



**HAL**  
open science

# Profils génomiques et impact pronostique dans les syndromes myéloprolifératifs

Damien Luque Paz

► **To cite this version:**

Damien Luque Paz. Profils génomiques et impact pronostique dans les syndromes myéloprolifératifs. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0046 . tel-03475920

**HAL Id: tel-03475920**

**<https://theses.hal.science/tel-03475920>**

Submitted on 11 Dec 2021

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

## L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : Génétique, Génomique, Bioinformatique

Par

**Damien LUQUE PAZ**

### **Profils génomiques et impact pronostique dans les syndromes myéloprolifératifs**

**Thèse présentée et soutenue à Angers le 28 Mai 2020**

**Unité de recherche : CRCINA INSERM Equipe 7**

#### **Rapporteurs avant soutenance :**

Olivier Kosmider	PU-PH, Université Paris V
Bruno Cassinat	Praticien Hospitalier, AP-HP / INSERM UMRS 1131

#### **Composition du Jury :**

Mathilde Hunault	PU-PH, Université d'Angers
Alain Morel	PU, Université d'Angers
Olivier Kosmider	PU-PH, Université Paris V
Bruno Cassinat	Praticien Hospitalier, AP-HP / INSERM UMRS 1131
Anne Murati	Praticien Hospitalier, Institut Paoli Calmettes Marseille
Jean-Christophe Ianotto	Praticien Hospitalier, CHRU Brest

#### **Directrice de thèse :**

Valérie Ugo	PU-PH, Université d'Angers
-------------	----------------------------

#### **Invité :**

Norbert Ifrah	PU-PH, Université d'Angers
---------------	----------------------------

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :

<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



## **Au Professeur Valérie Ugo,**

Je te remercie de m'avoir proposé et d'avoir dirigé ce travail. Depuis près de 9 ans, tu as su me donner le goût de l'Hématologie et de la recherche et tu m'as accompagné et guidé dans mon parcours professionnel. Je te remercie pour ta confiance et tes conseils. Je suis très heureux de pouvoir continuer à travailler à tes côtés.

## **Au Professeur Olivier Kosmider,**

Je te remercie de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse et d'avoir accepté d'en être un des rapporteurs.

## **Au Docteur Bruno Cassinat,**

Je te remercie de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse et d'avoir accepté d'en être un des rapporteurs. Je te remercie pour tes conseils lors de nos collaborations scientifiques.

## **Au Professeur Mathilde Hunault,**

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse. Je vous remercie infiniment pour vos conseils et votre disponibilité depuis mon arrivée à Angers. Travailler à vos côtés et aux côtés de votre équipe est un grand plaisir.

## **Au Professeur Norbert Ifrah,**

Je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail. Je tiens à vous remercier pour votre confiance et pour m'avoir soutenu à chaque grande étape de mon parcours professionnel. Je vous remercie également pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

## **Au Professeur Alain Morel,**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

## **Au Docteur Anne Murati,**

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je te remercie beaucoup pour nos échanges toujours intéressants et sympatiques.

## **Au Docteur Jean-Christophe Ianotto**

Je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Ce travail n'aurait pas été possible sans ta collaboration, je te remercie pour ta grande disponibilité, tes encouragements et tes précieux conseils.

## **Au Professeur Eric Lippert,**

Je te remercie pour ton aide et tes conseils qui ont grandement contribué à ce travail. Je remercie également l'ensemble du laboratoire d'Hématologie de Brest pour m'avoir formé à l'Hématologie durant mon internat et pour la poursuite de nos collaborations.

## **Au Professeur Gérard Socié,**

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre soutien et vos précieux conseils lors de ma préparation du CNU et lors des relectures de mes travaux. Je suis très honoré de la confiance que vous m'accordez.

## **Aux Biologistes du laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers,**

Je remercie Franck, Bénédicte, Alban, Marie et Matthieu pour m'avoir libéré du temps pour terminer cette thèse. C'est un honneur et un plaisir au quotidien de travailler avec vous.

Un merci tout particulier à Odile : pour ton accueil en biologie moléculaire, pour ta disponibilité, tes conseils et ton aide précieuse avec ta casquette CRB.

Je remercie Laurane dont le travail de M2 a contribué à cette thèse. C'est un grand plaisir de travailler avec toi.

A Anne, mon super binôme de biologie moléculaire, je te remercie pour tes encouragements, nos discussions et ton aide au quotidien. C'est une chance de pouvoir travailler avec toi.

## **A l'équipe d'Hématologie Moléculaire du CHU d'Angers,**

Je remercie Annaëlle, Françoise, Christelle, Valérie, Maxime (au cube), Agathe et Paul pour votre aide dans la réalisation de ce travail et pour votre bonne humeur et les pauses sucrés (promis après cette thèse je m'acquitte de mes dettes de gâteaux !).

Mention spéciale à Rébecca sans qui ce travail n'aurait pas été possible : un immense merci !

Un grand merci à Maxime Renard qui a permis au labo de passer le cap de la bioinformatique artisanale (et pour les superbes figures même si je suis un peu (trop ?) perfectionniste).

## **Aux Cliniciens du service des Maladies du Sang du CHU d'Angers,**

Je vous remercie tous pour votre participation et votre aide dans la conduite de nos travaux de recherche. Je remercie en particulier Aline et Sylvain pour vos conseils lors des réunions du jeudi midi. Un immense merci également à Françoise pour sa disponibilité et nos échanges.

A Corentin, merci pour ton aide dans les projets passés et à venir et merci pour ton amitié.

## **A Jérémie Riou,**

Quelle bonne idée de t'avoir contacté il y a maintenant près de 3 ans pour l'écriture d'un appel d'offre. Depuis, je te remercie pour ton expertise sur les statistiques (et m'avoir fait découvrir R) et pour ton amitié.

# REMERCIEMENTS

## **Aux Biologistes et Cliniciens du FIM,**

Je remercie en particulier Jean-Jacques Kiladjian, Lydia Roy, Chloé James, Brigitte Dupriez, François Delhommeau et Laura Velazquez pour les discussions scientifiques et les conseils qui ont contribué à la genèse, la conduite et l'exploitation de certains de mes travaux. Merci également à l'ensemble du CA du FIM pour sa confiance dans la conduite du projet de NGS des myélofibroses du FIM.

Je souhaite remercier sincèrement Stéphane Giraudier pour m'avoir confié l'exploitation des données de NGS de la cohorte de TE de Mondor.

Au groupe des moléculaires du FIM : Olivier, Ivan, Aurélie, Nabih et ceux déjà cités : un grand merci pour nos échanges et votre aide.

## **A mes Parents et à David**

Je vous remercie pour votre soutien indéfectible.

## **A mes Amis d'enfance, de fac, de Brest et d'Angers**

Je vous remercie pour votre amitié et votre soutien. J'espère vous voir tous très bientôt.

## **A Marie,**

Merci pour tout ! Pour ton amour au quotidien et pour tous ces moments que nous partageons. Tu es pour beaucoup dans ce travail et dans mon parcours, merci pour tes encouragements, tes relectures et ta grande patience.

## **A Idris,**

Merci pour ces moments de bonheur que nous vivons avec toi.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS : ASPECTS CLINIQUES</b>	<b>2</b>
Présentation clinique et classification	3
La polyglobulie de Vaquez	3
La thrombocytémie essentielle	4
La myélofibrose primitive	5
La myélofibrose préfibrotique ou prémyélofibrose	6
Pronostic et évolution des syndromes myéloprolifératifs	8
Survie globale	8
Evènements thrombotiques	10
Evolutions hématologiques	10
Principes de traitement	13
<b>LE PROFIL MUTATIONNEL DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS</b>	<b>16</b>
Les mutations promotrices	16
Mutations de JAK2	16
Mutations de MPL	20
Mutations de CALR	22
Les mutations additionnelles	26
Les différents gènes mutés	26
Mutations additionnelles et modèle tumoral des SMP	32
Complexité mutationnelle	32
Ordre d'acquisition des mutations et hétérogénéité clonale	32
Mutations additionnelles et évolutions hématologiques	34
Modèle mutationnel des syndromes myéloprolifératifs	37
Impact pronostique des mutations additionnelles	38
Dans la myélofibrose primitive	38
Dans la Polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle	40
Un modèle pronostique pan-SMP	40
Mutations additionnelles et réponse au traitement	42

<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>44</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>45</b>
<b>PARTIE 1 : PHASES CHRONIQUES DE SYNDROME MYELOPROLIFERATIF : POLYGLOBULIE DE VAQUEZ ET THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE</b>	<b>45</b>
Article 1 : L'analyse séquentielle de 18 gènes d'intérêt dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle <i>JAK2V617F</i> révèle une association entre les mutations additionnelles et l'aggravation de la maladie	46
Article 2 : Impact positif des mutations additionnelles sur les scores pronostiques usuels dans la thrombocytémie essentielle : expérience d'une cohorte monocentrique	67
Article 3 : L'évaluation moléculaire répétée de syndromes myéloprolifératifs avec mutation de <i>CALR</i> montre une association entre l'augmentation de la charge allélique <i>CALR</i> et l'aggravation de la maladie	95
<b>PARTIE 2 : PHASES EVOLUEES DE SYNDROME MYELOPROLIFERATIF : MYELOFIBROSE ET TRANSFORMATION LEUCEMIQUE</b>	<b>128</b>
Etude génomique par séquençage de nouvelle génération de 500 Myélofibroses de l'observatoire national	129
Article 4 : L'étude génomique des transformations leucémiques de polyglobulies de Vaquez et de thrombocytémies essentielles montre une association entre les profils moléculaires et le délai de survenue de la transformation	147
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>187</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>195</b>
Article I : Caractérisation clinique et biologique des syndromes myéloprolifératifs avec double mutation promotrice, une étude du FIM	195
Article II : Cas clinique décrivant l'association de mutations de <i>CALR</i> et de <i>LNK</i> conduisant à un phénotype de thrombocytémie essentielle avec érythrocytose	203
Article III : Cas clinique décrivant l'association de mutations rares des hotspots <i>JAK2V617</i> et <i>MPLW515</i> chez un patient avec thrombocytémie essentielle triple négative	206
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>210</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>230</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b>	<b>231</b>

## **Abréviations**

AMM : autorisation de mise sur le marché

ASCO : American Society of Clinical Oncology

BFU-E : progéniteur érythroïde burst forming Unit

BOM : biopsie ostéo-médullaire

CFU-E : progéniteur érythroïde colony forming Unit.

CRF : case report form

EPO : érythropoïétine

ESE : Exonic Splicing Enhancer

FIM : France Intergroupe des syndromes Myéloprolifératifs

GEBOM : Groupe d'Etude des Biopsies Ostéo-Médullaires

GMP : progéniteur granulo-monocytaire

HDAC : histone déacétylase

IP : investigateur principal

LAM : leucémie aiguë myéloblastique

LDH : lactate déshydrogénase

LMC : leucémie myéloïde chronique

LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique

MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire

MFP : myélofibrose primitive

NFS : numération formule sanguine

NGS : séquençage de nouvelle génération

OMS : organisation mondiale de la santé

préMFP : myélofibrose préfibrotique

PV : polyglobulie de Vaquez

SMD : syndromes myélodysplasiques

SMP : syndrome myéloprolifératif

TE : thrombocytémie essentielle

TPO : thrombopoïétine

## Introduction

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes physiologiques permettant la production continue et régulée de l'ensemble des cellules sanguines. Chez l'adulte l'hématopoïèse a lieu au niveau de la moelle osseuse. On distingue classiquement trois compartiments cellulaires au sein de l'hématopoïèse : le premier est celui des cellules souches hématopoïétiques qui sont dotées de capacités d'auto-renouvellement afin de maintenir constant ce compartiment tout au long de la vie (Figure 1). Les cellules souches hématopoïétiques sont en faible nombre et sont majoritairement quiescentes. Elles sont dotées de capacités de prolifération et de différenciation et sont seules capable de reconstituer l'ensemble de l'hématopoïèse. Le second compartiment est composé des progéniteurs qui proviennent de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques. Ces progéniteurs sont d'abord multipotents pouvant donner plusieurs lignées cellulaires puis unipotents au fur à mesure de leur différenciation. Enfin le dernier compartiment de l'hématopoïèse est composé des précurseurs, ceux-ci sont spécifiques d'un type cellulaire et vont terminer leur différenciation pour donner les cellules matures qui passeront dans la circulation sanguine. Au stade de précurseur, la capacité de prolifération est très faible.

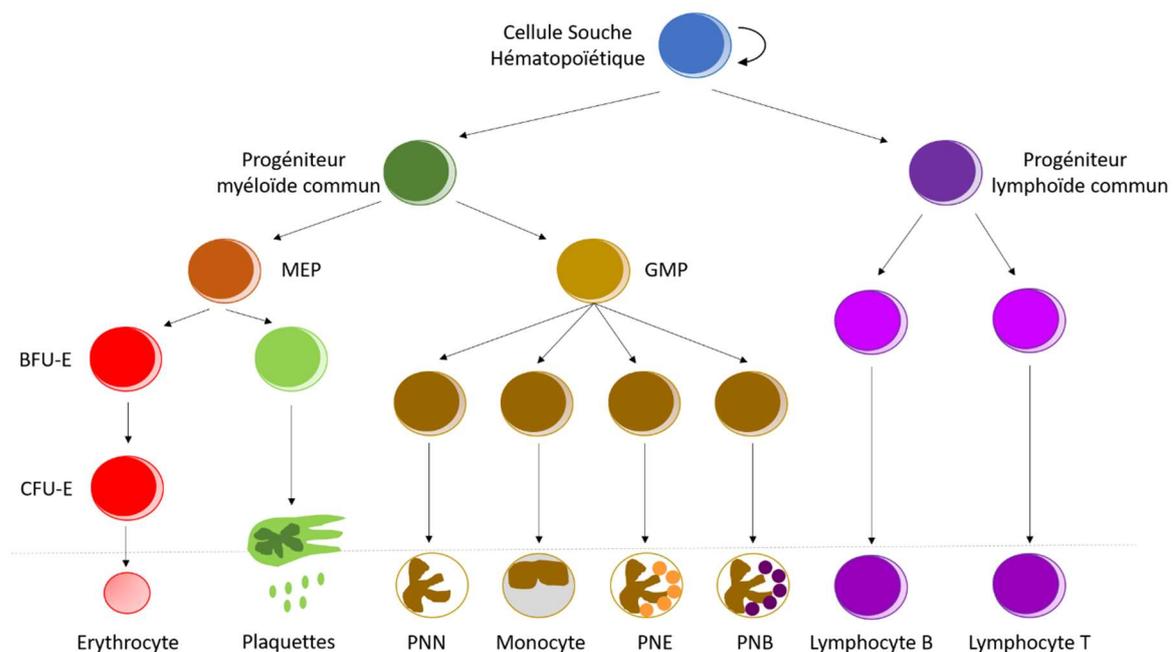


Figure 1 : Représentation schématique de l'hématopoïèse

*MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire, GMP : progéniteur granulo-monocytaire, BFU-E : progéniteur érythroïde Burst forming Unit, CFU-E : progéniteur érythroïde Colony forming Unit.*

La régulation de l'hématopoïèse permet l'adaptation de la production des cellules sanguines selon les besoins de l'organisme. Cette régulation met en jeu différents éléments dont notamment le micro-environnement médullaire qui forme la niche hématopoïétique (Boulais and Frenette, 2015). La régulation de l'hématopoïèse par le micro-environnement médullaire est médiée à la fois (i) via des interactions avec les différentes cellules

le composant (fibroblastes, macrophages, adipocytes, myofibroblastes...), (ii) via des interactions avec la matrice extracellulaire (fibronectine, laminines, collagènes) et enfin (iii) via des cytokines ou facteurs de croissance hématopoïétiques. Les facteurs de croissance hématopoïétiques peuvent être produits localement au niveau médullaire par un mécanisme paracrine ou autocrine ou être produits par d'autres organe comme par exemple l'érythropoïétine (EPO) produite par les cellules endothéliales des capillaires péri-tubulaires rénaux. Les facteurs de croissance hématopoïétiques peuvent agir à différents niveaux de l'hématopoïèse : soit aux phases précoces ou alors aux phases plus avancées et être alors spécifiques d'une lignée cellulaire. Les facteurs de croissance hématopoïétiques agissent sur les cellules de l'hématopoïèse via leur fixation à des récepteurs spécifiques qui entraîne une activation de voies de signalisation et, selon le type de cytokines et de cellules, un maintien de la quiescence, une prolifération ou une différenciation. D'autres facteurs interviennent également dans la régulation de l'hématopoïèse tels que l'expression de facteurs de transcription ou encore la concentration en oxygène dans la niche hématopoïétique qui régule la quiescence des cellules souches hématopoïétiques.

## Les syndromes myéloprolifératifs : aspects cliniques

Le terme syndrome myéloprolifératif a été introduit pour la première fois en 1951 par William Dameshek et rassemblait plusieurs hémopathies avec des similarités de présentation clinique et biologique (Dameshek, 1951). On distingue aujourd'hui quatre principaux syndromes myéloprolifératifs : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primitive (MFP). La LMC est caractérisée par la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 (formant le chromosome Philadelphie). La fusion des gènes *BCR* (breakpoint cluster) et *ABL* (Abelson) aboutit à la formation d'une protéine chimérique à activité tyrosine kinase constitutive. Les autres syndromes myéloprolifératifs représentent un ensemble hétérogène de pathologies regroupées sous le terme de syndromes myéloprolifératifs Philadelphie négatifs (SMP).

Les syndromes myéloprolifératifs sont des hémopathies malignes myéloïdes liées à une anomalie clonale de la cellule souche hématopoïétique. Ils sont caractérisés par une prolifération cellulaire conduisant à une hyperproduction de cellules myéloïdes matures. En fonction des pathologies, cette prolifération prédomine sur une lignée : érythroblastique dans la polyglobulie de Vaquez et mégacaryocytaire dans la thrombocytémie essentielle. La myélofibrose est une maladie plus complexe associant une prolifération de la lignée mégacaryocytaire à une fibrose de la moelle osseuse.

Cette prolifération est due à une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance hématopoïétiques et peut être mise en évidence par la culture *in vitro* des progéniteurs hématopoïétiques mise au point dans les années 1970 (McLeod et al., 1974; Prchal and Axelrad, 1974). En 2005, la découverte de la mutation V617F de *JAK2* a considérablement amélioré les connaissances sur la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs et en a modifié le diagnostic. La mise en évidence des mutations de *MPL* en 2006 puis de *CALR* en 2013 permettent, à l'heure actuelle, de disposer d'un marqueur moléculaire dans environ 90% des cas de SMP. Toutes ces mutations, dites promotrices, entraînent une activation constitutive de la signalisation JAK2-STAT5 à l'origine de l'autonomisation du clone malin vis-à-vis des facteurs de croissances. Les aspects physiopathologiques de ces mutations seront décrits dans la partie 2.1 de ce manuscrit.

## Présentation clinique et classification

### La polyglobulie de Vaquez

La polyglobulie de Vaquez est caractérisée par une prolifération cellulaire prédominant sur la lignée érythrocytaire. L'incidence de la PV est de 1/100 000 habitants/an et l'âge médian au diagnostic est de 60 ans (Titmarsh et al., 2014). Le diagnostic peut être fortuit ou être posé suite à la survenue de signes cliniques tels qu'une érythrose cutanée, une splénomégalie, un prurit aquagénique, des signes d'hyperviscosité ou une complication thrombotique. Les thromboses peuvent être de localisation artérielle ou veineuse et certaines d'entre elles de localisation atypique comme le syndrome de Budd-Chiari.

Au niveau de l'hémogramme, on observe une polyglobulie reflétée par une augmentation des taux d'hémoglobine et d'hématocrite. Une mesure du volume globulaire isotopique grâce à un isotope radiomarqué peut être parfois utile pour confirmer la polyglobulie. Une thrombocytose et une polynucléose sont également habituellement observées. Le diagnostic repose principalement sur la mise en évidence d'une mutation de *JAK2* retrouvée chez plus de 99% des patients (V617F ou de l'exon 12).

Les critères diagnostiques définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ont été révisés en 2016 avec des modifications introduites avec le passage de critère mineur à majeur de la biopsie ostéo-médullaire (BOM), l'abaissement des seuils d'hémoglobine et d'hématocrite, et la suppression de la culture cellulaire comme critère mineur (tableau I) (Arber et al., 2016).

Tableau I : Critères diagnostiques de la polyglobulie de Vaquez

Critères Majeurs
Hémoglobine > 16,5 g/dL chez l'homme, > 16 g/dL chez la femme Ou Hématocrite > 49 % chez l'homme, > 48 % chez la femme Ou augmentation de la masse sanguine totale (> 25% de la valeur théorique)
Biopsie ostéo-médullaire avec hypercellularité des trois lignées myéloïdes (panmyélose) et maturation mégacaryocytaire pléiomorphique
Présence d'une mutation de <i>JAK2</i> V617F ou de l'exon 12
Critères Mineurs
Taux sanguin d'EPO subnormal

Le diagnostic requiert les trois critères majeurs ou les deux premiers et le critère mineur

La biopsie ostéo-médullaire n'est pas requise en cas de polyglobulie avec hémoglobine > 18,5 g/dL chez homme (>16,5 g/dL chez la femme) ou hématocrite > 55% chez l'homme (> 49,5 chez la femme).

La BOM prend donc une place prépondérante pour le diagnostic de PV puisque faisant partie des critères majeurs requis. Toutefois, elle n'est pas obligatoire lorsque la polyglobulie dépasse les seuils de l'ancienne classification OMS 2008, à savoir 18,5 g/dL chez l'homme (ou hématicrite > 55%) et 16,5g/dL chez la femme (ou hématicrite > 49,5%). La BOM permet également l'identification des cas avec fibrose de grade 1, associés à un risque accru d'évolution vers une myélofibrose secondaire (Barbui et al., 2012a). Les seuils d'hémoglobine et d'hématicrite ont été abaissés pour permettre le diagnostic des polyglobulies dites masquées qui n'atteignaient pas les précédents seuils de la classification de 2008 et dont le diagnostic nécessitait la réalisation d'une masse sanguine (Cassinat et al., 2007). Le sous-diagnostic de ces polyglobulies masquées semble associé à de plus nombreuses complications thrombotiques du fait de l'usage moindre des saignées ou d'un traitement cytoréducteur (Lussana et al., 2014).

La culture cellulaire avec la pousse spontanée des progéniteurs érythroblastiques a été supprimée des critères diagnostiques de polyglobulie de Vaquez dans la nouvelle révision de la classification OMS. L'exclusion de cet examen, qui faisait partie des critères mineurs dans la classification de 2008, peut s'expliquer par le fait qu'il est de réalisation longue et complexe et n'est pas accessible à tous les centres. Toutefois la culture cellulaire peut s'avérer utile dans certains cas de diagnostic difficile, en particulier lorsque les mutations de *JAK2* ne sont pas retrouvées.

### **La thrombocytémie essentielle**

La thrombocytémie essentielle est caractérisée par une prolifération cellulaire prédominant sur la lignée mégacaryocytaire. Son incidence est de 1.6/100 000 habitant/an et l'âge médian au diagnostic est de 60 ans avec également un pic d'incidence chez la femme vers 30 ans. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une thrombocytose sur l'hémogramme, le plus souvent de manière fortuite ou plus rarement devant des signes cliniques tels que les érythroméalgies ou des complications thrombotiques artérielles ou veineuses.

La découverte de mutations somatiques promotrices des gènes *JAK2*, *CALR* et *MPL* depuis 2005 permet maintenant de disposer d'un marqueur moléculaire dans près de 85% des cas de thrombocytémie essentielle.

Les critères diagnostiques de la thrombocytémie essentielle ont été peu modifiés avec la révision de la classification de l'OMS en 2016. Au niveau moléculaire, les mutations de *MPL* et de *CALR* ont été ajoutées aux mutations de *JAK2* comme critère majeur (tableau II).

En l'absence de mutation promotrice (*JAK2*, *MPL* ou *CALR*) on parle de TE triple négative, ce qui semble correspondre à environ 15% des cas (Zoi and Cross, 2017). Le critère mineur est requis pour ces TE triples négatives, il peut consister en la mise en évidence d'un marqueur de clonalité ou l'absence de cause réactionnelle à la thrombocytose. Le marqueur de clonalité peut être une anomalie cytogénétique clonale (rare) ou une anomalie moléculaire somatique autre que les mutations promotrices. Ces mutations sont maintenant accessibles plus facilement grâce au séquençage de nouvelle génération (NGS).

La biopsie ostéo-médullaire est indispensable au diagnostic puisqu'elle seule permet le diagnostic différentiel avec la myélofibrose et en particulier les formes préfibrotiques.

Tableau II : Critères diagnostiques de la thrombocythémie essentielle

<b>Critères Majeurs</b>
Plaquettes $\geq$ 450 G/L
Biopsie ostéo-médullaire avec prolifération mégacaryocytaire et augmentation du nombre de formes matures de grande taille au noyau hyperlobulé. Pas d'augmentation significative des autres lignées. Rarement densification minimale de la trame réticulinique (fibrose grade 1)
Absence de critères OMS pour une LMC ( <i>BCR-ABL</i> ), une PV, une MFP, un syndrome myélodysplasique ou une autre hémopathie myéloïde
Présence d'une mutation de <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i>
<b>Critères Mineurs</b>
Présence d'un marqueur de clonalité ou absence d'étiologie pour une thrombocytose réactionnelle

Le diagnostic requiert les quatre critères majeurs ou les trois premiers et le critère mineur

### La myélofibrose primitive

La myélofibrose primitive (MFP) est une pathologie plus rare avec une incidence de l'ordre de 0,5 cas pour 100 000 habitants/an (Titmarsh et al., 2014). Cette maladie est plus complexe sur le plan physiopathologique puisqu'elle associe une prolifération cellulaire portant sur les lignées granuleuse et mégacaryocytaire et une fibrose de la moelle osseuse.

La maladie peut débuter par une période proliférative avec au niveau sanguin une hyperleucocytose associée à une myélémie voire une blastose circulante et une thrombocytose. Le développement de la fibrose médullaire est responsable de cytopénies et en particulier d'une anémie qui est fréquente dès le diagnostic. L'hématopoïèse extra-médullaire est responsable de la splénomégalie qui est très fréquemment retrouvée. L'âge médian au diagnostic est de 65 ans. Le terme de myélofibrose primitive est utilisé pour la distinguer des myélofibroses secondaires, notamment post-PV et post-TE (Mesa et al., 2007). Il n'existe pas de différence au niveau anatomo-pathologique entre les MFP et les myélofibroses post-TE ou post-PV et la prise en charge actuelle est identique. La myélofibrose peut se compliquer de manifestations thrombotiques (plus rares que dans la PV et la TE), d'hypertension portale ou de manifestations liées à l'insuffisance médullaire (hémorragies, infections). Au niveau moléculaire, une mutation promotrice portant sur l'un des gènes *JAK2*, *CALR* et *MPL* est retrouvée dans près de 90% des cas.

Dans la nouvelle révision de la classification OMS des néoplasies myéloprolifératives, la myélofibrose primitive dite avérée correspond uniquement aux cas de myélofibrose avec un grade de fibrose histologique MF2 ou MF3 puisque les grades 1 font maintenant partie des myélofibroses préfibrotiques. Au niveau moléculaire, les mutations de *CALR* retrouvées dans environ un tiers des cas, ont été ajoutées comme critère diagnostique majeur (tableau III). En l'absence de mutation promotrice (*JAK2*, *MPL* ou *CALR*), soit environ 7% des cas, un marqueur de clonalité peut être mis en évidence parmi les gènes les plus souvent mutés dans cette pathologie (*ASXL1*, *TET2*...). Toutefois, ces gènes ne sont pas spécifiques de la MFP car ils sont aussi fréquemment mutés

dans les syndromes myélodysplasiques (SMD), les formes mixtes SMD/SMP et plus rarement dans les autres NMP, ce qui impose toujours l'élimination de ces diagnostics différentiels (critère majeur 2). Au niveau des critères mineurs, l'hyperleucocytose supérieure à 11 G/L a été introduite aux côtés de l'anémie, de la splénomégalie, de l'augmentation des LDH et de l'érythroblastose sanguine.

Tableau III : Critères diagnostiques de la myélofibrose primitive

<b>Critères Majeurs</b>
Biopsie ostéo-médullaire avec prolifération et atypies mégacaryocytaires, accompagnée d'une fibrose réticulinque ou collagénique (grade 2 ou 3)
Absence de critères OMS pour une LMC ( <i>BCR-ABL</i> ), une PV, une MFP, un syndrome myélodysplasique ou une autre hémopathie myéloïde
Présence d'une mutation de <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> Ou présence d'un marqueur de clonalité (par exemple mutation de <i>ASXL1</i> , <i>TET2</i> , <i>EZH2</i> ; <i>IDH1/2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i> ) Ou absence de cause réactionnelle fibrose médullaire *
<b>Critères Mineurs</b>
Anémie non liée à une comorbidité
Hyperleucocytose $\geq 11$ G/L
Splénomégalie palpable
Augmentation des LDH (seuil variant selon le laboratoire)
Présence d'érythroblastes sanguins

Le diagnostic requiert les trois critères majeurs et au moins un critère mineur

\* : fibrose due à infection, maladie auto-immune, hémopathie lymphoïde, métastases médullaire, cause toxique.

### **La myélofibrose préfibrotique ou prémyélofibrose**

La prémyélofibrose est une entité intermédiaire entre la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive initialement décrite au niveau histologique il y a maintenant près de 20 ans (Thiele et al., 1999) (Figure 2). Par rapport aux patients atteints de TE, il semble que les patients atteints de prémyélofibrose évoluent plus fréquemment vers une myélofibrose avérée et ont un pronostic globalement plus défavorable avec une mortalité accrue (Thiele et al., 2002; Barbui et al., 2011a; Thiele et al., 2011; Gisslinger et al., 2016). A l'inverse, les patients atteints de prémyélofibrose semblent présenter une évolution plus favorable que les patients atteints de myélofibrose primitive (Barosi et al., 2012). Dans ces études, la définition de cette entité était uniquement histologique et correspondait au reclassement de thrombocytémies essentielles en prémyélofibroses.

La révision de 2016 de la classification de l'OMS des hémopathies malignes a intégré la prémyélofibrose sous le terme de myélofibrose préfibrotique avec des critères diagnostiques histologiques et clinico-biologiques (tableau

IV). Les critères diagnostiques de la myélofibrose préfibrotique (prémFP) reprennent les critères de la myélofibrose primitive avérée (MFP) hormis l'histologie médullaire qui les différencie et le critère mineur des érythroblastes sanguins qui a été supprimé.

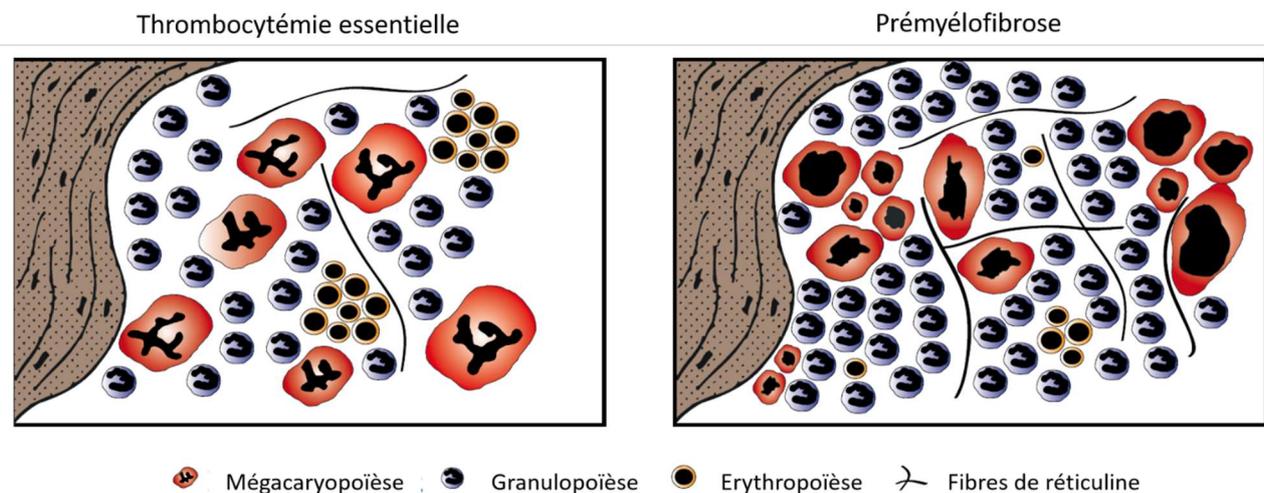


Figure 2 : Définition anatomo-pathologique de la thrombocytémie essentielle et de la prémyélofibrose  
*D'après Thiele et al Blood 2011 ; la prémyélofibrose est définie par une cellularité augmentée, une prolifération granuleuse au dépend de l'érythropoïèse, des mégacaryocytes fréquemment regroupés en cluster, de taille moyenne à grande avec un noyau hyperchromatique, bulbeux ou irrégulier. Les fibres de réticuline ne sont pas ou peu augmentés.*

La myélofibrose préfibrotique selon la classification 2016 de l'OMS regroupe donc les anciennes myélofibroses primitives avec fibrose de grade 1 ainsi que des formes sans fibrose médullaire anciennement classées en TE. Cette distinction entre TE et myélofibrose préfibrotique semble néanmoins difficile à établir du fait d'un manque important de reproductibilité de l'analyse histologique (Wilkins et al., 2008; Brousseau et al., 2010; Koopmans et al., 2011). Ce manque de reproductibilité a été confirmé dans une étude multicentrique avec un consensus parfait possible dans seulement 10% des cas entre les 6 anatomopathologistes (Buhr et al., 2012). De plus, le risque accru de transformation en myélofibrose et de mortalité des patients avec une prémyélofibrose n'est pas confirmé dans toutes les cohortes (Wilkins et al., 2008; Brousseau et al., 2010). Enfin, la présence d'un critère mineur de myélofibrose préfibrotique peut être retrouvé dans certains cas de TE tout comme il est possible d'être confronté à un cas de myélofibrose préfibrotique histologique sans aucun des critères mineurs de l'OMS 2016 (Jerczynski et al., 2017). De tels patients seront donc classés en syndromes myéloprolifératifs inclassables selon l'OMS, ce qui représenterait environ 9 % des cas selon l'étude précitée.

Tableau IV : Critères diagnostiques de la myélofibrose préfibrotique

<b>Critères Majeurs</b>
Biopsie ostéo-médullaire avec prolifération et atypies mégacaryocytaires, sans fibrose dépassant le grade 1, avec augmentation de la richesse, une prolifération granuleuse et souvent une diminution de l'érythropoïèse
Absence de critères OMS pour une LMC ( <i>BCR-ABL</i> ), une PV, une MFP, un syndrome myélodysplasique ou une autre hémopathie myéloïde
Présence d'une mutation de <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> ou <i>MPL</i> Ou présence d'un marqueur de clonalité (par exemple mutation de <i>ASXL1</i> , <i>TET2</i> , <i>EZH2</i> ; <i>IDH1/2</i> , <i>SRSF2</i> , <i>SF3B1</i> ) Ou absence de cause réactionnelle fibrose médullaire *
<b>Critères Mineurs</b>
Anémie non liée à une comorbidité
Hyperleucocytose $\geq 11$ G/L
Splénomégalie palpable
Augmentation des LDH (seuil variant selon institution)

Le diagnostic requiert les trois critères majeurs et au moins un critère mineur

\* : fibrose due à infection, maladie auto-immune, hémopathie lymphoïde, métastases médullaire, cause toxique.

## Pronostic et évolution des syndromes myéloprolifératifs

### Survie globale

Les syndromes myéloprolifératifs sont des hémopathies chroniques avec une grande hétérogénéité de pronostic entre les pathologies et au sein même d'entre elles. Ainsi, la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle ont une évolution le plus souvent chronique avec une médiane de survie de l'ordre de 14 et 22 ans respectivement (Passamonti et al., 2008; Tefferi et al., 2013). Les complications impactant le pronostic vital dans ces pathologies sont la survenue de thromboses et la transformation en leucémie aiguë. Par rapport aux patients atteints de TE, il semble que les patients atteints de prémyélofibrose ont un pronostic plus défavorable avec une mortalité accrue (56% vs 25% de mortalité à 15 ans).

