
TURCANT Alain

Hématologie ; transfusion
Biologie cellulaire
Pharmacologie

Médecine
Pharmacie
Médecine

AUTRES ENSEIGNANTS

AMIARD Stéphane
AUTRET Erwan
BRUNOIS-DEBU Isabelle
CAVAILLON Pascal
CHIKH Yamina
FISBACH Martine
LAFFILHE Jean-Louis
LETERTRE Elisabeth
O'SULLIVAN Kayleigh

Informatique
Anglais
Anglais
Pharmacie Industrielle
Économie-Gestion
Anglais
Officine
Coordination ingénierie de formation
Anglais

Médecine
Médecine
Pharmacie
Pharmacie
Médecine
Médecine
Pharmacie
Médecine
Médecine

Au Président, Monsieur le Professeur Norbert Ifrah,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury et de juger ce travail et ce malgré vos hautes responsabilités. Mais au-delà de cela, je tiens à vous remercier pour vos enseignements cliniques et scientifiques et votre soutien inconditionnel. Vous m'avez offert des opportunités uniques.

Au Directeur de Thèse, Monsieur le Docteur Frank Genevieve,

Je te remercie de m'avoir proposé ce travail, de m'avoir aidé à le développer et de m'avoir soutenu jusqu'à sa publication. Je suis reconnaissant pour tout ce que tu m'as appris sur l'Hématologie avec toujours beaucoup d'amitié et de disponibilité.

A Monsieur le Professeur Philippe Guardiola,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie de m'avoir initié à la Science fondamentale et je vous suis reconnaissant d'encadrer mon travail de thèse de Sciences.

A Madame le Professeur Mathilde Hunault,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie de m'avoir et de continuer à m'accompagner dans mes travaux de recherche. J'ai beaucoup appris de votre pragmatisme et de votre dynamisme auprès des patients.

A Madame le Professeur Valérie Ugo,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et surtout, d'y avoir participé activement. J'espère bien que nous pourrions poursuivre des travaux de recherche dans ce domaine.

Au Docteur Damien Luque Paz, avec qui j'ai élaboré ce travail, **aux co-auteurs** de la publication issue de ce travail et **aux techniciens** des différents laboratoires qui ont réalisé les analyses.

A l'ensemble des médecins que j'ai eu l'honneur de rencontrer au cours de mon cursus et qui m'ont transmis l'ensemble de leurs savoirs, savoir-faire et savoir-être. Je tiens à remercier particulièrement les Docteurs Bouvier, Donzeau, Gardembas, Gouault, Kouatchet, Moles, Mortaza, Pellier, Pierrot, Proust, Sayegh, Schmidt, Simon, Varache. Je me rends compte en écrivant vos noms que vous êtes les seuls chez qui je me sois jamais invité.

Au Docteur Mélanie Mercier, qui m'a convaincu de venir à Angers, qui a été ma co-interne puis ma chef mais surtout une grande amie. Par la même, je remercie **mes co-internes** et plus particulièrement, Aurélien, Cécile, Christopher, Clémence, Derek, Elise, Jean, Jean-Baptiste, Jonathan, Julien, Juliette, Marie-Anne, Margot, Marine, Marion, Morgane, Sandrine, Sophie, Tessa et Tony.

A l'ensemble des équipes médicales et paramédicales qui m'ont toujours accueilli à bras ouverts, qui m'ont fait grandir et desquelles il a toujours été difficile de partir.

A mes amis angevins ou ex-angevins, JB et Héloïse, Cyril et Marie, Tin-Hinan, Morgane, Maxime et Marlène, Mélissa, et **ma colocataire**, Géraldine, je tiens surtout à m'excuser car malheureusement je ne serai pas l'interne de vos enfants.

A mes copains de fac, Charles et Aurélien, et leurs compagnes, Mathilde et Tiphaine, et David. Nous avons pris des voies divergentes (sauf peut-être Charles qui s'est rapproché de ce domaine « difficile ») mais qu'est qu'il était agréable de vous retrouver récemment.

A mes amis, Adrien, Alexis, Siméon et Adeline, Sébastien, Paul-Antoine et Marion, Jacques. Vous faites d'autres choses dans la vie et je vous en remercie. Merci de m'élever.

A mes grands-parents, Jean et Marie Orvain, qui m'ont inculqué dès le plus jeune âge les rudiments de la Science.

A ma grand-mère Mimi, à **mon oncle** Arnaud, à **ma tante** Eliane, à **mon oncle** Gilles, à **mes cousins** Guillaume et Nicolas et ma **cousine** Margot. Les repas de famille, bien que trop rares, sont toujours de grands moments pour moi.

A mes parents. Merci de m'avoir fait ainsi.

A mon frère Thibault que je remercie de me rappeler que tout doit être remis en cause. A Clémentine qui lui rend la vie heureuse. **A ma sœur** Laureline que je remercie pour sa sensibilité, sa joie de vivre et sa malice.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABL	Abelson
ASXL1	Additional sex combs like 1
BCR	Breakpoint cluster region protein
CALR	Calreticuline
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
EPO	Erythropoïétine
EPOR	Erythropoietin receptor
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
GCSFR	Granulocyte colony-stimulating factor receptor
IDH	Isocitrate dehydrogenase
Hb	Hémoglobine
Ht	Hématocrite
JAK2	Janus kinase 2
LDH	Lactate déshydrogénase
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LMMC	Leucémie myélomonocytaire chronique
LMMJ	Leucémie myélomonocytaire juvénile
MFP	Myélofibrose primitive
MMP-9	Matix MetalloProteinase-9
MPL	Myeloproliferative leukemia viral oncogene
NMP	Néoplasie Myéloproliférative
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phosphoéthanolamine
PP2A	Protein phosphatase 2A
PV	Polyglobulie de Vaquez
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SETBP1	SET binding protein 1
SF3B1	Splicing factor 3B1
SMD	Syndrome myélodysplasique
SMS/NMPs-SI	Syndrome myélodysplasique/néoplasie myéloproliférative avec sidéroblastes en couronne
SMD/NMPs-SI-T	Syndrome myélodysplasique/néoplasie myéloproliférative avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TE	Thrombocytémie essentielle
TPO	Thromopoïétine
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION	12
1. Bases moléculaires	13
1.1. JAK2	13
1.2. MPL.....	15
1.3. CALR.....	16
2. Classifications et difficultés diagnostiques persistantes	18
2.1. Polyglobulie de Vaquez	18
2.2. TE, TE pré-fibrotique et myélofibrose	21
2.3. SMD/NMP	26
3. Cellules CD34+ circulantes.....	29
3.1. Origine des cellules CD34+ circulantes au cours de la myélofibrose	30
3.2. Apport clinique au cours des NMPs BCR-ABL négatives	31
4. Synthèse et question posée.....	33
ARTICLE	35
BIBLIOGRAPHIE	47
LISTE DES FIGURES	55
LISTE DES TABLEAUX	55
ANNEXE : VERSION PUBLIEE DE L'ARTICLE	56

INTRODUCTION

Les néoplasies myéloprolifératives (NMPs) sont caractérisées par la prolifération clonale d'une ou plusieurs lignées myéloïdes avec un risque de transformation en leucémie aiguë. Plusieurs anomalies génétiques ont été identifiées dans les NMPs conduisant à une prolifération anormale de précurseurs myéloïdes. La translocation t(9;22)(q34;q11), ou chromosome Philadelphie (Ph1), caractérisant la leucémie myéloïde chronique (LMC) est connue de longue date. Elle est à l'origine du transcrit de fusion *BCR-ABL* dont la protéine chimérique provoque l'activation permanente de la protéine kinase ABL.¹ Pour les NMPs BCR-ABL négatives principales, qui regroupent principalement la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP), les anomalies oncogénétiques initiatrices sont de découverte plus récente, et ont en commune de provoquer l'activation permanente de protéines à activité tyrosine kinase.²

La PV est une NMP acquise responsable d'une polyglobulie et de manière inconstante, d'une thrombocytose, d'une hyperleucocytose et d'une splénomégalie. Les progéniteurs de la PV sont hypersensibles à l'érythropoïétine (EPO) et font l'objet d'une prolifération accrue. La TE est une NMP caractérisée par une hyperplasie mégacaryocytaire et une thrombocytose et constitue souvent un diagnostic d'exclusion.³ La MFP est quant à elle caractérisée par une prolifération anormale de mégacaryocytes, une sécrétion cytokinique accrue, une fibrose médullaire, une circulation anormale de précurseurs hématopoïétiques et une hématopoïèse extra-médullaire.⁴ Alors que les patients atteints de PV ou de TE sont essentiellement à risque de complications thromboemboliques dans les premières années suivant le diagnostic et à risque de transformation en myélofibrose ou d'emblée en leucémie aiguë myéloblastique ensuite, le risque principal des patients atteints de MFP est celui de transformation leucémique à court terme.⁵

1. Bases moléculaires

Alors que les bases moléculaires de la LMC sont établies depuis de nombreuses années, la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des autres NMPs a été plus tardive. La mutation V617F du gène *JAK2* à l'origine de la grande majorité des PVs a été décrite en 2005.² Elle fut suivie de la découverte des mutations au niveau de l'exon 12 de *JAK2* et au niveau du gène *MPL* et puis très récemment de l'identification des mutations du gène codant pour la calréticuline (CALR) permettant désormais la mise en évidence d'une mutation initiatrice chez la plupart des patients atteints de NMP.⁶⁻⁹ L'ensemble des NMPs sont caractérisées par une signature d'expression génique où les gènes cibles de la voie JAK-STAT sont surexprimés. Par contre, l'expression transcriptionnelle différentielle d'autres voies oncogénétiques peut expliquer des phénotypes différents.¹⁰

1.1. JAK2

La perte d'hétérozygotie (disomie uniparentale) du bras court du chromosome 9 (9p) a été retrouvée comme un phénomène redondant chez un certain nombre de patients atteints de PV.¹¹ L'exploration de cette région va permettre la découverte de la mutation ponctuelle V617F au niveau de l'exon 14 du gène *JAK2* présente chez 95% des patients atteints de PV.^{2,12} Cette anomalie se situe au niveau du domaine JH2 impliqué dans l'auto-inhibition de l'activité tyrosine kinase de *JAK2* et va provoquer l'auto-phosphorylation constitutive de *JAK2*.^{12,13} Ainsi, le mutant *JAK2* est capable d'activer la voie STAT5 de manière permanente, à l'origine d'une hypersensibilité à l'EPO et à une prolifération accrue.^{2,12-14} Dans la plupart des cas la mutation est à l'état hétérozygote mais peut être à l'état homozygote chez certains patients, après recombinaison mitotique (**Figure 1**).¹²⁻¹⁴ Ce phénomène, généralement présent chez les patients dont l'hémopathie évolue plus longtemps, est de survenue probablement secondaire.¹² La recherche de la mutation V617F de *JAK2* par PCR dans les granulocytes sanguins est

devenue depuis, l'examen de première intention dans l'exploration d'une polyglobulie, en l'absence de cause secondaire évidente.¹⁵

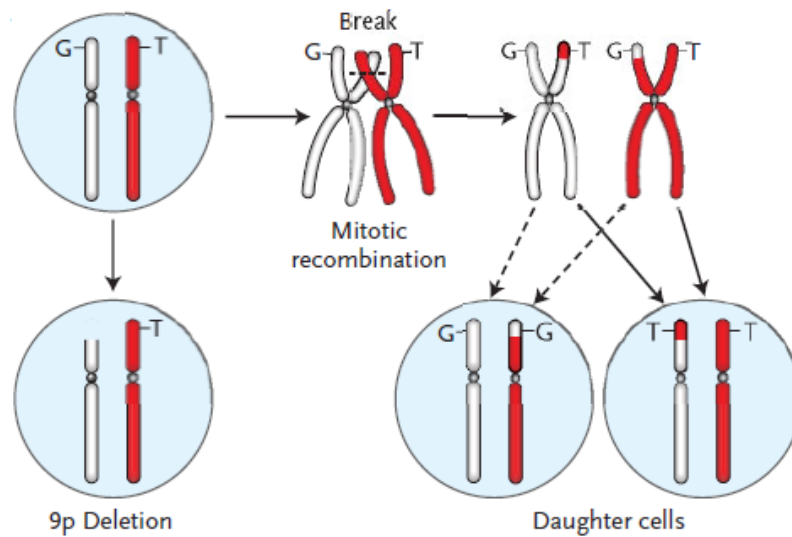


Figure 1. Perte d'hétérozygotie de 9p – délétion et recombinaison mitotique. D'après Kralovics et al.¹²

Des mutations de *JAK2* sont aussi retrouvées chez 56 à 59 % des patients atteints de TE et chez 50 à 69 % des patients atteints de MFP.^{8,9,14} Une même mutation peut aboutir à des phénotypes différents comme au cours de NMPs familiales où les membres d'une même famille vont présenter des profils phénotypiques différents.¹⁶ Les TE et les PVs liées à la mutation *JAK2V617F* font partie d'un continuum dont l'expression dépend d'autres événements, qu'ils soient environnementaux ou génétiques (carence martiale, sexe, etc.).¹⁷ Il semble exister une relation dose/phénotype en cas de mutation *JAK2V617F* : une expression peu importante de la mutation *JAK2V617F* provoque plutôt une expansion mégacaryocytaire et un phénotype proche d'une TE alors qu'une expression forte provoque une prolifération uniquement érythrocytaire (**Figure 2**).¹⁷⁻¹⁹ Alors que le taux de mutation *JAK2V617F* ne modifie pas le risque thromboembolique ou de transformation leucémique, il semble favoriser la transformation en myélofibrose même si des événements génétiques additionnels semblent nécessaires.²⁰⁻²²