La myélofibrose primitive a un pronostic plus péjoratif avec une médiane de survie entre 13 mois et 11 ans selon les groupes pronostiques (Cervantes et al., 2009; Dupriez et al., 1996). La mortalité dans cette pathologie peut être liée à l'insuffisance médullaire, à la survenue de thromboses ou à la transformation en leucémie aiguë. Les myélofibroses post-PV ou post-TE ont un pronostic comparable à la MFP. Plusieurs scores pronostiques ont été proposés dans la myélofibrose et sont résumés dans le tableau V. Les scores récents intégrant des données moléculaires seront développés dans la suite de ce mémoire.

Tableau V : Scores pronostiques dans la myélofibrose (hors scores avec mutations additionnelles)

Score	<b>Score de Lille</b> (Dupriez et al., 1996)	<b>IPSS</b> (Cervantes et al., 2009)	<b>DIPSS</b> (Passamonti et al., 2010a)	<b>MYSEC-PM</b> (Passamonti et al., 2017)
	Myélofibrose primitive au diagnostic	Myélofibrose primitive au diagnostic	Myélofibrose primitive durant le suivi	Myélofibrose secondaire au diagnostic
Paramètres et calcul du score	Anémie (<10g/dL) <b>1pt</b>	Anémie (<10g/dL) <b>1pt</b>	Anémie (<10g/dL) <b>2pt</b>	Anémie (<11g/dL) <b>2pt</b>
	Hyperleucocytose (>30G/L) ou Leucopénie (<4G/L) <b>1pt</b>	Hyperleucocytose (>25G/L) <b>1pt</b>	Hyperleucocytose (>25G/L) <b>1pt</b>	-
		Age (>65ans) <b>1pt</b>	Age (>65ans) <b>1pt</b>	Âge ( <b>0.15xâge pt</b> )
		Signes généraux* <b>1pt</b>	Signes généraux* <b>1pt</b>	Signes généraux* <b>1pt</b>
		Blastes sanguins (≥1%) <b>1pt</b>	Blastes sanguins (≥1%) <b>1pt</b>	Blastes sanguins (≥3%) <b>2pt</b>
				Thrombopénie (<150G/L) <b>1pt</b>
				CALR-non muté <b>2pt</b>
Catégories de risque	<b>Faible</b> (0pt) SM : 93 mois	<b>Faible</b> (0pt) SM : 135 mois	<b>Faible</b> (0pt) SM : Non atteinte	<b>Faible</b> (<11pts) SM : Non atteinte
	<b>Intermédiaire</b> (1pt) SM : 26 mois	<b>Int-1</b> (1pt) SM : 95 mois	<b>Int-1</b> (1-2pt) SM : 170 mois	<b>Int-1</b> (11-14pts) SM : 112 mois
		<b>Int-2</b> (2pts) SM : 48 mois	<b>Int-2</b> (3-4pts) SM : 48 mois	<b>Int-2</b> (14-16pts) SM : 53 mois
<b>Elevée</b> (2pts) SM : 13 mois	<b>Elevée</b> (>2pt) SM : 27 mois	<b>Elevée</b> (>4pt) SM : 18 mois	<b>Elevée</b> (>16pt) SM : 24 mois	

IPSS : International Prognostic Scoring System ; DIPSS : Dynamic International Prognostic Scoring System ; MYSEC-PM : Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model ; SM : survie médiane ; Int : Intermédiaire ; \* : perte de poids >10% dans l'année ou fièvre inexpliquée ou sueurs nocturnes persistante plus d'un mois

## Evènements thrombotiques

La survenue de thromboses est la complication la plus fréquente des syndromes myéloprolifératifs de type thrombocythémie essentielle et polyglobulie de Vaquez. Les complications thrombotiques peuvent survenir dès le diagnostic et tout au long de la maladie et peuvent être artérielles ou veineuses. L'incidence des thromboses est estimée à environ 1,5 à 3% des patients par an dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocythémie essentielle (Barbui et al., 2012b, 2014). Les principaux facteurs de risques de complications thrombotiques dans les syndromes myéloprolifératifs sont un âge supérieur à 60 ans et un antécédent de thrombose (Barbui et al., 2011b). La présence d'un de ces facteurs classe le patient comme à haut risque et justifie l'instauration d'un traitement cytoréducteur. Dans une cohorte de 494 patients (PV et TE) avec un antécédent de thrombose l'incidence annuelle du taux de récurrence était de 7,6% (De Stefano et al., 2008).

La physiopathologie des complications thrombotiques dans les syndromes myéloprolifératifs n'est pas totalement connue et plusieurs facteurs semblent jouer un rôle : les globules rouges, les plaquettes, les leucocytes, la rhéologie sanguine, les facteurs plasmatiques et les cellules endothéliales (Brusson et al., 2018; Guy and James, 2019). Le type de mutation promotrice influence également le risque thrombotique puisque dans la thrombocythémie essentielle, les patients avec mutations *JAK2V617F* ont un risque augmenté par rapport aux patients avec mutation de *CALR* (Rumi et al., 2014a).

Dans la thrombocythémie essentielle, une classification pronostique nommée IPSET-Thrombosis (International Prognostic Score of Thrombosis for Essential Thrombocythemia) a été proposée (Barbui et al., 2012b). Le calcul du score reprend en compte l'âge supérieur à 60 ans (1 point) et l'antécédent de thrombose (2 points) précédemment décrits en ajoutant la présence d'une mutation *JAK2V617F* (2 points) et la présence de facteur de risque cardiovasculaire (1 point). Le taux de survenue de thrombose selon les catégories de risque calculé est de 1,03% patients/an pour les faibles risques (0-1 point), de 2,32% patients/an pour les risques intermédiaires (2 points) et de 3,56% patients/an pour les risques élevés (>2 points). Ce score pronostique a plus récemment été modifié avec la suppression du critère concernant les facteurs de risque cardiovasculaires pour définir un nouveau groupe de très bas risque (âge<60 ans, absence de *JAK2V617F* et d'antécédent de thrombose) (Barbui et al., 2015). La bonne discrimination du risque thrombotique par ce score a pu être validée dans une cohorte de la Mayo Clinic (Haider et al., 2016).

## Evolutions hématologiques

Il existe un continuum d'évolution au sein des syndromes myéloprolifératifs puisque qu'une partie des patients avec une thrombocythémie essentielle peut évoluer vers une polyglobulie de Vaquez et que les patients atteints d'une thrombocythémie essentielle ou d'une polyglobulie de Vaquez peuvent évoluer vers une myélofibrose alors qualifiée de secondaire. Enfin tous les syndromes myéloprolifératifs peuvent évoluer vers une leucémie aiguë myéloblastique précédée parfois d'un état accéléré proche d'un syndrome myélodysplasique avec excès de blastes. Les évolutions et leurs incidences cumulées décrites sont résumées sur la figure 3.

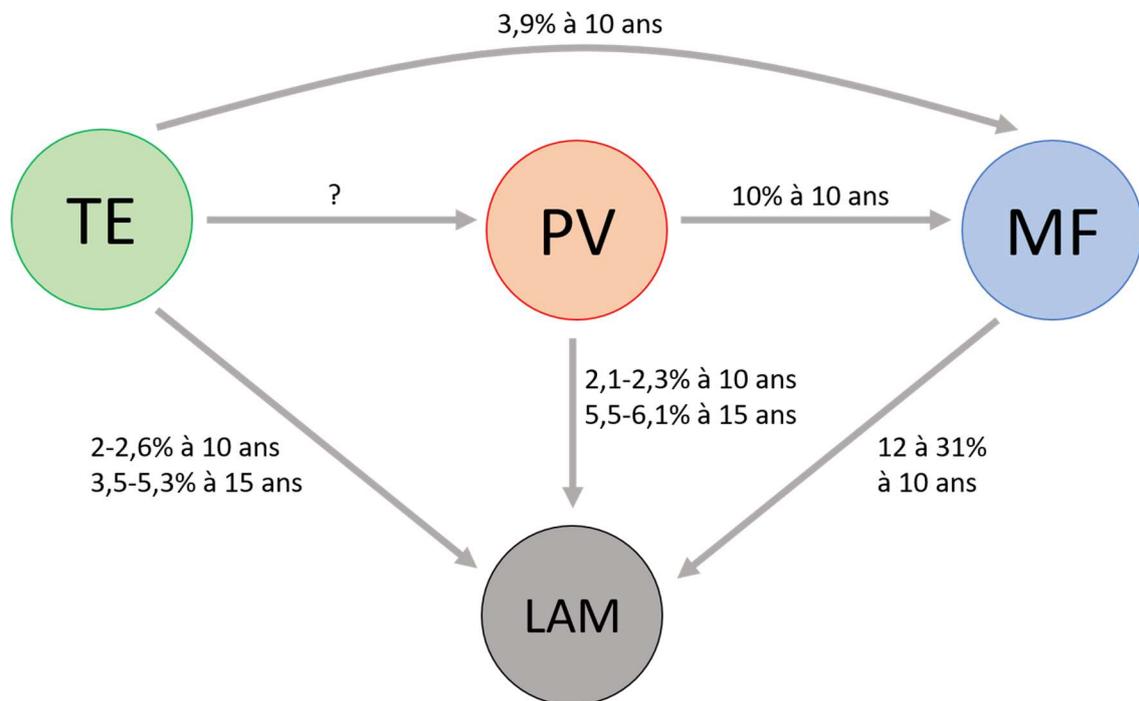


Figure 3 : Evolutions hématologiques des syndromes myéloprolifératifs et incidences cumulées (Gangat et al., 2011; Passamonti et al., 2008; Tefferi et al., 2013, 2014a)

Les formes histologiques prémyélofibrotiques identifiées parmi les thrombocythémies essentielles semblent associées à un risque accru d'évolution en myélofibrose avérée (17% à 15 ans contre 9% pour les TE 'classiques') et en leucémie aiguë (11,7% à 15 ans contre 2,1% pour les TE 'classiques') (Barbui et al., 2011a).

Les leucémies aiguës secondaires à un syndrome myéloprolifératif sont associées à un pronostic très péjoratif avec une survie médiane de 2 à 5 mois (Mesa et al., 2005; Tam et al., 2008; Tefferi et al., 2018a). De ce fait, l'identification précoce des patients à haut risque d'évolution est un des enjeux majeurs dans la prise en charge des syndromes myéloprolifératifs.

De nombreux facteurs de risques associés à l'évolution des syndromes myéloprolifératifs en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë ont été décrits et sont résumés dans le tableau VI. L'impact pronostique des mutations additionnelles sur les évolutions hématologiques sera traité dans la partie 2.2 de ce manuscrit.

Tableau VI : Paramètres au diagnostic associés aux évolutions hématologiques des syndromes myéloprolifératifs (hors mutations additionnelles)

	<b>Polyglobulie de Vaquez</b>	<b>Thrombocytémie essentielle</b>	<b>Myélofibrose primitive</b>
<b>Evolution en myélofibrose secondaire</b>	Fibrose à la BOM (Barbui et al., 2012a)  JAK2V617F > 50% (Passamonti et al., 2010b)	Anémie* (Passamonti et al., 2008)  Prémyélofibrose à la BOM (Barbui et al., 2011a)	
<b>Evolution en leucémie aiguë</b>	Age > 61 ans (Tefferi et al., 2013)  Leucocytes ≥ 15 G/L (Gangat et al., 2007a; Tefferi et al., 2013)  Caryotype anormal (Tefferi et al., 2013)	Age > 60 ans (Gangat et al., 2007b; Passamonti et al., 2008)  Prémyélofibrose à la BOM (Barbui et al., 2011a)  Anémie* (Gangat et al., 2007b)  Thrombocytose >1000 G/L (Gangat et al., 2007b)	Score DIPSS et DIPSS-plus (Gangat et al., 2011; Passamonti et al., 2010c)  Hyperleucocytose seuil à 25, 30, ou 40 G/L selon études (Dupriez et al., 1996; Tefferi et al., 2011)  Thrombopénie <50G/L <sup>†</sup> (Tam et al., 2009)  Blastes ≥10% sang ou moelle <sup>†</sup> (Tam et al., 2009)  Caryotype anormal ou monosomique (Dupriez et al., 1996; Tefferi et al., 2012; Vaidya et al., 2011)

BOM : biopsie ostéo-médullaire ; \* : anémie définie par valeur <12g/dL chez la femme et <13g/dL chez l'homme ; † : paramètre associée à la transformation leucémique dans la MFP et les myélofibroses secondaires

## Principes de traitement

### Acétylsalicylate de DL-lysine (« Aspirine »)

La prévention du risque thrombotique dans les syndromes myéloprolifératifs est l'objectif majeur à court et moyen terme et repose principalement sur l'utilisation d'acétylsalicylate de DL-lysine (aspirine) et la prise en charge des autres facteurs de risque cardiovasculaire. Dans la polyglobulie de Vaquez, le traitement par aspirine est presque toujours recommandé (Spivak, 2019). En effet le bénéfice de ce traitement sur la prévention de la survenue de thrombose dans la PV a été évalué dans un essai clinique et le traitement par aspirine entraînait une réduction du taux de thrombose (6,7% vs 15,5% pour le placebo) (Landolfi et al., 2004).

A l'inverse, le bénéfice du traitement préventif par aspirine dans la thrombocytémie essentielle n'a jamais été évalué dans un essai randomisé. Les données rétrospectives disponibles montrent un intérêt du traitement préventif de l'aspirine essentiellement chez les patients de haut risque vasculaire (âge > 60 ans et/ou mutation *JAK2V617F*) avec une réduction du taux de thromboses (Alvarez-Larrán et al., 2010, 2013). Dans une étude observationnelle multicentrique chez des patients de faible risque (âge < 60 ans et mutation de *CALR*), le traitement par aspirine n'influait pas la survenue de thromboses mais était associé à un risque accru de complications hémorragiques (Alvarez-Larrán et al., 2016). Un traitement préventif par aspirine est donc recommandé chez les patients de haut risque (âge > 60 ans et /ou antécédent de thrombose) ainsi que chez les patients de faible risque avec mutation *JAK2V617F*. Chez les patients de faible risque sans mutation *JAK2V617F*, une observation seule ou un traitement par aspirine peut être décidé selon l'évaluation des autres facteurs de risque cardiovasculaire et du risque hémorragique (Rumi and Cazzola, 2016).

Dans certaines situations à risque hémorragique, le traitement par aspirine pourra être suspendu après évaluation du rapport bénéfice/risque comme par exemple en cas de traitement par anticoagulant, de chirurgie ou de thrombocytose importante avec syndrome de Willebrand acquis (seuil de 1000 ou 1500 selon la littérature).

L'utilisation de l'aspirine en prévention des complications thrombotiques est actuellement discutée. D'une part car son bénéfice n'a pas été démontré chez les patients avec TE en particulier les patients de faible risque et d'autre part car son utilisation peut entraîner des effets indésirables graves. En effet de récentes études ont montré que son utilisation en prévention primaire chez des sujets âgés (>70ans) ou diabétiques était associée à une augmentation des événements hémorragiques et à une augmentation du risque de cancer (McNeil et al., 2018a, 2018b; The ASCEND Study Collaborative Group, 2018). Un essai de l'Intergroupe Français des syndromes Myéloprolifératifs (FIM) évalue actuellement l'arrêt de l'aspirine chez les patients avec thrombocytémie essentielle en réponse hématologique partielle. D'autre part, l'incidence des thromboses reste élevée chez les patients traités par aspirine. Ainsi les patients à haut risque pourraient bénéficier d'un traitement préventif par anticoagulants oraux (De Stefano et al., 2016; Mahé et al., 2018). Un essai clinique dans le cadre d'un PHRC-K 2019 va débiter en France pour évaluer l'efficacité de la prophylaxie par anticoagulants oraux directs (rivaroxaban ou apixaban) par rapport à l'aspirine dans la prévention des complications thromboemboliques chez des patients avec un syndrome myéloprolifératif de haut risque (IP : JC. Ianotto).

Le traitement des thromboses constituées repose sur l'utilisation d'anticoagulants qui seront poursuivis au long cours selon la localisation de la thrombose et l'évaluation du rapport bénéfice/risque.

### Traitement myélosuppresseur

Dans la polyglobulie de Vaquez, l'objectif thérapeutique est de maintenir un hématicrite inférieur à 45% car un essai clinique randomisé a montré que cette cible thérapeutique plus stringente est associée à une diminution de la mortalité liée aux événements cardiovasculaires et aux thromboses (Marchioli et al., 2013). Le traitement d'urgence repose sur des saignées réalisées dès le diagnostic pour diminuer rapidement l'hématocrite. Du fait de la mauvaise tolérance des saignées et de la carence martiale qu'elles induisent, les patients sont le plus souvent traités au long court par des médicaments cytoréducteurs. Dans la thrombocytémie essentielle, un traitement cytoréducteur est recommandé chez les patients de haut risque (âge > 60 ans et /ou antécédent de thrombose).

Les médicaments cytoréducteurs les plus souvent utilisés sont l'hydroxyurée et l'interféron- $\alpha 2$  pégylé. A l'heure actuelle, seule l'hydroxyurée possède une AMM pour le traitement de première ligne. L'effet cytoréducteur de l'hydroxyurée est basé sur une inhibition de la synthèse d'ADN par inhibition de la ribonucléoside diphosphate réductase. Le mécanisme d'action de l'interféron- $\alpha 2$  est plus complexe et non entièrement élucidé. Il met en jeu des effets immunomodulateurs et une action directe sur le clone tumoral. Le traitement par l'interféron- $\alpha 2$  pégylé a montré son efficacité dans les SMP avec notamment un effet sur la mutation *JAK2V617F* avec une réponse moléculaire correspondant à une diminution voire une indétectabilité de la charge allélique de la mutation (Ianotto et al., 2009; Kiladjian et al., 2006). L'effet de l'interféron- $\alpha 2$  sur le clone tumoral *JAK2V617F* et en particulier sur le compartiment de cellules souches a été montré dans deux travaux utilisant des modèles murins avec greffe compétitive (Hasan et al., 2013; Mullally et al., 2013). L'interféron- $\alpha 2$  a également montré une efficacité chez les patients avec mutation de *CALR* avec un taux de réponse hématologique comparable aux patients avec mutation *JAK2V617F* mais avec moins de réponses moléculaires (Czech et al., 2019). Le traitement par interféron- $\alpha 2$  pégylé est généralement proposé en première ligne aux sujets jeunes bien que ne disposant pas d'une AMM en France. Un nouvel interféron, le Ropéginterferon a été évalué dans un essai clinique de phase 3 pour le traitement de première ligne de la PV avec une bonne efficacité et tolérance et n'est, à l'heure actuelle, pas encore commercialisé en France (Gisslinger et al., 2020).

Le pipobroman est réservé aux traitements des patients très âgés ou en cas d'échec des autres cytoréducteurs du fait du risque leucémogène associé à son utilisation (Bjorkholm et al., 2011; Kiladjian et al., 2011). L'interféron- $\alpha 2$  n'est, quant à lui, pas associé à un risque de transformation leucémique (Gowin et al., 2012). Concernant l'hydroxyurée, son implication dans la survenue de leucémies secondaires est discutée mais n'a jamais été démontrée dans les plus grandes séries de patients publiées (Bjorkholm et al., 2011; Finazzi et al., 2005; Gangat et al., 2007b).

Le traitement de la myélofibrose est un traitement symptomatique : transfusions et érythropoïétine (EPO) dans les formes avec insuffisance médullaire et traitement cytoréducteur dans les formes hyperleucocytaires. La greffe de moelle allogénique reste le seul traitement curatif lorsqu'elle est possible en considérant l'âge et les comorbidités du patient. L'allogreffe est envisagée chez les patients avec un score pronostique de risque

intermédiaire ou élevé. Une étude récente de la société européenne de greffe de moelle portant sur 1055 patients avec une myélofibrose allogreffe entre 1995 et 2014 a montré une survie globale de 74% à 10 ans (Robin et al., 2019). Toutefois, le développement de nouvelles thérapies ciblant les protéines JAK1 et JAK2 a modifié la prise en charge de la myélofibrose. Le ruxolitinib, premier inhibiteur disponible a montré une amélioration des signes cliniques notamment de la splénomégalie avec une amélioration de la qualité de vie des patients (Mesa et al., 2013; Verstovsek et al., 2012). Dans l'essai de phase 3 CONFORT-II, le ruxolitinib a montré un plus grand taux de réponse clinique (diminution de la splénomégalie) et une meilleure survie globale par rapport au meilleur traitement disponible (Harrison et al., 2016). Le ruxolitinib permet une réduction modérée d'environ 20% de la charge allélique de la mutation *JAK2V617F* (Harrison et al., 2016). De par son inhibition de JAK1/2 non spécifique de la mutation V617F de JAK2, le ruxolitinib est également efficace dans les myélofibroses avec mutation de *CALR* (Guglielmelli et al., 2016)

Plus récemment, le ruxolitinib a également montré son efficacité dans le traitement de la PV (Vannucchi et al., 2015). Ce médicament a donc actuellement une AMM en première ligne dans la myélofibrose primitive ou secondaire et en seconde ligne dans la polyglobulie de Vaquez résistante ou intolérante à l'hydroxyurée.

Des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer le ruxolitinib en combinaison avec l'interféron- $\alpha 2$  (essai RuxoPeg Phase I/II du FIM), des agents hypométhylants, des IMiDs, des inhibiteurs de HDAC, de MDM2, ou d'autres kinases (Schieber et al., 2019). D'autres inhibiteurs de JAK, spécifiques de JAK2 ou non, sont également en cours d'évaluation dans le traitement de la myélofibrose (pacritinib, fedratinib, momelotinib ; données NCT).

## Le profil mutationnel des syndromes myéloprolifératifs

La mise en évidence de mutations somatiques dans les syndromes myéloprolifératifs a profondément modifié la compréhension de la physiopathologie de ces pathologies ainsi que leur diagnostic. Les mutations dites promotrices des gènes *JAK2*, *CALR* et *MPL* permettent d'expliquer le développement des SMP et font partie des critères diagnostiques décrits précédemment. Le développement des technologies de séquençage à haut débit a permis la découverte de nombreuses autres mutations souvent communes aux autres hémopathies myéloïdes que nous appellerons ici mutations additionnelles par rapport aux mutations promotrices.

En plus des mutations génétiques, des anomalies chromosomiques sont décrites dans les SMP. Celles-ci sont rares dans la PV et la TE (respectivement 11 et 5% des patients au diagnostic) (Gangat et al., 2008; Sever et al., 2009). Les anomalies les plus souvent retrouvées sont la délétion du bras long du chromosome 20 (20q), les trisomies 8 et 9 et les anomalies du chromosome 1. Dans ces deux pathologies, ces anomalies n'ont pas d'influence pronostique et ne sont pas recherchées en pratique courante. Dans la MFP, les anomalies cytogénétiques sont plus fréquentes puisqu'environ 40% des patients présentent un caryotype anormal au diagnostic (Wassie et al., 2015). Les anomalies retrouvées sont celles déjà citées pour la PV et la TE auxquelles s'ajoutent la délétion du bras long du chromosome 13 (13q) et les anomalies du chromosome 7. Ces anomalies sont intégrées dans certains scores pronostiques et sont associées à un pronostic péjoratif et à un risque de transformation leucémique accru (Gangat et al., 2011).

### Les mutations promotrices

La répartition des mutations promotrices de *JAK2*, *MPL* et *CALR* au sein des différents syndromes myéloprolifératifs est présentée sur la figure 4. Lorsqu'aucun de ces marqueurs n'est retrouvé, on parle alors de SMP triple négatif.

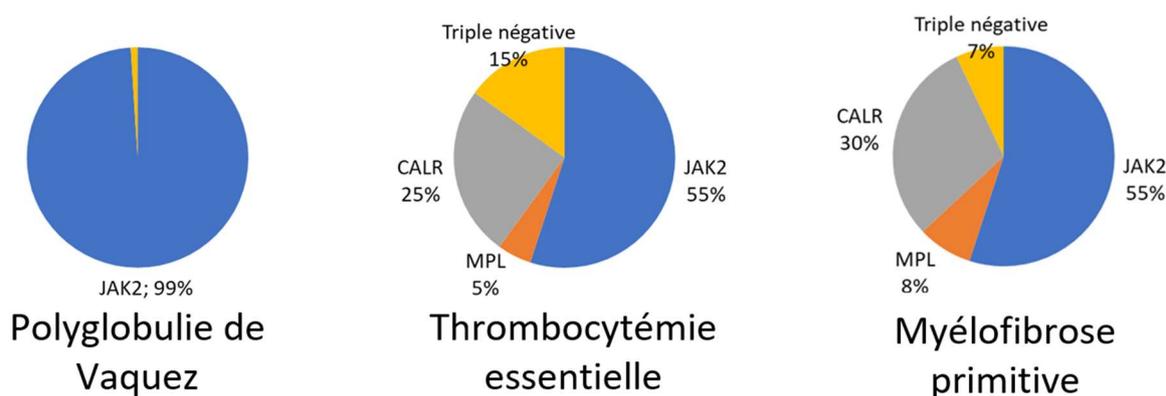


Figure 4 : Répartition des mutations promotrices dans les syndromes myéloprolifératifs

#### Mutations de JAK2

La famille des protéines JAK comprend quatre kinases (JAK1, 2, 3 et TYK2). Ces protéines sont des protéines kinases associées à des récepteurs cellulaires et permettant la transduction du signal lors de la fixation du ligand

à son récepteur. La protéine JAK2 (Janus Kinase 2) est particulièrement importante dans l'hématopoïèse puisqu'elle est associée notamment au récepteur à l'érythropoïétine (EPOR), au récepteur à la thrombopoïétine (MPL) et au récepteur au facteur de croissance granulocytaire (CSF3R). Après fixation du facteur de croissance à son récepteur, JAK2 est responsable de la phosphorylation de STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) qui va alors se dimériser et migrer dans le noyau pour y jouer le rôle de facteur de transcription (figure 5). En plus de la voie STAT5, d'autres voies de signalisation interviennent dans la transduction du signal, dont les deux principales sont la voie RAS (Rat Sarcoma) / MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase).

Le gène *JAK2* est situé sur le chromosome 9. La protéine JAK2 possède 2 domaines assez similaires : JH1 (JAK Homology domain 1) qui confère l'activité kinase et JH2 qui est un domaine « pseudokinase » sans activité catalytique propre mais jouant un rôle dans la régulation négative de l'activité kinase de JH1. Au niveau N-terminal, il y a un domaine FERM qui permet la liaison de JAK2 aux domaines intracellulaires des récepteurs aux cytokines. La découverte de la mutation *JAK2V617F* par plusieurs équipes en 2005 (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005) a permis une meilleure connaissance physiopathologique des SMP non LMC. Le diagnostic de ces pathologies a également été bouleversé puisque la mutation *JAK2V617F* est présente dans 97% des PV et environ la moitié des TE et MFP. Cette mutation est retrouvée dans toutes les myélofibroses post-PV et dans 60% des myélofibroses post-TE. Cette mutation est également retrouvée de façon rare dans certains syndromes mixtes myéloprolifératifs / myélodysplasiques (SMP/SMD) tels que la leucémie myélomonocytaire chronique ou l'anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne et thrombocytose.

La mutation *JAK2V617F* résulte d'un changement d'une guanine par une thymidine en position 1849 du gène. Le codon 617, localisé sur l'exon 14, est une position importante dans l'interface entre les domaines JH1 et JH2. Le changement d'une valine par une phénylalanine à cette position entraîne une levée de l'inhibition de JH2 sur le domaine catalytique JH1 et une activation constitutive de JAK2. La protéine JAK2 mutée active donc les voies de signalisation en aval (MAPK, STAT5, PI3K) en absence de cytokine de manière comparable à la cascade de signalisation déclenchée par la liaison du ligand à son récepteur. Cela induit un signal cellulaire de différenciation, de prolifération et de survie avec l'expression de protéines anti-apoptotiques. De récents travaux ont également montré que la mutation de JAK2 V617F entraîne une augmentation de la dimérisation des récepteurs aux cytokines via l'hélice  $\alpha$ C du domaine pseudokinase (Leroy et al., 2019; Wilmes et al., 2020).

Le rôle physiopathologie de la mutation *JAK2V617F* a été démontré dans des modèles murins. Ainsi l'expression de *JAK2V617F* conduit à un phénotype de polyglobulie évoluant vers la myélofibrose chez la souris (Lacout et al., 2006). Plusieurs autres modèles murins avec la mutation *JAK2V617F*, produits soit par transduction rétrovirale, transgénèse ou knock-in, ont également montré le rôle de cette mutation dans le développement des SMP (Li et al., 2011). Un travail chez la souris a également montré par des techniques de dilutions limites que la greffe d'une seule cellule souche hématopoïétique mutée *JAK2V617F* suffisait à induire un phénotype de SMP (Lundberg et al., 2014a).

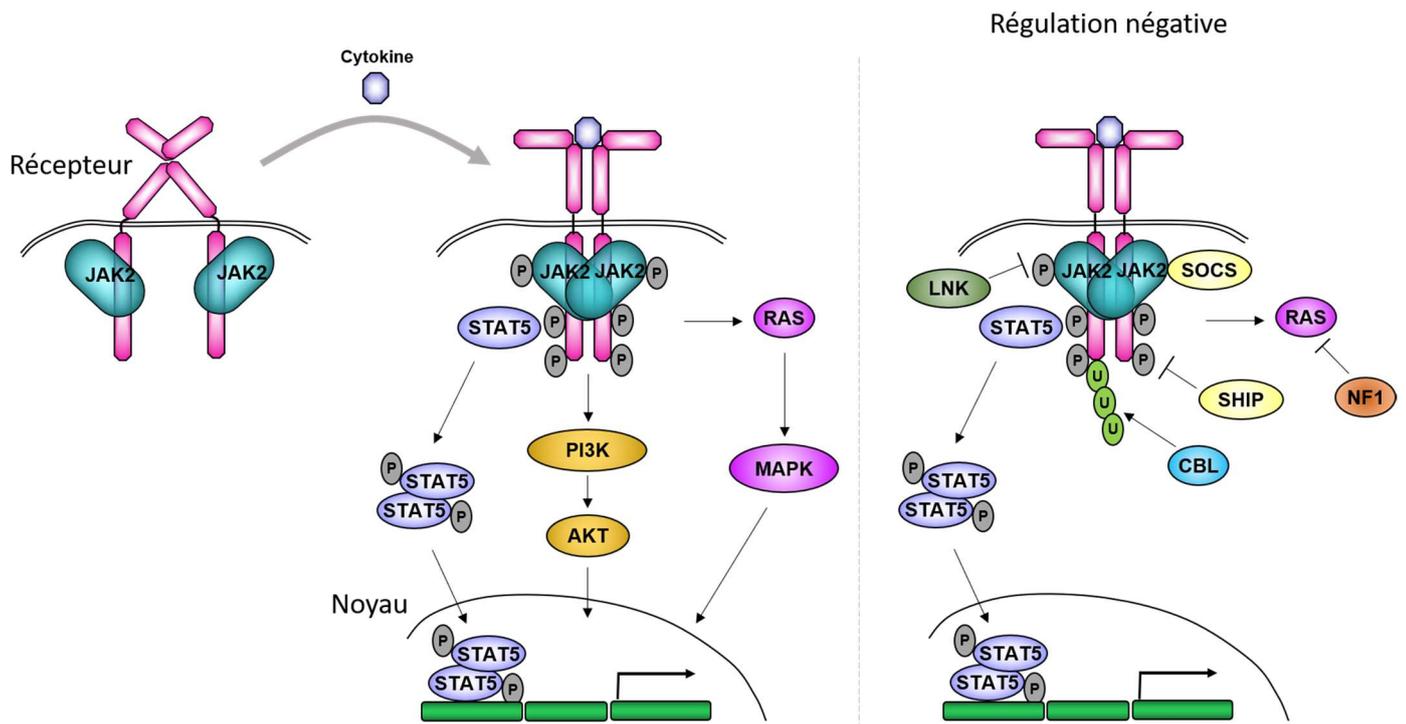


Figure 5 : Signalisation cellulaire par les récepteurs aux facteurs de croissance couplés à la protéine JAK2

Après fixation de la cytokine à son récepteur, il y a un changement de conformation du récepteur permettant le rapprochement des protéines JAK2 et ainsi leur activation. Les protéines kinases JAK2 vont se phosphoryler et phosphoryler la partie cytosolique du récepteur. La transduction du signal est possible grâce à la protéine JAK2. Cette protéine est responsable de la phosphorylation de STAT5 qui va alors se dimériser et migrer dans le noyau pour y jouer le rôle de facteur de transcription et induire l'expression de gènes contrôlant la prolifération, la différenciation cellulaire et des gènes anti-apoptotiques. Cette voie de signalisation est utilisée par une majorité de récepteur aux facteurs de croissance (récepteur à l'EPO, récepteur au TPO (MPL), récepteur au G-CSF...).

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

La voie JAK/STAT est régulée par différentes protéines :

- Les phosphatases SH2-containing inositol phosphatases (SHIP) qui régulent l'activité des kinases en déphosphorylant les résidus tyrosines de JAK2
- Les protéines suppressors of cytokine signaling (SOCS) qui entrent en compétition avec STAT5 pour la fixation à JAK2
- Les protéines Casitas B-cell lymphoma (CBL) qui sont des ubiquitines ligases et qui augmentent la dégradation des récepteurs à tyrosine kinase via la voie du protéasome
- Les protéines SH2B dont LNK ou SH2B3 qui se lit à JAK2 pour l'inhiber (Lymphocyte specific adaptor protein).

En plus de son rôle dans la signalisation des récepteurs aux cytokines, JAK2 a été mis en cause pour son influence dans la structure de la chromatine. Dans les cellules hématopoïétiques, la protéine JAK2 nucléaire peut phosphoryler l'histone H3Y41 et ainsi agir sur l'expression de gènes tels que LIM domain only 2 (LMO2) qui code un facteur de transcription essentiel à l'érythropoïèse (Dawson et al., 2009). La protéine JAK2 mutée peut également lier et phosphoryler PRMT5 (Protéine Arginine MéthylTransférase 5). PRMT5 transfère des groupements méthyl sur des protéines notamment des histones, contrôlant ainsi l'expression de certains gènes. La phosphorylation de PRMT5 diminue son activité et expliquerait en partie le phénotype des SMP car PRMT5 régule la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (Liu et al., 2011).

*JAK2V617F* serait également à l'origine d'une instabilité génétique. Cette instabilité génétique serait médiée par plusieurs mécanismes. Tout d'abord dans un modèle cellulaire, la mutation *JAK2V617F* augmente la recombinaison homologue et diminue l'activité de p53 via une augmentation de l'expression de MDM2 (Nakatake et al., 2012; Plo et al., 2008). Dans un modèle murin, la mutation *JAK2V617F* augmente le niveau des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ainsi les cassures double brin de l'ADN (Marty et al., 2013). Les cellules mutées peuvent également induire une augmentation des ROS et donc une instabilité génétique dans les cellules non mutées par sécrétion paracrine de lipocalin-2 (Kagoya et al., 2014). Cela pourrait générer un avantage de sélection aux cellules mutées par apoptose des cellules non mutées, et pourrait également être à l'origine de la leucémogénèse des cellules non mutées *JAK2V617F*.

La mutation *JAK2V617F* peut être retrouvée à l'état hétérozygote mais aussi à l'état homozygote (Kralovics et al., 2005). Ce passage de l'état hétérozygote à homozygote est expliqué par un mécanisme de recombinaison homologue avec perte d'hétérozygotie (figure 6).