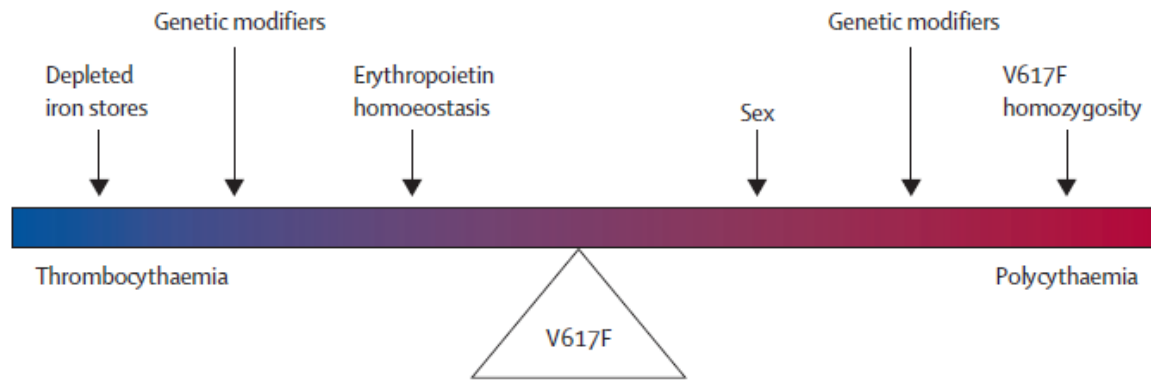


Figure 2. Modèle de continuum pour les TEs et les PVs avec mutation *JAK2V617F*. D'après Campbell et *al.*¹⁷

Chez les patients atteints de PV sans mutation *JAK2V617F*, des mutations fonctionnellement similaires de l'exon 12 de *JAK2* ont été mises en évidence.⁷ Ces mutations sont exclusivement retrouvées chez des patients atteints de PV et présentant une polyglobulie marquée et isolée et un taux d'EPO sérique effondrée.^{7,23,24} Par contre, l'histoire naturelle n'est pas différente de celle observée en cas de mutation V617F.²⁴ Grâce à l'élaboration de techniques simples et standardisées, des mutations de l'exon 12 de *JAK2* sont désormais recherchées en routine chez les patients présentant une polyglobulie isolée, sans mutation V617F, avec un taux d'EPO sérique effondrée et/ou une croissance cellulaire spontanée en culture.²⁵⁻²⁷

1.2. MPL

La mise en évidence d'un processus clonal chez les patients atteints de TE et de MFP sans mutation *JAK2* laissait envisager l'existence d'autres mutations initiatrices.^{28,29} D'autres récepteurs aux cytokines – EPOR, GCSFR et MPL – agissent également sur la voie JAK-STAT. Après séquençage des parties trans et juxta membranaires de ces gènes, il est retrouvé des mutations somatiques récurrentes au niveau de l'exon 10 de MPL, les mutations *MPLW515L* et *MPLW515K*.^{6,30} Normalement, en l'absence de thrombopoïétine (TPO), la conformation du récepteur empêche sa dimérisation et son activation. Des

mutations dans le domaine juxtamembranaire RWQFP lèvent l'auto-inhibition du récepteur et provoquent l'activation constitutive de MPL.³¹⁻³³ Cela va engendrer une croissance cellulaire spontanée, en l'absence de cytokines, et une hypersensibilité à la TPO via l'activation constitutive de la voie JAK-STAT.^{6,32}

La prévalence des mutations de *MPL* est de 1 à 4% pour les patients atteints de TE et de 5 à 8% pour les patients atteints de MFP.^{30,34-37} Elles peuvent être également recherchées en routine désormais.³⁸ Comparativement aux patients ayant une mutation *JAK2V617F*, les patients avec une mutation *MPL* ont un taux d'hémoglobine plus bas et un taux de plaquettes plus haut même s'il n'existe pas de véritable différence au niveau de l'histologie médullaire.³⁴⁻³⁶ Néanmoins, l'histoire naturelle des patients n'est pas différente qu'ils aient une mutation de *JAK2* ou de *MPL* et l'impact de ces mutations sur les risques thromboembolique et de transformation leucémique est débattu.³⁵⁻³⁷ Un taux de mutation plus élevé, comme cela est observé en cas de perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 1 (1p) où se situe le gène *MPL*, est généralement associé avec une fibrose médullaire plus importante.³⁷

1.3. CALR

Chez environ 35 % des patients atteints de TE et 19 à 40 % des patients atteints de MFP une mutation de *JAK2* ou de *MPL* ne peut être mise en évidence. Récemment, des mutations du gène *CALR* ont été retrouvées chez 25 à 29 % des patients atteints de TE et chez 13 à 35% des patients atteints de MFP (**Figure 3**). Les mutations de *CALR* sont principalement de 2 types (85% des patients) : i) type 1 avec délétion de 52 paires de base (c.1092_1143del) ; ii) type 2 avec insertion de 5 paires de base (c.1154_1155insTTGTC). Elles entraînent un décalage du cadre de lecture et une modification de la séquence en acides aminés de la partie C-terminale de la protéine. Cette nouvelle séquence comporte moins d'acides aminés chargés négativement – aucun en cas de mutation de type 1 et la moitié en cas de mutation de type 2 - et diminue la

présence de la protéine dans le réticulum endoplasmique.^{8,9} Ces mutations sont mutuellement exclusives avec les mutations *JAK2* et *MPL* et initient le processus de myéloprolifération dans des modèles fonctionnels par un mécanisme encore inconnu.⁸

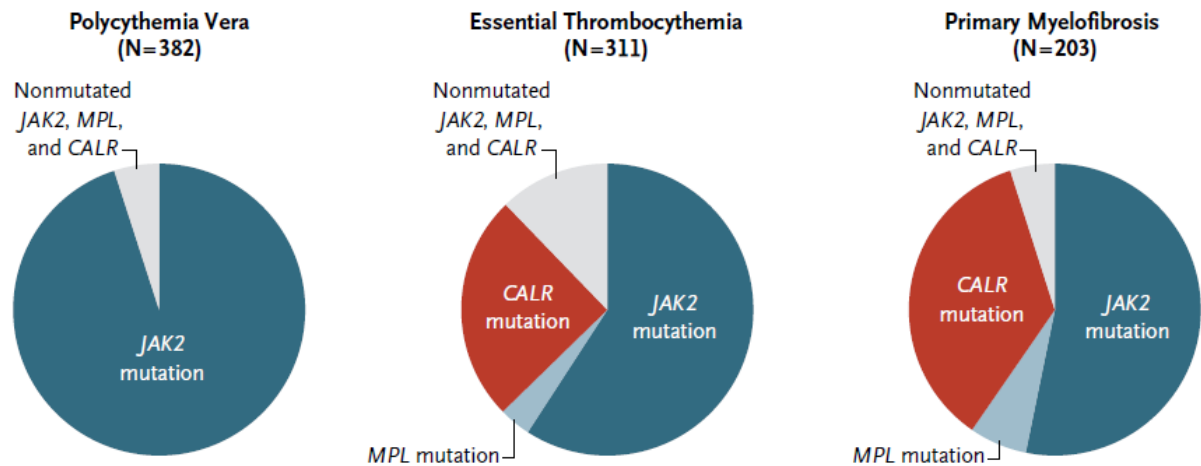


Figure 3. Répartition des mutations *JAK2*, *MPL* et *CALR* dans les NMPs sans chromosome Philadelphie. D'après Klampfl et al.⁸

Les patients avec mutation *CALR* ont le plus souvent des taux d'hémoglobine et de leucocytes inférieurs et un taux de plaquettes supérieur, un risque moindre de complication thromboembolique et une meilleure survie, comparativement aux patients avec mutation *JAK2*.^{8,9,39} Chez les patients atteints de TE, on constate une répartition plutôt équilibrée entre mutations *CALR* de type 1 et de type 2 alors que la grande majorité des patients atteints de MFP ont une mutation de type 1.³⁹⁻⁴¹ Chez les patients atteints de TE, une mutation de type 1 est à risque accru de transformation en myélofibrose par rapport aux mutations de type 2 (12,9% contre 0% à 10 ans, $p=0,007$) ou *JAK2V617F* (12,9% contre 3,3% à 10 ans).⁴¹ Par contre, chez les patients atteints de MFP, les mutations de type 2 sont associées à une blastose circulante plus importante, des événements génétiques additionnelles – mutations d'*EZH2* et *IDH* – et une survie inférieure.⁴²

Avec la découverte des mutations *CALR* il est désormais possible de diagnostiquer la grande majorité des NMPs. Les patients n'ayant aucune des 3 mutations – *JAK2*, *MPL* et

CALR – ne constituent que 6 à 12 % des patients avec TE et 4 à 5% des patients avec MFP.^{8,9} Chez ces patients, encore appelés « triple négatifs », un caryotype anormal, des mutations d'*ASXL1* ou du spliceosome sont retrouvés chez la majorité des patients avec MFP. La survie globale des patients avec MFP « triple-négative » est plus courte que pour les patients avec mutation *CALR*.^{39,43} Récemment, un séquençage de l'exome chez 69 patients « triple négatifs » a permis de mettre en évidence d'autres mutations de *MPL* ou *JAK2* chez un certain nombre de patients. Des études fonctionnelles ont pu montrer qu'il s'agissait de mutations « gain-de-fonction » mais d'efficacité inférieure aux mutations les plus courantes.^{44,45}

2. Classifications et difficultés diagnostiques persistantes

Plusieurs classifications permettent d'établir et de différencier les différentes NMPs dont la toute récente révision de la classification OMS.⁴⁶ Il reste néanmoins difficile de différencier certaines formes frontières, entre TE et PV et entre TE et myélofibrose (pré-myélofibrose). La tâche se complique d'ailleurs nettement lorsque l'on intègre les hémopathies associant des caractéristiques de NMPs et de SMDs.

2.1. Polyglobulie de Vaquez

Le diagnostic de polyglobulie de Vaquez repose sur la mise en évidence d'une polyglobulie vraie associée à un marqueur de clonalité, à savoir une mutation de *JAK2*. En plus de ces critères, la récente classification OMS de 2016 intègre l'analyse de l'histologie médullaire comme critère majeur et retire des critères mineurs la croissance endogène spontanée des colonies érythroblastiques in vitro (**Tableau I**).⁴⁶

Critères OMS 2008	
Critères majeurs	Hb >18,5 g/dl (homme) ou Hb >16,5 g/dl (femme) ou augmentation de la masse érythrocytaire > 25% au-dessus de la valeur normale
	Présence d'une mutation <i>JAK2V617F</i> ou d'une mutation de l'exon 12 de <i>JAK2</i>
Critères mineurs	Biopsie médullaire mettant en évidence une hypercellularité avec prolifération excessive des 3 lignées
	EPO sérique normale ou subnormale
	Croissance endogène spontanée de colonies érythroblastique in vitro
Le diagnostic de PV nécessite la présence des 2 critères majeurs et d'un critère mineur ou du 1er critère majeur et de 2 critères mineurs.	

Critères OMS 2016	
Critères majeurs	Hb >16,5 g/dl (homme) ou Hb >16 g/dl (femme) ou Ht >49% (homme) ou Ht >48% (femme) ou augmentation de la masse érythrocytaire > 25% au-dessus de la valeur normale
	Biopsie médullaire mettant en évidence une hypercellularité avec prolifération excessive des 3 lignées et mégacaryocytes matures et pléomorphes
	Présence d'une mutation <i>JAK2V617F</i> ou d'une mutation de l'exon de <i>JAK2</i>
Critère mineur	EPO subnormale
Le diagnostic de PV nécessite la présence des 3 critères majeurs ou des 2 premiers critères majeurs et d'un critère mineur (sauf si Hb >18,5 g/dl (hommes) ou Hb >16,5 g/dl (femmes) et 3ème critère majeur et critère mineur présents).	

Tableau I. Critères diagnostiques OMS 2008 et 2016 d'une PV.

La mise en évidence d'une augmentation de la masse sanguine par mesure isotopique (25% au-dessus de la normale supérieure) constitue le « gold standard » pour confirmer une polyglobulie vraie. Cet examen n'étant pas toujours disponible, le taux d'hémoglobine ou l'hématocrite peuvent être utilisés. Le taux d'hémoglobine manque de sensibilité puisque seulement 17 à 35% des hommes et 26 à 69% des femmes avec une masse sanguine réellement augmentée ont un taux d'hémoglobine supérieure aux seuils retenus.⁴⁷⁻⁴⁹ Il s'agit néanmoins d'un marqueur très spécifique et les hommes au-dessus de 18,5 g/dl et les femmes au-dessus de 16,5 g/dl ne justifient pas d'une détermination isotopique de la masse sanguine.⁴⁸ L'hématocrite est également un test spécifique et un seuil > 52% est quasiment toujours associé à une polyglobulie vraie et une détermination isotopique de masse sanguine peut être évitée ; celle-ci semble par contre justifiée chez tous les patients ayant un hématocrite entre 48 et 52%.⁴⁸ Elle permet

également de rectifier le diagnostic chez un certain nombre de patients atteints de PV mais se présentant avec une thrombocytose isolée.⁵⁰

L'étude de l'histologie médullaire permet dès la phase initiale la reconnaissance de signes médullaires spécifiques de PV et permet de différencier les patients atteints de PV de ceux ayant une polyglobulie réactionnelle ou une TE.⁴⁹ Ces signes incluent notamment une augmentation de la cellularité médullaire portant sur les 3 lignées, une mégacaryopoïèse accrue caractérisée par des mégacaryocytes de morphologie pléomorphe, de taille variable et avec des noyaux hyperlobés et une réaction inflammatoire stromale.⁵¹⁻⁵³ Une fibrose médullaire, principalement de grade 1, est objectivée chez 14% des patients atteints de PV. Ces patients ont le plus souvent une splénomégalie, moins de complications thromboemboliques mais un risque accru de transformation en myélofibrose.⁵⁴ Même si l'analyse de l'histologie médullaire souffre d'un manque de reproductibilité, il s'agit d'une véritable aide en cas de doute diagnostique.⁵⁵

La baisse du taux d'EPO endogène est le seul critère mineur de PV actuellement conservé. Son manque initial de standardisation rendait son utilisation controversée.⁵⁶ Une baisse du taux d'EPO endogène est très spécifique d'une PV mais des taux normaux peuvent être observés chez 13 à 20% des patients.^{49,56,57} La spécificité importante du test standardisé est néanmoins très utile pour facilement éliminer une polyglobulie secondaire.⁵⁶ La prolifération spontanée de colonies érythrocytaires, caractéristique inhérente aux PVs, a été mise à profit pour leur diagnostic. Les cultures de progéniteurs médullaires, en l'absence d'EPO, sont positives chez 73 à 93% des patients.^{57,58} Il s'agit d'un test spécifique puisqu'aucun patient atteint de polyglobulie secondaire et aucun volontaire sain ne présente de croissance cellulaire spontanée in vitro.⁵⁹ La sensibilité du test peut être augmentée en réalisant des cultures de progéniteurs provenant de la moelle osseuse et du sang périphérique.^{59,60} Ce test a montré son intérêt dans l'identification de certains patients se présentant avec une thrombocytose isolée mais dont l'évolution naturelle a bien été celle d'une PV.⁶¹

L'ensemble de ces tests diagnostiques – mesure isotopique de la masse sanguine, analyse de l'histologie médullaire, EPO endogène et cultures cellulaires – permettent de corriger le diagnostic de PV dans un certain nombre de cas où l'ensemble des critères diagnostiques habituels ne sont pas présents. Cette situation correspond à l'entité de polyglobulie masquée chez des patients ayant une histologie compatible avec le diagnostic de PV mais avec un taux d'hémoglobine trop faible. En comparaison aux patients atteints de PV « authentique », les patients avec une PV masquée constituent un groupe très hétérogène avec des patients atteints de PV précoces, ressemblant à des TE, et des patients présentant un variant plus agressif de PV. Sous réserve de cette hétérogénéité, les patients avec une polyglobulie masquée ont un taux de plaquettes plus élevé et un risque accru de complications thromboemboliques et de transformation.^{62,63}

2.2. TE, TE pré-fibrotique et myélofibrose

Les diagnostics de TE et de myélofibrose reposent principalement sur l'analyse de l'histologie médullaire (**Tableaux II et III**). L'analyse médullaire permet d'ailleurs à certains auteurs de différencier 2 entités aux évolutions différentes : TE et pré-myélofibrose (**Tableau IV**). La facilité d'effectuer le diagnostic de pré-myélofibrose est néanmoins remise en cause par d'autres groupes du fait d'un manque de reproductibilité de l'analyse de l'histologie médullaire.

Critères OMS 2008	
Critères majeurs	Plaquettes > 450 G/l Biopsie médullaire mettant en évidence une augmentation du nombre de mégacaryocytes avec présence de mégacaryocytes matures de grande taille Absence de critère OMS pour une LMC, PV, MFP, SMD ou tout autre néoplasie myéloïde Présence d'une mutation <i>JAK2V617F</i> ou tout autre marqueur de clonalité, sans argument pour une thrombocytose réactionnelle
Le diagnostic de TE nécessite la présence des 4 critères majeurs.	

Critères OMS 2016	
Critères majeurs	Plaquettes > 450 G/l Biopsie médullaire mettant en évidence une augmentation du nombre de mégacaryocytes avec présence de mégacaryocytes matures de grande taille avec des noyaux hyperlobulés sans augmentation significative des lignées granulocytaires ou érythrocytaires et avec une fibrose réticulinique minime (grade 1) Absence de critère OMS pour une LMC, PV, MFP, SMD ou tout autre néoplasie myéloïde Présence d'une mutation de <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>CALR</i>
Critère mineur	Présence d'un marqueur clonal ou absence d'argument pour une thrombocytose réactionnelle
Le diagnostic de TE nécessite la présence des 4 critères majeurs ou des 3 premiers critères majeurs et du critère mineur.	

Tableau II. Critères diagnostiques OMS 2008 et 2016 d'une TE.

Critères OMS 2008	
Critères majeurs	Biopsie médullaire mettant en évidence une prolifération mégacaryocytaire avec présence de signes d'atypie accompagnée d'une fibrose réticulinique ou collagénique Absence de critère OMS pour une LMC, PV, SMD ou tout autre néoplasie myéloïde Présence d'une mutation <i>JAK2V617F</i> ou tout autre marqueur de clonalité, sans argument pour une fibrose médullaire réactionnelle
Critères mineurs	Erythromyélocytémie Augmentation des LDHs sériques Anémie Splénomégalie

Le diagnostic de MFP nécessite la présence des 3 critères majeurs et de 2 critères mineurs.

Critères OMS 2016	
Critères majeurs	Biopsie médullaire mettant en évidence une prolifération mégacaryocytaire avec présence de signes d'atypie accompagnée d'une fibrose réticulinique ou collagénique de grade 2 ou 3 Absence de critère OMS pour une LMC, PV, TE, SMD ou tout autre néoplasie myéloïde Présence d'une mutation <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>CALR</i> , ou en l'absence d'une de ces mutations, la présence d'un marqueur clonal ou l'absence d'argument pour une myélofibrose réactionnelle
Critères mineurs	Anémie non liée à une autre cause Leucocytose $> 11 \times 10^9/l$ Splénomégalie palpable Augmentation des LDHs sériques Erythromyélocytémie

Le diagnostic de MFP nécessite la présence des 3 critères majeurs et d'au moins 1 critère mineur retrouvé à 2 occasions distinctes.

Tableau III. Critères diagnostiques OMS 2008 et 2016 d'une myélofibrose.

Critères OMS 2016	
Critères majeurs	Biopsie médullaire mettant en évidence une prolifération mégacaryocytaire avec présence de signes d'atypie sans fibrose réticulinique > 1, accompagnée d'une augmentation de la cellularité, de la prolifération granulocytaire et le plus souvent d'une diminution de l'érythropoïèse Absence de critère OMS pour une LMC, PV, TE, SMD ou tout autre néoplasie myéloïde Présence d'une mutation <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> ou <i>CALR</i> , ou en l'absence d'une de ces mutations, la présence d'un marqueur clonal ou l'absence d'argument pour une fibrose minime réactionnelle
Critères mineurs	Anémie non liée à une autre cause Leucocytose > 11 x 10 ⁹ /l Splénomégalie palpable Augmentation des LDHs sériques

Le diagnostic de préMFP nécessite la présence des 3 critères majeurs et d'au moins 1 critère mineur retrouvé à 2 occasions distinctes.

Tableau IV. Critères diagnostiques OMS 2016 d'une pré-myélofibrose primitive.

Les caractéristiques histologiques d'une TE incluent des mégacaryocytes en nombre augmenté, rassemblés de manière non-étroite, avec des noyaux hyperlobés en « ramure de cervidé » sans fibrose réticulinique. La myélofibrose est caractérisée par une prolifération des lignées mégacaryocytaires et granulocytaires avec des mégacaryocytes pléomorphes comportant des anomalies nucléaires et rassemblés de manière dense et une fibrose réticulinique puis collagenique.⁶⁴ Le diagnostic de pré-myélofibrose repose sur l'identification de plusieurs caractéristiques médullaires : une cellularité globale augmentée, des mégacaryocytes de taille moyenne à grande présentant des anomalies morphologiques, regroupés de manière dense, sans ou avec peu de fibrose réticulinique (**Figure 4**).^{65,66} L'identification précise de ces 2 entités – TE et pré-myélofibrose – est reproductible dans plus de 80% des cas, dans une étude, après analyse par différents anatomopathologistes expérimentés et dans des contextes géographiques différents.^{67,68} L'analyse de l'histologie médullaire permet l'identification des pré-myélofibroses à un stade où les manifestations clinico-biologiques (splénomégalie, taux d'hémoglobine plus faible, taux de leucocytes, plaquettes et de LDHs plus importants, nombre accru de cellules CD34+ circulantes) de myélofibrose ne sont pas toujours perceptibles.^{66,67} Les

patients atteints de pré-myélofibrose évolueront plus facilement vers une véritable myélofibrose (17% vs 9% de transformation en myélofibrose à 15 ans) et ont un pronostic globalement plus défavorable avec une mortalité accrue (56% vs 25% de mortalité à 15 ans).⁶⁶⁻⁶⁹

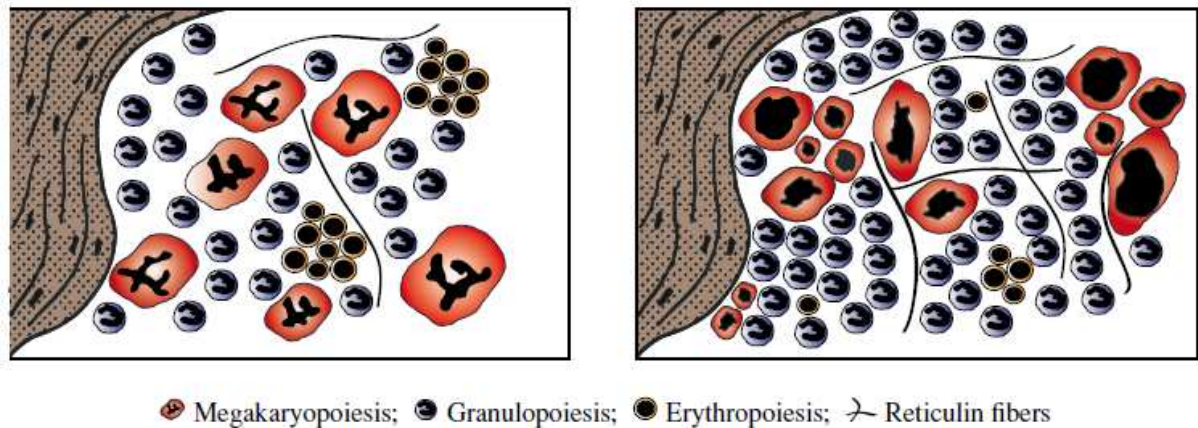


Figure 4. Représentation schématique des anomalies médullaires observées au cours de la TE (à gauche) et au cours de la prémyélofibrose (à droite). D'après Thiele et al.⁶⁸

Cette dichotomie entre TE et pré-myélofibrose semble néanmoins difficile à établir par d'autres groupes.⁷⁰⁻⁷³ Même s'il existe une bonne concordance interindividuelle dans l'évaluation d'un certain nombre de caractéristiques nécessaires au diagnostic (cellularité, nombre de regroupements de mégacaryocytes, fibrose réticulinique), il n'y a que peu de convergence quant au diagnostic final retenu : 10 à 48% de TE et 9 à 28% de pré-myélofibrose, selon les observateurs. Du fait d'un manque de précision quant au poids de chaque caractéristique médullaire dans la classification OMS, chaque anatomopathologiste attribue un poids différent pour chaque paramètre dans le diagnostic final.^{70,71} Une étude angevine a aussi pu mettre en évidence une discordance d'assignation chez 35% des patients.⁷² Ce manque de reproductibilité a encore été confirmé très récemment par 6 anatomopathologistes provenant de 5 pays européens différents avec un consensus parfait possible dans seulement 10% des cas.⁷³ De plus, le risque accru de transformation et de mortalité des patients avec une pré-myélofibrose n'est pas confirmé dans toutes les cohortes.^{70,72}