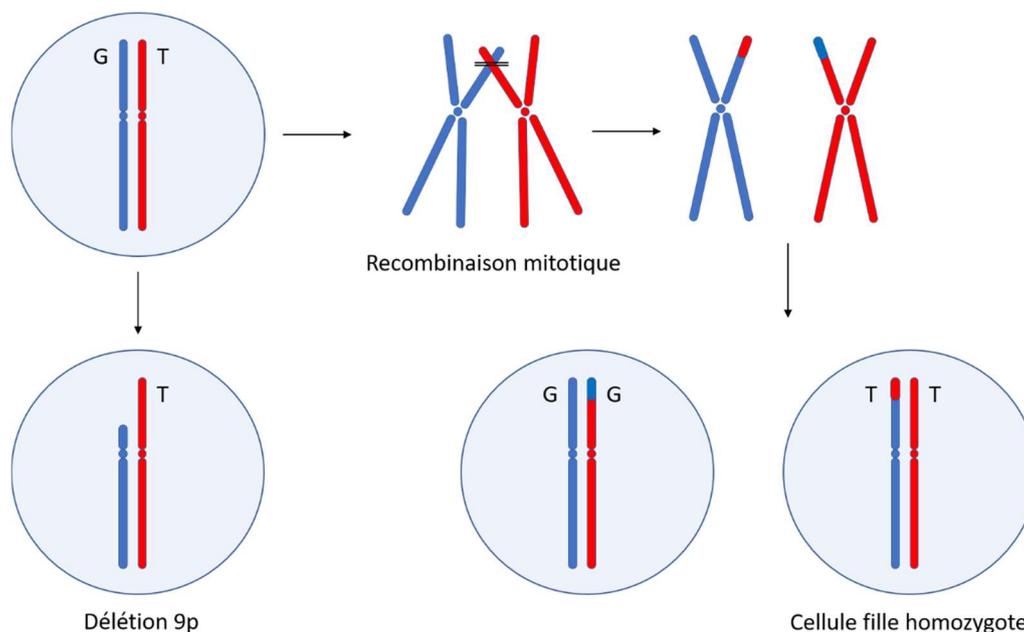


Figure 6 : Mécanisme de recombinaison homologue à l'origine de clones homozygotes pour la mutation *JAK2V617F* (d'après Kralovics et al. NEJM 2005)

La mesure de la charge allélique en *JAK2V617F* est un reflet partiel de ce mécanisme puisque les fortes charges (>50%) sont dues à la présence d'un ou plusieurs clones homozygotes. La différence observée entre les charges des différents SMP est une des hypothèses pouvant expliquer l'existence d'une même mutation dans trois pathologies différentes. En effet, dans la PV et la MFP la charge allélique de la mutation *JAK2V617F* est plus élevée que dans la TE (Antonioli et al., 2008). De plus, une étude transcriptomique a révélé que les patients avec un clone homozygote pour la mutation *JAK2V617F* (avec une charge allélique > 60%) présentent une signature d'expression génique différente des patients hétérozygotes (Rampal et al., 2014a). Le suivi de la charge allélique de *JAK2* a montré un intérêt pronostique puisqu'un passage à l'homozygotie, reflété par une charge allélique supérieure à 50%, est associé à une évolution vers la myélofibrose (Alvarez-Larrán et al., 2014). Enfin, le suivi de la charge allélique de *JAK2* a montré une décroissance chez les patients traités par interféron-alpha (Kiladjian et al., 2006).

Dans de rares cas de PV où la mutation *JAK2V617F* est absente, on retrouve des mutations de l'exon 12 de *JAK2* entre les domaines SH2 et JH2. Ces mutations n'intéressent pas le domaine pseudokinase mais modifient sa structure de façon assez semblable à la mutation V617F selon des outils de modélisation protéique (Albiero et al., 2008). Ces mutations de l'exon 12 ne sont pas retrouvées dans d'autres pathologies que la PV (Scott et al., 2007), ce qui n'est toujours pas expliqué. Il existe un hotspot des mutations entre les résidus 536 et 547. Les différentes mutations observées sont des substitutions, des délétions, des insertions et des duplications. Les patients avec une polyglobulie de Vaquez et une mutation de l'exon 12 de *JAK2* ont un âge plus jeune, un taux d'hémoglobine plus élevé et des taux de plaquettes et de leucocytes volontiers normaux par rapport aux patients avec mutation *JAK2V617F* (Tefferi et al., 2018b). Le pronostic associé à ces mutations de l'exon 12 de *JAK2* est superposable à celui de la mutation *JAK2V617F* (Passamonti et al., 2011).

Enfin d'autres mutations de *JAK2* peuvent être retrouvées soit dans des cas familiaux de thrombocytose ou de polyglobulie, ou dans des cas de SMP triple négatif. Ces mutations intéressent le plus souvent le domaine kinase ou pseudokinase mais aussi parfois le domaine FERM. Dans chacun de ces cas la mise en évidence fonctionnelle de la pathogénicité de la mutation est nécessaire afin de pouvoir affirmer leur responsabilité dans le phénotype observé. De plus, dans certains cas, c'est seule l'association composite de deux mutations qui entraîne une manifestation phénotypique (Kapralova et al., 2016). L'ensemble des mutations décrites sont résumées dans la figure 7 avec leur pathogénicité respective.

### **Mutations de MPL**

Le gène *MPL* (Myeloproliférative Leukemia), localisé sur le chromosome 1, code pour le récepteur à la thrombopoïétine (TPO), principal facteur de croissance de la lignée mégacaryocytaire. Les mutations de *MPL* ont été découvertes en 2006 (Pikman et al., 2006) et sont retrouvées dans la TE et la MFP (Pardanani et al., 2006). Les mutations sont situées sur le hotspot en position W515 au niveau de la jonction entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique. Les mutations les plus fréquentes sont les mutations W515L et W515K, plus rarement les mutations W515A, W515S et W515R peuvent être observées (Schnittger et al., 2009). Les mutations de *MPL* confèrent aux cellules une croissance indépendante des cytokines (TPO) et entraîne une activation constitutive de la voie de signalisation JAK2-STAT5 (Pikman et al., 2006).

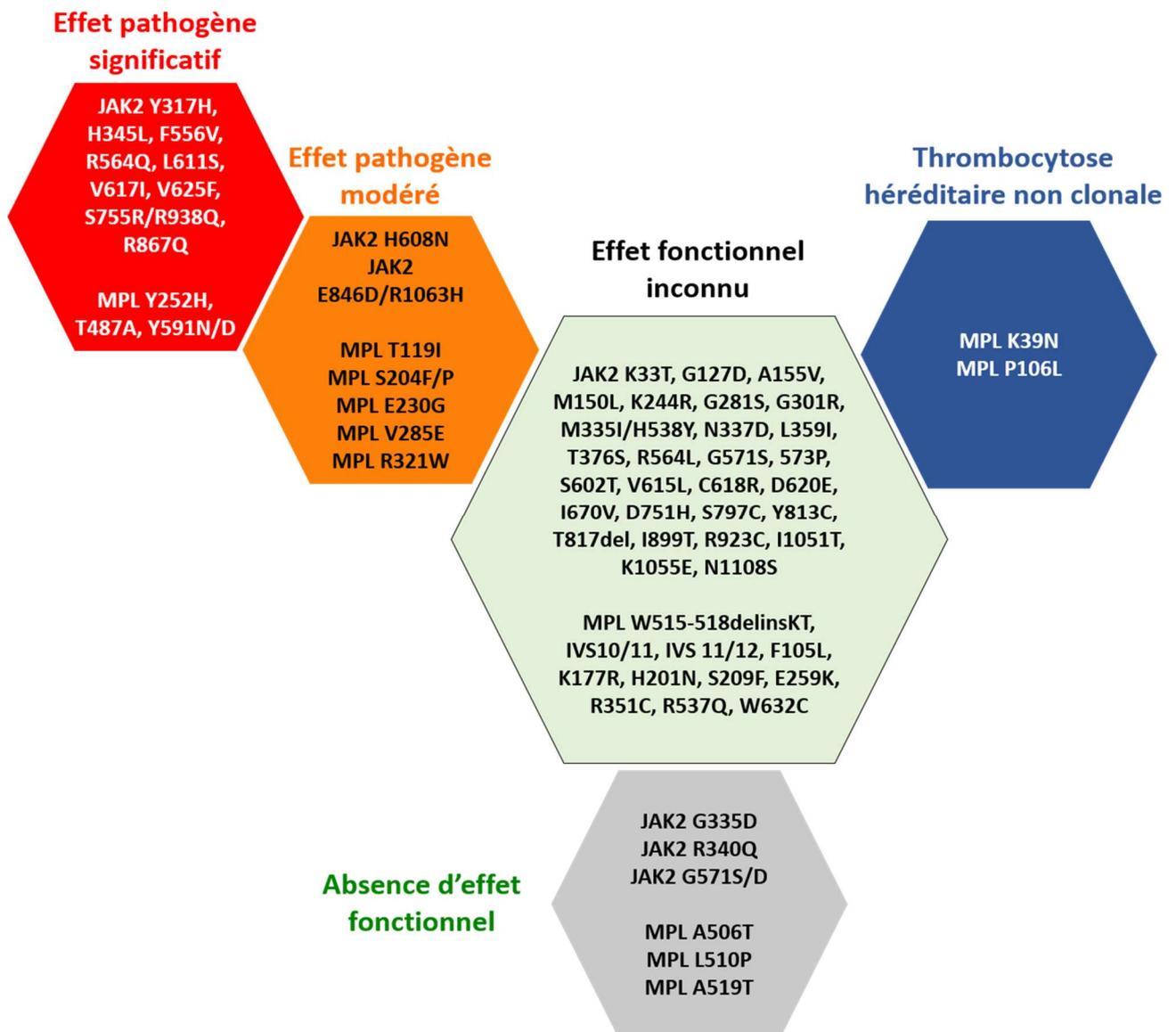


Figure 7 : Mutations non canoniques de JAK2 et MPL décrites dans les syndromes myéloprolifératifs

Références : (Aral et al., 2018; Cabagnols et al., 2016; Chaligné et al., 2008; Eder-Azanza et al., 2017; Etheridge et al., 2014; Kapralova et al., 2016; Lambert et al., 2012; Levine et al., 2005; Luque Paz et al., 2019; Ma et al., 2009, 2011; Marty et al., 2014; Maslah et al., 2019; Mead et al., 2012; Milosevic Feenstra et al., 2016; Rumi et al., 2014b; Schnittger et al., 2006; Warshawsky et al., 2010; Williams et al., 2007; Wu et al., 2014)

Figure réalisée avec Olivier Mansier et présentée à la journée scientifique du FIM 2019 (France Intergroupe des syndromes Myéloprolifératifs).

Dans un modèle murin, la mutation de *mpl* W515L est responsable d'une stimulation de la mégacaryocytopoïèse et du développement d'une fibrose médullaire (Pikman et al., 2006).

D'après un récent travail dans lequel les BOM étaient relues de manière centralisée, il semble que les mutations W515 de *MPL* sont plus fréquentes dans la myélofibrose primitive (6.3%) que dans la thrombocytémie essentielle (1.5%) (Szuber et al., 2018). Il ne semble pas y avoir d'impact pronostique des mutations W515 sur la survie ou la transformation en leucémie dans la thrombocytémie essentielle comme dans la myélofibrose primitive (Pardanani et al., 2011; Tefferi et al., 2014a).

Certains variants constitutionnels rares de *MPL* peuvent être responsables d'une thrombocytose familiale non clonale lorsqu'ils sont à l'état homozygote. C'est le cas notamment du variant dit 'Baltimore' K39N qui est présent à l'état hétérozygote chez 4,6% des personnes originaires d'Afrique ou du variant P106L associé à une thrombocytose de transmission autosomique récessive dans des familles originaires du bassin méditerranéen (El-Harith et al., 2009; Moliterno et al., 2004). Certaines mêmes mutations peuvent également être dans certains cas constitutionnelles et associées à une thrombocytose familiale et dans d'autres cas être somatiques à l'origine d'une thrombocytémie essentielle. C'est le cas par exemple du variant S505N de *MPL* (Boyd et al., 2010; Ding et al., 2004; Teofili et al., 2010).

D'autres mutations non-canoniques de *MPL* peuvent également être retrouvées en particulier dans les cas de TE triple négative. En 2015, deux équipes ont réalisé des séquençages d'exomes dans des cas de TE triples négatives et ont identifié des variants rares de *MPL* (Cabagnols et al., 2016; Milosevic Feenstra et al., 2016). Pour certains de ces variants (S204P, Y591D, Y591N), des études fonctionnelles ont démontré leur pathogénicité avec une activation dérégulée de la voie JAK2-STAT5 et une indépendance ou une hypersensibilité vis à vis de la TPO. Les différentes mutations non-canoniques décrites de *MPL* sont présentées dans la figure 7.

## Mutations de CALR

En décembre 2013, deux équipes ont décrit de nouvelles mutations dans les SMP (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013). Ces mutations intéressent le gène *CALR* codant pour la calréticuline et ont été découvertes grâce à des techniques de séquençage d'exome. Ces mutations sont retrouvées chez environ 23% des patients présentant une TE et 33% de ceux présentant une MFP. Ces mutations sont également retrouvées dans de très rares cas de syndrome mixte SMP/SMD.

La calréticuline est une protéine du réticulum endoplasmique qui joue le rôle de chaperone avec deux autres protéines : la calnexine et ERp57 (Michalak et al., 2009). La calnexine est une protéine transmembranaire voisine de la calréticuline, alors que cette dernière est soluble. Ces deux protéines de la famille des lectines contrôlent, dans le réticulum endoplasmique, le bon repliement des glycoprotéines nouvellement produites. De plus, la calréticuline joue un rôle dans l'homéostasie calcique puisqu'elle peut lier le calcium à deux niveaux : un site à forte affinité et faible capacité au sein d'une structure en bras riche en proline ; et un second site de faible affinité et de forte capacité représenté par les acides aminés acides en position C-terminale (Michalak et al., 2009). D'autres fonctions de la calréticuline ont été décrites, en particulier son rôle immunologique dans l'apoptose et la réponse antitumorale (Michalak et al., 2009). Dans ces cas, la calréticuline peut être transloquée à la surface cellulaire.

La calréticuline est composée de plusieurs domaines : un domaine N-terminal, un domaine P et le domaine C-terminal riche en acides aminés chargés négativement qui permet de lier le calcium. En position C-terminale se trouve un motif protéique KDEL qui permet la rétention de la calréticuline au niveau du réticulum endoplasmique.

Les mutations retrouvées sont des délétions et/ou insertions au niveau de l'exon 9 de *CALR*. Toutes les mutations aboutissent à un décalage du cadre de lecture et à une protéine *CALR* qui perd son motif protéique KDEL et présente une séquence peptidique carboxy-terminale commune. La perte de ce motif est à l'origine d'une perte de sa localisation dans le réticulum endoplasmique (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013). Les mutations de *CALR* sont aussi à l'origine d'une modification de la charge de la portion carboxy-terminale de la protéine : les acides aminés chargés négativement sont remplacés par des acides aminés basiques.

Les mutations sont classées par types, dont plus de cinquante sont décrits à ce jour. Parmi les mutations de *CALR*, les deux mutations les plus fréquentes sont une délétion de 52 paires de bases (type 1, 53%) et une insertion de 5 paires de bases (type 2, 31,7%) (Klampfl et al., 2013). Les mutations de type 2 sont plus fréquentes dans la TE (39% des mutations de *CALR*) que dans la MFP (13% des mutations de *CALR*), et inversement pour celles de type 1 qui sont plus fréquentes dans la MFP (70% des mutations de *CALR*) par rapport à la TE (51% des mutations de *CALR*) (Cabagnols et al., 2015). Selon les motifs d'acides aminés perdus, les mutations peuvent être classées en type 1-like, type 2-like ou autres types (Pietra et al., 2016).

Dans un modèle cellulaire (Ba/F3), une mutation de *CALR* confère une prolifération cellulaire qui est associée à une hyperactivation de STAT5. Ces résultats ont été par la suite confirmés dans d'autres modèles cellulaires : lignée UT7 et cellules humaines et murines éditées par CRISPR (Araki et al., 2016; Shide et al., 2017). Une étude transcriptomique a également montré que les mutations de *CALR* induisent une expression de gènes sous le contrôle de STAT5 (Rampal et al., 2014a).

Dans un modèle murin, la mutation de *CALR* de type 1 (del52) induit un phénotype de syndrome myéloprolifératif avec une thrombocytose et le développement d'une fibrose médullaire en 6 mois après la greffe (Marty et al., 2016). La mutation de *CALR* de type 2 (ins5) induit également une thrombocytose mais sans développement de fibrose. Au niveau de l'hématopoïèse dans ces modèles murins, les deux mutations sont à l'origine d'une prolifération de la lignée mégacaryocytaire mais seule la mutation del52 induit une expansion du compartiment de cellules souches (Marty et al., 2016). Ces différences entre mutations de type 1 et 2 a été confirmé par l'étude de modèles cellulaires et murin de types 1-like et 2-like (Toppaldoddi et al., 2019). Ces résultats sont en accord avec la fréquence des mutations de type 1 et 2 dans la TE et MFP, toutefois certains patients avec une mutation de type 2 présentent une fibrose médullaire. Les mécanismes à l'origine de ces différences restent à déterminer.

Au niveau physiopathologique, c'est récemment que les mécanismes de transformation des mutations de *CALR* ont été identifiés. La capacité des mutations de *CALR* à induire une indépendance aux cytokines est dépendante de la présence de MPL (Araki et al., 2016; Elf et al., 2016). Aucun effet fonctionnel n'est observé en présence du récepteur à l'érythropoïétine et seule une faible activation de STAT5 est observée avec le récepteur au G-CSF (Chachoua et al., 2015). Cette spécificité pour la signalisation médiée par MPL explique que les mutations

de *CALR* soient retrouvées dans les SMP avec atteinte de la lignée mégacaryocytaire et non pas dans la polyglobulie de Vaquez (Chauveau et al., 2017).

L'interaction entre MPL et la calréticuline mutée a lieu au niveau du domaine N de cette dernière (Araki et al., 2016). Cette interaction est normalement inhibée par le domaine P de la calréticuline non mutée mais lorsque *CALR* est muté, la néo-séquence C-terminale est responsable d'une levée de cette inhibition (figure 8). De plus, il a été montré que la formation de multimères de calréticuline mutée est nécessaire à l'activation de MPL (Araki et al., 2019).

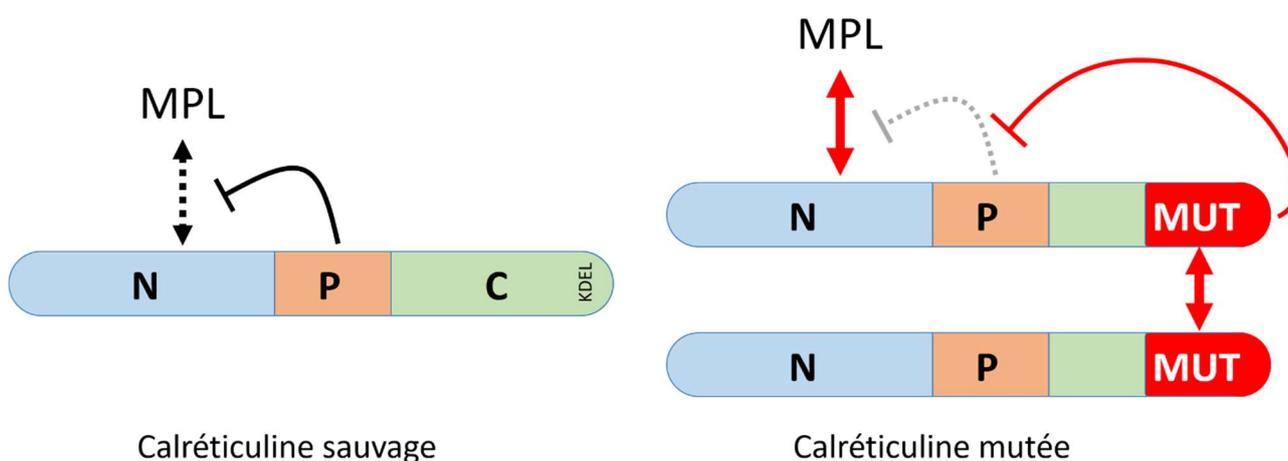


Figure 8 : Mécanisme de l'interaction entre MPL et la calréticuline mutée (d'après Araki et al. 2016)

*En condition sauvage, le domaine riche en proline (P) de la calréticuline inhibe la liaison entre son domaine N-terminal (N) et le récepteur à la thrombopoïétine (MPL). Lorsque la calréticuline est mutée, la formation d'homomultimères via la néo-séquence C-terminale permet une inhibition de l'effet inhibiteur du domaine P et ainsi une stabilisation de l'interaction avec MPL.*

La calréticuline interagit avec MPL via les sites glycosylés de ce dernier et en particulier au niveau de la position N117 (Chachoua et al., 2015; Pecquet et al., 2019). En plus de cette liaison, l'activation de MPL par la calréticuline mutée nécessite un motif hydrophobe dans le domaine extracellulaire de MPL. En effet la mutation de ce motif supprime la signalisation de MPL tandis que son ajout sur le récepteur à l'érythropoïétine permet une signalisation (Pecquet et al., 2019). La fixation de la calréticuline mutée à MPL modifie également le trafic cellulaire via le golgi de MPL puisque la calréticuline mutée est capable de rétablir l'export à la surface cellulaire du mutant de MPL R102P responsable de thrombopénies congénitales (Pecquet et al., 2019). La physiopathologie des mutations de *CALR* est résumée sur la figure 9.

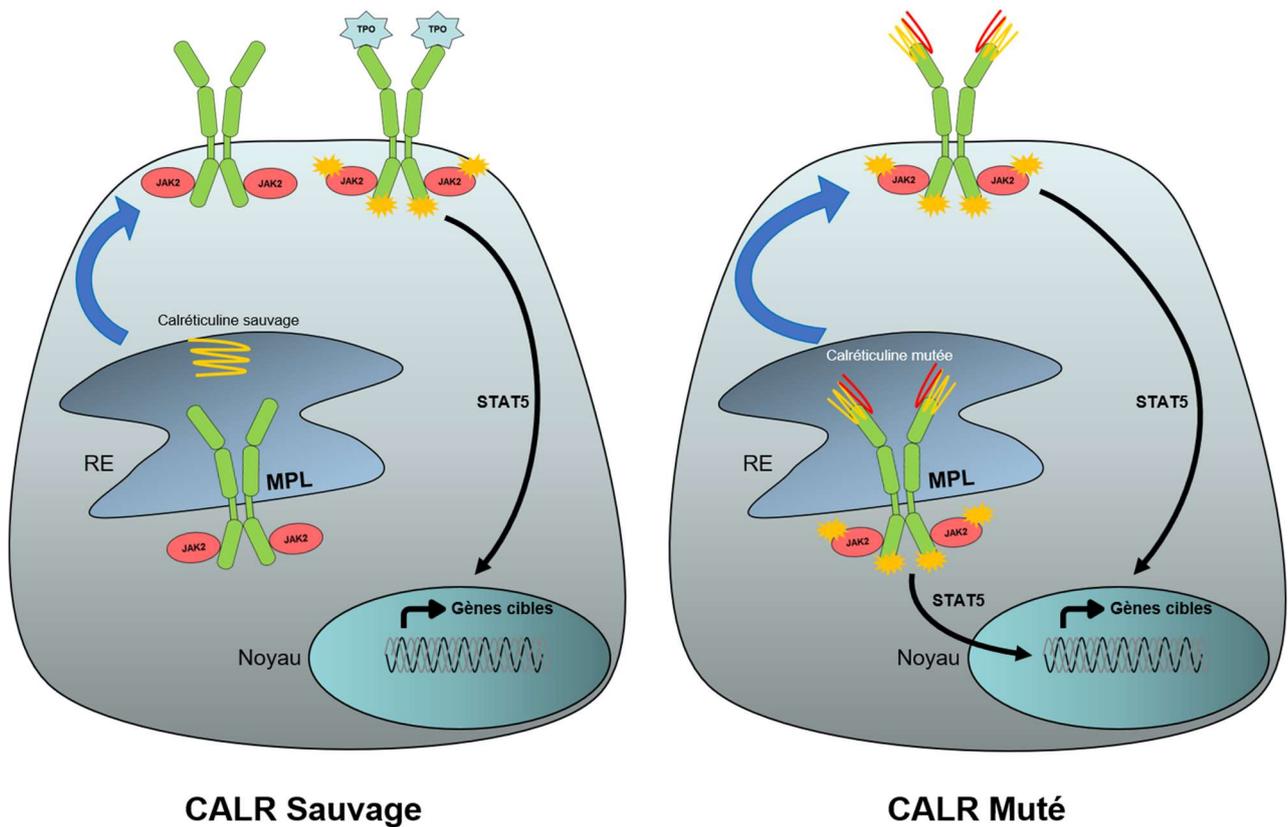


Figure 9 : Physiopathologie des mutations de CALR

Lorsque CALR est sauvage, la calréticuline interagit avec le récepteur à la thrombopoïétine (MPL) dans le réticulum endoplasmique (RE) pour vérifier son bon repliement. Par la suite MPL va être transloqué à la surface cellulaire via le golgi. Après fixation de la thrombopoïétine (TPO) à MPL, l'activation de la voie de signalisation JAK2-STAT5 permet l'expression de gènes cibles. En cas de mutation de CALR, la calréticuline mutée va se fixer à MPL et induire une activation de ce dernier en l'absence de TPO.

Les mutations de CALR semblent également impacter le pronostic des SMP. Dans la TE, les patients avec ces mutations présenteraient moins de complications thrombotiques que les patients mutés JAK2V617F (AL Assaf et al., 2015; Andrikovics et al., 2014; Rotunno et al., 2014; Rumi et al., 2014a; Tefferi et al., 2014b, 2014a). Aucune différence entre ces mutations n'a été mise en évidence au niveau de la survie globale ou du risque de transformation en myélofibrose ou en leucémie aiguë (Andrikovics et al., 2014; Rotunno et al., 2014; Rumi et al., 2014a; Tefferi et al., 2014b, 2014a).

Dans la MFP, les mutations de CALR sont associées à un meilleur pronostic avec une meilleure survie globale, indépendamment des classifications pronostiques existantes (IPPS au diagnostic et DIPSS lors du suivi) et y compris après allogreffe de moelle osseuse (Klampfl et al., 2013; Panagiota et al., 2014; Rumi et al., 2014c; Tefferi et al., 2014a). Ce bon pronostic semble toutefois restreint aux mutations de type 1 ou "type-1-like" (Tefferi et al., 2014d, 2014c). Au contraire, les patients triple négatifs (JAK2, MPL et CALR) semblent avoir un pronostic plus mauvais que les patients avec un de ces marqueurs moléculaires (Tefferi et al., 2014e, 2014a).

## Les mutations additionnelles

### Les différents gènes mutés

Des mutations somatiques en dehors des gènes promoteurs ont été décrites dans les syndromes myéloprolifératifs. Ces mutations dites additionnelles ont d'abord été mises en évidence par des approches de SNP array avec l'étude de régions avec une perte d'hétérozygotie ou une zone minimale délétée. C'est par cette approche que les mutations de *TET2* ou d'*EZH2* ont été mise en évidence (Delhommeau et al., 2009; Ernst et al., 2010). Par la suite, l'émergence du séquençage de nouvelle génération (NGS) a grandement augmenté la liste des gènes mutés dans les syndromes myéloprolifératifs (figure 10). Une majorité de ces mutations additionnelles n'est pas spécifique des syndromes myéloprolifératifs et est retrouvée dans les hémopathies myéloïdes en général. Les mutations additionnelles peuvent toucher des gènes avec diverses fonctions cellulaires : signalisation, épigénétique, épissage, facteur de transcription etc...

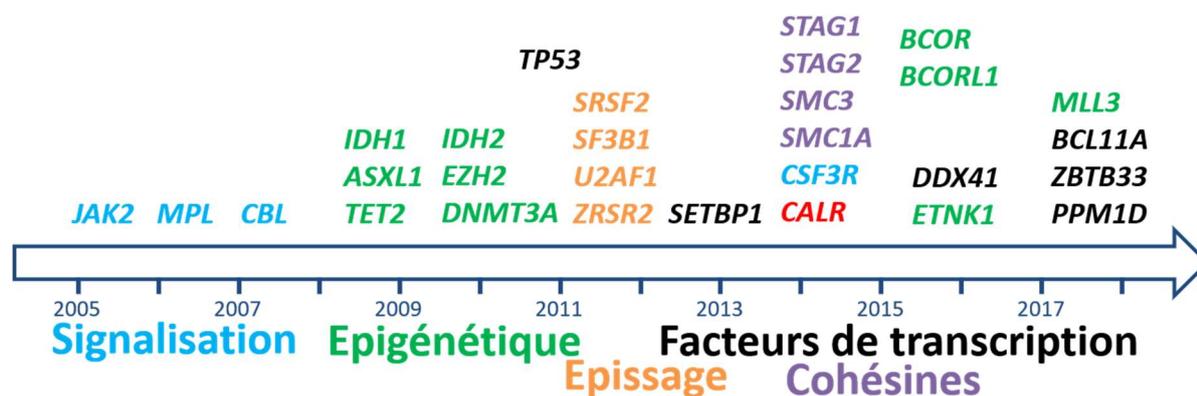


Figure 10 : Complexification des gènes mutés dans les syndromes myéloprolifératifs

### Mutations et signalisation cellulaire

Ces mutations touchent notamment les voies de signalisation des récepteurs aux cytokines. Elles peuvent toucher directement les récepteurs aux cytokines (*C-KIT*), la voie JAK-STAT et sa régulation (*LNK*, *CBL*) ou encore d'autres voies de signalisation comme la voie RAS-MAPK (*NRAS*, *NF1*) (figure 11).

### Mutations et épigénétique

L'épigénétique est l'ensemble des mécanismes régulant l'expression des gènes sans altération des séquences nucléotidiques. Il s'agit d'un phénomène transmissible et réversible. Les deux principaux niveaux de régulation épigénétique sont la méthylation de l'ADN et la modification post-traductionnelle des histones. La méthylation de l'ADN a lieu en 5' des cytosines, le plus souvent sur des îlots CpG positionnés sur le promoteur du gène et est une marque de répression de la transcription.

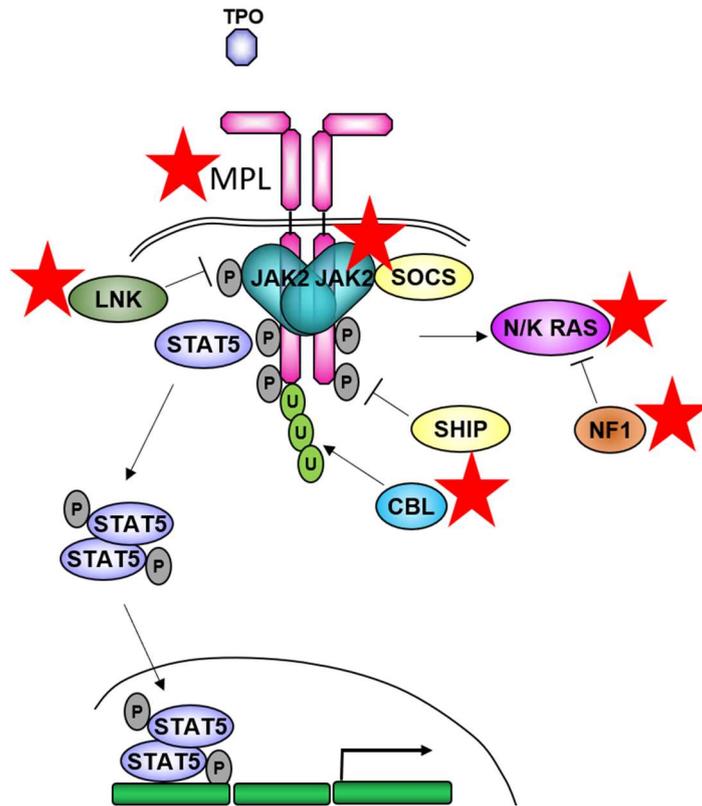


Figure 11 : Mutations de gènes impliqués dans la signalisation cellulaire dans les SMP  
 Les gènes pouvant être mutés dans les SMP sont représentés par une étoile rouge

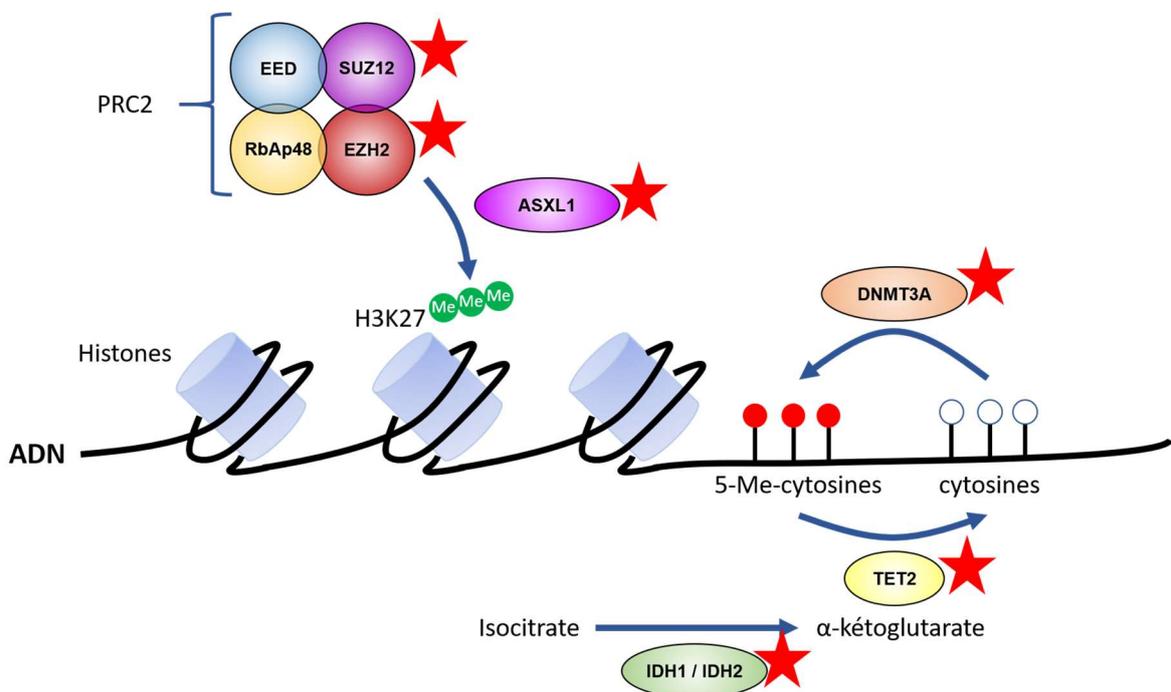


Figure 12 : Mutations des gènes impliqués dans l'épigénétique dans les SMP  
 Les gènes pouvant être mutés dans les SMP sont représentés par une étoile rouge

La méthylation est permise par des DNA méthyl-transférases (DNMT) et la déméthylation nécessite plusieurs étapes successives d'hydroxylation faisant intervenir les enzymes TET comme TET2. L'hydroxylation par TET2 utilise des co-facteurs comme le fer et l' $\alpha$ -kétoglutarate produits par les enzymes isocitrate déshydrogénase (IDH1 et 2).

Les premières mutations touchant l'épigénétique décrites dans les hémopathies sont les mutations de *TET2* en 2009 (Delhommeau et al., 2009). Le rôle de la perte de *tet2* dans la prolifération myéloïde a été démontré chez des souris KO qui présentaient alors une splénomégalie, une monocytose et une hématopoïèse extra-médullaire (Moran-Crusio et al., 2011). Les mutations de *TET2* aboutissent à une diminution de l'hydroxyméthylation et à une hyperméthylation du génome (Nischal et al., 2013).

Les mutations des gènes *IDH* touchent l'exon 4 avec un hotspot sur les résidus arginines R132 (IDH1), R172 (IDH2) et R140 (IDH2). Les néo-enzymes mutées acquièrent une capacité de transformation de l' $\alpha$ -KG en 2-hydroxyglutarate. La conséquence est une hyperméthylation de l'ADN et une diminution de l'hydroxylation par TET2 (Figueroa et al., 2010). Les mutations de *TET2* et *IDH* sont exclusives l'une de l'autre. De plus, l'accumulation de 2-hydroxyglutarate a un effet leucémogène indépendant comme montré dans un modèle murin et pourrait jouer un rôle dans la méthylation des histones H3K9 et H3K27 (Losman et al., 2013; Lu et al., 2012).

La modification des histones va influencer sur le niveau de compaction de la chromatine et donc sur l'accessibilité aux gènes et leur transcription. L'acétylation des histones permet une activation de la transcription. La méthylation des histones est un phénomène plus complexe car en fonction des histones et des résidus méthylés il pourra y avoir une activation ou une répression de la transcription. Il existe d'autres types de modifications comme l'ubiquitination ou l'ADP-ribosylation. Les complexes polycomb sont des protéines regroupées dans deux ensembles : Polycomb Repressive Complex 1 et 2 (PRC 1 et 2). Ces complexes vont interagir avec les histones afin de maintenir réprimés certains gènes. En particulier PRC2 dont la sous-unité catalytique EZH2 est une méthyltransférase responsable de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27) et qui est une marque de répression de la transcription. Les mutations d'*EZH2* observées dans les hémopathies myéloïdes sont associées à une perte de fonction (Ernst et al., 2010).