Différencier clairement TE, pré-myélofibrose et myélofibrose semble difficile par la seule analyse de l'histologie médullaire du fait de l'existence d'un continuum entre ces différentes entités.⁷⁴ Pour certains, le niveau de fibrose est finalement l'élément le plus corrélé avec la survie des patients.^{75,76} Ainsi, chez les patients présentant une thrombocytose, une classification histologique reposant sur le niveau de fibrose est proposée : (i) TE vraie sans fibrose réticulinique ; (ii) mégacaryocytes pléomorphes et/ou prolifération granulocytaire et/ou fibrose de grade 1 (TE pré-fibrotique) ; (iii) critères de TE et fibrose évidente et ; (iv) fibrose de grade 3 et 2 critères mineurs de la classification OMS.⁷³ D'autres proposent une dichotomie similaire même si les grades de fibrose sont attribués de manière différente.⁷⁴ L'adjonction d'autres paramètres que l'analyse de l'histologie médullaire pourrait permettre de mieux définir ces entités, à savoir la charge allélique mutée ou les cultures cellulaires.⁷⁷⁻⁷⁹ Aussi, le rôle de l'évaluation de la fibrose splénique par élastographie pourrait être évalué dans ce contexte.⁸⁰

2.3. SMD/NMP

Il existe un certain nombre d'entités associant caractéristiques des SMDs et des NMPs : leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ), LMC atypique, syndrome myélodysplasique/néoplasie myéloproliférative avec sidérobastes en couronne et thrombocytose (SMDs/NMPS-SI-T) et SMDs/NMPs non classables (**Figure 5**).^{81,82} A l'heure actuelle, il n'a été identifié de mutations spécifiques que pour certaines entités comme les mutations de *SF3B1* et de *JAK2* au cours des ARSI-T et les mutations de *SETBP1* dans la LMC atypique (**Figure 6**).⁸¹

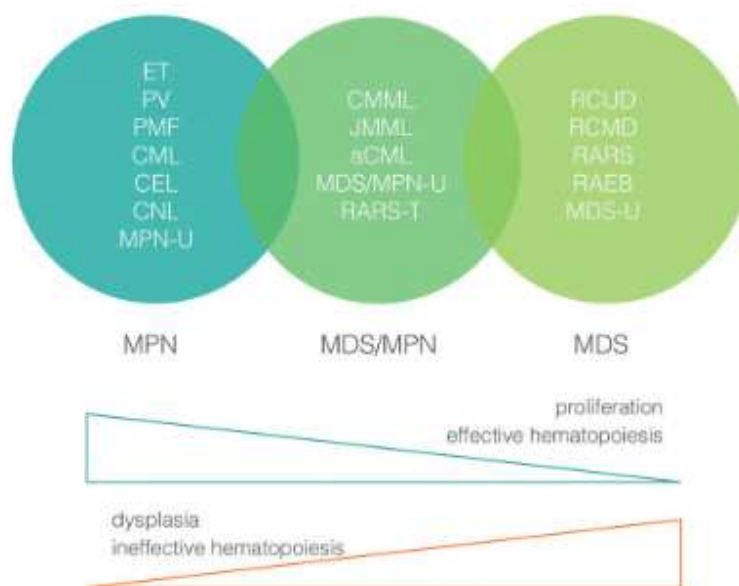


Figure 5. NMPs, SMDs et formes frontières. D'après Mughal et al.⁸¹

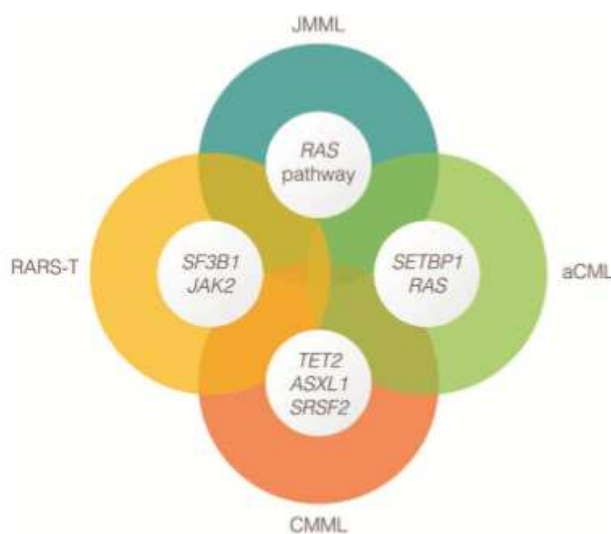


Figure 6. Anomalies moléculaires récurrentes dans les NMPs/SMDs. D'après Mughal et al.⁸¹

Le diagnostic de LMMC nécessite la présence d'une monocytose circulante persistante > 1 G/l avec des monocytes > 10% de la formule leucocytaire. La dysplasie d'au moins une lignée sanguine est fréquemment observée. On différencie différentes sous-entités selon

le nombre de blastes médullaires (<5% : LMMC-O ; 5 à 10% : LMMC-I ; 10 à 20% LMMC-II) et selon le caractère plus myélodysplasique (leucocytes <13 G/l) ou plus myéloprolifératif (leucocytes >13 G/l).⁸³⁻⁸⁸ Alors que les profils myélodysplasiques ont un programme transcriptionnel proche des SMDs avec sidéroblastes en couronne avec la surexpression d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'érythropoïèse et moins de mutations, les profils myéloprolifératifs ont plus de mutations, notamment d'ASXL1, et des gènes impliqués dans la signalisation.^{87,89-91} Il existerait néanmoins un continuum entre ces deux formes où l'acquisition d'une mutation de RAS favoriserait le passage vers un sous-type myéloprolifératif.^{84,85,92,93}

Le diagnostic de SMD/NMP-SI-T repose sur la présence de plus de 15% de sidéroblastes au niveau médullaire et d'une thrombocytose > 450 G/l, en l'absence d'anomalie chromosomique del(5q). Il s'agit d'une entité hétérogène associant à différents degrés les caractéristiques dysplasiques des SMD/NMPs-SI, avec un risque de transformation leucémique, et myéloprolifératives des TE, avec un risque thromboembolique.⁹⁴⁻⁹⁶ Au niveau moléculaire, l'appartenance aux SMDs/NMPs est confirmée par l'existence de la double mutation de *SF3B1*, impliquée dans l'épissage et spécifique des SMD/NMPs-SI, et de *JAK2*, mutation clé des NMPs.^{95,97-103}

Les LMCs atypiques diffèrent de la LMC par l'existence d'une dysplasie multi-lignée et de l'absence de chromosome Philadelphie ou de son transcrit équivalent.^{104,105} Les mutations de *JAK2*, *MPL* et *CSF3R* sont peu fréquentes, contrairement aux mutations de *RAS*.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Une mutation hétérozygote de *SETB1* est retrouvée chez 25 à 30 % des patients alors qu'elles sont peu fréquentes dans les autres pathologies myéloïdes. Ces mutations seraient responsables d'une augmentation de la protéine SETB1, une stabilisation accrue de la protéine SET, une inhibition de PP2A et une prolifération accrue. L'inhibition de PP2A est également un mode d'action du transcrit de fusion BCR-ABL des LMCs « classiques » en faveur d'une homologie avec la LMC classique.^{109,110}

Les SMDs/NMPs non classables sont des entités rares possédant de nombreuses similitudes avec les LMCs atypiques et les SMD/NMPs-SI-T. La différenciation de ces entités a été rendue nécessaire de par l'existence de pronostics différents.^{108,111} Cette entité reste très hétérogène et les progrès en biologie moléculaire devraient permettre d'affiner la différenciation des NMP/SMDs.¹⁰⁸

3. Cellules CD34+ circulantes

Le CD34 est un marqueur exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques immatures mais aussi à la surface des cellules endothéliales des petits vaisseaux. Il s'agit d'une glycophosphoprotéine, membre de la famille des sialomucines, ayant un rôle dans d'adhésion et la signalisation cellulaire. Au sein des cellules hématopoïétiques, son rôle est double : adhésion au microenvironnement médullaire et prévention de la différenciation des cellules myéloïdes.

En conditions physiologiques, le nombre de cellules CD34+ circulantes est faible, dont l'origine peut être hématopoïétique et/ou endothéliale.^{112,113} Les cellules CD34+ circulantes augmentent lors de mobilisations cellulaires consécutives à la sécrétion de cytokines, après certaines chimiothérapies comme le cyclophosphamide ou encore lors de l'administration de facteurs de croissance.^{114,115} L'administration de facteurs de croissance granulocytaires provoque la protéolyse de SDF-1 et perturbe ses interactions avec son récepteur, CXCR4, provoquant ainsi la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans la circulation.¹¹⁶ Leur nombre peut être également augmenté au cours des hémopathies malignes, notamment celles où une blastose sanguine plus ou moins importante est classiquement observée. Dans le cadre des NMPs, leur numération a été proposée comme marqueur diagnostique de myélofibrose par plusieurs équipes.^{4,117,118}

3.1. Origine des cellules CD34+ circulantes au cours de la myélofibrose

Deux hypothèses ont été proposées quant à l'origine de la recirculation des cellules CD34+ au cours de la myélofibrose : i) du fait du remaniement fibreux médullaire; ii) du fait d'un défaut d'adhésion à cause d'une anomalie de la cellule clonale et/ou d'une modification du microenvironnement. La première hypothèse a pu être écartée puisque les patients atteints de myélofibrose secondaire à l'hypertension artérielle pulmonaire n'ont pas d'augmentation du nombre de cellules CD34+ circulantes contrairement à ceux atteints de myélofibrose primitive. La recirculation des cellules CD34+ seraient donc plutôt secondaire au processus clonal, soit liée à une anomalie intrinsèque de la cellule clonale, soit liée à une modification du microenvironnement.¹¹⁹

Les cellules mononucléées issues du clone de myélofibrose sécrètent davantage d'élastase neutrophilique et de MMP-9 (Matix MetalloProteinase-9) créant ainsi un environnement protéolytique. Cela va être notamment responsable d'un clivage de la molécule d'adhésion VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) à la surface des cellules CD34+ et d'une mobilité accrue de ces cellules.¹²⁰ Par un mécanisme encore inconnu, l'expression de CXCR4 est diminuée au sein des cellules hématopoïétiques issues de patients atteints de myélofibrose permettant leur recirculation.¹²¹ Ces phénomènes semblent s'intensifier avec l'augmentation de la charge allélique des mutations « driver » dont la mutation *JAK2V617F*.¹²²

Un certain nombre de cellules CD34+ circulantes correspondent à des cellules endothéliales, qu'il s'agisse de précurseurs (CD34+VEGFR2+AC133+) ou de cellules endothéliales matures (CD34+VEGFR2+AC133-).¹¹³ L'intérêt de ces cellules a notamment été étudié dans les maladies cardio-vasculaires où leur nombre diminue avec l'âge, le sexe féminin et le tabagisme mais augmente avec le poids, le cholestérol total et l'utilisation de statines. Des facteurs génétiques sont également décrits.^{123,124} Un nombre plus important de progéniteurs endothéliaux CD34+KDR+ est associé avec un risque cardio-vasculaire réduit par une régénération endothéliale accrue.¹²³ Ces cellules sont

également augmentées au cours des NMPs même si l'impact physiopathologique de ces cellules endothéliales clonales n'est pas encore établi.^{125,126} Il a été observé que ces précurseurs endothéliaux étaient plus nombreux au cours des pré-myélofibroses que dans les myélofibroses déclarées avec une corrélation inverse avec le nombre de cellules hématopoïétiques progénitrices. La mobilisation de ces cellules serait donc responsable d'une néoangiogenèse impliquée dans les mécanismes physiopathologiques précoces.¹²⁵

Cette néoangiogenèse est importante dans la constitution de l'hématopoïèse extra-médullaire, notamment au niveau splénique. Il a été montré que l'augmentation du taux de cellules CD34+, d'origine endothéliale, au cours de la MFP était associée avec l'augmentation des capillaires spléniques au détriment des sinusoides spléniques.¹²⁷ Le nombre accru de capillaires spléniques est le reflet d'une mobilisation de la rate vers une hématopoïèse extra-médullaire avec un nombre accru de cellules CD34+ d'origine hématopoïétique maligne.^{127,128} Afin de permettre cette hématopoïèse extra-médullaire au niveau splénique, une modification du microenvironnement splénique est également nécessaire. Il n'est pas encore établi si cela intervient via un reconditionnement des cellules spléniques endogènes par les CSHs malignes recirculantes ou via la mobilisation de cellules mésenchymateuses médullaires.¹²⁸

3.2. Apport clinique au cours des NMPs BCR-ABL négatives

La numération des cellules CD34+ circulantes par cytométrie de flux est maintenant bien maîtrisée par de nombreux laboratoires. Des méthodes internationales de standardisation ont été élaborées et des programmes de contrôle inter-laboratoires mis en place afin de garantir une bonne reproductibilité des mesures.¹²⁹ La principale indication de cette numération s'inscrit dans le cadre des greffes des cellules souches hématopoïétiques autologues ou allogéniques, pour le monitoring des patients et le contrôle de qualité des produits de thérapie cellulaire.¹¹²

Hormis l'utilité bien établie de cette indication, quelques travaux publiés avant l'avènement récent de la biologie moléculaire ont soulevé un intérêt du test au cours des NMPs BCR-ABL négatives montrant que le taux de cellules CD34+ circulantes était très augmenté chez les patients atteints de MFP. Ceci permettant le diagnostic différentiel avec les autres entités. Un nombre de cellules CD34+ circulantes $\geq 15 \times 10^6/l$ permettrait de distinguer les myélofibroses des PVs et des TEs. Cependant, seules 3 études ont investigué spécifiquement cette question.^{4,64,117-119} Un autre groupe a montré que l'évaluation du nombre de cellules CD34+ circulantes pouvait également se faire par quantification par qPCR dans le sang de l'ARNm circulant du gène codant pour le CD34 avec des résultats similaires.¹³⁰