La protéine ASXL1 joue un rôle important dans les modifications épigénétiques, notamment en facilitant l'action du complexe PRC2 de triméthylation de l'histone H3K27. Les mutations d'*ASXL1* sont le plus souvent des mutations non-sens ou avec un décalage du cadre de lecture entraînant toutes les deux une protéine tronquée. Ces mutations sont associées à une perte de fonction et une diminution de la triméthylation de H3K27 (Abdel-Wahab et al., 2012). Plus récemment, il a également été montré que les mutations d'*ASXL1* ont un effet gain de fonction puisque la protéine mutée se lie à BAP1 et BRD4 et augmente leur activité (Balasubramani et al., 2015; Yang et al., 2018).

Des mutations ont été décrites à la fois dans les gènes contrôlant la méthylation de l'ADN (*TET2*, *IDH1* et 2, *DNMT3A*) et dans ceux contrôlant les modifications post-traductionnelles des histones (*ASXL1*, *EZH2*, *SUZ12*) (figure 12).

## Mutations et épissage

L'épissage est une étape de maturation essentielle qui permet de passer du transcrite primaire à des ARN messagers qui seront traduits en protéines. La machinerie responsable de ce phénomène est le spliceosome qui est composé de protéines et de complexes ribonucléoprotéiques (snRNP) (figure 13). Le spliceosome reconnaît des sites donneurs et accepteurs au niveau des régions introniques flanquant les exons et un site de branchement suivi d'une séquence poly-pyrimidique dans l'intron. Au niveau de l'exon en 3', une séquence ESE (Exonic Splicing Enhancer) permet la fixation de protéines ST contenant un domaine riche en dipeptide arginine/sérine qui va stabiliser l'interaction spliceosome-ARN. Les introns sont ensuite clivés par deux réactions successives de trans-estérification.

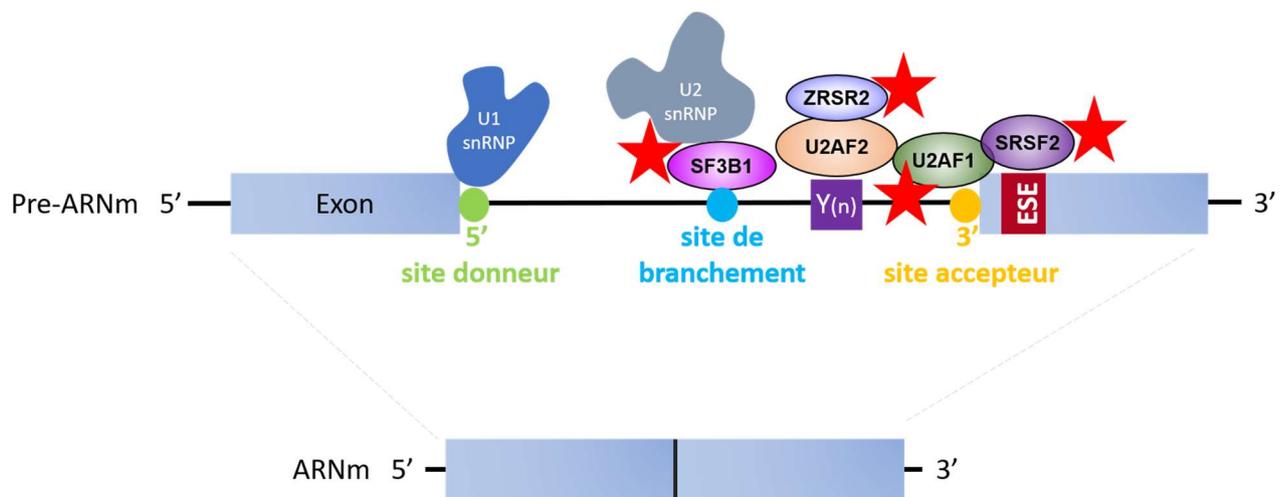


Figure 13 : Mutations des gènes impliqués dans l'épissage des ARNm dans les SMP  
Les gènes pouvant être mutés dans les SMP sont représentés par une étoile rouge

Les mutations des gènes codant des sous-unités du spliceosome ont été décrites dans toutes les hémopathies dont les SMP (Yoshida et al., 2011). Ces mutations concernent dans la grande majorité des cas des positions récurrentes sur ces gènes ou hotspots et sont à l'origine d'anomalies de l'épissage telles que l'expression de transcrits alternatifs par modification des sites d'épissage, la rétention d'introns ou le saut d'exons (Pellagatti et al., 2018; Shiozawa et al., 2018). Ces anomalies de l'épissage peuvent être des événements leucémogènes à l'origine des hémopathies myéloïdes via un dérèglement de nombreuses fonctions touchant le métabolisme, l'apoptose, la prolifération, l'épigénétique... Par exemple, les mutations de *SRSF2* en position P95 entraînent la rétention d'un exon poison d'*EZH2* avec un codon stop prématuré responsable d'une diminution de la méthylation de l'histone H3K27 et induisant un phénotype de myélodysplasie chez la souris (Kim et al., 2015). Enfin, il peut exister une coopération entre certaines anomalies de l'épigénétique et de l'épissage dans les mécanismes de leucémogénèse comme récemment décrite entre les mutations d'*IDH2* et de *SRSF2* (Yoshimi et al., 2019).

**Les gènes mutés chez plus de 1% des patients avec un SMP sont décrits dans le tableau VII avec leurs fonctions, les fréquences de mutation par pathologie et leur possible impact pronostique.**

Tableau VII : Description des gènes mutés dans les syndromes myéloprolifératifs à une fréquence supérieure à 1%

Gene	Chromosome	Fonction	Détail de la fonction	Localisation des mutations	Types de mutation	Fréquence dans les SMP (%)				Impact pronostique décrit (références)
						PV	TE	MFP	LAM post SMP	
<i>JAK2</i>	9p24	Signalisation	Signalisation JAK/STAT	Hotspots V617F et exon 12 <b>Mais mutations sur tous exons (en particuliers SMP triples négatifs)</b>	Substitution et Frameshifts	98	55	60	-	Impact pronostique des mutations promotrices non détaillé ici
<i>MPL</i>	1p34	Signalisation	Récepteur à la TPO. Signalisation JAK/STAT	Exon 10 <b>Mais mutations sur tous exons (en particuliers SMP triples négatifs)</b>	Substitutions	0	5-7	5-10	-	Impact pronostique des mutations promotrices non détaillé ici
<i>NRAS</i>	1p13	Signalisation	Signalisation ERK/MAPK	Hotspots acides aminés G12, G13 et Q61	Substitutions	3	<2	2-5	8-11	Pronostic défavorable dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>SH2B3</i>	12q24	Signalisation	Régulation négative de JAK2	Tous exons mais hotspot exon 2	Substitution et Frameshifts	1-2	1-5	2-6	11	Pronostic défavorable dans la MFP (Tefferi, Blood Advances 2016) et la TE (Tefferi, Blood Advances 2016)
<i>CBL</i>	11q23	Signalisation	Ubiquitine ligase régulation négative JAK2	Hotspot exons 8-9	Tous types	2	2	4-6	3-4	Pronostic défavorable dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>NF1</i>	17q11	Signalisation	GTPase régulant négativement voie RAS	Tous exons	Tous types	3	0	0-3	7	-
<i>ASXL1</i>	20q11	Régulation épigénétique	Modifications des histones	Tous exons mais hotspot exon 12	Le plus souvent frameshift et nonsense	2-7	5-10	15-35	17-47	Pronostic défavorable dans la MFP (Vannucchi Leukemia 2013 and Gugliemelli JCO 2018) et dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>EZH2</i>	7q36	Régulation épigénétique	Méthylation Histone H3K27 (enzyme de PRC2)	Tous exons	Tous types	1-2	1-2	7-10	7-13	Pronostic défavorable dans la MFP (Vannucchi Leukemia 2013 and Gugliemelli JCO 2018) et dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>KMT2C</i>	7q36	Régulation épigénétique	Méthylation Histone H3K4	Tous exons	Nonsense et frameshift	<2	<2	<2	-	-

<i>IDH1</i>	2q34	Régulation épigénétique	Production de l'αKT (co-facteur TET2). Néo-enzymes mutées produit 2-HG	R132 hotspot	Substitutions	1-2	1-2	5-6	13	Pronostic défavorable dans la MFP (Vannucchi Leukemia 2013 and Gugliemelli JCO 2018) et dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>IDH2</i>	15q26	Régulation épigénétique	Production de l'αKT (co-facteur TET2). Néo-enzymes mutées produit 2-HG	R140 and R172 hotspots	Substitutions	1-2	1-2	5-6	7-15	Pronostic défavorable dans la MFP (Vannucchi Leukemia 2013 and Gugliemelli JCO 2018) et dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>TET2</i>	4q24	Régulation épigénétique	Hydroxylation des 5-methylcytosines	Tous exons	Tous types	10-20	3-10	10-20	19-25	Absence d'impact pronostique dans la littérature
<i>DNMT3A</i>	2p23	Régulation épigénétique	Méthylation des cytosines	All exons and R882 hotspot	Tous types	5-10	1-5	8-12	3-17	Absence d'impact pronostique dans la littérature
<i>SRSF2</i>	17q25	Epissage ARNm	Fixation sur site accepteur 3'	P95 hotspot	Substitutions	<2	<2	3-23	13-22	Pronostic défavorable dans la MFP (Vannucchi Leukemia 2013 and Gugliemelli JCO 2018) et dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>SF3B1</i>	2q31	Epissage ARNm	Fixation sur site de branchement de l'intron	Exon 14 - 16 hotspots	Substitutions	2-10	<2	5	7-15	Pronostic défavorable dans la TE (Tefferi, Blood Advances 2016)
<i>U2AF1</i>	21q22	Epissage ARNm	Fixation sur site de branchement de l'intron	S34 et Q157 hotspots	Substitutions	<2	<2	2-12	5-12	Pronostic défavorable dans la MFP (Tefferi, JCO 2018) et dans tous les SMP (Grinfeld, NEJM 2018)
<i>NFE2</i>	12q13	Facteur de transcription	Régulation différenciation des lignées érythroïdes et mégacaryocytaires	Tous exons	Tous types	2		-		-
<i>TP53</i>	17p13	Cycle cellulaire	Facteur de transcription en réponse aux dommages de l'ADN	Exons 2-11	Tous types	Rare (2%) Très faibles VAF chez 15%		16-50		Pronostic défavorable dans tous les SMP avec un risque accru de transformation en LAM (Grinfeld, NEJM 2018) Impact inconnu des mutations de faible charge allélique
<i>CHEK2</i>	22q12	Cycle cellulaire	Kinase activant p53	Tous exons	Tous types	<2	<2	<2	-	-
<i>PPM1D</i>	17q23	Cycle cellulaire	Phosphatase régulant négativement p53	Exon 6 hotspot	Nonsense et frameshift	1.9		-		-

## Mutations additionnelles et modèle tumoral des SMP

### Complexité mutationnelle

Le nombre de mutations somatiques dans les SMP évalué par séquençage d'exome (tous les exons soit environ 30 000 000 bases : 30 Mb) est d'environ 0,1 mutation par Mb (Nangalia et al., 2013). Pour comparaison, ce nombre moyen de mutations est de 0,37 / Mb pour les leucémies aiguës myéloïdes *de novo* et est d'environ 100 / Mb pour les mélanomes ou les cancers pulmonaires (Lawrence et al., 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

La myélofibrose est une maladie plus complexe au niveau mutationnel avec un taux moyen de 1,5 mutations additionnelles par patient contre 0,38 à 0,63 pour la thrombocythémie essentielle et la polyglobulie de Vaquez respectivement (Brecqueville et al., 2012; Delic et al., 2016). Les mutations d'*ASXL1* sont plus fréquentes dans la MFP, tandis que les mutations de *TET2* sont retrouvées aussi fréquemment dans la MFP que la PV ou la TE (Brecqueville et al., 2012). Les mutations intéressant les gènes impliqués dans la signalisation cellulaire ou dans l'épissage sont surtout retrouvées dans les myélofibroses (Bartels et al., 2015; Grinfeld et al., 2018; Lundberg et al., 2014b; Nangalia et al., 2013). Cette répartition inégale des mutations pourrait être l'une des explications aux différences phénotypiques entre les trois SMP. Certaines de ces mutations sont également décrites comme exclusives. Ainsi, par exemple, les mutations des gènes du spliceosome sont exceptionnellement associées aux mutations de *CALR* (Bartels et al., 2015; Lundberg et al., 2014b; Nangalia et al., 2013).

### Ordre d'acquisition des mutations et hétérogénéité clonale

Bien avant la mise en évidence des mutations additionnelles, il existait des arguments forts pour que la mutation promotrice de *JAK2* soit un second évènement oncogénétique dans un clone préexistant (figure 14). En effet des études de clonalité par inactivation du chromosome X ou la mise en évidence d'anomalies cytogénétiques avaient montré que *JAK2V617F* était acquise secondairement (Kralovics et al., 2006).

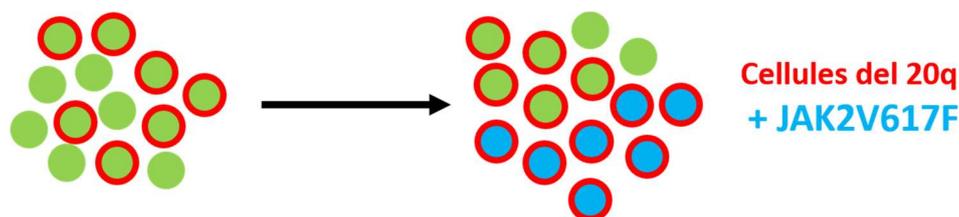


Figure 14 : La mutation promotrice *JAK2V617F* peut être acquise secondairement (d'après Kralovics et al. 2006)

Des travaux plus récents couplent le séquençage haut débit (NGS) avec l'analyse à l'échelon clonal des mutations dans des colonies issues des progéniteurs hématopoïétiques. La recherche des mutations retrouvées par NGS dans les colonies permet d'identifier l'ordre d'acquisition de ces mutations et permet aussi de préciser si ces mutations surviennent dans un même clone ou dans des clones différents (figure 15).

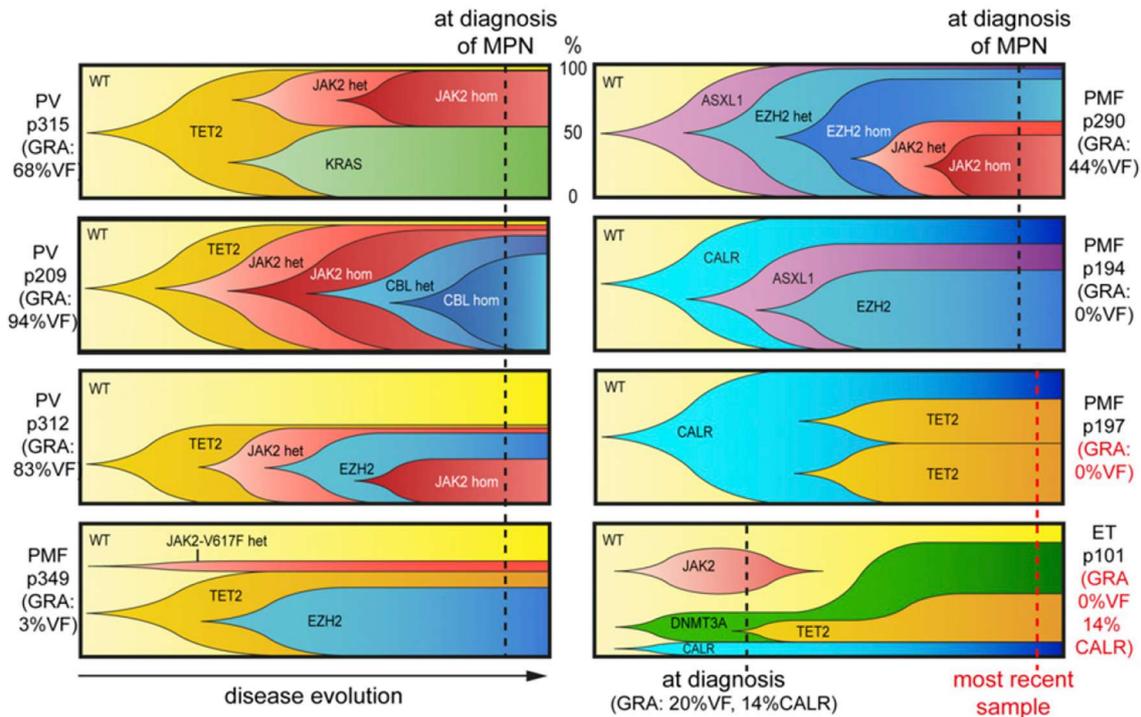


Figure 15 : Illustration de l'hétérogénéité clonale et de l'acquisition de mutations dans les SMP (Lundberg et al, Blood 2014)

Les mutations de *TET2*, mises en évidence en 2009, ont d'abord été décrites comme un évènement précédant la mutation *JAK2V617F* (Delhommeau et al., 2009). Les mutations de *TET2* sont associées à une augmentation de la prolifération au niveau du compartiment des cellules souches hématopoïétiques. Par la suite il a été montré que les mutations de *TET2* peuvent aussi être acquises secondairement et ainsi entraîner une expansion du clone double muté *JAK2-TET2* au niveau des cellules souches et des progéniteurs avec plus souvent des clones homozygotes *JAK2V617F* (Ortmann et al., 2015; Schaub et al., 2010). L'ordre d'acquisition des mutations pourrait également influencer les propriétés des cellules tumorales ainsi que le phénotype de la maladie (Ortmann et al., 2015). Ainsi lorsque *TET2* est acquis en premier, la mutation *JAK2V617F* provoquerait un phénotype de thrombocytémie essentielle tandis qu'à l'inverse lorsque *JAK2V617F* est acquis en premier le phénotype serait celui d'une polyglobulie de Vaquez. Une étude transcriptionnelle chez ces patients a montré que selon l'ordre d'acquisition des mutations, des gènes peuvent être surexprimés dans un cas et sous-exprimés dans l'autre cas. Enfin les patients avec une mutation de *JAK2* acquise en premier sont plus jeunes avec un risque accru de survenue de thromboses (Ortmann et al., 2015). Contrairement aux mutations de *JAK2*, les mutations de *CALR* semblent être toujours un évènement précoce (Klampfl et al., 2013; Lundberg et al., 2014b).

Les mutations de *TET2* ne sont pas spécifiques des SMP et sont retrouvées dans toutes les hémopathies myéloïdes. De plus ces mutations somatiques peuvent également être retrouvées chez des patients indemnes d'hémopathies (Busque et al., 2012). De récents travaux de séquençage d'exome ont ainsi montré que des mutations somatiques sont retrouvées dans les leucocytes de sujets sains (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014) ou ne présentant pas d'hémopathies (Xie et al., 2014). La présence de ces mutations est le reflet d'une hématopoïèse clonale. Leur fréquence augmente avec l'âge : elles sont rares avant 50 ans et de plus en

plus fréquentes après 65 ans. Ces mutations intéressent, dans la majorité des cas, des gènes impliqués dans la leucémogénèse et en particulier des gènes ayant un rôle épigénétique. Les gènes les plus souvent mutés sont *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* (Jaiswal et al., 2014). Les sujets porteurs de ces mutations ont un risque augmenté de développer une hémopathie avec un risque relatif évalué entre 11,1 et 12,9 (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014). Ce risque serait plus élevé lorsque la charge allélique de la mutation est élevée, c'est-à-dire lorsque le clone représente une part plus importante de l'hématopoïèse (Jaiswal et al., 2014). La survie de ces sujets est également diminuée (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014) et le risque de thrombose est également augmenté (Jaiswal et al., 2017).

En plus de ces mutations initiatrices, des mutations peuvent être acquises secondairement aux mutations promotrices (figure 15). L'acquisition de ces mutations au cours de la maladie peut être le reflet de l'instabilité génétique induite par la mutation *JAK2V617F* (Marty et al., 2013; Plo et al., 2008). Afin de mesurer cette acquisition de nouvelles mutations au cours du temps nous pouvons nous intéresser aux études longitudinales avec réalisation séquentielle de séquençage NGS (Lundberg et al., 2014b; Senín et al., 2018). Dans ces travaux le taux d'acquisition de nouvelles mutations est relativement faible puisqu'il est de 1,5 à 1,7 mutations pour 100 patients par an. De plus certaines mutations nouvellement détectées sont en fait présentes dès le diagnostic à un très faible taux et reflètent plus une évolution clonale qu'une réelle acquisition de la mutation (Lundberg et al., 2014b).

Ce faible taux de nouvelles mutations lors de la phase chronique des SMP ne s'applique pas aux évolutions hématologiques qui sont souvent associées à l'acquisition d'anomalies moléculaires (Senín et al., 2018).

## **Mutations additionnelles et évolutions hématologiques**

### *Myélofibroses secondaires*

Les myélofibroses secondaires sont caractérisées par un profil mutationnel plus complexe que dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle (Brecqueville et al., 2014). Par rapport aux myélofibroses primitives, le profil mutationnel des myélofibroses secondaires est sensiblement le même avec tout de même moins de mutations d'*ASXL1* et de *SRSF2* (Courtier et al., 2020). Ces mutations sont en fait souvent présentes dès la phase chronique de la maladie formant ainsi un sous-groupe de patients à fort risque évolutif (Bartels et al., 2018). La progression des formes préfibrotiques de myélofibrose vers une myélofibrose avérée est également associée à la présence de mutations additionnelles dès la phase préfibrotique sur les gènes *SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1* et *IDH1/2* (Bartels et al., 2020). Cette évolution en myélofibrose avérée est également accompagnée d'acquisition de mutations sur les gènes *TP53*, *ASXL1*, *EZH2*, *N/KRAS* dans 39% des cas alors que les patients stables au stade préfibrotique ne présentent l'acquisition d'une mutation que dans 11% des cas (Bartels et al., 2020).

### *Leucémies aiguës secondaires*

Le profil mutationnel des LAM post-SMP est différent de celui des LAM *de novo*. En effet, dans les LAM post-SMP, hormis les mutations diagnostiques, les mutations les plus souvent retrouvées sont les mutations de *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2*, *LNK*, *NRAS* et *TP53* (Courtier et al., 2017; Green and Beer, 2010; Harutyunyan et al.,

2011; Lasho et al., 2018; Pardanani et al., 2010; Rampal et al., 2014b; Zhang et al., 2012). Tandis que les mutations de *NPM1*, *FLT3* ou *CEBPa*, fréquentes dans les LAM *de novo*, sont rares dans les LAM post-SMP. De plus, le profil mutationnel des LAM post-SMP semble également différer selon que le SMP ait ou non la mutation V617F de *JAK2* (Rampal et al., 2014b).

Lors de la transformation de certains SMP en leucémie aiguë, la mutation *JAK2*V617F peut ne plus être retrouvée (Theocharides et al., 2007). Dans ce cas, une première hypothèse est la coexistence d'un autre clone que celui avec la mutation de *JAK2*, qui avec l'acquisition d'autres mutations serait responsable de la transformation en leucémie aiguë (Beer et al., 2010). Une autre hypothèse est la survenue d'un évènement leucémogène dans un clone tumoral précédent celui ayant acquis la mutation *JAK2*V617F ce qui lui conférerait un avantage de prolifération à l'origine de la disparition du clone muté *JAK2*V617F (Beer et al., 2010).

Lors de la transformation d'un SMP en leucémie aiguë, une comparaison du profil mutationnel entre la phase chronique et la phase de leucémie permet de mettre en évidence l'acquisition de mutations. Les mutations les plus souvent acquises lors de la transformation en leucémie aiguë intéressent les gènes *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2*, *RUNX1* et *TP53* (Abdel-Wahab et al., 2010a; Beer et al., 2010; Courtier et al., 2017; Zhang et al., 2012). L'utilisation de techniques sensibles comme le séquençage de nouvelle génération a pu montrer que certaines de ces mutations sont en fait présentes dès la phase chronique de la maladie à une faible charge allélique. C'est le cas par exemple des mutations de *TP53* qui sont souvent retrouvées à une faible charge allélique et dont l'augmentation est associée à la transformation leucémique (Lundberg et al., 2014b; Rampal et al., 2014b). Dans une majorité de cas, la charge allélique des mutations de *TP53* dépasse même 50%, ce qui laisse suggérer une relation entre l'inactivation homozygote de *TP53* et la transformation en LAM des SMP (Rampal et al., 2014b). Le rôle des mutations de *TP53* dans la transformation en leucémie aiguë a été démontré dans un modèle murin : les souris greffées avec des cellules *JAK2*-muté et *TP53* inactivé développent une LAM (Rampal et al., 2014b).

Chez des sujets en phase chronique, l'utilisation de techniques de séquençage très sensibles permet de détecter de très faibles mutations de *TP53* chez environ 15% des patients (Kubesova et al., 2018). De tels cas de très faibles variants de *TP53* peuvent aussi être détectés chez des sujets 'sains' (Wong et al., 2014). Les facteurs influençant l'émergence et la sélection du faible clone *TP53* à l'origine de la transformation leucémique ne sont pas connus à ce jour. Une des hypothèses serait l'implication du traitement cytoréducteur selon un mécanisme déjà décrit pour les leucémies aiguës secondaires aux chimiothérapies (Wong et al., 2014, 2018). En effet ces leucémies aiguës secondaires présentent également des mutations de *TP53* dans plus de 50% des cas. Ces mutations sont détectables à un très faible niveau (de l'ordre de 0.01% de charge allélique) avant toute chimiothérapie par des techniques très sensibles (PCR digitale et NGS avec UMIs). Le rôle du traitement sur la sélection des clones *TP53* a été démontré dans un modèle murin de greffe compétitive ou le traitement par agent alkylant favorisait les cellules KO pour *tp53* (Wong et al., 2014). Plus récemment des mutations de *PPM1D*, phosphatase régulant la voie P53, ont été décrites dans les leucémies secondaires aux traitements avec le même mécanisme de sélection (Wong et al., 2018). Le même type de mutation de *PPM1D* est retrouvé dans 1,9% des syndromes myéloprolifératifs en phase chronique (Grinfeld et al., 2018).

Le lien entre traitement par hydroxyurée et mutation de *TP53* a récemment été étudié par Kubesova et al (Kubesova et al., 2018). Leur travail incluait tous les types de SMP y compris la myélofibrose et retrouvait une association entre la présence de clones *TP53*-muté et un traitement par hydroxyurée >4 ans, toutefois cette association perdait sa signification statistique après ajustement sur l'âge. Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'en effet l'hématopoïèse clonale est liée à l'âge et, de plus, l'indication de traitement dans les SMP dépend de l'âge. Cette association entre traitement et mutation de *TP53* reste à préciser.

### Mutations additionnelles et modèles murins

Le rôle des mutations additionnelles sur la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs a été étudié par le biais de modèles murins associant la mutation *JAK2V617F* à une inactivation d'un gène ou un *knock-in* d'une mutation hotspot. Ces différents travaux ont montré un rôle des mutations additionnelles dans les évolutions en myélofibrose ou en leucémie aiguë. Les principaux modèles sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Modèles murin avec mutation *JAK2V617F* et mutations additionnelles

Gènes	Type modèle	Phénotype (vs <i>JAK2V617F</i> )	Fonctionnel (vs <i>JAK2V617F</i> )	Référence
<i>DNMT3A</i>	<i>Jak2V617F</i> + CRISPR/CAS9 <i>dnmt3a</i> (délétion hétérozygote)	Développement d'une myélofibrose	Hypométhylation et diminution activité PRC2. Signature inflammatoire	(Jacquelin et al., 2018)
<i>TET2</i>	<i>Jak2V617F</i> KI + <i>tet2</i> KO (délétion homozygote)	PV plus floride (splénomégalie, hyperleucocytose)	Avantage de prolifération	(Chen et al, 2015)
<i>TET2</i>	<i>Jak2V617F</i> KI + <i>tet2</i> KO (délétion homozygote)	MF plus floride (splénomégalie, hyperleucocytose)	Avantage de prolifération	(Kameda et al., 2015)
<i>IDH1 / 2</i>	<i>Jak2V617F</i> KI + <i>IDH1R132H</i> ou <i>idh2R140Q</i>	Phénotype similaire (PV) Lors transplantation LT- HSC, survie diminuée vs <i>jak2V617F</i>	Avantage de prolifération	(McKenney et al., 2018)
<i>EZH2</i>	<i>Jak2V617F</i> KI + délétion <i>ezh2</i> inductible (homozygote)	Développement précoce d'une myélofibrose	Diminution H3K27me3 et sur- expression <i>hmga2</i>	(Sashida et al., 2016)
<i>EZH2</i>	<i>JAK2V617F</i> inductible + délétion <i>ezh2</i> inductible (hétéro ou homozygote)	Développement d'une myélofibrose plus marquée et survie diminuée	Expansion HSC et progéniteurs (vers lignée MK) Diminution H3K27me3 et sur- expression <i>hmga2</i>	(Shimizu et al., 2016)
<i>EZH2</i>	<i>Jak2V617F</i> KI + délétion <i>ezh2</i> inductible	Développement d'une myélofibrose plus marquée et survie diminuée	Diminution progéniteurs érythroïdes et augmentation MK Diminution H3K27me3 et sur-expression <i>hmga2</i>	(Yang et al., 2016)

HSC : cellule souche hématopoïétique ; MK : mégacaryocytaire

## Modèle mutationnel des syndromes myéloprolifératifs

Un des modèles tumoraux actuellement proposé des SMP est présenté sous forme simplifiée sur la figure 16.

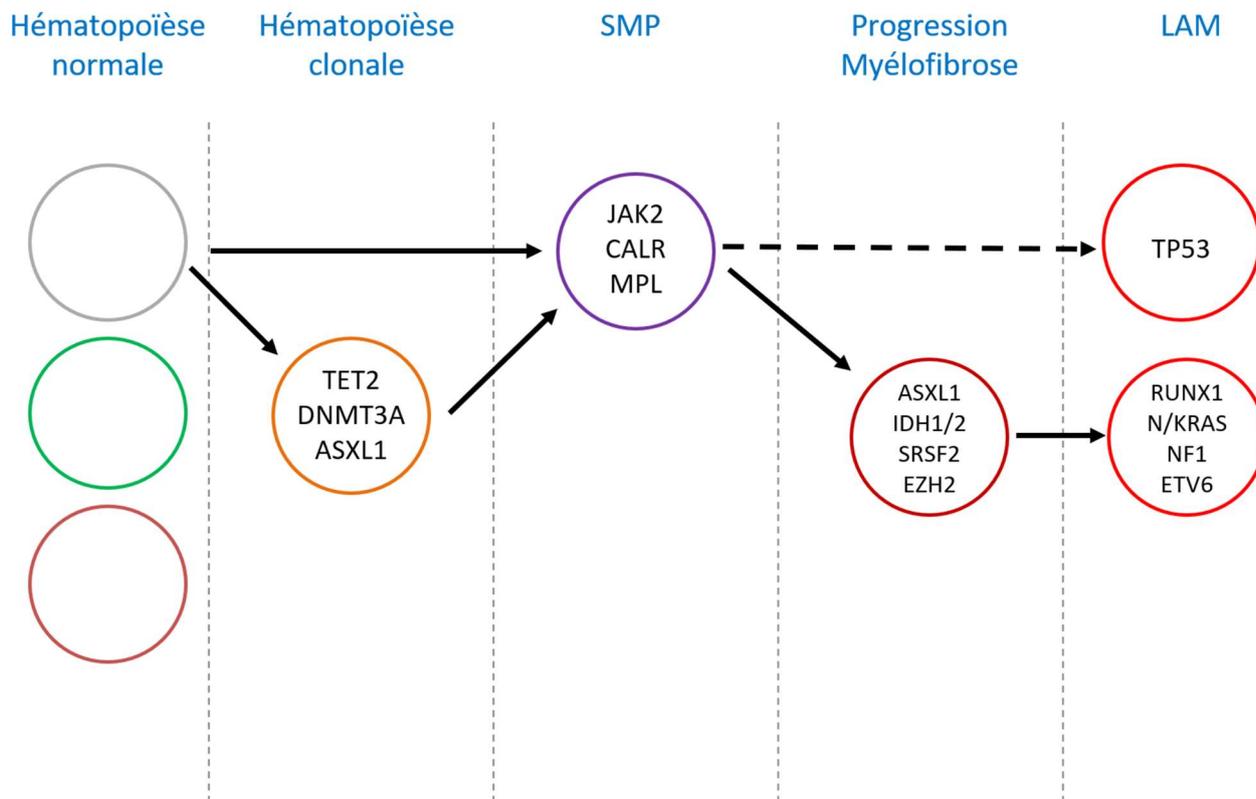


Figure 16 : Modèle tumoral simplifié des syndromes myéloprolifératifs

Le premier évènement peut être une mutation somatique, le plus souvent sur des gènes de l'épigénétique, entraînant une hématopoïèse clonale qui est retrouvée chez certains sujets sains. Les mutations de TET2 ou DNMT3A qui sont les plus souvent retrouvées dans l'hématopoïèse clonale sont associées à une augmentation de la réplication, ce qui pourrait induire indirectement d'autres mutations à l'origine du développement de l'hémopathie. En fonction du gène touché par ce second évènement mutationnel, le patient développera un syndrome myéloprolifératif, un syndrome myélodysplasique ou une leucémie aiguë myéloïde. Dans le cas des SMP, ce deuxième évènement sera l'acquisition d'une mutation promotrice de JAK2, CALR ou MPL.

Le syndrome myéloprolifératif peut également survenir directement par l'acquisition d'une mutation promotrice. Cette hypothèse s'appuie sur les modèles murins expérimentaux et sur le fait qu'une mutation additionnelle n'est pas toujours retrouvée y compris lors d'analyse d'exome.

La progression en myélofibrose ou en leucémie aiguë secondaire est liée à la survenue d'autres mutations. Le cas des mutations de TP53 qui peuvent être présentes à très faible niveau dès la phase chronique est représenté ici. Cette représentation simplifiée ne prend pas en compte l'hétérogénéité clonale ou les différents modèles de progression clonale vers la LAM post-SMP. De plus, un évènement précurseur conduisant à un clone pré-leucémique n'est pas toujours retrouvé et les mutations épigénétiques de TET2 et DNMT3A peuvent aussi survenir après la mutation JAK2V617F.

## Impact pronostique des mutations additionnelles

### Dans la myélofibrose primitive

L'impact pronostique des mutations additionnelles a d'abord été décrit dans la myélofibrose primitive en 2013 par l'équipe de *Vannucchi* (Vannucchi et al., 2013). Dans ce travail réalisé par séquençage Sanger, les mutations de 5 gènes (*ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2* et *SRSF2*) constituaient une signature moléculaire de haut risque associée à une diminution de la survie globale et à un risque accru de transformation leucémique. Cette influence sur le pronostic était indépendante de la classification IPSS. Le nombre de mutations parmi ces gènes semble également pronostique avec un impact péjoratif en cas de mutation multiple (Guglielmelli et al., 2014a). Dans une autre étude réalisée par séquençage de nouvelle génération (NGS), les mutations de *ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *KIT*, *SH2B3* et *CEBPa* étaient associées à une survie diminuée et à un risque augmenté de transformation leucémique indépendamment de la classification pronostique DIPSS et du type de mutation promotrice (Tefferi et al., 2016a).

Récemment ces mutations additionnelles ont été intégrées à des scores pronostiques résumés dans le tableau IX (MIPSS70, MIPSS70+, MIPSS70+v2.0 et GIPSS). L'ajout des mutations additionnelles aux scores pronostiques existant permet notamment d'affiner l'évaluation pronostique des patients classés de risque faible et présentant des mutations additionnelles. Par exemple les patients de faible risque selon le score IPSS étaient reclassés selon le score moléculaire MIPSS70 soit en risque faible avec une survie médiane de 28 ans ou, en cas de mutation additionnelle, en risque intermédiaire avec une survie médiane de 10 ans (Guglielmelli et al., 2018). Le score pronostique MIPSS70 a également montré son intérêt en termes de survie post-allogreffe dans une cohorte monocentrique de 110 patients avec myélofibrose primitive ou secondaire allogreffés avec un conditionnement fludarabine/melphalan (Ali et al., 2019). Un score spécifique évaluant le pronostic post-allogreffe des myélofibroses primitives et secondaires et prenant en compte les mutations d'*ASXL1* a également été récemment développé (MTTS myelofibrosis transplant scoring system) (Gagelmann et al., 2019).

Dans la myélofibrose secondaire, le rôle pronostique des mutations additionnelles a été peu étudié. Dans une cohorte de 359 myélofibroses secondaires à une polyglobulie de Vaquez ou à une thrombocytémie essentielle, seules les mutations de *SRSF2* avaient un impact péjoratif sur la survie globale et uniquement dans les myélofibroses post-TE (Rotunno et al., 2016).

Dans la prémyélofibrose, les mutations de haut-risque moléculaire (*ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2* et *SRSF2*) semblent également être associées à un mauvais pronostic (Guglielmelli et al., 2017).

Tableau IX : Classifications pronostiques dans la myélofibrose incluant les mutations additionnelles

Score	<b>MIPSS 70 et MIPSS 70-plus</b> (Guglielmelli et al., 2018)	<b>MIPSS 70-plus v2.0</b> (Tefferi et al., 2018c)	<b>GIPSS</b> (Passamonti et al., 2017)
	Myélofibrose primitive et âge < 70 ans (pour développement mais validation sur tous âges)	Myélofibrose primitive et âge < 70 ans (cohorte de MIPS70-plus avec modification score)	Myélofibrose primitive (tous âges)
Paramètres et calcul du score	Anémie (<10g/dL) <b>1pt</b>	Anémie modérée <b>1pt</b> ♂ : 9-11g/dL ♀ : 8-10g/dL Anémie sévère <b>2pt</b> ♂ : <9g/dL ♀ : <8g/dL	
	Blastes ≥ 2% <b>1pt</b>	Blastes ≥ 2% <b>1pt</b>	
	Signes généraux* <b>1pt</b>	Signes généraux* <b>1pt</b>	
	Mutations HMR <b>1pt</b> <i>ASXL1, IDH1/2, EZH2, SRSF2</i>	Mutations HMR <b>2pt</b> <i>ASXL1, IDH1/2, EZH2, SRSF2 et U2AF1</i>	Mutation haut risque <b>1pt/mut</b> <i>ASXL1, SRSF2, U2AF1</i>
	Absence de mutation de <i>CALR</i> de type1/type1-like <b>2pts</b>	Absence de mutation de <i>CALR</i> de type1/type1-like <b>2pts</b>	Absence de mutation de <i>CALR</i> de type1/type1-like <b>1pts</b>
	≥2 mutations HMR <b>2pts</b>	≥2 mutations HMR <b>3pts</b>	
	Pour MIPSS 70-plus : Caryotype défavorable <b>3pts</b>	Caryotype défavorable <b>3pts</b> Caryotype très défavorable <b>4pts</b>	Caryotype défavorable <b>1pts</b> Caryotype très défavorable <b>2pts</b>
Catégories de risque	<b>Faible</b> MIPSS70(0-1pt) SM : 27,7 ans MIPSS70+(0-2pts) SM : 20 ans	<b>Très faible</b> (0pt) SM : NA <b>Faible</b> (0-2pts) SM : 10,3 ans	<b>Faible</b> (0pt) SM : 26,4 ans
	<b>Intermédiaire</b> MIPSS70(2-4pts) SM : 7,1 ans MIPSS70+(3pts) SM : 6,3 ans	<b>Intermédiaire</b> (3-4pts) SM : 7,1 ans	<b>Int-1</b> (1pt) SM : 8 ans
	<b>Elevée</b> (>4pts) MIPSS70(>4pts) SM : 2,3 ans MIPSS70+(4-6pts) SM : 3,9 ans	<b>Elevée</b> (5-8pts) SM : 3,5 ans	<b>Int-2</b> (2pts) SM : 4,2 ans
	<b>Très élevée</b> MIPSS70+(>6pts) SM : 1,7 ans	<b>Très élevée</b> (>8pts) SM : 1,8 ans	<b>Elevée</b> (>2pt) SM : 2 ans

\*: perte de poids>10% dans l'année ou fièvre inexpliquée ou sueurs nocturnes persistante plus d'un mois ; SM : survie médiane ; NA : non atteinte

## Dans la Polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle

Dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle, l'impact pronostique des mutations additionnelles a été moins étudié que dans la myélofibrose primitive. En 2014, une étude portant sur 197 patients avec un syndrome myéloprolifératif, dont majoritairement des cas de PV et TE, a montré qu'un nombre de mutations additionnelles élevé était associé à une survie diminuée et à un risque accru de transformation leucémique (Lundberg et al., 2014b). Par la suite plusieurs travaux ont pu suggérer un rôle pronostique des mutations additionnelles dans ces pathologies. Dans un travail portant sur 143 thrombocytémies essentielles, les mutations de *SRSF2* et *ASXL1* étaient associées à une survie diminuée (Asp et al., 2016). La présence de mutations additionnelles au diagnostic de PV était également associée à une transformation leucémique dans une étude cas témoins incluant 64 patients (Bartels et al., 2018). Une limite à ces travaux est l'absence d'analyse multivariée et donc de correction sur l'âge et les classifications pronostiques usuelles.

Une classification pronostique moléculaire a été pour la première fois proposée en 2016 une étude comprenant 133 PV et 183 TE (Tefferi et al., 2016b). Des signatures de mauvais pronostic comprenant les gènes *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH2* dans la PV et *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2* et *EZH2* dans la TE étaient associées à une survie diminuée indépendamment de la classification pronostique IPSET-survie basée sur l'âge, l'antécédent de thrombose et une hyperleucocytose supérieure à 11G/L. Ces signatures moléculaires étaient aussi associées à la survenue d'une évolution en myélofibrose ou en leucémie aiguë. Les mêmes équipes ont très récemment proposé deux classifications pour la PV et la TE intégrant la présence de mutations additionnelles aux facteurs pronostiques déjà décrits (Tefferi et al., 2020). Pour la PV, l'identification des patients de haut risque dans le score MIPSS-PV est basée sur la présence de mutations de *SRSF2*, d'un antécédent de thrombose, d'un âge au diagnostic supérieur à 67 ans et d'une hyperleucocytose supérieure à 15G/L. Pour la TE, l'identification des patients de haut risque dans le score MIPSS-ET est basée sur la présence de mutations de *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* et *TP53*, d'un âge au diagnostic supérieur à 65 ans, d'un sexe masculin et d'une hyperleucocytose supérieure à 11G/L. Les patients de haut risque selon ces classifications présentaient une survie globale diminuée.

Un très récent travail a également proposé une classification pronostique dans la PV basée sur l'âge, l'antécédent de thrombose et la présence de mutations d'*ASXL1* (Andréasson et al., 2020). Dans ce travail portant sur 85 patients la présence d'un ou plusieurs de ces facteurs était associée à une survie diminuée.

## Un modèle pronostique pan-SMP

Récemment l'équipe de P. Campbell a étudié le profil mutationnel d'une grande cohorte de 2035 patients par un séquençage NGS ciblé de 69 gènes (Grinfeld et al., 2018). Cette cohorte était composée de 1321 TE, 356 PV, 309 myélofibroses primitives ou secondaires et 49 SMP non classés. Le NGS ciblé utilisé permettait aussi la détection de certaines anomalies cytogénétiques de nombre. En utilisant un modèle Bayésien, ce travail propose une classification moléculaire de ces syndromes myéloprolifératifs en 7 groupes associés à des pronostics distincts (tableau X).

Tableau X : Classification moléculaire des syndromes myéloprolifératifs selon Grinfeld et al.

Ordre des groupes pour classification	Groupe (Mutations ou CNV)	Pronostic <i>vs patients du groupe JAK2 hétérozygote</i>	
		PV / TE	Myélofibrose
	<b>Anomalie TP53 ou aneuloïdie</b> <i>TP53, del(17p), del(5 ou 5q)</i>	Survie globale diminuée Survie sans leucémie aiguë diminuée	
<b>SMP avec mutation de gène de l'épissage ou de la régulation de la chromatine</b> <i>EZH2, IDH1, IDH2, ASXL1, PHF6, CUX1, ZRSR2, SRSF2, U2AF1, KRAS, NRAS, GNAS, CBL, Chr7/7qLOH, Chr4qLOH, RUNX1, STAG2, BCOR</i>	Survie globale diminuée Survie sans leucémie aiguë diminuée Survie sans myélofibrose diminuée	Survie globale diminuée	
<b>SMP avec mutation de CALR</b> <i>CALR ou del(20q)</i>	-	-	
<b>SMP avec mutation de MPL</b>	Survie globale diminuée	Survie sans leucémie aiguë diminuée	
<b>SMP avec mutation de JAK2 homozygote ou mutation de NFE2</b>	Survie sans myélofibrose diminuée	-	
<b>SMP avec mutation de JAK2 hétérozygote</b>			
<b>SMP sans mutation driver</b>	Survie globale diminuée	-	

Une évaluation pronostique personnalisée est également proposée dans ce travail sur le modèle de ce que la même équipe a précédemment publié dans la leucémie aiguë myéloblastique (Gerstung et al., 2017). Les critères pris en compte sont la pathologie, l'âge, le sexe, la présence d'une splénomégalie, l'antécédent de thrombose, la NFS au diagnostic et le profil mutationnel. Le calculateur est accessible en ligne et deux exemples générés sont présentés sur la figure 17 (<https://cancer.sanger.ac.uk/mpn-multistage/>).

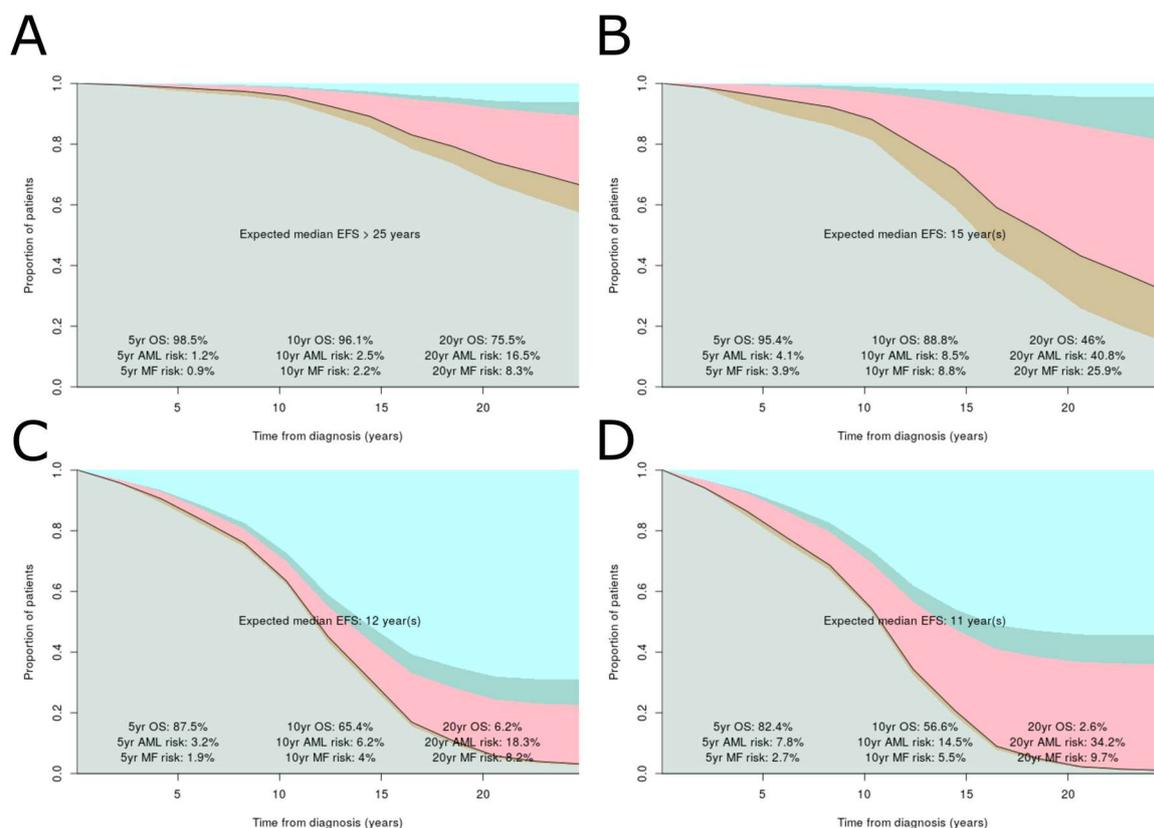


Figure 17 : Exemples de prédictions pronostiques selon Grinfeld et al.

*Evaluations pronostiques réalisées pour des patients fictifs. A et B : TE chez une femme de 38 ans, sans antécédent de thrombose, sans splénomégalie, hémoglobine : 13 g/dL, leucocytes : 8G/L, plaquette : 660 G/L, mutation promotrice JAK2V617F sans (A) et avec (B) mutation de SRSF2. C et D : TE chez un homme de 68 ans, sans antécédent de thrombose, sans splénomégalie, hémoglobine : 13.5 g/dL, leucocytes : 11G/L, plaquette : 850 G/L, mutation promotrice JAK2V617F sans (C) et avec (D) mutation de TET2.*

### Mutations additionnelles et réponse au traitement

Enfin la présence de certaines mutations additionnelles pourrait être associée à une résistance au traitement. Cette résistance au traitement a particulièrement été étudiée pour l'interféron  $\alpha$  et le ruxolitinib.

Le traitement par interféron  $\alpha$  ne semble pas efficace sur les clones portant une mutation de TET2 malgré une efficacité sur le clone portant la mutation promotrice JAK2V617F et indépendamment de la réponse hématologique (Kiladjian et al., 2010). Les patients avec une PV ou une TE, avec mutations de JAK2 ou de CALR, n'obtenant pas de rémission moléculaire complète ou partielle sous interféron ont le plus souvent d'autres mutations, notamment dans des gènes impliqués dans l'épigénétique, ou les acquièrent en cours de traitement (Quintás-Cardama et al., 2013; Verger et al., 2015).

Concernant le ruxolitinib, premier inhibiteur de JAK1/JAK2 commercialisé, une étude ancillaire aux essais cliniques de phase 3 (CONFORT I et II) chez 166 patients a montré que l'amélioration de la survie globale avait aussi lieu chez les patients avec des mutations additionnelles de haut risque moléculaire (Guglielmelli et al., 2014b). Toutefois deux récents travaux dans la myélofibrose semblent montrer que la présence de mutations

additionnelles au diagnostic ou leur acquisition durant le suivi est associée à une perte de la réponse au traitement sur la réduction de la splénomégalie et à une augmentation des arrêts de traitements (Pacilli et al., 2018; Spiegel et al., 2017). Par ailleurs, la présence d'une évolution clonale au moment de l'arrêt du ruxolitinib semble être associée à une survie diminuée (Newberry et al., 2017).

Enfin le traitement par ruxolitinib n'améliore pas le pronostic chez des patients avec une thrombocythémie essentielle résistante ou intolérante à l'hydroxyurée et présentant des mutations de haut risque moléculaire (*TP53*, *SRSF2*, *SF3B1* ou *ZRSR2*) (O'Sullivan et al., 2019).

## Objectifs du travail de thèse

---

Avec l'arrivée du séquençage de nouvelle génération, la recherche de mutations additionnelles est devenue progressivement accessible aux laboratoires hospitaliers. Ce travail de thèse s'intègre dans une démarche de biologie translationnelle et regroupe plusieurs études génomiques sur des cohortes locales, régionales et nationales de patients atteints de syndrome myéloprolifératif.

Le premier objectif de ce travail était d'étudier l'impact pronostique des mutations additionnelles dans les syndromes myéloprolifératifs et en particulier de préciser si le rôle pronostique d'un gène est fonction :

- Du type de syndrome myéloprolifératif et du type de mutation promotrice
- De la mutation en elle-même (en termes de type de mutation, de position sur le gène, de pathogénicité connue ou non et de charge allélique)
- De l'évolution de la mutation dans le suivi (stabilité, disparition, expansion voire apparition)

Le deuxième objectif était de caractériser l'évolution mutationnelle dans les syndromes myéloprolifératifs à l'aide d'une évaluation séquentielle du profil moléculaire à la fois lors de la phase chronique de la maladie et lors de la transformation leucémique.

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié cinq cohortes de patients soit un total de 813 patients avec un syndrome myéloprolifératif (282 TE, 52 PV et 479 myélofibroses) et 948 séquençages nouvelle génération analysés.

Les résultats seront présentés en deux parties, avec tout d'abord les travaux menés dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle qui sont les syndromes myéloprolifératifs avec l'évolution la plus chronique. Dans la seconde partie seront présentés les travaux réalisés dans la myélofibrose et les transformations leucémiques de syndromes myéloprolifératifs. Les résultats sont présentés sous la forme d'articles hormis la partie sur la cohorte nationale de myélofibroses car les résultats sont encore en cours d'analyse.

Partie 1 : Phases chroniques de syndrome myéloprolifératif :  
polyglobulie de Vaquez et thrombocytémie essentielle

## Article 1 : L'analyse séquentielle de 18 gènes d'intérêt dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle *JAK2V617F* révèle une association entre les mutations additionnelles et l'aggravation de la maladie

*Sequential analysis of 18 genes in polycythemia vera and essential thrombocythemia reveals an association between mutational status and clinical outcome*

**D. Luque Paz\***, A. Chauveau\*, F. Boyer, C. buors, L. Samaison, L. Cottin, V. Seegers, C. Férec, C. Le Maréchal, P. Guéguen, E. Lippert, J.C. Ianotto and V. Ugo

Publié dans *Genes, Chromosomes and Cancer* (2017), 56: 354-362

L'impact pronostique des mutations additionnelles dans les syndromes myéloprolifératifs a surtout été étudié dans la myélofibrose primitive. En 2017, peu de données étaient disponibles quant à leur impact pronostique dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle : dans une cohorte tous syndromes myéloprolifératifs confondus, la présence de mutation additionnelles était associée à un pronostic péjoratif (Lundberg et al., 2014b). L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact pronostique des mutations additionnelles dans une cohorte de patients avec polyglobulie de Vaquez ou thrombocytémie essentielle.

Nous avons analysé le profil mutationnel au diagnostic et à 3 ans de suivi chez 50 syndromes myéloprolifératifs avec mutation V617F de *JAK2* (22 TE et 28 PV). Les 18 gènes du panel étudié ont été sélectionnés pour leur fréquence de mutation dans les syndromes myéloprolifératifs ou pour leur rôle dans la leucémogénèse myéloïde. La vérification du caractère somatique ou constitutionnel des variants de signification indéterminée sur ADN extrait d'ongles a permis d'identifier 15 mutations constitutionnelles qui ont été exclues des analyses. L'aggravation de la maladie à 3 ans de suivi était définie par un critère composite clinico-biologique.

Au moins une mutation additionnelle était détectable au diagnostic chez 21 des 50 patients et leur présence était significativement associée à l'aggravation de la maladie. L'augmentation de la charge allélique d'une mutation additionnelle entre le diagnostic et le suivi à 3 ans était également associée à l'aggravation de la maladie.

Bien que la mutation *JAK2V617F* soit associée à une instabilité génétique, nous montrons dans ce travail que peu de mutations sont en fait acquises lors du suivi en phase chronique. En effet les mutations nouvellement détectées étaient présentes dès le diagnostic et reflètent donc d'avantage une évolution clonale que l'acquisition de nouvelles mutations.

Ces résultats suggèrent un rôle pronostique des mutations additionnelles dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle avec mutation *JAK2V617F*. L'évaluation répétée du profil mutationnel permet de mettre en évidence les évolutions clonales pouvant impacter le pronostic de ces pathologies.

# Sequential Analysis of 18 Genes in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia Reveals an Association between Mutational Status and Clinical Outcome

Damien Luque Paz,<sup>1,2,3,4†</sup> Aurélie Chauveau,<sup>4,5,6,7†</sup> Françoise Boyer,<sup>4,8</sup> Caroline Buors,<sup>4,5</sup> Laura Samaison,<sup>7</sup> Laurane Cottin,<sup>1,2,3,4</sup> Valérie Seegers,<sup>2,3,9</sup> Claude Férec,<sup>6,7,10</sup> Cédric Le Maréchal,<sup>6,7,10</sup> Paul Gueguen,<sup>6,7,10</sup> Eric Lippert,<sup>4,5,6,7</sup> Jean-Christophe Ianotto,<sup>4,11</sup> and Valérie Ugo<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>CHU Angers, Laboratoire d'Hématologie, Angers, France

<sup>2</sup>Université d'Angers, UFR Santé, Angers, France

<sup>3</sup>INSERM Unité 892, CNRS Unit 6299, Angers, France

<sup>4</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire 'Grand Ouest Against Leukemia' (FHU GOAL)

<sup>5</sup>CHU Brest, Laboratoire d'Hématologie, Brest, France

<sup>6</sup>Université de Brest, Bretagne Occidentale, UFR Médecine, Brest, France

<sup>7</sup>INSERM Unité I078, CHRU Brest, Brest, France

<sup>8</sup>CHU Angers, Service des Maladies du Sang, Angers, France

<sup>9</sup>Département de Statistique, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers, France

<sup>10</sup>CHU Brest, Laboratoire de Génétique, Brest, France

<sup>11</sup>CHU Brest, Service d'Hématologie Clinique, Brest, France

Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal diseases characterized by driver mutations of *JAK2*, *MPL*, or *CALR*. Additional mutations may occur in epigenetic regulators, signaling, or splicing genes that may be useful in the prognostic assessment of MPN patients. In primary myelofibrosis, molecular-based prognostic scoring systems have been recently proposed, but few data are available to date for polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET). In this study, we used a next generation sequencing-based 18-gene panel in 50 *JAK2V617F* positive PV and *JAK2V617F* positive ET patients from an institutional cohort investigated at diagnosis and at 3-year follow-up (3y). Disease progression at 3y was defined by a composite criterion. Patients (28 PV and 22 ET) were included according to their clinical status, with or without disease progression. At diagnosis, we found 28 additional mutations in 21 of the 50 patients. Patients with disease progression were more likely to have at least one additional mutation. There was no difference between PV and ET. All patients with two or more additional mutations exhibited disease progression at 3y. No novel mutations appeared at 3y. The allele burden increase by at least one mutation at 3y was more frequent in patients with disease progression. Our data suggest that screening for additional mutations in PV and ET could identify patients at a higher risk of disease progression. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

## INTRODUCTION

Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms (MPN) are chronic hematopoietic disorders characterized by clonal expansion of mature myeloid cells of different myeloid lineage depending on the disease subtype: erythroid lineage in polycythemia vera (PV) or megakaryocytic lineage in essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). The overall survival is better in PV and ET than in PMF, with a median survival of 14, 20, and 6 years, respectively (Passamonti et al., 2008; Tefferi et al., 2013). Nevertheless, some patients with PV or ET may progress to acute myeloid leukemia or to secondary myelofibrosis (Passamonti et al., 2003, 2008).

Most often, MPN are linked with a driver mutation in genes (*JAK2*, *MPL* or *CALR*) involved in JAK-STAT signaling. The Val617Phe mutation of *JAK2*

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

<sup>†</sup>These two authors contributed equally to this work.

Supported by: [Canceropole Grand Ouest]; [Ligue contre le Cancer Grand Ouest].

\*Correspondence to: Valérie Ugo; Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie en Santé, CHU ANGERS, 4 Rue Larrey, 49933 ANGERS Cedex 9, France. Email: valerie.ugo@univ-angers.fr

Received 8 April 2016; Revised 2 December 2016;

Accepted 3 December 2016

DOI 10.1002/gcc.22437

Published online 1 February 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

(*JAK2V617F*) is found in the majority of MPN cases: more than 95% of PV and around 50% of ET and PMF (Baxter et al., 2005; James et al., 2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005). In *JAK2V617F*-negative ET and PMF patients, *MPL* or *CALR* genes are often mutated (Pikman et al., 2006; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013). However, the mutational landscape of MPN is complex and many additional mutations have been found in genes involved in epigenetics, signaling, or splicing (Delhommeau et al., 2009; Gelsi-Boyer et al., 2009; Pardanani et al., 2010a; Yoshida et al., 2011). Studies have revealed that these additional mutations may either be early events or may occur later in the course of the disease (Schaub et al., 2010; Lundberg et al., 2014; Ortmann et al., 2015).

Genetic studies of paired chronic MPN/secondary AML samples have found multiple genetic abnormalities at transformation, suggesting that the acquisition of additional mutations is involved in disease progression (Abdel-Wahab et al., 2010a; Zhang et al., 2012; Brecqueville et al., 2014). Though rare, *TP53* mutations seem to play a major role in leukemic transformation of MPN (Harutyunyan et al., 2011; Lundberg et al., 2014; Rampal et al., 2014).

In PMF, a large-scale study by Vannucchi et al. (2013) proposed a molecular prognostic classification for the first time. Patients with a mutation in one of five genes (*ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1*, or *IDH2*) constitute an IPSS/DIPSS-plus independent category with poorer overall survival and an increased risk of leukemic transformation. Mutations in two or more of these five genes predict the worst survival (Guglielmelli et al., 2014).

In PV and ET, the data available to date do not provide enough evidence for 'routine' screening of additional mutations either at diagnosis or at follow-up, even though next generation sequencing (NGS) technologies are becoming widely available.

We studied 50 *JAK2V617F*-positive PV/ET cases by targeted NGS of 18 genes at the time of diagnosis and at 3-year follow-up (3y). The genes were selected after reviewing the literature and comprised (i) the most frequently mutated genes in PV and ET, (ii) the genes identified in the study by Vannucchi et al. (2013), and (iii) genes identified in blast phases of MPN. We analyzed the impact of mutations on disease outcome at 3y. Our results suggest that disease progression was associated with additional mutations at diagnosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Samples

Fifty *JAK2V617F*-mutated MPN patients (28 PV and 22 ET) were studied (Supporting Information Table 1). All patients were selected from an institutional cohort of *JAK2V617F* positive PV and *JAK2V617F* positive ET. Disease progression at 3y follow-up was defined in the design of the cohort by the presence (at 3y) of at least one of the following criteria: (i) leukocytosis  $>12 \times 10^9/L$  or immature granulocytes  $>10\%$  or erythroblasts  $>1\%$  in blood; (ii) anemia not related to treatment toxicity (hemoglobin below 13 g/dL for men and 12 g/dL for women); (iii) thrombocytopenia (platelets below  $150 \times 10^9/L$ ) not related to treatment toxicity; (iv) onset or worsening of splenomegaly; (v) onset of thrombocytosis (platelets over  $450 \times 10^9/L$ ) under hydroxyurea treatment; or (vi) inadequate control of the patient's condition using the treatment (defined by at least one treatment change for reasons other than an adverse event). We performed a nested case-control study by selecting patients with ( $n = 24$ ) and without disease progression at 3y ( $n = 26$ ). Detailed data of criteria for the 24 patients with disease progression are summarized in Supporting Information Table 7. All patients signed a written informed consent approved by the local institutional review board (IRB Ouest 6). Diagnosis was performed according to the 2008 WHO criteria. DNA was extracted from polymorphonuclear cells. Clinical and biological data were collected in a web-based eCRF (Capture System®, ClinSight, DIRC GO CHU BREST).

### Next Generation Sequencing (NGS)

NGS was performed on each patient at diagnosis and at 3y. All exons of 18 genes (*JAK2*, *MPL*, *SH2B3*, *CBL*, *NRAS*, *NF1*, *TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *SUZ12*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TP53*, *IKZF1*, and *SETBP1*) were covered by an Ampliseq<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA) custom design. Library preparation and sequencing using PGM (Thermo Fisher Scientific) were performed according to the manufacturer's instructions (details provided in Supporting Information Methods).

### Mutation Calling

Substitutions and small insertions/deletions were detected using the Variant Caller v4.2 plugin from Torrent Suite Software. For mutation calling,

minimum coverage of called regions was set to 50 and the minimum variant allele frequency (VAF) was set to 2%. Integrative Genomics Viewer (IGV, Cambridge, UK) was used to visualize the read alignment and confirm the variant calls (Robinson et al., 2011). Only exonic nonsynonymous mutations were retained and putative somatic mutations were obtained by removal of known polymorphisms with a population frequency >0.01 (details provided in Supporting Information Methods).

### Validation of NGS and Additional Mutation Screening

Sanger validation was attempted for all mutations detected with NGS but failed to validate mutations with a VAF below 10%. For a minority of amplicons, no sequencing coverage was obtained with NGS. Among the uncovered areas, there were three hotspots where mutations are found in MPN: *SRSF2* Pro95, *SF3B1* Lys700 and the end of *SH2B3* exon 2. Mutations in these regions were screened using Sanger sequencing for *SRSF2* and *SH2B3* and using HRM for *SF3B1*. *CALR* exon 9 mutations were screened by a fragment analysis as previously described (Klampfl et al., 2013). Some recurrent mutations in *ASXL1* were not detected with Ion Torrent technology as the Gly646Trpfs\*12 mutation (c.1934dupG) localized in a homopolymer. We therefore analyzed exon 12 of *ASXL1* by Sanger sequencing in all samples. Technical details are given in the Supporting Information Methods and Supporting Information Tables S2 and S3.

### Somatic Validation

A somatic validation by nail DNA sequencing was performed for mutations that had an allele frequency between 40% and 60% and that were not confirmed as somatic in the COSMIC database. *JAK2* mutations other than V617F were also validated for somatic status because of the homologous recombination of chromosome 9 previously described in MPN which can skew the allele burden of a constitutional heterozygous variant (Kralovics et al., 2005). Mutations resulting in a truncated protein were considered to be somatic because of the presumed impact on protein functions. Details are given in the Supporting Information Methods.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism, version 5.0 (GraphPad Software, La

Jolla, CA). Comparisons between sample groups for clinico-biological data were performed using the Chi2 or Fisher's exact tests for qualitative variables and the Mann-Whitney test for continuous variables. Correlation for continuous variables was performed using Spearman Rank-Order correlation.

## RESULTS

### NGS Results and Validation

The selection and validation of mutations are summarized in Supporting Information Figure 1. For the 100 samples, the mean coverage of NGS was  $1067\times$  [IC<sub>95%</sub>: 1031–1103]. On average, 97.7% [IC<sub>95%</sub>: 97.4–97.9] of bases had a coverage of at least  $100\times$ . We found 48 putative mutations in 31 of 50 patients. Forty-three mutations were validated by Sanger sequencing. Four mutations with low VAF (below 10%) were validated because they were present on both strands of DNA with good Phred quality scores and because they were found in both diagnosis and follow-up samples. Somatic validation identified 15 germline polymorphisms (Supporting Information Table 4). Overall, we found 32 somatic additional mutations that corresponded to 28 mutations found in both diagnostic and follow-up samples and four mutations that were only detected at 3y.

### Frequency and Distribution of Mutations at the Time of Diagnosis

Ten of the 18 genes analyzed were mutated in at least one patient at diagnosis (Fig. 1). No mutation was found in the *JAK2* (apart from *JAK2*V617F), *MPL*, *NF1*, *SUZ12*, *EZH2*, *TP53*, *IKZF1*, and *SETBP1* genes. There was an average of 1.6 mutations per patient at diagnosis including *JAK2*V617F. Genes involved in epigenetic regulation were the most frequently mutated (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, and *DNMT3A*). Nine mutations were not previously described in myeloid malignancies. Two of these resulted in a truncated *DNMT3A* (p.Arg767Glyfs\*12; c.2299delA) or *TET2* (Tyr1766\*; c.5298C>A). The other seven new mutations were nonsynonymous mutations with a deleterious impact on protein function predicted by at least one bioinformatics tool (PolyPhen2 and/or SIFT) (Supporting Information Table 5).

We found four mutations of *ASXL1* in three patients: three frameshift mutations and one nonsense mutation, which all result in a protein truncated from its C-terminal domain (Figs. 1 and 2). The Glu635Argfs\*15 mutation (c.1900\_1922del) was

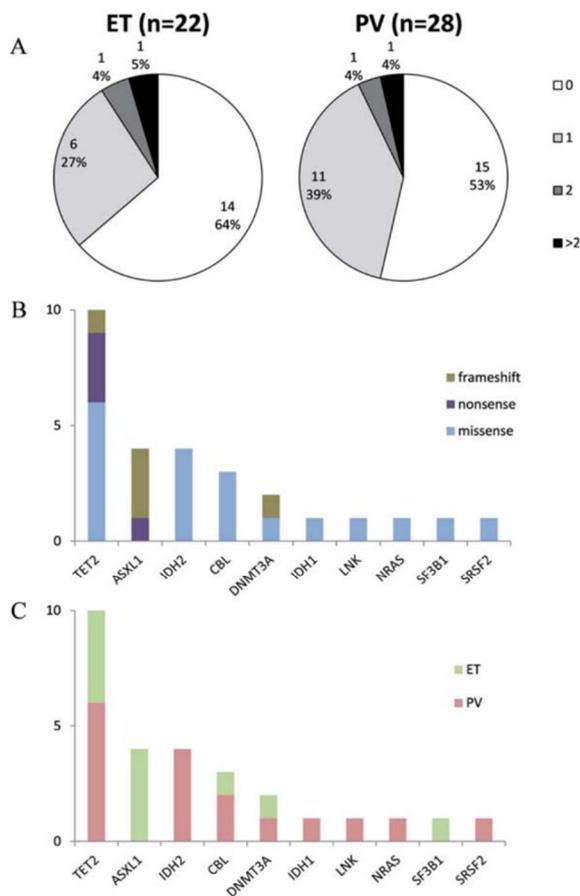


Figure 1. Mutations detected at the time of diagnosis. Distribution of mutations among PV and ET (A), number of mutations per gene according to the type of mutation (B), and subtype of MPN (C). [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

found in two patients. One patient had two mutations in *ASXL1*: Glu635Argfs\*15 (c.1900\_1922del) and Leu775\* (c.2324T>A). The same *IDH2* Arg140Gln mutation (c.419G>A) was found in four PV patients.

There was no correlation between the presence or the number of mutations and *JAK2V617F* allele burden ( $P = 0.36$ ). Furthermore, there was no difference either in the number or in the presence of mutations between PV and ET ( $P = 0.73$  and  $P = 0.63$ , respectively).

Overall, 29 out of 50 patients only had the *JAK2V617F* mutation and no mutation in any of the other genes analyzed.

#### Mutation Evolution at 3-Year Follow-up

At 3y follow-up, four new mutations were detected in four different patients: one PV and three ET (Supporting Information Table 6). Two of these mutations occurred in *TET2* with a low VAF: 5.2% for Trp1847\* (c.5541G>A) and 4.2% for

Arg1262Trp (c.3784C>T). The *TET2* Arg1262Trp mutation had not been previously described in MPN. The other two mutations occurred in *IDH1* (Arg132His; c.395G>A; 19.5%) and *SRSF2* (Pro95Leu; c.284C>T; approximately 15%). In these two cases, the allele burden of *JAK2V617F* decreased between the diagnosis and 3y. Thus, the *JAK2V617F* allele burden evolved from 76.1 to 32.1% for the patient with *IDH1* mutation and from 35% to 6.6% for the patient with *SRSF2* mutation. Review of the initial NGS data showed that three of these mutations were already present in diagnosis samples with a low VAF (<2%) and were not retained by bioinformatic analysis. The fourth mutation was a *SRSF2* mutation occurring in a region poorly covered by NGS and was only detectable by Sanger sequencing; thus, the presence of the mutation with a low VAF in the diagnosis sample is uncertain.

The increase of the mutation allele burden between diagnosis and follow-up was defined by a 20% relative increase of the VAF. An increase of at least one mutation was observed in 15 patients (9 PV and 6 ET) (Fig. 3). In eight patients, there was only an increase of the *JAK2V617F* allele burden. In four patients, there was an allele burden increase of *JAK2V617F* and of one other mutation (Patients No. 1025, 1027, 1036, and 1047; Fig. 3). In particular, patient No. 1036, who had five somatic mutations, presented an allele burden increase of *JAK2V617F* and *SH2B3* mutations whereas the mutations of *SRSF2*, *TET2*, and *IDH2* remained stable. Finally, three patients exhibited an increase of a mutation allele burden and with a decrease of the *JAK2V617F* allele burden (Patients No. 1003, 2001, and 2075; Fig. 3).

#### Clinical Correlation at 3-Year Follow-up

Patients who had evidence of progression at 3y were more likely to have additional mutations at diagnosis ( $P = 0.025$ ) (Fig. 2). It is worth noting that all patients with two or more additional mutations exhibited disease progression at 3y ( $P = 0.046$ ). A mutation of *ASXL1*, *IDH1/2*, or *SRSF2*, which is a poor prognostic factor in primary myelofibrosis, was found in eight patients at diagnosis, all with disease progression at 3y ( $P = 0.001$ ).