Les résultats rapportés dans ces quelques études montrent que chez les patients atteints de myélofibrose, le nombre de cellules CD34+ circulantes est similaire qu'il s'agisse d'une MFP ou d'une myélofibrose secondaire à une PV ou à une TE.^{4,131} Par contre, ce nombre augmente avec la durée d'évolution, la taille de la rate et l'importance de la myélémie.^{4,118,131} Leur nombre augmenterait également chez les patients atteints de PV et de TE en cas d'évolution vers une myélofibrose et pourrait donc constituer un marqueur de suivi même si les résultats sont contradictoires.^{118,131} L'augmentation du nombre de cellules CD34+ dès le stade de pré-myélofibrose est également débattue, le nombre de cellules CD34+ circulantes étant globalement plutôt corrélé au degré de fibrose médullaire.^{64,74,122,125,131}

Au cours des myélofibroses, le nombre de cellules CD34+ circulantes est corrélé avec la réponse thérapeutique et notamment la réponse splénique. Les niveaux les plus élevés de cellules CD34+ circulantes sont retrouvés chez les patients atteints de myélofibrose après splénectomie.⁴ Ce nombre diminue rapidement après la splénectomie mais de manière extrêmement transitoire. Les autres sites d'hématopoïèse extra-médullaires se développent ensuite et remplacent la rate comme réservoirs de cellules CD34+ qui peuvent alors recirculer.¹³² Dans le contexte d'allogreffe, le nombre de cellules CD34+

circulantes en pré ou post-greffe ne conditionne pas le pronostic et leur numération ne semble donc pas un outil intéressant dans ce contexte.¹³³

4. Synthèse et question posée

Le diagnostic des NMPs BCR-ABL négatives repose sur l'histologie de la moelle osseuse et sur la mise en évidence d'anomalies moléculaires impliquées dans leur développement. Certaines sont de découverte très récente, depuis peu utilisées dans l'arsenal diagnostique des NMPs.^{2,6-9} Actuellement, l'association d'une mutation de *JAK2*, *CALR* ou *MPL* et d'un profil histologique médullaire typique permet l'identification d'une PV, d'une TE ou d'une MFP dans la grande majorité des cas.¹³⁴ Il existe cependant situations de diagnostic difficile. Certaines formes frontières incluent des caractéristiques cliniques et biologiques propres à différentes NMPs. Ainsi, certains patients atteints de TE présentent dès le diagnostic des anomalies médullaires évocatrices de myélofibrose.⁶⁷ S'y associent d'autres entités difficiles à classer dont les caractéristiques cliniques et biologiques sont à la frontière entre syndrome myélodysplasique et NMP.^{100,135} Chez un certain nombre de patients, un diagnostic précis est difficile à établir, d'autant plus si la biopsie ostéo-médullaire est non informative ou non réalisable. Il faut également ajouter les patients chez qui une mutation spécifique ne peut être retrouvée, comme chez 6 à 12% des patients atteints de TE et 4 à 5% des patients atteints de MFP.^{8,9} La distinction de ces entités est importante puisqu'elle implique une évolution différente et donc une prise en charge adaptée.¹³⁵

Il semble que la quantification des cellules souches hématopoïétiques CD34+ circulantes puisse dans ce contexte constituer une aide au diagnostic. Ces cellules sont naturellement présentes en faible nombre dans la circulation sanguine. Elles peuvent augmenter en cas de mobilisation cellulaire lors d'une stimulation cytokinique survenant lors de différents événements inflammatoires ou lors de l'administration de facteurs de croissance granulocytaires.^{114,115} Leur nombre augmente également lors des

myéloproliférations clonales. Quelques travaux, publiés avant l'avènement récent de la biologie moléculaire, ont montré que leur nombre était très augmenté chez les patients atteints de MFP, rendant cette quantification intéressante pour le diagnostic différentiel avec les autres NMPs BCR-ABL négatives.^{4,117,118} En dépit de ces résultats et d'une standardisation des méthodes de numération de ces éléments, ce paramètre n'est actuellement pas intégré au sein des critères diagnostiques retenus par l'OMS et la littérature reste rare sur le sujet.⁴⁶ Nous avons réévalué ici l'intérêt de la numération des cellules CD34+ circulantes pour le diagnostic des NMPs BCR-ABL négatives en pratique courante.

ARTICLE

CIRCULATING CD34+ CELL COUNT DIFFERENTIATES PRIMARY MYELOFIBROSIS FROM OTHER PHILADELPHIA-NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS: A PRAGMATIC STUDY

Authors : C. ORVAIN,^{1,2,3*} D. LUQUE PAZ,^{2,4,5,*} I. DOBO,² L. COTTIN,² G. LE CALVEZ,⁴ A. CHAUVEAU,⁴ M. MERCIER,¹ J. FARHI,¹ F. BOYER,¹ J.C. IANOTTO,⁶ B. GUIBOURG,⁷ MC. ROUSSELET,⁸ M. ZANDECKI,² N. IFRAH,^{1,3,5} M. HUNAUT-BERGER,^{1,3,5} V. UGO,^{2,3,4,5} F. GENEVIEVE.²

[1] Service des Maladies du Sang, CHU d'Angers, Angers

[2] Laboratoire d'Hématologie, CHU d'Angers, Angers

[3] INSERM U892/CNRS 6295, Université d'Angers, Angers

[4] Laboratoire d'Hématologie, CHU de Brest, Brest

[5] Université d'Angers, UFR Santé, Angers

[6] Service d'Hématologie Clinique, Institut de Cancéro-Hématologie, CHU de Brest, Brest

[7] Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU de Brest, Brest

[8] Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU d'Angers, Angers

* These authors contributed equally to the work and share the first authorship.

Corresponding author:

Franck Genevieve

CHU d'Angers

Laboratoire d'Hématologie

4 rue Larrey

49933 Angers Cedex 9, France

Phone number: + 33 241 35 53 53

Fax number: + 33 241 35 55 99

E-mail address: frgenevieve@chu-angers.fr

Word count: 1382

Running title: Circulating CD34+ cell count in myeloproliferative neoplasms

Abstract

A high number of circulating CD34+ cells has been advocated to distinguish primary myelofibrosis from other Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. We re-evaluated the diagnostic interest of measuring circulating CD34+ cells in 26 healthy volunteers and 256 consecutive patients at diagnosis for whom a myeloproliferative neoplasm was suspected. The ROC curve analysis showed that a number of CD34+ $<10/\mu\text{l}$ excludes the diagnosis of primary myelofibrosis with a sensitivity of 97% and a specificity of 90% (area under the curve: 0.93 [0.89-0.98]; $p < 0.001$). Patients with PMF harbouring a CALR mutation had more circulating CD34+ cells than patients with either a JAK 2 or MPL mutation ($p = 0.02$ and $p < 0.01$, respectively). These results suggest that this fast, simple, non-invasive, and standardized test is of particular interest to exclude the diagnosis of primary myelofibrosis.

Keywords: primary myelofibrosis (PMF); myeloproliferative neoplasms (MPN); circulating CD34+ cells.

Introduction

A high number of circulating CD34+ cells has been advocated to distinguish primary myelofibrosis (PMF) from other Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPN).¹⁻⁴ However, this test is not included in the current WHO diagnosis criteria and literature remains sparse on the subject.⁵ The diagnostic criteria for MPNs are evolving with molecular genetic testing, including the recently discovered calreticulin (*CALR*) mutations: the presence of a *JAK2*, *CALR* or *MPL* mutation and a typical histopathology in bone marrow biopsy now enable the diagnosis of essential thrombocythaemia (ET) and PMF in most cases.⁶⁻⁸ In this current context, we re-evaluated the diagnostic interest of measuring circulating CD34+ cells for the diagnosis of Philadelphia-negative MPNs in daily practice.

Methods

Patients

We conducted a retrospective study in two centres between 2010 and 2012 that included patients with cytosis, cytopenia with leukoerythroblastosis and/or teardrop cells, splenomegaly or for whom the occurrence of splanchnic thrombosis was investigated. The study was performed in accordance with institutional ethical guidelines and the Declaration of Helsinki. The number of circulating CD34+ cells was determined in all consecutive patients at diagnosis in whom Philadelphia-negative MPN was suspected. Results were correlated with clinical and biological data available and with the final diagnosis following the WHO diagnostic criteria for each patient.⁵

Circulating CD34+ cell count, cultures and mutation analysis

The determination of circulating CD34+ cells was obtained through flow cytometry with a standardized simple platform technique with a CD45 gate being selected first (BD™ Stem Cell

Enumeration Kit, BD Bioscience; Stem-Kit™ CD34 HPC Enumeration kit, Beckman Coulter). Results for growth of progenitors on a collagen gel without and with growth factors (StemCell Technologies™) were available for 82 patients and were performed as previously described.⁹ *JAK2 V617F*, *MPL* and *CALR* status were established for all patients with confirmed Philadelphia-negative MPNs. *JAK2 V617F* and *MPL W515L/K* mutation status were assessed using quantitative polymerase chain reaction according to the manufacturer's recommendation (Mutascreen *JAK2* and Mutascreen *MPLW515LK* kits, Qiagen, respectively). *CALR* mutations were screened in patients with suspected ET or PMF by fragment analysis as previously described and confirmed with Sanger sequencing.⁶

Statistical analysis

Continuous variables were described as medians (and range) while categorical variables were described as counts (and percentages). CD34+ cell counts between disease groups were compared for all patients with a non-parametric Mann & Whitney test and were confronted to the WHO criteria for the diagnosis of MPNs by receiver operating curves (ROC).⁵ For patients with PMF, CD34+ cells levels were compared between molecular groups with a non-parametric Mann & Whitney test. All tests were two-sided with a statistical significance < 0.05. Statistical analyses were performed using SPSS version 20 (SPSS, Inc.).

Results

The number of circulating CD34+ cells was determined in 26 healthy volunteers and 256 consecutive patients at diagnosis in whom Philadelphia-negative MPN could be considered. The diagnostic algorithm followed for each patient is shown in figure 1. The biological characteristics of the 256 patients included are described in table 1. Polycythaemia vera (PV) (n=42) and chronic myeloid leukaemia (CML) (n=10) were diagnosed according to the WHO criteria.

Nineteen patients were found to have myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) or myelodysplastic syndromes (MDS) with myeloproliferative features such as chronic myelomonocytic leukaemia (CMML) or refractory anaemia with ring sideroblasts and thrombocytosis (RARS-T). A bone marrow biopsy was available for 114/196 other patients (58%). On the whole, the diagnosis was either based on a bone marrow biopsy in 70% and 80% of patients with ET and PMF, respectively, or on typical clinical and biological features plus the presence of a clonal mutation. No proof of a MPN could be made in 55 patients (43 with polycythaemia and 12 with thrombocytosis).

The median number of CD34+ cells determined in healthy volunteers was 2.6/ μ l (standard derivation: 1.3). It was similar to that of healthy volunteers in (i) patients with MDS/MPN or MDS with myeloproliferative features, and (ii) patients with non-malignant polycythaemia or thrombocytosis. Noteworthy, patients with MDS/MPN had a very heterogeneous distribution of CD34+. However, the number of circulating CD34+ cells was significantly higher in PMF, ET, PV and CML in comparison to healthy volunteers. Furthermore, it was significantly higher in patients with PMF when compared to patients with ET or PV (figure 2). The ROC curve analysis showed that in this setting a number of CD34+ <10/ μ l excludes the diagnosis of PMF with a negative predictive value of 99.5% (ROC curve parameters: AUC: 0.93 [0.89-0.98]; $p < 0.001$; sensitivity: 97%, specificity: 90%, positive predictive value: 52%). Similar results were found when considering only patients with Philadelphia-negative MPNs ($n=172$ patients; ROC curve parameters: AUC: 0.98 [0.94-1]; $p < 0.001$; sensitivity: 97%; specificity: 97%) or patients for whom a bone marrow biopsy was available ($n=126$ patients; ROC curve parameters: AUC: 0.92 [0.85-0.98]; $p < 0.001$; sensitivity: 96%; specificity: 99%).

In patients with PMF, 20/35 patients (57%) had a *JAK2* mutation, 6/35 patients (17%) had a *MPL* mutation, 7/35 patients (20%) had a type-1 *CALR* mutation, and 2/35 patients (6%) were

“triple negative”. These two patients had a typical bone marrow biopsy pattern and, interestingly, a high number of circulating CD34+ cells (69 and 175/ μ l). Out of the 13 “triple negative” patients with ET, 11 could be diagnosed with a typical bone marrow histopathology: all but one had a number of CD34+ cells < 10/ μ l. Patients with PMF harbouring a *CALR* mutation had more circulating CD34+ cells than patients with either a *JAK 2* or *MPL* mutation ($p = 0.02$ and $p < 0.01$, respectively).