Patients with disease progression were also more likely to have additional mutations with an allele burden greater than 20% at diagnosis ( $P = 0.011$ ). Finally, disease progression at 3y was associated with an allele burden increase of at least one mutation

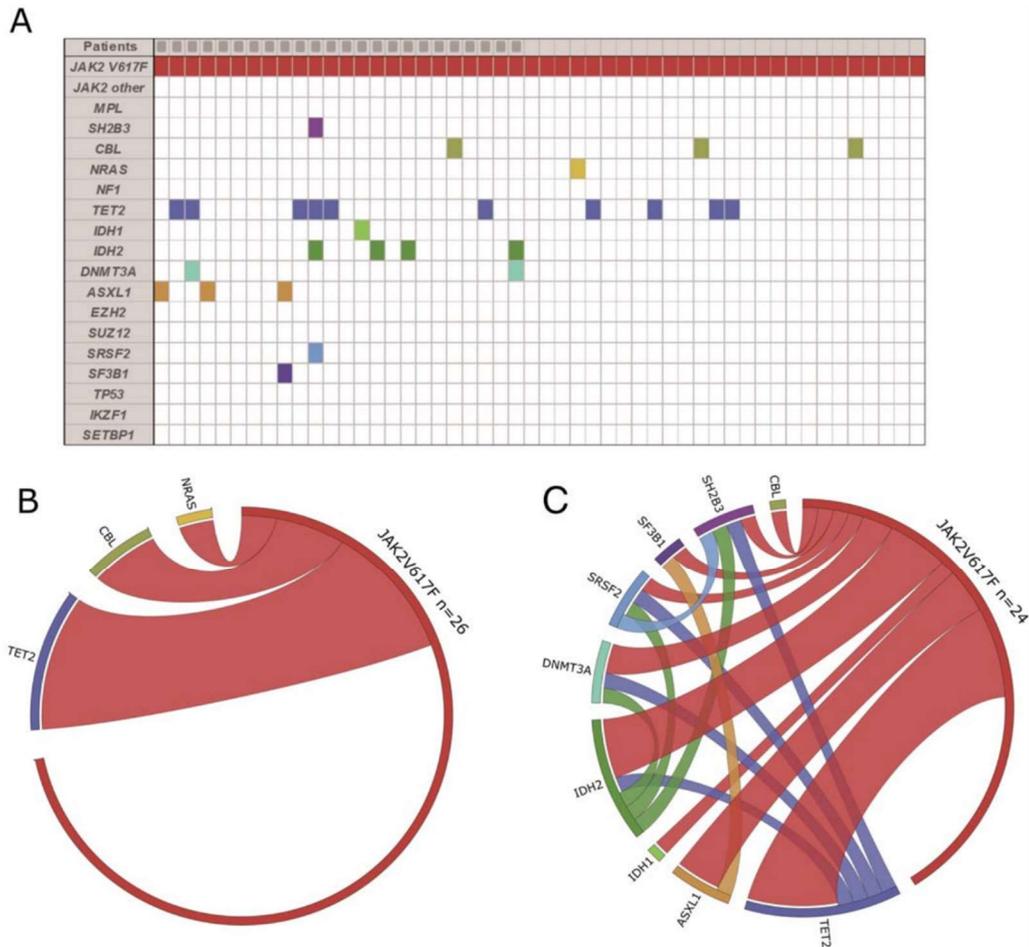


Figure 2. Mutation profile of patients at the time of diagnosis according to disease progression. Distribution of mutations among patients according to disease progression (A). Each column represents a patient and columns with a gray square denote patients with disease progression at 3y. The colored boxes correspond to the presence of a mutation. Circos plot showing the frequency of co-occurring mutations

in patients without disease progression at 3y (B) and in patients with disease progression at 3y (C). The length of the arc on JAK2V617F corresponds to the frequency of mutations and the width of the ribbon corresponds to the relative frequency of the association of two mutations. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

(*JAK2V617F* included) ( $P = 0.019$ ). The statistical results are summarized in Table 1.

## DISCUSSION

We studied the mutational landscape of 50 *JAK2V617F* positive PV and *JAK2V617F* positive ET patients at diagnosis and at 3-year follow-up using an 18-gene NGS panel, and found an average of 1.6 mutations per patient, with no difference between PV and ET. This is consistent with a previous study (Brecqueville et al., 2012). In contrast, PMF exhibits more somatic mutations and seems to be molecularly more complex. An exome-sequencing study showed a median of 6.5 mutations per patient in PV and ET (Nangalia et al., 2013). Noteworthy, only *JAK2V617F* positive MPN cases were included in our study to

avoid molecular heterogeneity, but consequently, the findings should not be extended to *CALR/MPL* or triple negative ET cases.

*TET2* and *IDH* mutations were more frequent in our population (20 and 10%, respectively) than in other studies (8–15 and 1–2%, respectively) (Delhommeau et al., 2009; Brecqueville et al., 2012; Nangalia et al., 2013; Lundberg et al., 2014). This might be explained by the fact that half of the population studied was made up of patients with disease progression. *TET2* mutations seemed to be more frequent in patients with disease progression than in patients without progression (6/24 vs. 4/26), but that did not reach statistical significance and does not allow any conclusions about *TET2* and clinical prognosis. Indeed, the prognostic impact of *TET2* mutations in MPN is debated and larger studies are still needed (Tefferi et al.,

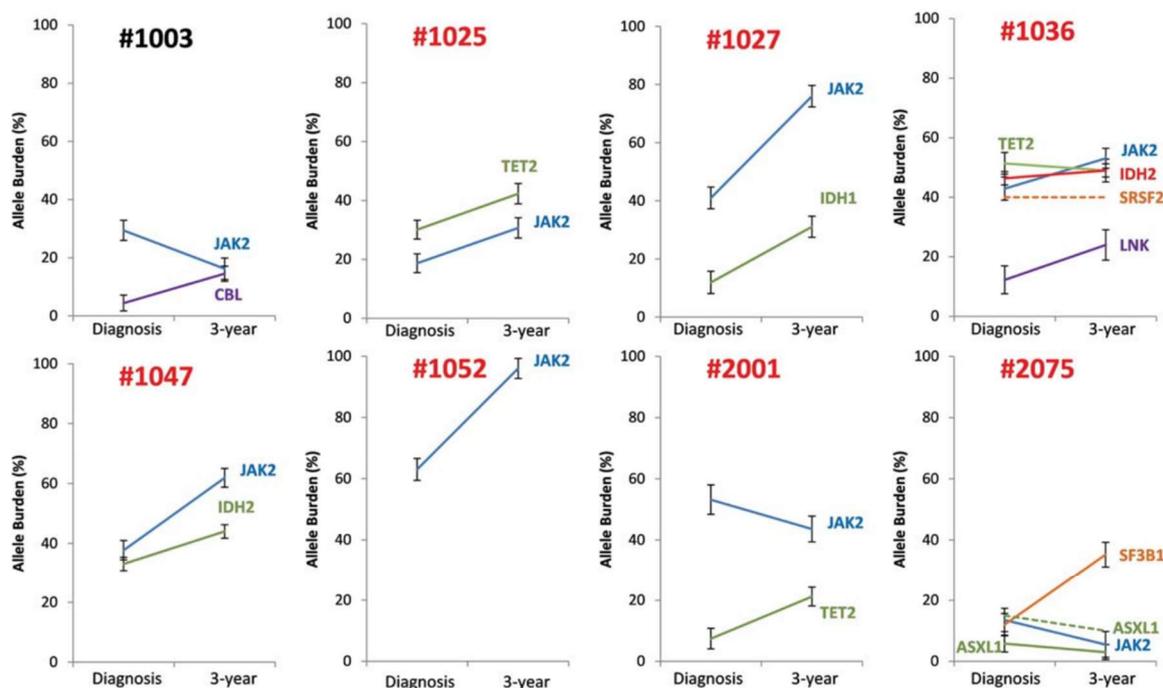


Figure 3. Examples of the evolution of mutations in patients with an allele burden increase. The increase is defined by a 20% relative increase of the allelic burden with no intersection between the two confidence intervals of the allelic burdens. The identification of patients is marked in black for patients with no progression at 3y and in red

for patients exhibiting disease progression at 3y. Allele burden and confidence interval data were provided by NGS, with the exception of mutations of SRSF2 and ASXL1 (dotted line) where the allele burden was approximated by Sanger sequencing. [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

TABLE I. Association of Additional Mutations and Disease Progression at 3-Year Follow-Up

	Progression (n = 24)	No progression (n = 26)	P
<b>At diagnosis</b>			
Presence of at least one mutation with <sup>a</sup> :			
VAF ≥ 2%	14 (58%)	7 (27%)	0.025
VAF ≥ 10%	11 (46%)	3 (12%)	0.07
VAF ≥ 20%	9 (38%)	2 (8%)	0.011
Presence of a <i>TET2</i> mutation	6 (25%)	4 (15%)	0.49*
Presence of at least one mutation other than <i>TET2</i> <sup>a</sup>	11 (46%)	3 (12%)	0.007
Presence of <i>ASXL1</i> , <i>IDH1/2</i> , <i>EZH2</i> or <i>SRSF2</i> mutation	8 (33%)	0 (0%)	0.001*
Presence of 2 or more mutations <sup>a</sup>	4 (17%)	0 (0%)	0.046*
<b>At 3-years follow-up</b>			
Allele burden increase of at least one mutation			
Presence of at least one mutation with <sup>a</sup> :	11 (46%)	4 (15%)	0.019
VAF ≥ 2%	16 (67%)	9 (35%)	0.024
VAF ≥ 10%	12 (50%)	5 (19%)	0.022
VAF ≥ 20%	11 (46%)	3 (12%)	0.007

Statistics were calculated with the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test if conditions for the  $\chi^2$  test were not met (P marked with \*).

VAF, variant allele frequency.

<sup>a</sup>JAK2V617F mutation omitted.

2009; Lundberg et al., 2014). It is worth noting that the order of the acquisition of *TET2* and *JAK2* mutations may influence clinical features (Ortmann et al., 2015).

In the literature, mutations of the *IDH* genes are mainly found during the blast phase (Green and

Beer, 2010; Pardanani et al., 2010b; Tefferi et al., 2010). In our study, the five patients with mutations in *IDH1* or *IDH2* exhibited disease progression at 3y. We found the *ASXL1* Gly646Trp\*12 mutation in one patient. This recurrent mutation was first described as a PCR artefact but is now considered

to be a *bona fide* mutation (Abdel-Wahab et al., 2010b; Brecqueville et al., 2012; Itzykson et al., 2013; Schnittger et al., 2013).

In PMF, a 5 gene-based prognostic signature (*ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*, and *SRSF2*) was recently defined (Vannucchi et al., 2013). In our work, all patients with at least one mutation in these five genes present a disease progression at 3y. In PV and ET, there is no validated prognosis score for overall survival or leukemic transformation. In this study, disease progression was defined by a composite criterion. We showed that patients with disease progression at 3y were more likely to have additional mutations at diagnosis. Moreover, we observed that all patients with two or more additional mutations exhibited disease progression. Lundberg et al. (2014) have previously demonstrated a prognostic impact of somatic mutations on leukemic transformation and survival in a MPN cohort including PV, ET, and PMF.

When sequencing the 3y samples, only four new mutations were detected. Three of these mutations were already present in the diagnostic sample with a very low VAF (<2%) and therefore were excluded by the initial bioinformatic analysis. The acquisition of new mutations at leukemic transformation was described using Sanger sequencing that does not detect low VAF (Abdel-Wahab et al., 2010a; Zhang et al., 2012). We accept that sequencing only 18 genes may limit our findings and that a 3y follow-up is too short to detect the appearance of new mutations. Nevertheless, in Lundberg's study, using a targeted next-generation sequencing (NGS) of 104 genes, the vast majority of somatic mutations were already present at diagnosis (Lundberg et al., 2014).

We found an association between disease progression and the increase of at least one mutation allelic burden at 3y. It has been demonstrated that the *JAK2V617F* allele burden influences the MPN phenotype and may be correlated with myelofibrosis transformation suggesting that *JAK2V617F* monitoring could be clinically useful (Larsen et al., 2007a; Tiedt et al., 2008; Passamonti et al., 2010; Alvarez-Larrán et al., 2014). In some cases, we observed a decrease of *JAK2V617F* allele burden and a concomitant increase of another mutation in the 3y sample. These results are consistent with the fact that leukemic transformation of *JAK2V617F* MPN often occurs in a *JAK2* wildtype clone (Theocharides et al., 2007; Beer et al., 2010). It has been demonstrated that minor *TP53* mutated clones could precede leukemic transformation (Harutyunyan et al., 2011; Lundberg et al., 2014;

Rampal et al., 2014). In our study, we did not detect any *TP53* mutations despite good coverage, but we only investigated 50 patients and *TP53* mutations are rare during the chronic phase of MPN, with a frequency of around 2% in previous studies (Nangalia et al., 2013; Lundberg et al., 2014). In order to distinguish somatic mutations from rare germline variants, we used DNA derived from nails. Hair follicles and buccal swabs can also provide germline DNA but contamination by leukocytes is possible with buccal swabs (Tenedini et al., 2014). Some studies used DNA from T-lymphocytes but *JAK2V617F* or epigenetic gene mutations can also be found in T cells (Larsen et al., 2007b; Shlush et al., 2014).

In summary, our results suggest that both the presence of additional mutations at diagnosis and the increase of allele burden are associated with disease progression in PV and *JAK2V617F* ET. Larger clinical studies are needed to confirm the relevance of a systematical screening of mutational profile in PV and ET, especially on leukemic transformation and overall survival. Comprehensive clonal studies in the NGS era are still needed to better understand the underlying molecular mechanisms of mutation acquisition.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brest Biological Resources Center/Local tumor tissue biobank BB-0033-00037 "CRB Santé/Tumorothèque de Brest" for providing high-quality and annotated samples, the France Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) for helpful discussions, Denise Jolivot and the DRC of CHU Angers for helpful methodological support, and the Federative Program 'FHU GOAL' Grand Ouest Against Leukemia for institutional support.

#### REFERENCES

- Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, Heguy A, Bueso-Ramos C, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S. 2010a. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 70:447–452.
- Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. 2010b. The most commonly reported variant in *ASXL1* (c.1934dupG; p. Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia* 24:1656–1657.
- Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, Kerguelen A, Carlos Hernández-Boluda J, Martínez-Avilés L, Fernández-Rodríguez C, Gómez M, Lombardía L, Angona A, Ancochea A, Senín A, Longarón R, Navarro B, Collado M, Besses C. 2014. *JAK2V617F* monitoring in polycythemia vera essential thrombocythemia: Clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation thrombotic events. *Am J Hematol* 89:517–523.
- Baxter EJ, Scott L, M, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott

- MA, Erber WN, Green AR. Cancer Genome Project 2005. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054–1061.
- Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D, Kusec R, McMullin MF, Harrison CN, Vannucchi AM, Vainchenker W, Green AR. 2010. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* 115:2891–2900.
- Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccia N, Cervera N, Gelsi-Boyer V, Arnoulet C, Gisserot O, Verrot D, Slama B, Vey N, Mozziconacci M-J, Birnbaum D, Murati A. 2012. Mutation analysis of ASXL1 CBL DNMT3A IDH1 IDH2 JAK2 MPL NF1 SF3B1 SUZ12 TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 743–755.
- Brecqueville M, Rey J, Devillier R, Guille A, Gillet R, Adelaide J, Gelsi-Boyer V, Arnoulet C, Chaffanet M, Mozziconacci M-J, Vey N, Birnbaum D, Murati A. 2014. Array comparative genomic hybridization sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica* 99: 37–45.
- Delhommeau F, Dupont S, Valle VD, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic J-P, Robert F, Alberdi A. 2009. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 360:2289–2301.
- Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adélaïde J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, Lagarde A, Prebet T, Nezri M, Sainty D, Olschwang S, Xerri L, Chaffanet M, Mozziconacci M-J, Vey N, Birnbaum D. 2009. Mutations of polycytemia-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 145:788–800.
- Green AR, Beer PA. 2010. Somatic mutations of IDH1 IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 362:368.
- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, Biamonte F, Pardanani A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Fanelli T, Pietra D, Rumi E, Finke C, Gangat N, Ketterling RP, Knudson RA, Hanson CA, Bosi A, Pereira A, Manfredini R, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Vannucchi AM, Tefferi A. 2014. The number of prognostically detrimental mutations prognosis in primary myelofibrosis: An international study of 797 patients. *Leukemia* 28:1804–1810.
- Harutyunyan A, Klampff T, Cazzola M, Kralovics R. 2011. p53 lesions in leukemic transformation. *N Engl J Med* 364:488–490.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, Adès L, Fenaux P, Platzbecker U, Gagey O, Rameau P, Meurice G, Oréar C, Delhommeau F, Bernard OA, Fontenay M, Vainchenker W, Droin N, Solary E. 2013. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood* 121:2186–2198.
- James C, Ugo V, Le Couedic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* 434:1144–1148.
- Klampff T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanesi C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schönegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R. 2013. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 369:2379–2390.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. 2005. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352:1779–1790.
- Larsen TS, Pallisgaard N, Møller MB, Hasselbalch HC. 2007a. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia polycythemia vera primary myelofibrosis—Impact on disease phenotype. *Eur J Haematol* 79:508–515.
- Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. 2007b. The JAK2 V617F mutation involves B-T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 136:745–751.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera essential thrombocythemia myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7:387–397.
- Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, Girsberger S, Lehmann T, Passweg J, Stern M, Beisel C, Kralovics R, Skoda RC. 2014. Clonal evolution clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123:2220–2228.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du M-Q, Greaves M, Bowen D, Huntly BJP, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR. 2013. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 369: 2391–2405.
- Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, Baxter EJ, Massie CE, Papaemmanuil E, Menon S, Godfrey AL, Dimitropoulou D, Guglielmelli P, Bellosillo B, Besses C, Döhner K, Harrison CN, Vassiliou GS, Vannucchi AM, Campbell PJ, Green AR. 2015. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 372:601–612.
- Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. 2010a. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms in chronic-phase disease with TET2 IDH JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* 24:1713–1718.
- Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. 2010b. IDH1 IDH2 mutation analysis in chronic-and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 24:1146–1151.
- Passamonti F, Malabarba L, Orlandi E, Baratè C, Canevari A, Brusamolino E, Bonfichi M, Arcaini L, Caberlon S, Pascutto C, Lazzarino M. 2003. Polycythemia vera in young patients: A study on the long-term risk of thrombosis myelofibrosis leukemia. *Haematologica* 88:13–18.
- Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, Boggi S, Astori C, Bernasconi P, Varettoni M, Brusamolino E, Pascutto C, Lazzarino M. 2008. Prognostic factors for thrombosis myelofibrosis leukemia in essential thrombocythemia: A study of 605 patients. *Haematologica* 93:1645–1651.
- Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, Roncoroni E, Astori C, Merli M, Boggi S, Pascutto C, Lazzarino M, Cazzola M. 2010. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation vascular complications. *Leukemia* 24:1574–1579.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I. 2006. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 3:1140–1151.
- Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, Nahas M, Wang K, Lipson D, Otto GA, Yelensky R, Hricik T, McKenney AS, Chiosis G, Chung YR, Pandey S, Brink MRM, van den Armstrong SA, Dogan A, Intlekofer A, Manshour T, Park CY, Verstovsek S, Rapaport F, Stephens PJ, Miller VA, Levine RL. 2014. Genomic functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci* 111:E5401–E5410.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29:24–26.
- Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, Skoda RC. 2010. Clonal analysis of TET2 JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 115:2003–2007.
- Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, Kohlmann A, Illig T, Klopp N, Wichmann H-E, Kreuzer K-A, Schmid C, Staib P, Peceny R, Schmitz N, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. 2013. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia* 27: 82–91.
- Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, Kennedy JA, Schimmer AD, Schuh AC, Yee KW, McLeod JL, Doodens M, Medeiros JF, Marke R, Kim HJ, Lee K, McPherson JD, Hudson TJ, Brown AMK, Fouad Yousif Trinh

- QM, Stein LD, Minden MD, Wang JCY, Dick JE. 2014. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* 506:328–333.
- Tefferi A, Pardanani A, Lim K-H, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager S, Mullally A, Li C-Y, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gilliland DG, Levine RL. 2009. TET2 mutations their clinical correlates in polycythemia vera essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia* 23:905–911.
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, Pieri L, Finke CM, Kilpivaara O, Wadleigh M, Mai M, McClure RF, Gilliland DG, Levine RL, Pardanani A, Vannucchi AM. 2010. IDH1 IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic- fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia* 24: 1302–1309.
- Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, Randi ML, Vaidya R, Cazzola M, Rambaldi A, Gisslinger B, Pieri L, Ruggeri M, Bertozzi I, Sulai NH, Casetti I, Carobbio A, Jeryczynski G, Larson DR, Müllauer L, Pardanani A, Thiele J, Passamonti F, Barbui T. 2013. Survival prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: An international study. *Leukemia* 27:1874–1881.
- Tenedini E, Bernardis I, Artusi V, Artuso L, Roncaglia E, Guglielmelli P, Pieri L, Bogani C, Biamonte F, Rotunno G, Mannarelli C, Bianchi E, Pancrazzi A, Fanelli T, Malagoli Tagliazucchi G, Ferrari S, Manfredini R, Vannucchi AM, Tagliafico E. 2014. Targeted cancer exome sequencing reveals recurrent mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 28:1052–1059.
- Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo S-S, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC. 2007. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 110:375–379.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. 2008. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 111:3931–3940.
- Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, Finke C, Score J, Gangat N, Mannarelli C, Ketterling RP, Rotunno G, Knudson RA, Susini MC, Laborde RR, Spolverini A, Pancrazzi A, Pieri L, Manfredini R, Tagliafico E, Zini R, Jones A, Zoi K, Reiter A, Duncombe A, Pietra D, Rumi E, Cervantes F, Barosi G, Cazzola M, Cross NC, Tefferi A. 2013. Mutations prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 27:1861–1869.
- Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann W-K, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih L-Y, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. 2011. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478:64–69.
- Zhang S-J, Rampal R, Manshoury T, Patel J, Mensah N, Kayserian A, Hricik T, Heguy A, Hedvat C, Gonen M, Kantarjian H, Levine RL, Abdel-Wahab O, Verstovsek S. 2012. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood* 119:4480–4485.

## SUPPLEMENTAL METHODS

### Library Preparation and Sequencing

The NGS library, with a total of 585 amplicons, was generated following the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 protocol. Briefly, 20 ng of DNA was used in two multiplex PCR. The two PCR products were then pooled and adapters P1 and A (Ion Xpress Barcode Kit) were ligated with DNA ligase. Following AMPure bead purification (Beckman Coulter), the concentration was determined using the Ion Library TaqMan Quantitation Assay Kit. Next, seven libraries were pooled and clonal amplification, enrichment, and isolation of positive Ion Sphere Particles were performed using the Ion OneTouch 2 and Ion OneTouch ES system (Ion Torrent, Life Technologies). Ion Sphere Particles were loaded on an Ion 318 chip which has a 5-million-reads-per-run capacity. The sequencing run was performed on an Ion Torrent PGM using the Ion PGM 200 Sequencing Kit.

### Variant Annotation

Each variant was annotated using the following resources: dbSNP138, 1000 genomes, Exome Sequencing Project (ESP), and the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). The functional effects of mutations were predicted using Polyphen2 and SIFT algorithms (Kumar et al., 2009; Adzhubei et al., 2010).

### Confidence Intervals for VAF

A 95% confidence interval for VAF of each somatic mutation was calculated, based on a normal approximation of the observed VAF and of the sequencing depth.

### Variant Validation

Sanger sequencing results for *ASXL1* and *TET2* were available for 37 patients at the time of diagnosis and these results were compared with those of the NGS sequencing. Therefore, for these samples, some mutations did not need further validation. For Sanger sequencing, the primers were designed using the Primer 3 tool (Supplemental Table S2) (Untergasser et al., 2012). Sequencing was performed with the HotStar Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen) for amplification and BygDye Terminator v1.1 Kit (Life Technologies) for sequencing reaction.

## Mutation Screening of Uncovered NGS Regions

The *SH2B3* exon 2 hotspot was uncovered (<50X) only for 28 of 100 samples. Sanger sequencing was performed with the HotStar Taq DNA Polymerase Kit (Qiagen) for amplification and BygDye Terminator v1.1 Kit (Life Technologies) for sequencing reaction. HRM was performed with MeltDoctor HRM Master Mix (Life Technologies) on an ABI7500 instrument (Life Technologies). Exon 12 of *ASXL1* was amplified using the LongRange PCR Kit (Qiagen) and 18 Sanger sequencings were performed to cover the entire exon (primers are detailed on supplemental table S3).

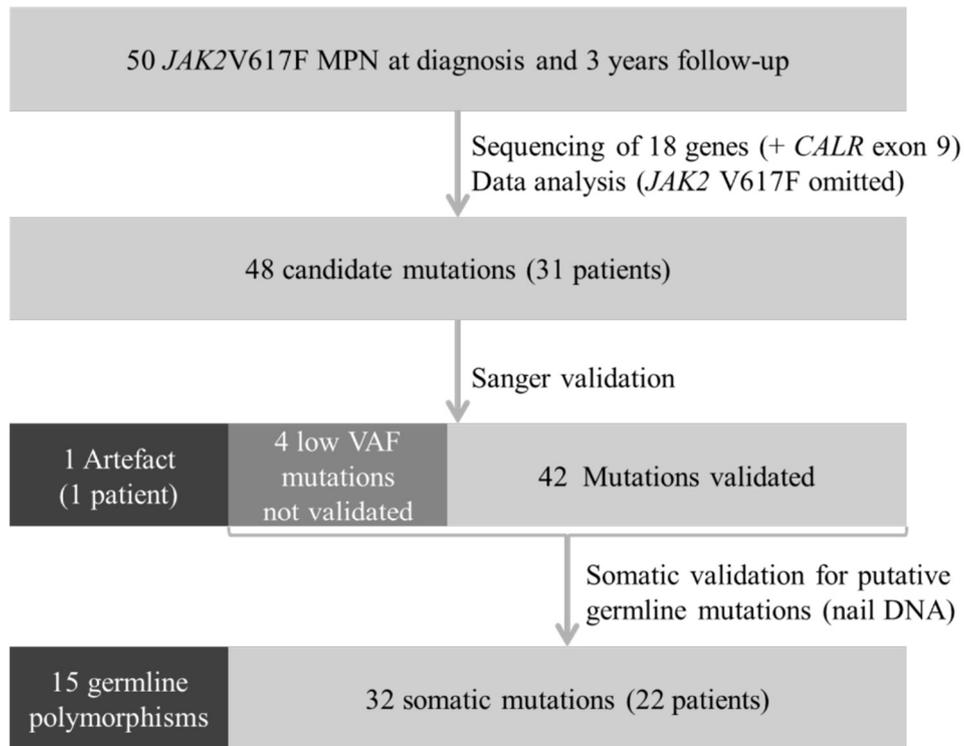
## Somatic Validation

For somatic validation, nail samples were collected. DNA was extracted using the ChargeSwitch Forensic DNA Purification Kit (Life Technologies) with protocol modifications: 20 µL of proteinase K and five hours of incubation. Sanger sequencing was performed with the same primers and the same conditions as for the NGS validation.

## REFERENCES

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7: 248–249.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4: 1073–1081.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: 115.

**Supplemental Figure 1.** Filtering and Selection of Variants



Each mutation validation step is represented. The light gray squares represent the retained mutations at each step. The darker gray square represents mutations not validated by Sanger and retained as somatic (explained in the Materials and Methods section). The darkest grey squares represent mutations excluded at each step. Somatic validation was performed for 14 mutations (see somatic validation criteria in the Methods section) and found that 13 out of 14 mutations were germline (listed in Supplemental Table 4). Moreover, a *DNMT3A* mutation (Glu30Ala; c.89A>C) was present in two patients with an allele burden close to 50%. Obtaining a nail sample was not feasible because the patients were deceased. We reviewed the two cases and discovered that they were twins and for this reason we excluded these mutations; they were considered as a heterozygous germline polymorphism.

Supplemental Table 1. Clinical Characteristics of the Patients at Diagnosis

	<b>Total (n=50)</b>	<b>ET (n=22)</b>	<b>PV (n=28)</b>
<b>% Female</b>	48	64	36
<b>Average age (years)</b>	67.6 [29-91]	70.1 [46-87]	65.8 [29-91]
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	16.2 [11.4-20.7]	14.6 [11.2-17.7]	17.5 [13.5-20.7]
<b>Platelets (10<sup>9</sup>/L)</b>	631 [135-1349]	725 [568-1349]	557 [135-1262]
<b>Leukocytes (10<sup>9</sup>/L)</b>	10.7 [4.5-21.3]	10.4 [4.5-18]	10.9 [6.4-21.3]

Supplemental Table 2. Primers Used for Sanger Validation.

Gene	Exon	Mutation	Forward primer	Reverse primer	Length (bp)
<i>CBL</i>	8	Gly397Val, His398Arg	accagactagatgcttctg	aggccaccctgtatcagt	385
<i>CBL</i>	9	Pro417Leu	tactgatacaaggggtggcc	gccagctcctaaactgcca	373
<i>DNMT3A</i>	3	Glu30Ala	cctggaagtgtggctcgt	ggagggtgttaggatgtga	264
<i>DNMT3A</i>	7	Gly243Arg	tcccaggctgagaagaaag	tgggagatggagagaggaga	315
<i>DNMT3A</i>	19	Phe732Ser, Arg767Glyfs*12	agctattcccgatgaccctg	tgaagcagcagccaaggta	318
<i>IDH1</i>	3	Phe32Val	gtgtagagatgcaaggagatg	ggacttgaattcctggcttga	227
<i>IDH1</i>	4	Arg132His	ggatgctgcagaagctataa	catgcaaatcacattattgcc	275
<i>IDH1</i>	5	His170Pro Amplification	ttgacatactgccctattgtct	cttagctacagtcatacatacc	245
<i>IDH1</i>	5	His170Pro Sequencing	aactgatttggctcctggg	cttagctacagtcatacatacc	-
<i>IDH1</i>	6	Tyr183Cys	ggcatttgggtgtggggg	tgcaaatgctcagctactgaga	329
<i>IDH2</i>	4	Arg140Gln	ccactattatctctgctc	gctaggcgaggagctccagt	250
<i>IDH2</i>	11	Thr435Met	gcaggagatggctgttctga	cctgcctcacgtcccat	382
<i>JAK2</i>	24	Arg1063His	tgactggaggaaattgagaaaga	gctccgcacattaaattcagg	284
<i>JAK2</i>	25	Asn1108Ser	tggttatgacatgtgccctg	tttccacatcttctgtggctag	399
<i>LNK</i>	4	Glu301Lys	tgtgctgaagtgagtgaca	tctctgcttctgtctctcc	303
<i>LNK</i>	6	Gly387Arg	agcccaggacataaggtagc	gctgtgggaggagaggatg	382
<i>LNK</i>	7	Ser460Asn	ccaccctctccactgga	aagcctctaccctctacca	302
<i>NF1</i>	22	Ser979Gly	tgtgggtgcactactctgt	tcagtagaatgcttacctgacca	264
<i>NRAS</i>	3	Asn85Ser	attgaactccctccctcc	tgtggtaacctcatttcccca	300
<i>SF3B1</i>	16	Gly740Glu	aacttaggtaattgtggggca	tcaagaaagcagcctaaacc	310
<i>TET2</i>	3	Tyr867His	tgaaatcaagtgcatacaaaa	taattggcctgtgcatctga	477
<i>TET2</i>	3	Ile830*	ccttttgaacataagcctca	gggtcttgttctgcaaaa	428
<i>TET2</i>	6	Arg1262Trp, Val1213Met	gcccttatctgctgcaagtg	gcacgctgaactctctctct	376
<i>TET2</i>	6	Arg1202*	gcccttatctgctgcaagtg	gcacgctgaactctctctct	376
<i>TET2</i>	7	Phe1300Cys	cctataatcagctgcaca	cagtttgggaaaactttgatt	342
<i>TET2</i>	9	Arg1359Cys, Cys1378Arg	tgtcattccatttgttctg	acagccatgtggaactgtga	405
<i>TET2</i>	10	Glu1492Val	ggacctgtagttgagctgt	ccacacaacacattatctaca	547
<i>TET2</i>	11	Met1701Ile, Val1718Leu, Pro1723Ser, Tyr1766*	ccagccaaggttggaaata	actagtccaatggctgctt	462
<i>TET2</i>	11	Gln1542*	gacaatgatcagaaccctga	tagggctgggtcttccatag	408
<i>TET2</i>	11	Trp1847*	atgacatgcttccacaca	atgggatttctgaggcaca	476

Mutations of *TET2*: Ile830Ilefs\*16, Arg1202\*, Arg1359Cys, Val1718Leu, and Tyr1766\* were already known because of *TET2* Sanger sequencing data were available for these patients.

Supplemental Table 3. Primers Used for Mutation Screening of Uncovered Regions with NGS

Gene	Exon	Comment	Forward primer	Reverse primer	Length (bp)
<i>LNK</i>	2	-	ccctgctcctccagcac	ctggaaagccatcacacctc	435
<i>SF3B1</i>	16	HRM	aacttaggtaatgtggggca	ttcctctgtgtggcggata	193
<i>SRSF2</i>	2	-	tgaggacgctatggatgcc	cctcagccccgtttacctg	175
<i>ASXL1</i>	12	Amplification	tgactcacacagtcccaccagaaa	agcccaatgggttataccaggaa	3360
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	tctagttttgctttacagtccta	agcaccctggaaagtgtac	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	agaggtcaccactgccataga	gctactgaggttgggagga	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	ggactcacagatgggctagg	cctcatcattcgatgggatgggta	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	tgaatcctcaccgactgattgcct	cagaggctgatccgtggac	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	tgtcaacaggtggacattgaa	aaccttcttaggggcaagc	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	aaccacttgatgacagttgctg	agcacggactcctctgat	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	tgactcctccatccagtgacaaa	ttccttggagtctgtaccc	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	tgctgagatccctccagttt	gcaccaaagttgctttgtggctc	-
<i>ASXL1</i>	12	Sequencing	agcaggcattttatgggaag	gatcaatcattatcaaaatacacaca	-

Supplemental Table 4. Germline Mutations

Patient	Diagnosis	Gene	Mutation	Genetic	VAF (%) diagnosis	Coverage diagnosis (X)	VAF (%) follow-up	Coverage Follow-up (X)	Found in nail DNA	COSMIC reference	Somatic validation in previous studies
1004	ET	NF1	Ser979Gly	c.2935A>G	46,4	1878	49,6	1496	YES	-	-
1027	PV	JAK2	Arg1063His	c.3188G>A	64,1	1512	87,5	1752	YES	-	-
1047	PV	TET2	Met1701Ile	c.5103G>A	50,6	1277	51,9	1402	YES	-	-
1052	PV	IDH1	His170Pro	c.509A>C	52,2	1341	50,4	653	YES	-	-
1054	PV	TET2	Tyr867His	c.2599T>C	48,9	1999	50,1	1821	YES	-	-
1054	PV	TET2	Pro1723Ser	c.5167C>T	45,0	658	50,7	1114	YES	-	-
2007	ET	IDH1	Tyr183Cys	c.548A>G	45,8	990	50,3	1369	YES	-	-
2007	ET	SH2B3	Glu301Lys	c.901G>A	50,9	458	47,7	558	YES	-	-
2016	PV	DNMT3A	Glu30Ala	c.89A>C	47,1	997	46,7	901	-	COSM307361	NO
2020	PV	IDH1	Phe32Val	c.94T>G	46,9	1609	49,0	1135	YES	-	-
2028	PV	DNMT3A	Gly234Arg	c.700G>A	50,1	930	50,4	879	YES	-	-
2028	PV	JAK2	Asn1108Ser	c.3323A>G	11,5	1109	28,6	1180	YES	COSM33708	NO
2029	PV	IDH2	Thr435Met	c.1304C>T	48,5	1565	47,8	372	YES	-	-
2043	PV	DNMT3A	Glu30Ala	c.89A>C	47,9	1353	49,5	1654	-	COSM307361	NO
2075	ET	IDH1	Tyr183Cys	c.548A>G	49,7	1268	49,3	1618	YES	-	-

Supplemental Table 5. Somatic Mutations Identified at Diagnosis of the 50 MPN Patients (excluding JAK2V617F)

Patient	Diagnosis	Gene	Mutation	Genetic	VAF (%) diagnosis	Coverage diagnosis (X)	95% Confidence interval / Lower limit	95% Confidence interval / Upper limit	VAF (%) follow-up	Coverage follow-up (X)	95% Confidence interval / Lower limit	95% Confidence interval / Upper limit	Sanger validation	Somatic validation	Previously described in myeloid neoplasms	COSMIC reference	Somatic validation in previous studies	Score Polyphenz	Score SIFT
2035	ET	ASXL1	Glu635Argfs*15	c.1900_1922del	Sanger	-	-	-	Sanger	-	-	-	YES	-	YES	COSM36165	YES	-	-
2075	ET	ASXL1	Glu635Argfs*15	c.1900_1922del	Sanger	-	-	-	Sanger	-	-	-	YES	-	YES	COSM36165	YES	-	-
1022	ET	ASXL1	Gly646Trpfs*12	c.1934dupG	Sanger	-	-	-	Sanger	-	-	-	YES	-	YES	COSM34210	YES	-	-
2075	ET	ASXL1	Leu775*	c.2324T>A	5.8	1326	3.1	8.5	3	1654	0.5	5.5	NO	-	YES	COSM219136	NO	-	-
1061	PV	CBL	Gly397Val	c.1190G>T	8.8	866	5.4	12.2	2.6	989	-0.6	5.8	YES	-	NO	-	-	1 (Damaging)	0,02 (Deleterious)
1003	PV	CBL	His398Arg	c.1193A>G	4.4	1331	1.7	7.1	14.5	1516	11.9	17.1	YES	-	YES	COSM87283	NO	1 (Damaging)	0 (Deleterious)
2067	ET	CBL	Pro417Leu	c.1250C>T	12.8	1444	10.2	15.4	10.2	2000	8.0	12.4	YES	-	YES	COSM34081	NO	1 (Damaging)	0,01 (Deleterious)
2054	ET	DNMT3A	Phe732Ser	c.2195T>C	42.2	1412	39.5	44.9	42.6	1441	40.0	45.2	YES	YES	NO	-	-	0,999 (Damaging)	0 (Deleterious)
1018	PV	DNMT3A	Arg767Glyfs*12	c.2299delA	46.7	1269	43.9	49.5	48.7	1459	46.1	51.3	YES	-	NO	-	-	-	-
1027	PV	IDH1	Arg132His	c.395G>A	11.9	682	8.1	15.7	31.1	768	27.5	34.7	YES	-	YES	COSM28746	YES	0,127 (Benign)	0 (Deleterious)
1028	PV	IDH2	Arg140Gln	c.419G>A	36.7	1624	34.2	39.2	41.7	1337	39.0	44.4	YES	-	YES	COSM41590	YES	1 (Damaging)	0 (Deleterious)
1036	PV	IDH2	Arg140Gln	c.419G>A	46.4	1998	44.2	48.6	49	1999	46.8	51.2	-	-	YES	COSM41590	YES	1 (Damaging)	0 (Deleterious)
1047	PV	IDH2	Arg140Gln	c.419G>A	33.1	2000	30.9	35.3	44	2000	41.8	46.2	-	-	YES	COSM41590	YES	1 (Damaging)	0 (Deleterious)

2016	PV	IDH2	Arg140Gln	c.419G>A	4.4	1999	2.2	6.6	3.7	1568	1.2	6.2	-	-	YES	COSM41590	YES	1 (Damaging)	0 (Deleterious)
1036	PV	SH2B3	Gly387Arg	c.1159G>A	12.3	455	7.6	17.0	24	387	18.9	29.1	YES	-	NO	-	1 (Damaging)	0 (Deleterious)	
1008	PV	NRAS	Asn85Ser	c.254A>G	3.9	462	-0.8	8.6	<2	559	-	-	NO	-	NO	-	0,213 (Benign)	0 (Deleterious)	
2075	ET	SF3B1	Gly740Glu	c.2219G>A	12	758	8.4	15.6	35.3	615	31.3	39.3	YES	-	YES	COSM313120	YES	1 (Damaging)	0 (Deleterious)
1036	PV	SRSF2	Pro95Leu	c.284C>T	Sanger	-	-	-	Sanger	-	-	-	YES	-	YES	COSM146288	YES	0,753 (Damaging)	0,01 (Deleterious)
1017	ET	TET2	Ile830Ilefs*16	c.2488_2489insA	45.9	1300	43.1	48.7	43.3	1623	40.8	45.8	YES	-	YES	COSM110762	NO	-	-
1014	PV	TET2	Arg1202*	c.3604A>T	42.5	894	39.2	45.8	49.4	1359	46.7	52.1	YES	-	YES	COSM87123	YES	-	-
1001	PV	TET2	Val1213Met	c.3637G>A	2.9	727	-0.8	6.6	3.3	1184	0.4	6.2	NO	-	NO	-	1 (Damaging)	0 (Deleterious)	
2054	ET	TET2	Phe1300Cys	c.3899T>G	23.6	937	20.3	26.9	21	1024	17.9	24.1	YES	-	YES	COSM211622	NO	1 (Damaging)	0,02 (Deleterious)
1018	PV	TET2	Arg1359Cys	c.4075C>T	57.2	1351	54.5	59.9	52.8	1471	50.2	55.4	YES	-	YES	COSM41649	YES	0,948 (Damaging)	0,14 (Tolerated)
1065	ET	TET2	Cys1378Arg	c.4132T>C	6.9	764	3.3	10.5	2.7	1175	-0.2	5.6	NO	-	NO	-	0,999 (Damaging)	0,01 (Deleterious)	
1002	PV	TET2	Glu1492Val	c.4475A>T	17.3	883	13.9	20.7	8	716	4.3	11.7	YES	-	NO	-	0,984 (Damaging)	0,05 (Tolerated)	
2001	PV	TET2	Gln1542*	c.4624C>T	7.4	891	4.0	10.8	21.2	1041	18.1	24.3	YES	-	YES	COSM43526	NO	-	-
1036	PV	TET2	Val1718Leu	c.5152G>T	51.4	753	47.8	55.0	49	675	45.2	52.8	YES	-	YES	COSM41742	YES	0,07 (Benign)	1 (Tolerated)
1025	ET	TET2	Tyr1766*	c.5298C>A	30.1	1003	26.9	33.3	42.3	844	38.9	45.7	YES	-	NO	-	-	-	-

Supplemental Table 6. Somatic Mutations Newly Detected at 3-Year Follow-Up

Patient	Diagnosis	Gene	Mutation	Genetic	VAF (%) diagnosis	Coverage diagnosis (X)	95% Confidence interval / Lower limit	95% Confidence interval / Upper limit	Sanger validation	Previously described in myeloid neoplasms	COSMIC reference	Somatic validation in previous studies	Score Polyphen2	Score SIFT
2054	ET	TET2	Trp1847*	c.5541G>A	< 2	1008	-	-	YES	YES	COSM43214	YES	-	-
1017	ET	TET2	Arg1262Trp	c.3784C>T	< 2	1836	-	-	YES	NO	-	-	1 (Damaging)	0 (Deleterious)
2016	PV	IDH1	Arg132His	c.395G>A	Absent	1021	-	-	YES	YES	COSM28746	YES	0,127 (Benign)	0 (Deleterious)
2019	ET	SRSF2	Pro95Leu	c.284C>T	Absent	-	-	-	YES	OUI	COSM146288	YES	0,753 (Damaging)	0,01 (Deleterious)

Supplemental Table 7. Patients with Disease Progression at 3-Year Follow-Up and Progression Criteria.

Patient	Diagnosis	Disease progression at 3-year follow-up	Leukocytosis, immature granulocytes or erythroblasts	Anemia not related to treatment toxicity	Thrombocytopenia not related to treatment toxicity	Splenomegaly onset or worsening	Thrombocytosis under hydroxyurea treatment	Inadequate control of the patient's condition <sup>a</sup>
1013	ET	YES						X
1034	ET	YES					X	X
1042	PV	YES				X		
1052	PV	YES	X					
1054	PV	YES						X
1058	PV	YES						X
1062	ET	YES						X
1068	PV	YES	X				X	X
2029	PV	YES				X		
2043	PV	YES					X	
1014	PV	YES	X					X
1018	PV	YES					X	
1022	ET	YES	X				X	
1025	ET	YES					X	
1027	PV	YES					X	X
1028	PV	YES	X					
1036	PV	YES						X
1047	PV	YES					X	
1061	PV	YES					X	X
1065	ET	YES						X
2016	PV	YES		X				
2035	ET	YES					X	
2054	ET	YES	X	X			X	
2075	ET	YES						X

Columns 4 to 9 correspond to the 6 different items of the composite endpoint.

<sup>a</sup>: "Inadequate control of the patient's condition" was defined by at least one drug change for reasons other than an adverse event, excluding dose change.

## Article 2 : Impact positif des mutations additionnelles sur les scores pronostiques usuels dans la thrombocytémie essentielle : expérience d'une cohorte monocentrique

*Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience*

**D. Luque Paz\***, O. Mansier\*, J. Riou\*, C. Conejero, L. Roy, C. Belkhdja, V. Ugo and S. Giraudier

Publié dans *Haematologica* (2019), 104: e134-e137

L'impact pronostique des mutations additionnelles dans les syndromes myéloprolifératifs a surtout été démontré dans la myélofibrose primitive. Des travaux récents suggéraient un rôle dans la thrombocytémie essentielle. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'impact pronostique des mutations additionnelles et l'apport de celles-ci par rapport aux classifications pronostiques existantes dans une cohorte de patients avec thrombocytémie essentielle.

Une cohorte monocentrique de 190 diagnostics consécutifs de thrombocytémie essentielle a été étudiée en NGS sur un panel de 16 gènes. Les mutations retenues ont ensuite été classées grâce aux données de la littérature et à des outils bioinformatiques de prédiction selon leur pathogénicité suspectée en 3 catégories : pathologique, possiblement pathologique et de pathogénicité indéterminée.

Les mutations promotrices dans la cohorte étaient réparties en 116 *JAK2V617F* (61%), 27 *CALR* (14%) et 4 *MPL* (2%). Quarante-trois patients (23%) ne présentaient aucune mutation promotrice (triple négatifs). Au moins une mutation additionnelle a été détectée chez 83 patients (43,7%), portant la preuve d'une hématopoïèse clonale à 85,3% des cas contre 77,4% avec les analyses moléculaires classiques (*JAK2*, *CALR* et *MPL*). Les mutations de *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* et *SRSF2* étaient significativement associées à un âge plus avancé.

Avec un suivi médian de 6.4 ans, 18 thromboses, 11 évolutions hématologiques et 16 décès ont été observés.

En analyse multivariée, la présence d'une mutation additionnelle était associée à une survie globale et une survie sans évènement diminuées (HR=3.5 et HR=2 respectivement), et ce, indépendamment de la classification de l'ELN basée sur l'âge et l'antécédent de thrombose. De manière intéressante ces résultats étaient retrouvés à la fois en ne retenant que les mutations pathologiques et aussi lorsque toutes les mutations additionnelles étaient retenues.

Ces résultats ont permis de confirmer l'apport de la recherche de mutations additionnelles pour la stratification pronostique des patients atteints de thrombocytémie essentielle.

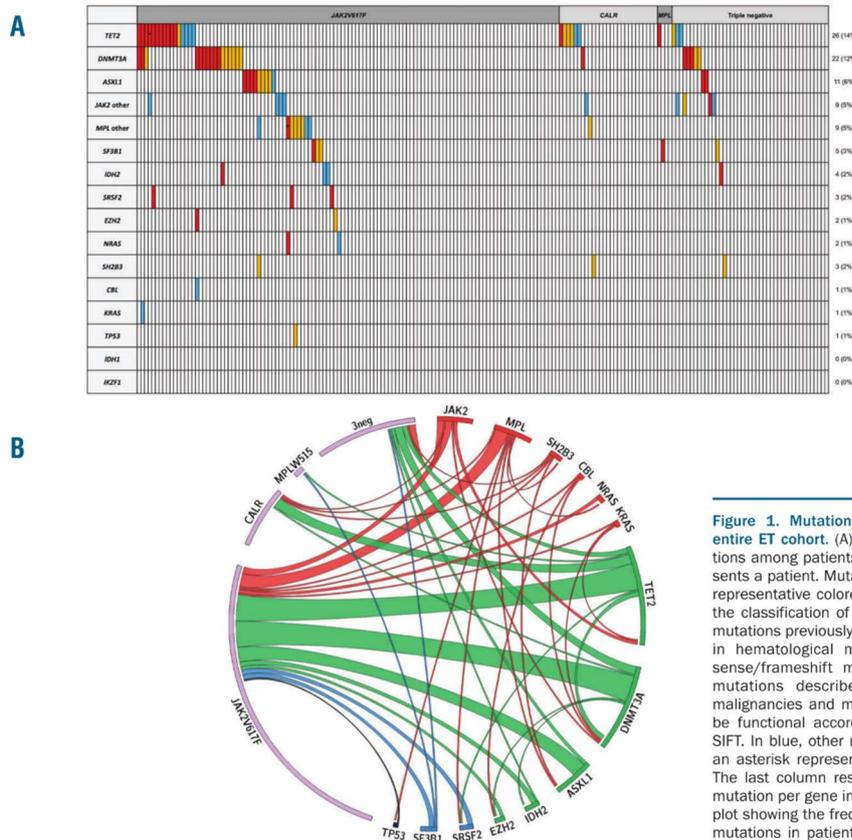
**Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience**

Classical Philadelphia-negative myeloproliferative syndromes (MPN) are characterized by the presence of driver mutations (*JAK2*, *CALR* or *MPL*) and comprise polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). The prognosis of ET is highly variable from one patient to another and is related to two major risks of complications: an increased risk for thrombosis (the most frequent) and a risk of hematological transformation (the most severe) into secondary myelofibrosis or acute leukemia. Different prognostic scoring systems based on clinical (age, history of thrombosis) and biological factors (leukocyte count, driver mutation) have been developed in ET.<sup>1,2</sup> Since the milestone study from Vannucchi *et al.*,<sup>3</sup> additional mutations have been clearly demonstrated as important prognostic factors in PMF<sup>4</sup> but, to date, few data are available in ET. In this study, we analyzed prognostic factors and validated scoring systems in a single center cohort of ET patients, and we evaluated the additive impact of NGS

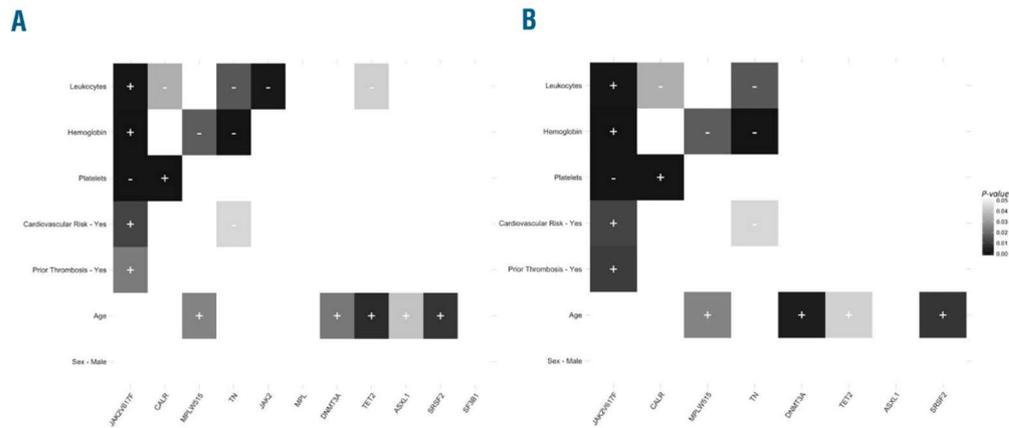
analysis.

The cohort consisted of 190 consecutive ET patients diagnosed at the Henri Mondor hospital between January 2000 and December 2016 (patients' clinical and biologic characteristics at diagnosis are summarized in *Online Supplementary Table S1*). All patients meet the ET WHO 2008 criteria for diagnosis. With a median follow up of 6.4 years, thrombosis occurred in 18 cases (9.4%) and transformation into myelofibrosis, myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia was observed in 11 cases (5.7%). A total of 16 deaths (8.4%) were observed during the follow up.

Driver molecular mutations were as follow: *JAK2V617F* (allelic burden over 0.5%) in 116 patients (61.1 %), *CALR* mutations in 27 patients (14.2%, of which 15 are del52 (type 1), 8 ins5 (type 2) and 4 other mutations inducing a similar frameshift (details in *Online Supplementary Table S2*)) and *MPLW515K/L* mutation in 4 patients (2.1%). Triple negative patients represented 22.6% of the cohort (n= 43). *CALR* mutations were previously associated with a favorable prognosis in ET. In this study we failed to draw a conclusion about the prognostic impact of these mutations, probably due to the small number of *CALR* mutated cases.<sup>5</sup>



**Figure 1. Mutational landscape of the entire ET cohort.** (A) Distribution of mutations among patients. Each column represents a patient. Mutations are depicted by representative colored boxes according to the classification of pathogenicity. In red: mutations previously described as somatic in hematological malignancies or nonsense/frameshift mutations. In orange, mutations described in hematological malignancies and mutations supposed to be functional according to Polyphen2 or SIFT. In blue, other mutations. Boxes with an asterisk represent a double mutation. The last column resumes the number of mutation per gene in the cohort. (B) Circos plot showing the frequency of co-occurring mutations in patients where the width of the ribbon corresponds to the relative frequency of the association of two mutations.



**Figure 2. Association between clinico-biological parameters and mutations.** Additional mutations were tested when all of them were considered (panel A) and when only pathogenic mutations were considered (panel B). Colored boxes represent a significant link, based on appropriate statistical test (Exact Fisher, t-test, Mann-Whitney). A plus sign represents a positive link whereas a minus sign represents a negative link.

Searching for additional mutations, a 16-genes NGS panel (*ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *SF3B1*, *SRSF2*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *MPL*, *SH2B3*, *IKZF1*) was used at the time of diagnosis (or during the first years of follow up). After removal of known polymorphisms, mutations were classified according to their putative impact in three groups: A (pathogenic mutations), B (likely pathogenic mutations) and C (mutations of unknown significance) (Details in *Online Supplementary Methods*). We then evaluated the impact of these additional mutations by taking into account all mutations ("ABC") or by considering only the most pathogenic ("A").

At least one additional mutation was found in 83 patients (44%). The mutation frequencies and details are reported in Figure 1A, *Online Supplementary Figure S4* and *Table S3*. Notably, an additional mutation was detected in 15/43 triple negative patients (35%). The most mutated genes were *TET2* (ABC: 13.7%, A: 6.8%), *DNMT3A* (ABC: 11.5%, A: 6.8%) and *ASXL1* (ABC: 5.8%, A: 3.2%). Association of mutations, considering all additional mutations (ABC), are represented in the Figure 1B. The most frequent associations of mutated genes concerned *JAK2V617F* and both *TET2* and *DNMT3A* (16 cases each). Of note, mutations of *CALR* and *ASXL1* or splicing genes (*SRSF2* and *SF3B1*) were mutually exclusive. As already described, the NGS analysis showed good performance in measuring the allelic charge of the *JAK2V617F* mutation and high correlation with standard procedures (*Online Supplementary Figure S2*).<sup>6</sup> Only 2 mutations of low allele burden (0.14 and 0.24%) were not detected due to insufficient sequencing depth (4218 and 918X).

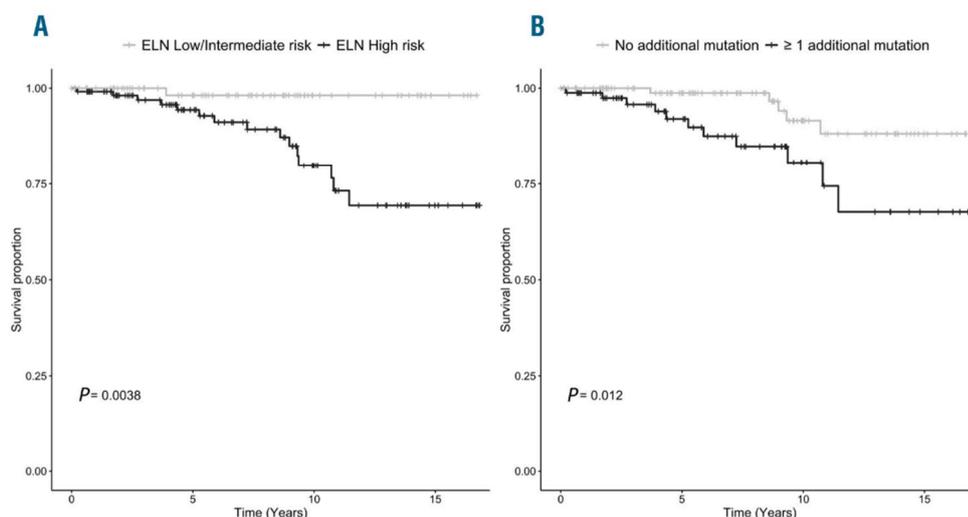
Association of clinico-biological parameters and molecular landscape were tested with driver mutations and additional mutations for which mutations of "ABC" and "A" classifications were analyzed separately (Figure 2). With the "ABC" classification, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* and *SRSF2* mutations were associated with older age ( $P=0.022$ ,  $P=0.0066$ ,  $P=0.04$ ,  $P=0.0087$  respectively), *JAK2* mutations other than *V617F* and *TET2* mutations were also associated with lower leukocytes count ( $P=0.0014$  and  $P=0.042$  respectively, Figure 2A). When

we applied the "A" classification, *TET2*, *DNMT3A* and *SRSF2* were still associated with older age ( $P=0.043$ ,  $P=0.003$  and  $P=0.0087$  respectively) (Figure 2B).

We studied the performance of ELN<sup>7</sup> (high risk defined as age > 60 years or a history of thrombosis), IPSET-survival<sup>8</sup> and IPSET-thrombosis<sup>1</sup> scoring systems (details in *Online Supplementary Table S11*) using the concordance index for overall survival and event-free survival (death, hematologic progression and thrombosis: all events, then separate analyses) (details of prognostic groups in *Online Supplementary Table S4*). In our cohort, the ELN score seemed to be the better prognostic scoring system. It was able to categorize patients according to overall and event-free survival ( $P=0.0038$  and  $P=0.00063$ , respectively, Figure 3A and *Online Supplementary Figure S3*), but not thrombosis or transformation separately. The IPSET-survival score was able to discriminate for overall survival ( $P=0.033$ , *Online Supplementary Figure S4*). Lastly, in our cohort IPSET-Thrombosis did not allow us to discriminate survival, all events, transformation nor thrombosis (*Online Supplementary Figure S5*).

Thereafter, we tested the prognostic impact of additional mutations. Results of all univariate analysis are summarized in *Online Supplementary Table S5*. We assessed with multivariate models whether prediction of prognosis was improved by incorporating the NGS findings into the ELN classification (*Online Supplementary Methods*). For "ABC" classification, the presence of at least one additional mutation and the number of additional mutations were associated with adverse prognosis in term of survival ( $P=0.012$  and  $P=0.019$  respectively, Figure 3B and *Online Supplementary Figure S6*). The same result was observed with the "A" classification with lower  $P$ -values ( $P=0.0024$  and  $P=0.00016$ ; *Online Supplementary Figures S7* and *S8*). Interestingly, the HMR signature was associated with survival only when we considered pathogenic mutations ( $P=0.011$ ).

In multivariate analysis, whatever the additional mutation classification (ABC or A), both ELN status and the presence of an additional mutation were associated (i) to a higher risk of event ((ELN status (HR: 3.75 (High risk/Low+Int risk),  $P=0.0185$ ) and additional mutation (HR: 2 (Yes/No),  $P=0.035$ ); *Online Supplementary Tables S6*



**Figure 3.** Overall survival of the entire cohort according to the ELN classification and additional mutations. Kaplan-Meier representation of survival data according to ELN prognostic score (panel A) and to the presence of one or more additional mutations (driver mutations were excluded and all additional mutations detected were considered: "ABC" classification) (panel B).

and S7), and (ii) to a lower overall survival (ELN status (HR: 9.6 (High risk/Low+Int risk),  $P=0.029$ ) and additional mutation (HR: 3.5 (Yes/No),  $P=0.022$ ; *Online Supplementary Tables S8 and S9*).

Hematological transformation was associated with male sex ( $P=0.0047$ ), *MPLW515* mutations ( $P<0.0001$ ) and splice mutations ( $P<0.0001$ ). In multivariate analysis, only male sex (HR: 5.9,  $P=0.029$ ) remained associated to hematological transformation (*Online Supplementary Table S10*). The presence of cardiovascular risk factor was associated with thrombotic events in univariate ( $P=0.013$ ) and multivariate (HR: 3.2 (Yes/No); 95% CI [1.2-8.1];  $P=0.016$ ) analysis.

In our study, targeted-NGS sequencing increased the proportion of ET patients with a clonal marker from 77.4% with driver mutations to 85.3%. Then, detection of a mutation by NGS screen can improve the diagnosis of clonal hematopoiesis in case of triple negative patients.<sup>5,9</sup> However, the interpretation of an additional mutation has to consider the age of the patient and the allele burden due to clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) that can be found in healthy subjects. The result of the NGS must obviously be compared with all WHO diagnostic criteria to avoid a false diagnosis of MPN, particularly when detecting mutations in *TET2*, *DNMT3A* and *ASXL1* that have been demonstrated to be the most frequent in both CHIPs<sup>12</sup> and MPN (after the driver mutations) in previous studies<sup>10,11</sup> as in ours. In the present cohort, these mutations were associated with older age at diagnosis, raising the question of the presence of CHIPs associated to MPN either with 2 separates clones or with the acquisition of a driver mutation in a CHIP clone. This last hypothesis is supported by studies at clonal level that have shown that patients with both *TET2* and *JAK2V617F* mutations were older when the *TET2* mutation was first acquired.<sup>15</sup> However, we detected few additional mutations with allele burden <20%, and the distribution of the allele burdens between

patients over or under 65 years was similar (*Online Supplementary Figure S9*). This suggests that there were few CHIPs among the mutations detected in this study. Therefore, these additional mutations in our cohort can be considered as true clonal markers of MPN.

The prognostic impact of additional mutations in MPN was mostly studied in PMF where a signature of 5 genes (*ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* and *SRSF2: HMR*) was associated to poor prognosis.<sup>3</sup> This HMR signature also showed an impact in pre-fibrotic PMF<sup>14</sup> but not in our ET cohort.

In ET, few studies are available to date. Tefferi *et al.* described an adverse molecular signature in a cohort of 183 ET patients with a validation in another cohort of 174 patients.<sup>15</sup> Notably, *ASXL1* and *SRSF2* were not found to be associated with adverse prognosis in this ET cohort, despite conveying a worse outcome in PMF or in another cohort of ET.<sup>3</sup>

In our study, the presence of at least one additional mutation at the time of diagnosis improved the prognostic evaluation of ELN classification in terms of overall survival and event-free survival. No impact of additional mutations on hematological transformation was found in multivariate analysis with a limited number of events. The prognostic impact of additional mutations was similar when we considered all mutations or only the most pathogenic. This result is of interest in the context of the rise of NGS in clinical practice because the classification of mutations encountered can be difficult particularly when a germline sample is not analyzed in parallel. Our study focused on diagnosis, but additional mutations could appear during the follow up even if this seems to be a rare event during chronic stage of the disease.<sup>16,11</sup> Nevertheless, some of these mutations could have a strong prognostic impact, such as *TP53* mutations.<sup>17,18</sup>

To conclude, our results suggest that NGS provides additional information on prognosis in ET. Larger studies are still needed for recommending a systematic molecular screening at ET diagnosis or during follow up.

Damien Luque Paz,<sup>1,2,3,4</sup> Olivier Mansier,<sup>4,5,6,7</sup> Jérémie Riou,<sup>1,8</sup>  
Carole Conejero,<sup>9,10</sup> Lydia Roy,<sup>9,11</sup> Célia Belkhdja,<sup>4,9,11</sup>  
Valérie Ugo<sup>12,3,4</sup> and Stéphane Giraudier<sup>4,12,13</sup>

DLP, OM and JR contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Université Angers, UFR Santé; <sup>2</sup>CHU d'Angers, Laboratoire d'Hématologie; <sup>3</sup>INSERM, CRCINA Université de Nantes, Université d'Angers; <sup>4</sup>France Intergroupe des syndromes Myéloprolifératifs (FIM), Nice; <sup>5</sup>Université de Bordeaux, UFR Sciences de la Vie et de la Santé; <sup>6</sup>CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie; <sup>7</sup>INSERM U1034, Université de Bordeaux; <sup>8</sup>MINT UMR INSERM 1066, Université d'Angers; <sup>9</sup>Université Paris 12, Créteil; <sup>10</sup>APHP, Hôpital Henri Mondor, Laboratoire d'Hématologie, Créteil; <sup>11</sup>APHP, Hôpital Henri Mondor, Service Clinique d'Hématologie, Créteil; <sup>12</sup>Université Paris-Diderot and <sup>13</sup>APHP, Hôpital Saint Louis, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Paris, France

**Acknowledgments:** the authors thank the local tumor biobank of Henri Mondor Hospital for providing high-quality samples and the French clinical and biological network of myeloproliferative neoplasms (FIMBANK) supported by a grant from the National Institute of Cancer (INCa BCB 2013). They also thank the FIM group and J.J. Kiladjian for assistance.

**Funding:** this work was supported by a grant from the National Institute of Cancer (INCa, TRANSLA CTIM3).

**Correspondence:** STEPHANE GIRAUDIER  
stephane.giraudier@aphp.fr  
doi:10.3324/haematol.2018.197699

Information on authorship, contributions, and financial & other disclosures was provided by the authors and is available with the online version of this article at [www.haematologica.org](http://www.haematologica.org).

## References

- Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128–5133.
- Passamonti F, Thiele J, Girodon F, et al. A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2012;120(6):1197–1201.
- Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861–1869.
- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation age patients with primary myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):310–318.
- Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431–438.
- Abdelhamid E, Figeac M, Renneville A, et al. Quantification of JAK2V617F mutation by next-generation sequencing technology. *Am J Hematol*. 2013;88(6):536–537.
- Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from european LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):761–770.
- Asp J, Andréasson B, Hansson U, et al. Mutation status of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis defines clinical outcome. *Haematologica*. 2016;101(4):e129–e132.
- Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333–342.
- Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NFI, SF3B1, SUZ12 and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):743–755.
- Luque Paz D, Chauveau A, Boyer F, et al. Sequential analysis of 18 genes in polycythemia vera and essential thrombocythemia reveals an association between mutational status and clinical outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(5):354–362.
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488–2498.
- Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372(7):601–612.
- Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood*. 2017;129(24):3227–3236.
- Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv*. 2016;1(1):21–30.
- Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220–2228.
- Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahab O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):E5401–E5410.
- Alvarez-Larrán A, Senín A, Fernández-Rodríguez C, et al. Impact of genotype on leukaemic transformation in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol*. 2017;178(5):764–771.

**Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience**

Damien Luque Paz,<sup>\*1,2,3,4</sup> Olivier Mansier,<sup>\*4,5,6,7</sup> Jérémie Riou,<sup>\*1,8</sup> Carole Conejero,<sup>9,10</sup> Lydia Roy,<sup>9,11</sup> Célia Belkhdja,<sup>4,9,11</sup> Valérie Ugo<sup>1,2,3,4</sup> and Stéphane Giraudier<sup>4,12,13</sup>

DLP, OM and JR contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Université Angers, UFR Santé; <sup>2</sup>CHU d'Angers, Laboratoire d'Hématologie; <sup>3</sup>INSERM, CRCINA Université de Nantes, Université d'Angers; <sup>4</sup>France Inter-groupe des syndromes Myéloprolifératifs (FIM), Nice; <sup>5</sup>Université de Bordeaux, UFR Sciences de la Vie et de la Santé; <sup>6</sup>CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie; <sup>7</sup>INSERM U1034, Université de Bordeaux; <sup>8</sup>MINT UMR INSERM 1066, Université d'Angers; <sup>9</sup>Université Paris 12, Créteil; <sup>10</sup>APHP, Hôpital Henri Mondor, Laboratoire d'Hématologie, Créteil; <sup>11</sup>APHP, Hôpital Henri Mondor, Service Clinique d'Hématologie, Créteil; <sup>12</sup>Université Paris-Diderot and <sup>13</sup>APHP, Hôpital Saint Louis, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Paris, France

Correspondence: STEPHANE GIRAUDIER

stephane.giraudier@aphp.fr

doi:10.3324/haematol.2018.197699

## Supplemental methods

### Molecular Analysis

DNA was isolated from total blood with a QiaAmp DNA extraction kit and the QiaCube robot (Qiagen, Germantown, MD) and quantitated by Nanodrop spectrophotometry (Agilent, Santa Clara, CA). DNA samples were stored at diagnosis (n = 112, 58.9%) or during the first years of follow-up (median time period between diagnosis and sample collection = 2.28 years). All patients were first tested for *JAK2* (allele specific PCR), *MPL* (Sanger sequencing) and *CALR* (Sanger sequencing) mutations using different methods.

NGS was performed at Henri Mondor hospital between September 2016 and October 2017, by a 16-genes panel (*ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *TP53*, *SF3B1*, *SRSF2*, *CBL*, *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *MPL*, *SH2B3*, *IKZF1*). For NGS, we used MiSeq-Illumina technology with a TruSeq Custom Amplicon (TSCA) library from Illumina. For TSCA, 250ng of DNA were used to generate amplicons covering the regions of interest, designed with the Design Studio software (Illumina), with a median length of 425bp, the strategy being based on PCR multiplexing without fragmentation. TSCA libraries were run on MiSeq instruments (Illumina) for reversible terminator-based sequencing by synthesis chemistry in paired-end 250bp cycle sequencing.

Sequencing data were first aligned on hg19 genome using BaseSpace (Illumina). Variant calling and annotation were done with a custom pipeline using VarScan2 for SNP and short Indels calling and Annovar for databases annotation (Cosmicv81, dbSNP138, Exac03, 1000genomes, ESP6500, clinvar). For mutation calling, minimum coverage of called regions was set to 50 and the minimum variant allele frequency (VAF) was set to 5%. The mutation *JAK2*V617F was manually inspected on BAM file using IGV.

Only exonic nonsynonymous mutations were retained and putative somatic mutations were obtained by removal of known polymorphisms with a population frequency  $> 0.01$  using the 1000 genomes, Exome Sequencing Project and the Exome Aggregation Consortium (ExAC) resources. The functional effects of mutations were predicted using Polyphen2 and SIFT algorithms. Integrative Genomics Viewer (IGV, Cambridge, United Kingdom) was used to visualize the reads alignment and confirm the variant calls. Mutations were classified according to their putative impact in three groups: A: Mutations described as somatic and functional in hematological malignancies or non-sense/frameshift mutations (Pathogenic variants), B: Mutations supposed to be functional according to Polyphen2 or SIFT algorithms but functionally not tested in the literature or described in COSMIC without confirmation of the somatic status (Likely pathogenic variants) and C: Mutations of unknown significance in the databases (variants of unknown significance). The filtering, the validation by visualization on IGV and the classification of the mutations were performed independently by 2 molecular biologists and all discordant cases were then reviewed by all authors.