Discussion

We confirm in this retrospective study performed in daily practice that determining the number of CD34+ circulating cells is of diagnostic interest when PMF is suspected. It is significantly higher in PMF, a number < 10/ μ l allowing the exclusion of this particular MPN with excellent sensibility and specificity (97% and 90%, respectively).

The discovery of *CALR* mutations eases the diagnosis of MPNs.^{6,7} Some authors now propose a classification integrating molecular markers to enable the diagnosis of almost all patients with ET and PMF. However, a bone marrow evaluation remains mandatory to differentiate these two entities.⁸ In our study, as in previous reports, the number of CD34+ cells easily differentiated patients with ET and PMF.¹⁻⁴ Whereas a threshold of 15/ μ l circulating CD34+ cells was selected in initial studies, a 10/ μ l level was more discriminating in our cohort: under this level we are confident with the exclusion of PMF. Unlike previous studies, we found that using the count of CD34+ cells in an unselected cohort of patients was rather helpful because of its negative predictive value than for its negative predictive value. Using a cut-off of 15/ μ l only marginally modified the diagnostic value of the test in our study. When a bone marrow biopsy is contraindicated we confirm that this test is of particular usefulness. In our hands, ROC curve analysis was similar when only patients with bone marrow biopsy confirmation were considered.

Despite molecular testing, no mutation could be found in 4.7 to 12.3% of patients with PMF (6% in our cohort) and in 10.3 to 13% of patients with ET (14% in our cohort); these patients are known as “triple negative” patients.^{6,10,11} Determining the number of CD34+ cells might therefore be useful for these patients. Indeed, the number of CD34+ cells was high in the two “triple negative” patients with PMF and low in all but one “triple negative” patients with ET in our study. This test might also be of interest to differentiate pre-fibrotic myelofibrosis from other cases of TE. Unfortunately, because of poor reproducibility between centers in classifying patients with prefibrotic myelofibrosis, we could not address this question.

Interestingly, patients with PMF and *CALR* mutations had significantly more circulating CD34+ cells than other patients in our cohort. It has been shown that circulating CD34+ can be divided into two types of cells: hematopoietic progenitor cells (HPCs) and endothelial progenitor cells (EPCs). EPCs are especially present in the peripheral blood of patients with PMF in the earlier phase of the disease when vasculogenesis is important.¹² The less severe clinical course of patients with *CALR*-mutated PMF, with a reduced risk of transformation and thrombo-embolic complications, might indicate that these mutations have different pathophysiological implications.^{10,13} This impact on prognosis appears limited to type-1 or type-1 like *CALR* mutation.¹¹ Whether the type of circulating CD34+ cells (HPCs or EPCs) is associated or not with a specific mutation might bring insight on some of the mechanisms underlying PMF.

Acknowledgements

We thank technicians from both centers for their help.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, et al (2001) Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34 (+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 98:3249-3255.
2. Andréasson B, Swolin B, Kutti J (2002) Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 68:189-193.
3. Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, et al (2003) Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 88:1123-1129.
4. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A (2005) Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol* 128:42-48.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 127:2391-2405.
6. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 369:2379-2390.
7. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 369:2391-2405.
8. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T (2014) An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of the WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 28:1407-1413.
9. Dobo I, Boiret N, Lippert E, et al (2004) A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* 89:1207-1212.
10. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al (2014) Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 124:1062-1069.
11. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al (2014) Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 124:2507-13.
12. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, et al. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia (2005) *J Clin Oncol* 23:5688-5695.
13. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. (2016) Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 30:431-438.

Table 1: Results of molecular biology and growth of progenitors for each disease group.

Disease category	Number of CD34+ cells (median, range, / μ l)	Bone marrow biopsy (% biopsy performed)	Mutations			Endogenous colony assays	
			JAK2 (%)	MPL (%)	CALR (%)	Triple negative	(number positive/number performed)
Essential thrombocythemia (n = 93 patients)	3.5 (1-32)	66/93 (71%)	70%	2%	13%	14%	52/61
Polycythemia vera (n = 42 patients)	4 (0.5-18)	6/42 (14%)	95%				9/9
MPN unclassifiable (n = 2 patients)	1.2 (1.1-5.3)	0 (0%)	100%				2/2
Primary myelofibrosis (n = 35 patients)	51 (2.5-717)	28/35 (80%)	57%	17%	20%	6%	11/13
CML (n = 10 patients)	144 (3.4-1930)	3/10 (30%)					3/3
CMML (n = 8 patients), RARS-T (n = 3 patients), RAEB (n = 4 patients), other MDS (n = 4 patients)	4.1 (0.5-899)	14/19 (74%)	16%				1/6
Non malignant thrombocythemia (n = 12 patients)	2.5 (1-14)	3/12 (25%)					0/4
Non malignant polycythemia (n = 43 patients)	2.5 (0.5-18)	6/43 (14%)					0/10

CML: Chronic Myeloid Leukemia; CMML: Chronic MyeloMonocytic Leukemia; MDS: MyeloDysplastic Syndrome; MPN: MyeloProliferative Neoplasm; RAEB: Refractory Anemia and Excess Blasts; RARS-T: Refractory Anemia with Ringed Sideroblasts and Thrombocytosis.

Figure Legends

Figure 1: Flow chart of patients investigated for a myeloproliferative neoplasm.

CML: chronic myeloid leukemia; CMML: chronic myelomonocytic leukemia; ET: essential thrombocythemia; MDS: myelodysplastic syndrome; MPNu: myeloproliferative neoplasm unclassified; PMF: primary myelofibrosis; PV: polycythemia vera; RAEB: refractory anemia with excess blasts; RARS-T: refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocythemia.

Figure 2: Number of CD34+ cells according to disease group.

**: Significant difference between disease group and healthy volunteers; #: Significant difference between PMF and other disease group.*

Figure 1.

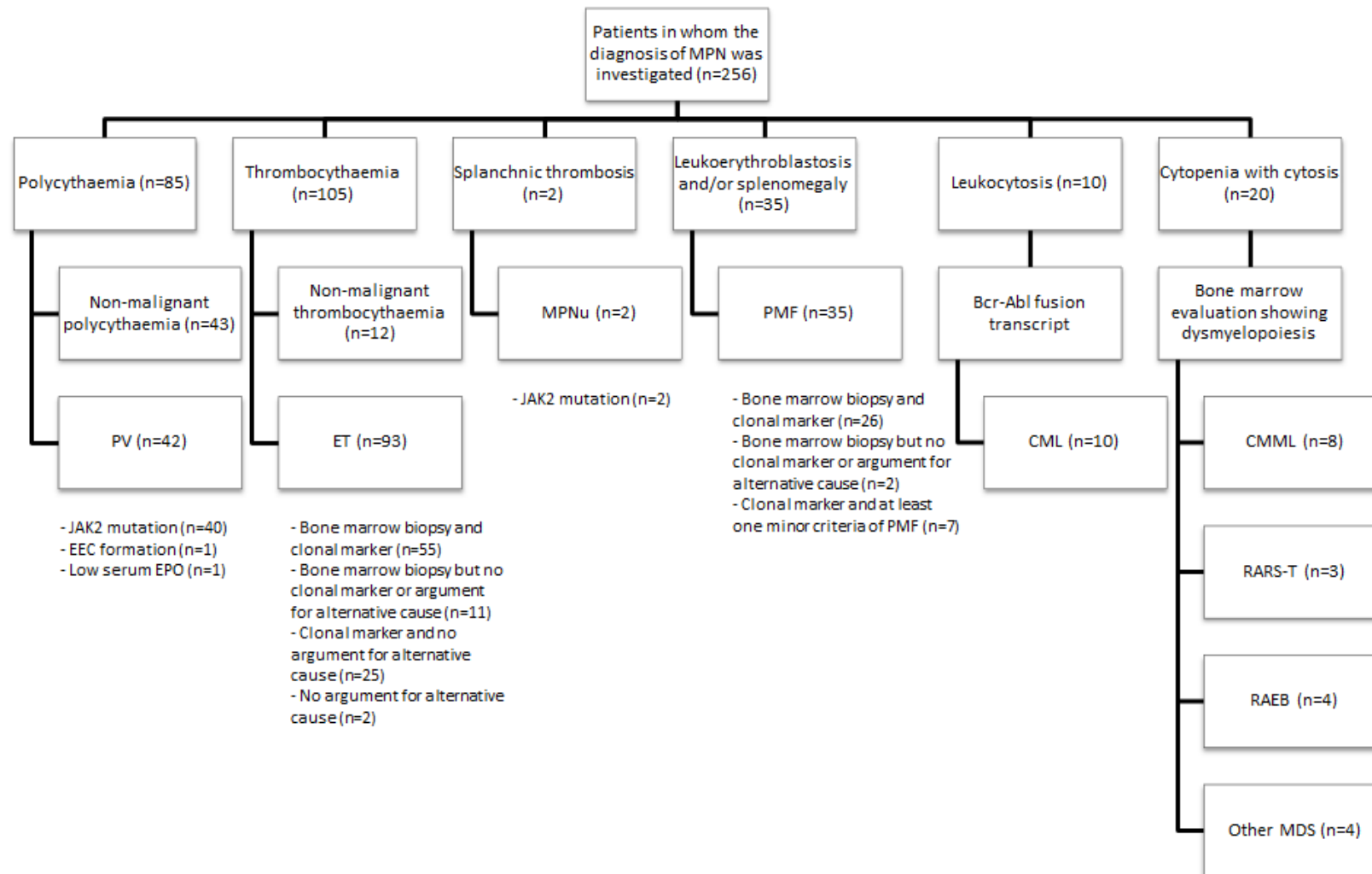
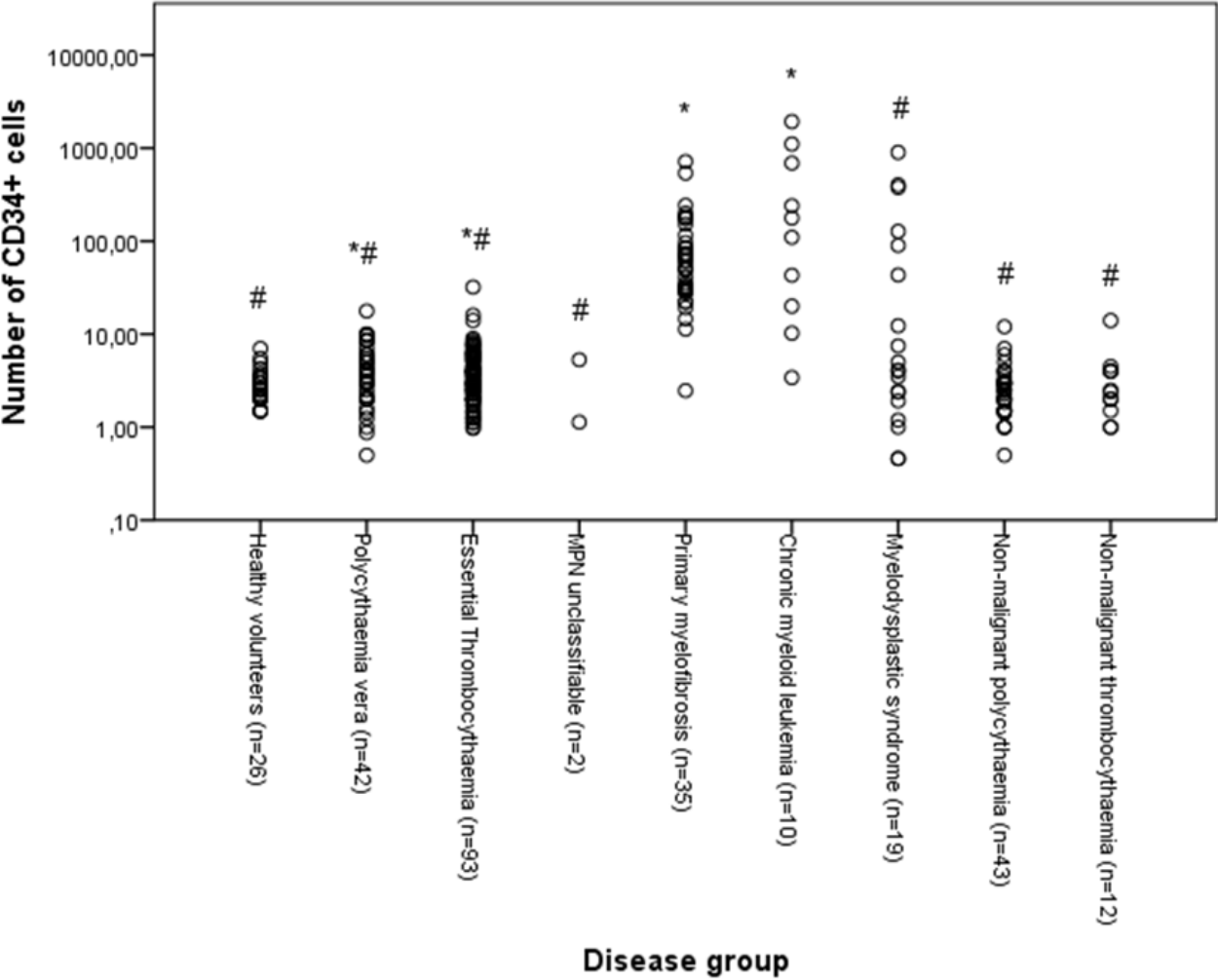


Figure 2.



BIBLIOGRAPHIE

1. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2015;385(9976):1447-59.
2. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A and others. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144-8.
3. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006;355(23):2452-66.
4. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, Frassoni F. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98(12):3249-55.
5. Hultcrantz M, Wilkes SR, Kristinsson SY, Andersson TM, Derolf Å, Eloranta S, Samuelsson J, Landgren O, Dickman PW, Lambert PC and others. Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. *J Clin Oncol* 2015;33(20):2288-95.
6. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I and others. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):e270.
7. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN and others. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459-68.
8. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D and others. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379-90.
9. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG and others. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391-405.
10. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, Bass AJ, Pretz J, Ahn J, Hricik T and others. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014;123(22):e123-33.
11. 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.
12. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
13. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S and others. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97.
14. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N and others. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9464):1054-61.
15. James C, Delhommeau F, Marzac C, Teyssandier I, Couedic JP, Giraudier S, Roy L, Saulnier P, Lacroix L, Maury S and others. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006;20:350-3.
16. Rumi E, Passamonti F, Della Porta MG, Elena C, Arcaini L, Vanelli L, Del Curto C, Pietra D, Boveri E, Pascutto C and others. Familial chronic myeloproliferative disorders: clinical phenotype and evidence of disease anticipation. *J Clin Oncol* 2007;25(35):5630-5.
17. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, Duffy A, Boyd EM, Bench AJ, Scott MA and others. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366(9501):1945-53.
18. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008;111(8):3931-40.

19. Li J, Kent DG, Godfrey AL, Manning H, Nangalia J, Aziz A, Chen E, Saeb-Parsy K, Fink J, Sneade R and others. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood* 2014;123(20):3139-51.
20. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, Strand JS, Elliott M, Mesa R, Li CY, Wadleigh M, Lee SJ, Gilliland DG. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* 2006;106(3):631-5.
21. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S and others. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia* 2010;24(9):1574-9.
22. Spivak JL, Considine M, Williams DM, Talbot CC, Rogers O, Moliterno AR, Jie C, Ochs MF. Two clinical phenotypes in polycythemia vera. *N Engl J Med* 2014;371(9):808-17.
23. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, Ferrari M, Gisslinger H, Kralovics R, Cremonesi L and others. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111(3):1686-9.
24. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, Kiladjian JJ, McMullin MF, Ruggeri M, Besses C and others. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* 2011;117(10):2813-6.
25. Percy MJ, Scott LM, Erber WN, Harrison CN, Reilly JT, Jones FG, Green AR, McMullin MF. The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels. *Haematologica* 2007;92(12):1607-14.
26. Jones AV, Cross NC, White HE, Green AR, Scott LM. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica* 2008;93(10):1560-4.
27. Ugo V, Tondeur S, Menot ML, Bonnin N, Le Gac G, Tonetti C, Mansat-De Mas V, Lecucq L, Kiladjian JJ, Chomienne C and others. Interlaboratory development and validation of a HRM method applied to the detection of JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera patients. *PLoS One* 2010;5(1):e8893.
28. Kiladjian JJ, Elkassar N, Cassinat B, Hetet G, Giraudier S, Balitrand N, Conejero C, Briere J, Fenaux P, Chomienne C and others. Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia* 2006;20(6):1181-3.
29. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, Gilliland DG, Busque L. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107(10):4139-41.
30. Pardanan AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ and others. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472-6.
31. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2006;107(5):1864-71.
32. Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, Kiladjian JJ, Socié G, Bordessoule D, Le Bousse-Kerdilès MC and others. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 2008;22(8):1557-66.
33. Defour JP, Itaya M, Gryshkova V, Brett IC, Pecquet C, Sato T, Smith SO, Constantinescu SN. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(7):2540-5.
34. Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioli E, Bosi A, Barosi G, Vannucchi AM, Myelofibrosis G--IRO and others. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br J Haematol* 2007;137(3):244-7.
35. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, Wilkins BS, Reilly JT, Hasselbalch HC, Bowman R and others. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* 2008;112(1):141-9.

36. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, Ruggeri M, Specchia G, Lo-Coco F, Delaini F and others. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* 2008;112(3):844-7.
37. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, Sant'Antonio E, Ferretti V, Pancrazzi A, Rotunno G and others. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2013;121(21):4388-95.
38. Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A, Anand S, Vaghela KJ, Beer P, Scott MA, Bareford D, Green AR, Huntly B and others. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 2010;149(2):250-7.
39. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martínez-Trillos A, Casetti I, Colomer D, Pieri L, Praticorona M, Rotunno G and others. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124(7):1062-9.
40. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, Girodon F, Alexandre JH, Mansier O, Viallard JF and others. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015;29(1):249-52.
41. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C, Sant'Antonio E, Abbonante V, Moccia F, Casetti IC and others. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2016;30(2):431-8.
42. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, Hanson CA, Pardanani A. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 2014;28(7):1568-70.
43. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, Maffioli M, Caramazza D, Passamonti F, Pardanani A. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472-7.
44. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, Marzac C, Le Couédic JP, Droin N, Chachoua I and others. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* 2016;127(3):333-42.
45. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, Bagienski K, Kubesova B, Pietra D, Gisslinger B and others. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016;127(3):325-32.
46. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391-405.
47. Johansson PL, Safai-Kutti S, Kutti J. An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol* 2005;129(5):701-5.
48. Alvarez-Larrán A, Ancochea A, Angona A, Pedro C, García-Pallarols F, Martínez-Avilés L, Bellosillo B, Besses C. Red cell mass measurement in patients with clinically suspected diagnosis of polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica* 2012;97(11):1704-7.
49. Silver RT, Chow W, Orazi A, Arles SP, Goldsmith SJ. Evaluation of WHO criteria for diagnosis of polycythemia vera: a prospective analysis. *Blood* 2013;122(11):1881-6.
50. Cassinat B, Laguillier C, Gardin C, de Beco V, Burcheri S, Fenaux P, Chomienne C, Kiladjian JJ, Group P-N. Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass? *Leukemia* 2008;22(2):452-3.
51. Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. The value of bone marrow histology in differentiating between early stage Polycythemia vera and secondary (reactive) Polycythemia. *Haematologica* 2001;86(4):368-74.
52. Thiele J, Kvasnicka HM. Diagnostic impact of bone marrow histopathology in polycythemia vera (PV). *Histol Histopathol* 2005;20(1):317-28.

53. Gianelli U, Iurlo A, Vener C, Moro A, Fermo E, Bianchi P, Graziani D, Radaelli F, Coggi G, Bosari S and others. The significance of bone marrow biopsy and JAK2V617F mutation in the differential diagnosis between the "early" prepolycythemic phase of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Clin Pathol* 2008;130(3):336-42.
54. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Randi ML, Bertozzi I, Marino F, Vannucchi AM, Pieri L and others. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood* 2012;119(10):2239-41.
55. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Rethinking the diagnostic criteria of polycythemia vera. *Leukemia* 2014;28(6):1191-5.
56. Mossuz P, Girodon F, Donnard M, Latger-Cannard V, Dobo I, Boiret N, Lecron JC, Biquet C, Barro C, Hermouet S and others. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica* 2004;89(10):1194-8.
57. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, Randi ML, Vaidya R, Cazzola M, Rambaldi A and others. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27(9):1874-81.
58. Lemoine F, Najman A, Baillou C, Stachowiak J, Boffa G, Aegerter P, Douay L, Laporte JP, Gorin NC, Duhamel G. A prospective study of the value of bone marrow erythroid progenitor cultures in polycythemia. *Blood* 1986;68(5):996-1002.
59. Dobo I, Donnard M, Girodon F, Mossuz P, Boiret N, Boukhari R, Allégraud A, Bascans E, Campos L, Pineau D and others. Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assays performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol J* 2004;5(2):161-7.
60. Weinberg RS, Worsley A, Gilbert HS, Cuttner J, Berk PD, Alter BP. Comparison of erythroid progenitor cell growth in vitro in polycythemia vera and chronic myelogenous leukemia: only polycythemia vera has endogenous colonies. *Leuk Res* 1989;13(4):331-8.
61. Shih LY, Lee CT. Identification of masked polycythemia vera from patients with idiopathic marked thrombocytosis by endogenous erythroid colony assay. *Blood* 1994;83(3):744-8.
62. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Finazzi G, Carobbio A, Rumi E, Luigia Randi M, Betozi I, Vannucchi AM, Pieri L and others. Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study. *Am J Hematol* 2014;89(1):52-4.
63. Barbui T, Thiele J, Carobbio A, Gisslinger H, Finazzi G, Rumi E, Luigia Randi M, Vannucchi AM, Gisslinger B, Müllauer L and others. Masked polycythemia vera diagnosed according to WHO and BCSH classification. *Am J Hematol* 2014;89(2):199-202.
64. Florena AM, Tripodo C, Iannitto E, Porcasi R, Ingrao S, Franco V. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004;89(8):911-9.
65. Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) - a clinicopathological study. *Leukemia* 1999;13(11):1741-8.
66. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Zankovich R, Diehl V. Follow-up examinations including sequential bone marrow biopsies in essential thrombocythemia (ET): a retrospective clinicopathological study of 120 patients. *Am J Hematol* 2002;70(4):283-91.
67. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, Rodeghiero F, d'Amore ES, Randi ML, Bertozzi I and others. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011;29(23):3179-84.
68. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood* 2011;117(21):5710-8.
69. Gisslinger H, Jeryczynski G, Gisslinger B, Wölfler A, Burgstaller S, Buxhofer-Ausch V, Schalling M, Krauth MT, Schiefer AI, Kornauth C and others. Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria. *Leukemia* 2016;30(5):1126-32.

70. Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, Buck G, Wheatley K, East CL, Paul B, Harrison CN, Green AR, Campbell PJ. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood* 2008;111(1):60-70.
71. Koopmans SM, Bot FJ, Lam KH, van Marion AM, de Raeve H, Hebeda KM. Reproducibility of histologic classification in nonfibrotic myeloproliferative neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2011;136(4):618-24.
72. Brousseau M, Parot-Schinkel E, Moles MP, Boyer F, Hunault M, Rousselet MC. Practical application and clinical impact of the WHO histopathological criteria on bone marrow biopsy for the diagnosis of essential thrombocythemia versus prefibrotic primary myelofibrosis. *Histopathology* 2010;56(6):758-67.
73. Buhr T, Hebeda K, Kaloutsi V, Porwit A, Van der Walt J, Kreipe H. European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis. *Haematologica* 2012;97(3):360-5.
74. Barosi G, Rosti V, Bonetti E, Campanelli R, Carolei A, Catarsi P, Isgrò AM, Lupo L, Massa M, Poletto V and others. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis. *PLoS One* 2012;7(4):e35631.
75. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, Calori R, Radaelli F, Iurlo A, Caberlon S, Gerli G, Boiocchi L, Deliliers GL. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2008;111(4):1862-5.
76. Campbell PJ, Bareford D, Erber WN, Wilkins BS, Wright P, Buck G, Wheatley K, Harrison CN, Green AR. Reticulin accumulation in essential thrombocythemia: prognostic significance and relationship to therapy. *J Clin Oncol* 2009;27(18):2991-9.
77. Juvonen E, Ikkala E, Oksanen K, Ruutu T. Megakaryocyte and erythroid colony formation in essential thrombocythaemia and reactive thrombocytosis: diagnostic value and correlation to complications. *Br J Haematol* 1993;83(2):192-7.
78. Dobo I, Boiret N, Lippert E, Girodon F, Mossuz P, Donnard M, Campos L, Pineau D, Bascans E, Praloran V and others. A standardized endogenous megakaryocytic erythroid colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* 2004;89(10):1207-12.
79. Hussein K, Bock O, Theophile K, von Neuhoff N, Buhr T, Schlué J, Büsche G, Kreipe H. JAK2(V617F) allele burden discriminates essential thrombocythemia from a subset of prefibrotic-stage primary myelofibrosis. *Exp Hematol* 2009;37(10):1186-1193.e7.
80. Iurlo A, Cattaneo D, Giunta M, Gianelli U, Consonni D, Fraquelli M, Orofino N, Bucelli C, Bianchi P, Augello C and others. Transient elastography spleen stiffness measurements in primary myelofibrosis patients: a pilot study in a single centre. *Br J Haematol* 2015;170(6):890-2.
81. Mughal TI, Cross NC, Padron E, Tiu RV, Savona M, Malcovati L, Tibes R, Komrokji RS, Kiladjan JJ, Garcia-Manero G and others. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2015;100(9):1117-30.
82. Orazi A, Germing U. The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features. *Leukemia* 2008;22(7):1308-19.
83. González-Medina I, Bueno J, Torrequebrada A, López A, Vallespí T, Massagué I. Two groups of chronic myelomonocytic leukaemia: myelodysplastic and myeloproliferative. Prognostic implications in a series of a single center. *Leuk Res* 2002;26(9):821-4.
84. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, Ball G, Keating MJ, Estey EH, Glassman AB, Albitar M, Kwari MI, Beran M. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood* 2002;99(3):840-9.
85. Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, Lambertenghi Deliliers G, Beran M, Onida F. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin Cancer Res* 2010;16(8):2246-56.
86. Such E, Germing U, Malcovati L, Cervera J, Kuendgen A, Della Porta MG, Nomdedeu B, Arenillas L, Luño E, Xicoy B and others. Development and validation of a prognostic

- scoring system for patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood* 2013;121(15):3005-15.
87. Cervera N, Itzykson R, Coppin E, Prebet T, Murati A, Legall S, Vey N, Solary E, Birnbaum D, Gelsi-Boyer V. Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol* 2014;89(6):604-9.
 88. Schuler E, Schroeder M, Neukirchen J, Strupp C, Xicoy B, Kündgen A, Hildebrandt B, Haas R, Gattermann N, Germing U. Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leuk Res* 2014;38(12):1413-9.
 89. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Hodnefield JM, Knudson RA, Ketterling RP, Al-kali A and others. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes. *Leukemia* 2013;27(7):1504-10.
 90. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, Berthon C, Adès L, Fenaux P, Beyne-Rauzy O and others. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2428-36.
 91. Gelsi-Boyer V, Cervera N, Bertucci F, Brecqueville M, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Mozziconacci MJ, Mills KI, Cross NC and others. Molecular similarity between myelodysplastic form of chronic myelomonocytic leukemia and refractory anemia with ring sideroblasts. *Haematologica* 2013;98(4):576-83.
 92. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Aceto N, Remy V, Pinson S, Houdayer C, Arnoulet C, Sainty D, Bentires-Alj M and others. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer* 2008;8:299.
 93. Padron E, Abdel-Wahab O. Importance of genetics in the clinical management of chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2374-6.
 94. Schmitt-Graeff A, Thiele J, Zuk I, Kvasnicka HM. Essential thrombocythemia with ringed sideroblasts: a heterogeneous spectrum of diseases, but not a distinct entity. *Haematologica* 2002;87(4):392-9.
 95. Malcovati L, Della Porta MG, Pietra D, Boveri E, Pellagatti A, Galli A, Travaglini E, Brisci A, Rumi E, Passamonti F and others. Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood* 2009;114(17):3538-45.
 96. Broseus J, Florensa L, Zipperer E, Schnittger S, Malcovati L, Richebourg S, Lippert E, Cermak J, Evans J, Mounier M and others. Clinical features and course of refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2012;97(7):1036-41.
 97. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood* 2006;108(5):1781-2.
 98. Ceesay MM, Lea NC, Ingram W, Westwood NB, Gäken J, Mohamedali A, Cervera J, Germing U, Gattermann N, Giagounidis A and others. The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia* 2006;20(11):2060-1.
 99. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, Sekeres MA, Maciejewski JP. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 2006;108(7):2173-81.
 100. Wang SA, Hasserjian RP, Loew JM, Sechman EV, Jones D, Hao S, Liu Q, Zhao W, Mehdi M, Galili N and others. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia* 2006;20(9):1641-4.
 101. Schmitt-Graeff AH, Teo SS, Olschewski M, Schaub F, Haxelmans S, Kirn A, Reinecke P, Germing U, Skoda RC. JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 2008;93(1):34-40.
 102. Broséus J, Alpermann T, Wulfert M, Florensa Brichs L, Jeromin S, Lippert E, Rozman M, Lifermann F, Grossmann V, Haferlach T and others. Age, JAK2(V617F) and SF3B1

- mutations are the main predicting factors for survival in refractory anaemia with ring sideroblasts and marked thrombocytosis. *Leukemia* 2013;27(9):1826-31.
103. Jeromin S, Haferlach T, Grossmann V, Alpermann T, Kowarsch A, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. High frequencies of SF3B1 and JAK2 mutations in refractory anemia with ring sideroblasts associated with marked thrombocytosis strengthen the assignment to the category of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2013;98(2):e15-7.
 104. Onida F, Ball G, Kantarjian HM, Smith TL, Glassman A, Albitar M, Scappini B, Rios MB, Keating MJ, Beran M. Characteristics and outcome of patients with Philadelphia chromosome negative, bcr/abl negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 2002;95(8):1673-84.
 105. Breccia M, Biondo F, Latagliata R, Carmosino I, Mandelli F, Alimena G. Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2006;91(11):1566-8.
 106. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, Bottomly D, Wilmot B, McWeeney SK, Tognon CE and others. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med* 2013;368(19):1781-90.
 107. Pardanani A, Lasho TL, Laborde RR, Elliott M, Hanson CA, Knudson RA, Ketterling RP, Maxson JE, Tyner JW, Tefferi A. CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia. *Leukemia* 2013;27(9):1870-3.
 108. Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, Weinzierl E, Hatem J, Jaso J, Kanagal-Shamanna R and others. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(17):2645-51.
 109. Meggendorfer M, Bacher U, Alpermann T, Haferlach C, Kern W, Gambacorti-Passerini C, Haferlach T, Schnittger S. SETBP1 mutations occur in 9% of MDS/MPN and in 4% of MPN cases and are strongly associated with atypical CML, monosomy 7, isochromosome i(17)(q10), ASXL1 and CBL mutations. *Leukemia* 2013;27(9):1852-60.
 110. Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, Antolini L, Mologni L, Donadoni C, Papaemmanuil E and others. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 2013;45(1):18-24.
 111. Cannella L, Breccia M, Latagliata R, Frustaci A, Alimena G. Clinical and prognostic features of patients with myelodysplastic/myeloproliferative syndrome categorized as unclassified (MDS/MPD-U) by WHO classification. *Leuk Res* 2008;32(3):514-6.
 112. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
 113. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA and others. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95(3):952-8.
 114. Lévesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Williams B, Winkler IG, Simmons PJ. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp Hematol* 2002;30(5):440-9.
 115. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 2003;102(4):1249-53.
 116. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N and others. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002;3(7):687-94.
 117. Andréasson B, Swolin B, Kutti J. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Eur J Haematol* 2002;68(4):189-93.
 118. Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, Rumi E, Pungolino E, Malcovati L, Pascutto C, Morra E, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2003;88(10):1123-9.
 119. Popat U, Frost A, Liu E, Guan Y, Durette A, Reddy V, Prchal JT. High levels of circulating CD34 cells, dacrocytes, clonal hematopoiesis, and JAK2 mutation differentiate myelofibrosis with myeloid metaplasia from secondary myelofibrosis associated with pulmonary hypertension. *Blood* 2006;107(9):3486-8.

120. Xu M, Bruno E, Chao J, Huang S, Finazzi G, Fruchtman SM, Popat U, Prchal JT, Barosi G, Hoffman R and others. Constitutive mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis may be due to the action of a number of proteases. *Blood* 2005;105(11):4508-15.
121. Rosti V, Massa M, Vannucchi AM, Bergamaschi G, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Guglielmelli P and others. The expression of CXCR4 is down-regulated on the CD34+ cells of patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38(3):280-6.
122. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L and others. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;107(9):3676-82.
123. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353(10):999-1007.
124. Cohen KS, Cheng S, Larson MG, Cupples LA, McCabe EL, Wang YA, Ngwa JS, Martin RP, Klein RJ, Hashmi B and others. Circulating CD34(+) progenitor cell frequency is associated with clinical and genetic factors. *Blood* 2013;121(8):e50-6.
125. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Hoffman R, Barosi G. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23(24):5688-95.
126. Oppliger Leibundgut E, Horn MP, Brunold C, Pfanner-Meyer B, Marti D, Hirsiger H, Tobler A, Zwicky C. Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. *Haematologica* 2006;91(11):1465-72.
127. Barosi G, Rosti V, Massa M, Viarengo GL, Pecci A, Necchi V, Ramaioli I, Campanelli R, Marchetti M, Bazzan M and others. Spleen neoangiogenesis in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 2004;124(5):618-25.
128. Wang X, Prakash S, Lu M, Tripodi J, Ye F, Najfeld V, Li Y, Schwartz M, Weinberg R, Roda P and others. Spleens of myelofibrosis patients contain malignant hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2012;122(11):3888-99.
129. Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. *Cytotherapy* 2003;5(1):55-65.
130. Oppliger Leibundgut E, Brunold C, Marti D, Horn MP, Seiler C, Schroeder V, Schmid JP, Tobler A, Zwicky C. Progenitor cell trafficking in physiologic conditions and in myeloproliferative diseases: quantification of CD34+ cells by polymerase chain reaction. *Haematologica* 2005;90(7):875-80.
131. Arora B, Sirhan S, Hoyer JD, Mesa RA, Tefferi A. Peripheral blood CD34 count in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a prospective evaluation of prognostic value in 94 patients. *Br J Haematol* 2005;128(1):42-8.
132. Massa M, Campanelli R, Lupo L, Fois G, Viarengo G, Jemos V, Rosti V, Barosi G. Splenectomy produces a rapid but transient decrease of the frequency of circulating CD34+ haematopoietic progenitor cells in primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 2011;152(5):665-7.
133. Alchalby H, Lioznov M, Fritzsche-Friedland U, Badbaran A, Zabelina T, Bacher U, Stübig T, Ayuk FA, Zander AR, Kröger N. Circulating CD34(+) cells as prognostic and follow-up marker in patients with myelofibrosis undergoing allo-SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(1):143-5.
134. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014;28(7):1407-13.
135. DiNardo CD, Daver N, Jain N, Pemmaraju N, Bueso-Ramos C, Yin CC, Pierce S, Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM and others. Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, unclassifiable (MDS/MPN, U): natural history and clinical outcome by treatment strategy. *Leukemia* 2014;28(4):958-61.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Perte d'hétérozygotie de 9p – délétion et recombinaison mitotique	14
Figure 2. Modèle de continuum pour les TEs et les PVs avec mutation <i>JAK2V617F</i>	15
Figure 3. Répartition des mutations <i>JAK2</i> , <i>MPL</i> et <i>CALR</i> dans les NMPs sans chromosome Philadelphie	17
Figure 4. Représentation schématique des anomalies médullaires observées au cours de la TE et au cours de la prémyélofibrose	25
Figure 5. NMPs, SMDs et formes frontières	27
Figure 6. Anomalies moléculaires récurrentes dans les NMPs/SMDs	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Critères diagnostiques OMS 2008 et 2016 d'une PV	19
Tableau II. Critères diagnostiques OMS 2008 et 2016 d'une TE	22
Tableau III. Critères diagnostiques OMS 2008 et 2016 d'une myélofibrose	23
Tableau IV. Critères diagnostiques OMS 2016 d'une pré-myélofibrose primitive	24

ANNEXE : VERSION PUBLIEE DE L'ARTICLE

La Numération des Cellules CD34+ Circulantes Permet de Différencier la Myélofibrose

Primitive des Autres Néoplasies Myéloprolifératives BCR-ABL négatives.

RÉSUMÉ

Il a été suggéré qu'un nombre élevé de cellules CD34+ circulantes permettait de différencier les myélofibroses primitives (MFPs) des autres néoplasies myéloprolifératives sans chromosome Philadelphie. Nous avons réévalué l'intérêt diagnostique de ce test chez 26 volontaires sains et 256 patients consécutifs au diagnostic et chez qui une néoplasie myéloproliférative était suspectée. L'analyse de la courbe ROC a permis de montrer qu'un nombre de CD34+ < 10/ μ l permettait d'exclure le diagnostic de MFP avec une sensibilité de 97% et une spécificité de 90% (aire sous la courbe : 0,93 [0,89-0,98] ; $p < 0,001$). Les patients atteints de MFP avec une mutation de CALR avaient un nombre plus important de cellules CD34+ circulantes par rapport à ceux ayant une mutation de JAK2 ou de MPL ($p = 0,02$ et $p < 0,01$, respectivement). Ces résultats confirment que ce test rapide, non-invasif et standardisé est particulièrement intéressant afin d'éliminer le diagnostic de MFP.

Mots-clés : Myélofibrose primitive (MFP) ; néoplasies myéloprolifératives (NMPs) ; cellules CD34+ circulantes.

Circulating CD34+ Cell Count Differentiates Primary Myelofibrosis From Other

Philadelphia-negative Myeloproliferative Neoplasms: A Pragmatic Study.

ABSTRACT

A high number of circulating CD34+ cells has been advocated to distinguish primary myelofibrosis from other Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. We re-evaluated the diagnostic interest of measuring circulating CD34+ cells in 26 healthy volunteers and 256 consecutive patients at diagnosis for whom a myeloproliferative neoplasm was suspected. The ROC curve analysis showed that a number of CD34+ < 10/ μ l excludes the diagnosis of primary myelofibrosis with a sensitivity of 97% and a specificity of 90% (area under the curve: 0.93 [0.89-0.98]; $p < 0.001$). Patients with PMF harbouring a CALR mutation had more circulating CD34+ cells than patients with either a JAK2 or MPL mutation ($p = 0.02$ and $p < 0.01$, respectively). These results suggest that this fast, simple, non-invasive, and standardized test is of particular interest to exclude the diagnosis of primary myelofibrosis.

Keywords : Primary myelofibrosis (PMF) ; myeloproliferative neoplasms (MPN) ; circulating CD34+ cells.