## **Statistics**

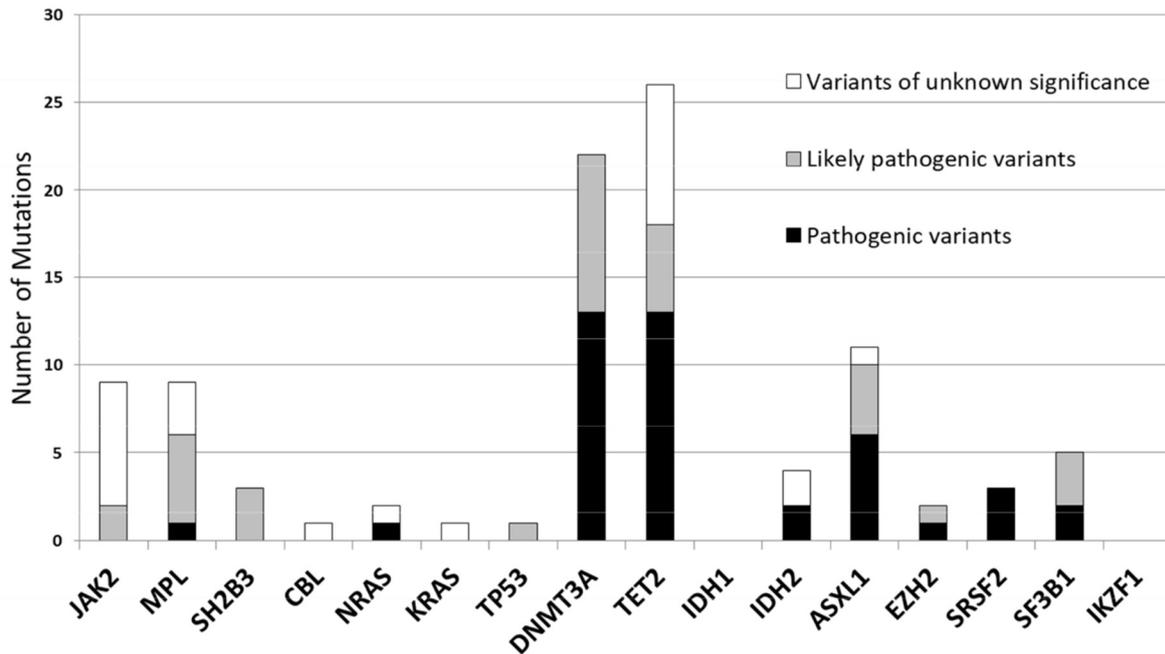
Variables were summarized as frequencies and percentages or means  $\pm$  standard deviation, or median and Inter-Quartile Range, as appropriate. Comparisons were performed using Fisher exact test, or Student t-test or Mann-Whitney test, as appropriate. Survival curves were obtained with the Kaplan-Meier method. Cox proportional hazard regression models were performed for all events, PFS, thrombosis and transformation with results presented as hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs). Characteristics associated with significant results (type-one error rate at 0.25) in univariate analysis, performed with a cox-model, were included in the multivariate Cox proportional hazard regression models. Then a step by step manual backward selection was performed. All models were tested for assumptions and were found to be valid unless otherwise indicated. All tests were 2-sided with p-values smaller than

0.05 considered statistically significant. Statistical analyses were performed with R version 3.4.2 (R Core Team, Vienna, Austria).

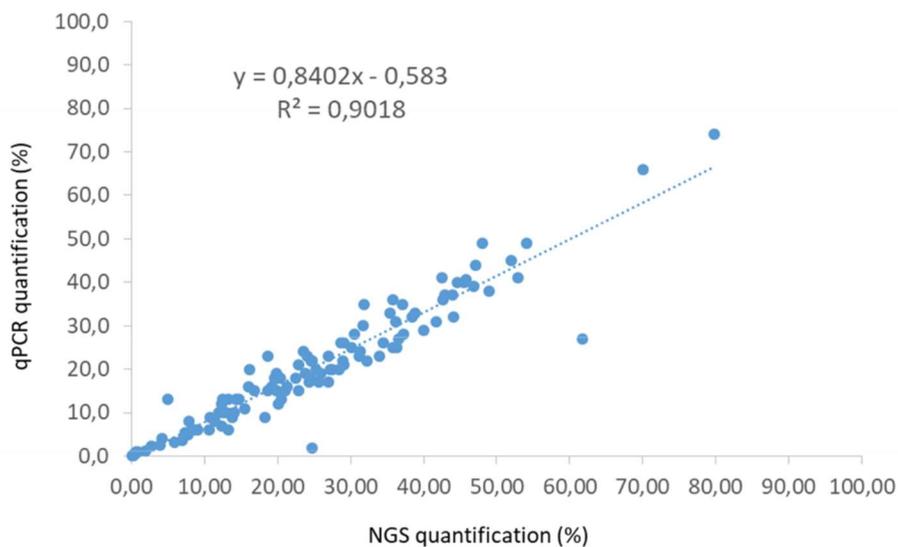
### **Ethic consideration**

Patients have provided written informed consent for the use of remnant DNA for investigational purposes. This non-interventional research was made in accordance with the MR03 french methodology for biomedical research.

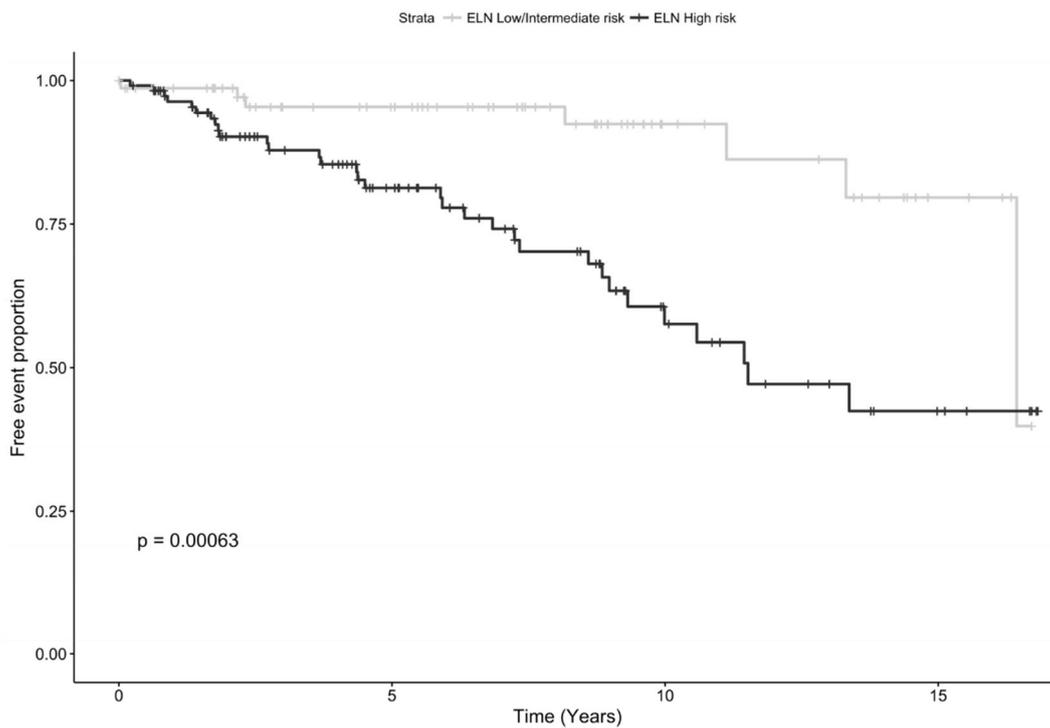
## Supplemental data



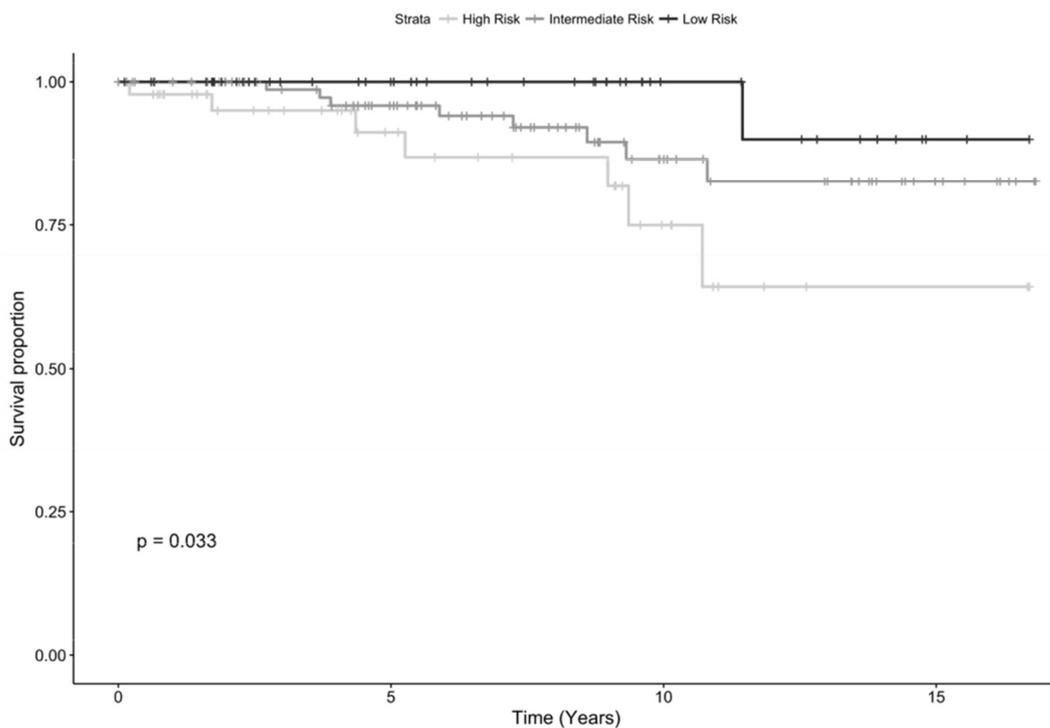
**Supplemental Figure S1:** Repartition of additional mutations among the sequenced genes according to their pathogenic classification



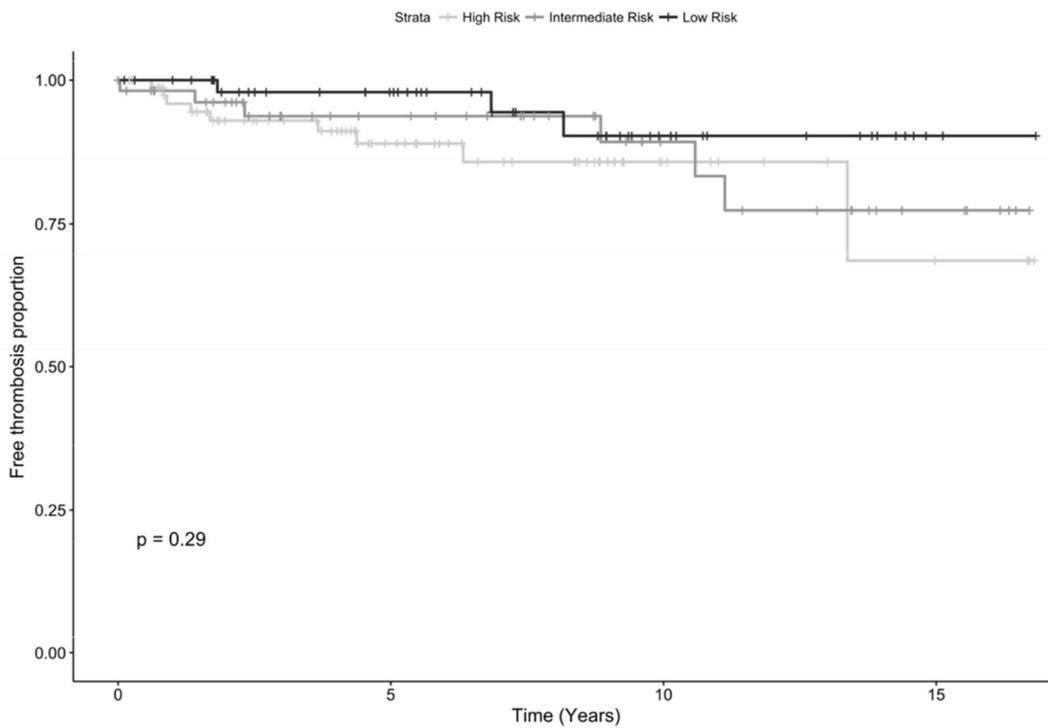
**Supplemental Figure S2:** Correlation between quantitative PCR and NGS for JAK2V617F allele burden measurement



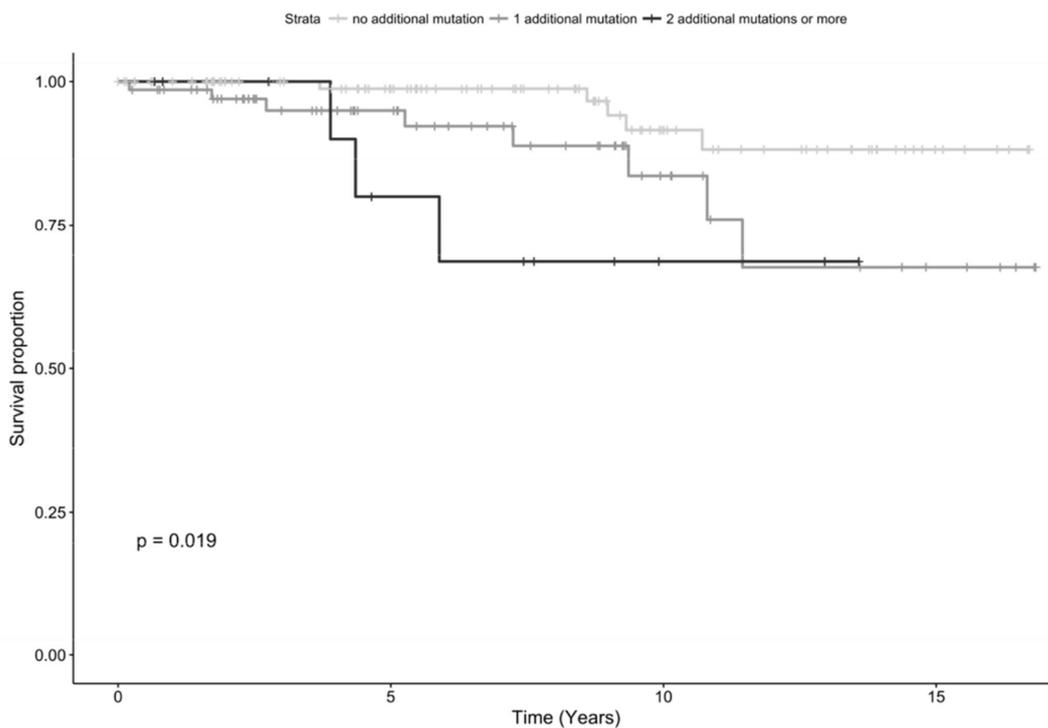
**Supplemental Figure S3:** Event free survival (death, transformation or thrombosis) according to the ELN prognostic score



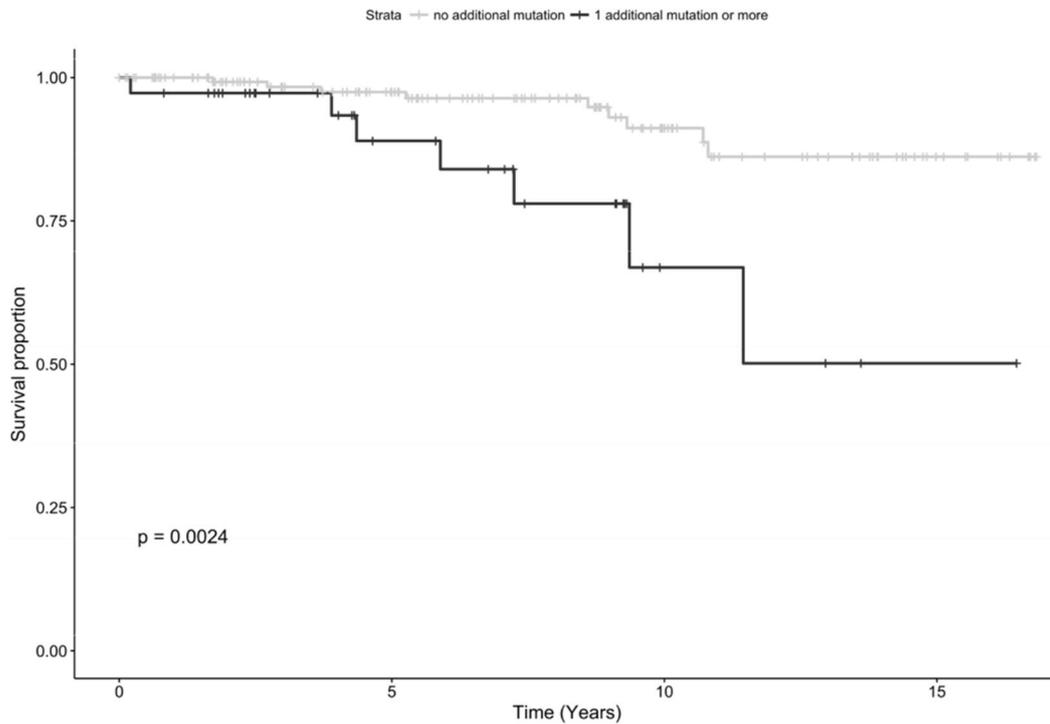
**Supplemental Figure S4:** Overall survival according to the IPSET-survival prognostic score



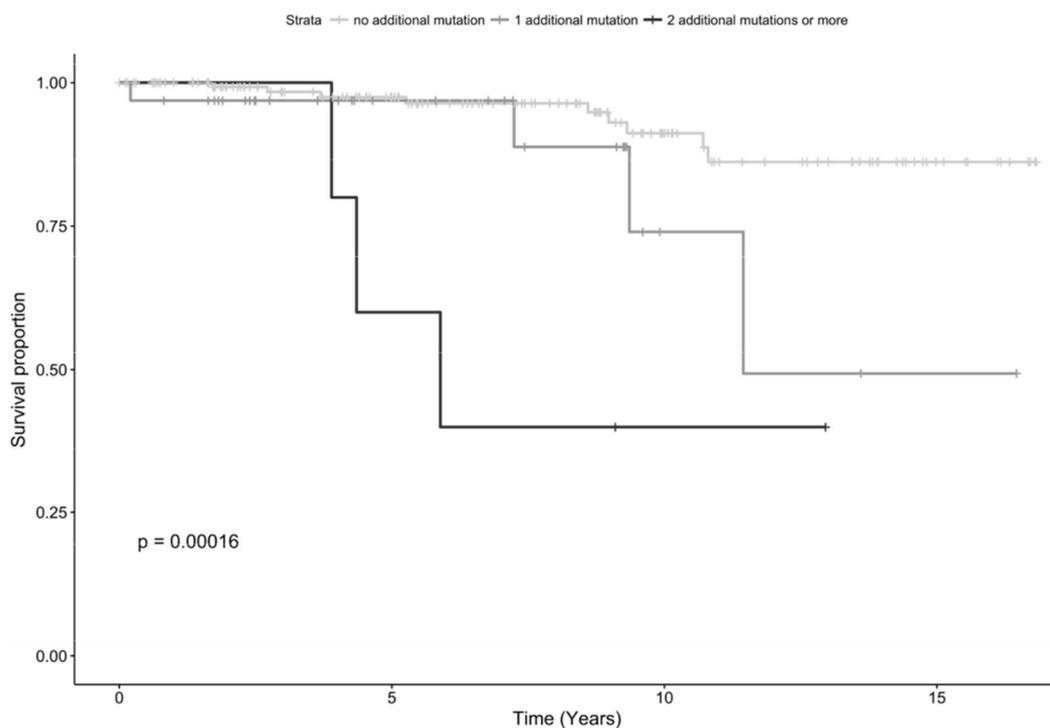
**Supplemental Figure S5:** Thrombosis free survival according to the IPSET-thrombosis prognostic score



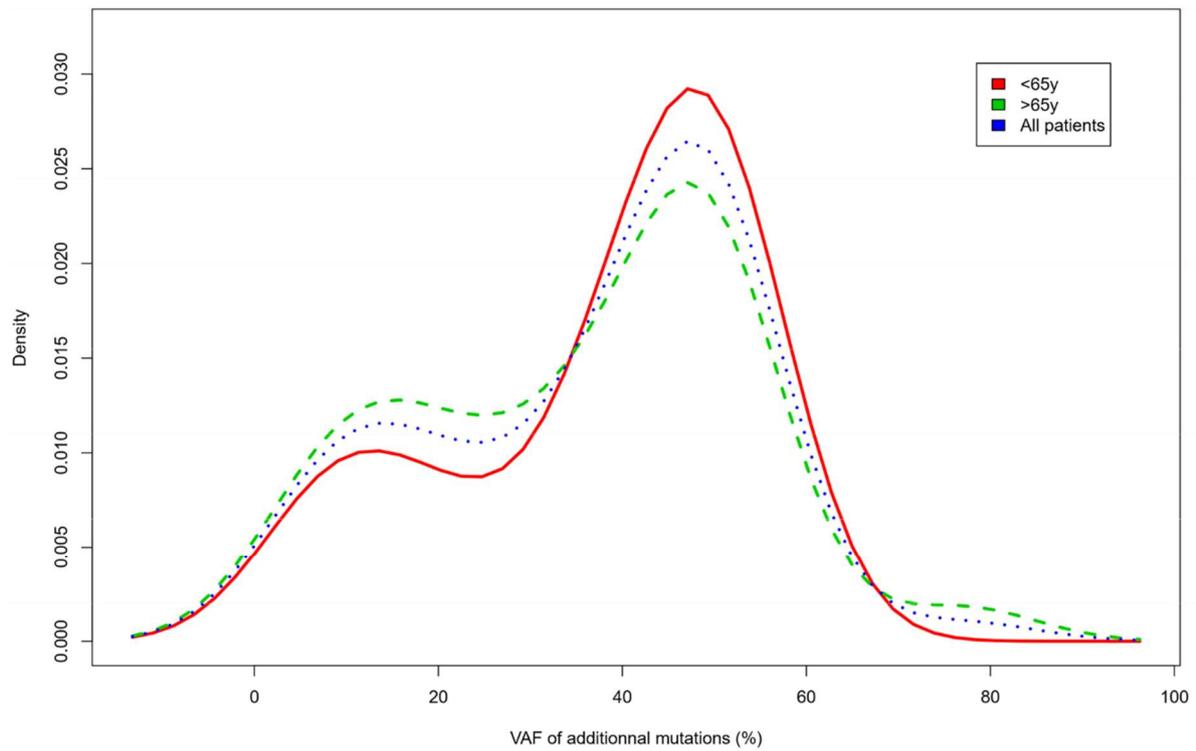
**Supplemental Figure S6:** Overall free survival according to the number of additional mutations (all mutations were considered, "ABC" classification)



**Supplemental Figure S7:** Overall free survival according to the presence of at least one additional mutation (only pathogenic mutations were considered, "A" classification).



**Supplemental Figure S8:** Overall free survival according to the number of additional mutations (only pathogenic mutations were considered, "A" classification)



**Supplemental Figure S9:** Density plot showing distribution of variant allele frequencies (VAF) of additional mutations for all patients, patients > 65 years and patients < 65 years.

**Supplemental Table S1: Patients characteristics (n=190)**

Parameter		Entire cohort
Sex ratio (M/F)		0.4 (76/114)
Age (median[IQ range])		61 [19;93]
Hemoglobin (g/dL) (median [IQ range])		14.2 [9.1;17.1]
Platelets (10 <sup>9</sup> /L) median [IQ range]		774 [484;1895]
Leukocytes (10 <sup>9</sup> /L) median [IQ range]		9.8 [2.3;26.4]
Thrombosis history before diagnosis n (%)		35 (18)
CV risk history n (%)		65 (34)
Driver mutations n (%)	<i>JAK2V617F</i>	116 (61%)
	<i>CALR</i>	27 (14%)
	<i>MPLW515</i>	4 (2%)
	Triple negative	43 (23%)
Events during follow-up n (%)	Deaths	16 (8.4)
	Hematological transformation	11 (5.7)
	Thrombosis	18 (9.4)
First line therapy	No cytoreductive drug	20 (11%)
	Hydroxycarbamide	159 (84%)
	Peg-Interferon	10 (5.5%)
	Pipobroman	1 (0.5%)
ASA treatment		151/159 (95%)

**Supplemental Table S2:** Description of the *CALR* mutations others than type 1 and 2 (NM\_004343.3)

Patient	cDNA	Protein change
5002	c.1100_1145del	p.(Leu367Glnfs*48)
4599	c.1099_1132del	p.(Leu367Argfs*52)
2665	c.1147_1154delinsTGTC	p.(Glu383Cysfs*46)
3666	c.1121_1139del	p.(Lys374Argfs*50)

**Supplemental Table S3:** All additional mutations detected using NGS sequencing.

Gène	Mutation	VAF (%)	Depth (X)	COSMIC reference	dbSNP rs	POLYPHEN2	SIFT	Pathogenic classification	N° patient
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.C1762T:p.Q588X	7	1563	COSM110707	-	.	.	A	445
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.C3965G:p.P1322R	49	736	COSM36204	rs141930107	-	-	B	2296
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.C1774T:p.Q592X	48	3249	COSM96400	-	.	D	A	2654
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.1888_1910del:p.H630fs	21	508	-	-	-	-	A	3288
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.T1747C:p.W583R	48	2015	-	-	D	T	B	3590
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.C3935T:p.A1312V	51	875	COSM97046	rs148144203	B	T	B	3658
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon11:c.C1534T:p.Q512X	31	254	COSM3799427;COSM443634	-	-	-	A	4417
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.2497delA:p.S833fs	10	1634	COSM97036	-	-	-	A	5454
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon12:c.G4099A:p.V1367I	56	283	COSM723114	rs147456014	B	T	C	6189
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon11:c.C1636T:p.Q546X	51	1349	-	-	-	-	A	6301
ASXL1	ASXL1:NM_015338:exon11:c.A1654G:p.I552V	50	2433	-	rs143952412	P	T	B	B2(80)
CBL	CBL:NM_005188:exon15:c.G2269A:p.A757T	52	402	COSM3687124	rs146517083	B	T	C	3705
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon22:c.2481delC:p.F827fs	12	1831	COSM53096	rs769831202	-	-	A	1258
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon19:c.C2245T:p.R749C	8	2089	COSM219133	-	D	D	A	1416
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon22:c.2498_2510del:p.I833fs	49	1811	-	-	-	-	A	1670
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon22:c.2577dupA:p.W860fs	15	6322	-	-	-	-	A	1713
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon23:c.G2645A:p.R882H	39	526	COSM52944;COSM442676	rs147001633	B	D	A	2230
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon23:c.G2645A:p.R882H	37	253	COSM52944;COSM442676	rs147001633	P	D	A	2493
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon14:c.T1640A:p.L547H	39	1287	COSM231556	-	D	D	B	2550
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon18:c.C2099T:p.P700L	6	502	-	-	D	D	B	2641
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon9:c.C1103T:p.A368V	27	45	-	-	D	D	B	2891
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon14:c.G1627T:p.G543C	21	1340	COSM87002	-	D	D	A	3267
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon19:c.T2210G:p.L737R	37	1137	COSM87008	-	D	D	A	3705
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon19:c.C2206T:p.R736C	18	1662	COSM231560	-	D	D	B	3904

DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon7:c.G682T;p.E228X	6	157	COSM5989188;COSM5989189	-	-	-	A	4751
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon23:c.G2645A;p.R882H	41	911	COSM52944;COSM442676	rs147001633	P	D	A	4924
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon14:c.1603_1623dup;p.Y528_Q534dup	40	626	-	-	-	-	B	5428
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon23:c.C2695T;p.R899C	13	388	COSM5075581	-	D	D	B	5653
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon23:c.A2716G;p.K906E	28	489	-	-	D	D	B	5784
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon19:c.C2311T;p.R771X	20	353	COSM231563	-	-	-	A	5828
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon19:c.T2264C;p.F755S	35	382	-	rs536841393	D	D	B	5839
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon14:c.G1628T;p.G543V	8	4876	COSM249135	-	D	D	B	5928
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon23:c.A2716T;p.K906X	56	249	-	-	-	-	A	B2 1351
DNMT3A	DNMT3A:NM_175629:exon22:c.C2536T;p.Q846X	7	4703	-	-	-	-	A	B2 1521
EZH2	EZH2:NM_004456:exon16:c.A1927G;p.I643V	49	2559	-	-	P	T	B	2748
EZH2	EZH2:NM_004456:exon9:c.A965G;p.N322S	52	2639	COSM53031	rs151023145	B	T	A	3705
IDH2	IDH2:NM_002168:exon4:c.G419A;p.R140Q	21	47	COSM41590	rs121913502	D	D	A	1084
IDH2	IDH2:NM_002168:exon11:c.C1304T;p.T435M	50	160	-	rs118053940	B	T	C	2524
IDH2	IDH2:NM_002168:exon4:c.G419A;p.R140Q	17	507	COSM41590	rs121913502	D	D	A	5428
IDH2	IDH2:NM_002168:exon11:c.C1304T;p.T435M	52	156	-	rs118053940	B	T	C	B2 1471
JAK2	JAK2:NM_004972:exon24:c.G3188A;p.R1063H	46	1170	-	rs41316003	B	T	C	861
JAK2	JAK2:NM_004972:exon18:c.C2390G;p.S797C	45	4309	COSM2777217	rs201992086	B	T	C	965
JAK2	JAK2:NM_004972:exon5:c.C464T;p.A155V	49	5870	-	-	P	D	B	1416
JAK2	JAK2:NM_004972:exon24:c.G3188A;p.R1063H	49	966	-	rs41316003	B	T	C	3005
JAK2	JAK2:NM_004972:exon9:c.C1127G;p.T376S	50	719	-	-	D	P	B	3631
JAK2	JAK2:NM_004972:exon19:c.G2538C;p.E846D	56	-	-	rs150221602	B	D	C	4958
JAK2	JAK2:NM_004972:exon25:c.A3323G;p.N1108S	50	925	COSM33708	rs142269166	B	T	C	5555
JAK2	JAK2:NM_004972:exon24:c.G3188A;p.R1063H	47	601	-	rs41316003	B	T	C	6117
JAK2	JAK2:NM_004972:exon25:c.A3323G;p.N1108S	48	1866	COSM33708	rs142269166	B	T	C	B2 1310
KRAS	KRAS:NM_033360:exon5:c.G504T;p.L168F	50	2728	-	-	B	T	C	B2 1351
MPL	MPL:NM_005373:exon12:c.T1771G;p.Y591D	53	344	COSM28997	-	D	D	A	1006
MPL	MPL:NM_005373:exon4:c.C601A;p.H201N	37	1734	-	-	B	T	C	1006
MPL	MPL:NM_005373:exon3:c.T313C;p.F105L	52	455	-	rs145313814	B	T	C	2426

MPL	MPL:NM_005373:exon11:c.G1610A:p.R537Q	78	676	-	-	rs3820551	D	T	B	4823
MPL	MPL:NM_005373:exon12:c.G1896C:p.W632C	17	269	-	-	-	D	D	B	5241
MPL	MPL:NM_005373:exon5:c.G775A:p.E259K	41	110	-	-	rs528834914	B	T	B	6136
MPL	MPL:NM_005373:exon4:c.C626T:p.S209F	48	1073	-	-	-	P	T	B	6188
MPL	MPL:NM_005373:exon12:c.G1896C:p.W632C	13	122	-	-	-	D	D	B	6235
MPL	MPL:NM_005373:exon7:c.C1051T:p.R351C	49	575	-	-	rs201998783	D	D	B	B2 384
MPL	MPL:NM_005373:exon4:c.A530G:p.K177R	50	5388	-	-	-	B	T	C	B2(80)
NRAS	NRAS:NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	36	6717	COSM573	-	rs121434596	B	D	A	1006
NRAS	NRAS:NM_002524:exon3:c.G189C:p.E63D	27	1085	-	-	-	B	T	C	4362
SF3B1	SF3B1:NM_012433:exon14:c.G1998T:p.K666N	38,00	2555	COSM131557	-	-	D	D	A	3542
SF3B1	SF3B1:NM_012433:exon15:c.A2098G:p.K700E	42	2320	COSM84677	-	rs559063155	D	D	A	4669
SF3B1	SF3B1:NM_012433:exon21:c.T3047C:p.L1016P	5	197	-	-	-	D	D	B	5504
SF3B1	SF3B1:NM_012433:exon21:c.G3127A:p.A1043T	8	123	-	-	-	D	D	B	5725
SF3B1	SF3B1:NM_012433:exon21:c.A3037T:p.I1013F	7	98	-	-	-	D	D	B	B2(80)
SH2B3	SH2B3:NM_005475:exon4:c.G841T:p.D281Y	6	187	-	-	-	D	D	B	796
SH2B3	SH2B3:NM_005475:exon6:c.G1175A:p.R392Q	76	42	COSM5840118;COSM5840119	-	-	D	D	B	2414
SRSF2	SRSF2:NM_003016.4:exon1:c.C284A:p.P95H	45	29	COSM146288	-	-	D	D	A	2680
SRSF2	SRSF2:NM_003016.4:exon1:c.C285A:p.P95T	45	571	COSM307353	-	-	D	D	A	4216
SRSF2	SRSF2:NM_003016.4:exon1:c.C284T:p.P95L	17	82	-	-	-	D	D	A	6235
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.T5366C:p.M1789T	5,7	262	-	-	-	B	T	C	187
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.G5152T:p.V1718L	50	1091	COSM41742	-	rs142312318	B	T	C	632
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.G5103A:p.M1701I	52	1155	-	-	rs62623390	B	T	C	652
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.C4613T:p.P1538L	53	191	-	-	-	B	T	C	861
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.C4854A:p.Y1618X	50	474	-	-	-	-	-	A	937
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.A413T:p.Q138L	51	1461	-	-	rs138203452	P	D	B	1891
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.T5890C:p.Y1964H	47	537	COSM4642835	-	106197557	D	T	B	2569
TET2	TET2:NM_001127208:exon9:c.T4129G:p.F1377V	47	240	-	-	-	D	D	B	2665
TET2	TET2:NM_001127208:exon5:c.3573_3794delinsCTAAGTGC:p.Q1191Hfs*2	31	3167	-	-	-	D	D	A	2680
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.2217delT:p.P739fs	45,9	1727	-	-	-	-	-	A	2863

TET2	TET2:NM_001127208:exon6:c.3729_3733del;p.K1243fs	17,5	644	-	-	-	-	-	-	A	2969
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.C1852T;p.Q618X	12	1589	-	-	-	-	-	-	A	3005
TET2	TET2:NM_001127208:exon7:c.G3845A;p.G1282D	50	2453	COSM1737890	-	D	D	D	D	B	3005
TET2	TET2:NM_001127208:exon7:c.G3863A;p.G1288D	35	2063	-	-	D	D	D	D	B	3666
TET2	TET2:NM_001127208:exon10:c.C4210T;p.R1404X	20	3556	COSM42037	-	-	-	-	-	A	3904
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.T4983G;p.Y1661X	22	473	-	-	-	-	-	-	A	4413
TET2	TET2:NM_001127208:exon9:c.4060_4061del;p.R1354fs	48	605	COSM1318617	-	-	-	-	-	A	4924
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.C521A;p.P174H	48	5203	-	rs146031219	B	D	D	D	C	5169
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.2551delC;p.P851fs	40	6320	-	-	-	-	-	-	A	5744
TET2	TET2:NM_001127208:exon10:c.C4481G;p.S1494X	32	1643	-	-	-	-	-	-	A	5979
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.T5618A;p.I1873N	40	403	-	-	D	D	D	D	B	6434
TET2	TET2:NM_001127208:exon6:c.T3743C;p.L1248P	34	1923	COSM211718	rs372179780	D	D	D	D	A	4407
TET2	TET2:NM_017628:exon3:c.3231dupC;p.H1077fs	48	3897	-	-	D	D	D	D	A	4819
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.A1330G;p.T444A	47	6870	-	-	B	T	T	T	C	B2 1280
TET2	TET2:NM_001127208:exon6:c.3730_3731del;p.L1244fs	48	1358	COSM3719516	-	-	-	-	-	A	B2 1351
TET2	TET2:NM_001127208:exon11:c.G5152T;p.V1718L	54	1314	COSM41742	rs142312318	B	T	T	T	C	B2 588
TET2	TET2:NM_001127208:exon3:c.C521A;p.P174H	50	2179	-	rs146031219	B	D	D	D	C	B2(485)
TP53	TP53:NM_000546:exon10:c.T1096G;p.S366A	38	1263	COSM44832	rs17881470	B	T	T	T	B	B2 384

**Supplemental Table S4:** Characteristics of ET patients according to the validated scoring systems ELN, IPSET-survival and IPSET-thrombosis.

HR: High Risk; IR: Intermediate Risk; LR: Low Risk

Classification	Class	Sex ratio (M/F)	Age Median [IQR]	Hemoglobin (g/dL) median [IQR]	Platelets (109/L) median [IQR]	Leukocytes (109/L) median [IQR]	Thrombosis history before diagnosis n (%)	CV risk history n (%)	Driver mutation JAK2/CALR/MPL/ Triple negative n (%)
ELN	HR n=113	0.71	71 [35;93]	14 [10.3;17]	743 [514;1490]	9.9 [2.3;15]	37 (33)	62 (55)	72/15/4/22 (64/13/3.5/19.5)
	IR n=44	0.63	53 [42;59]	14.6 [9.1;17.1]	736 [484;1760]	8.9 [4.3;21]	0 (0)	2 (6)	23/4/0/8 (53/9/0/18)
	LR n=33	0.57	31 [19;40]	14.3 [10.8;16.9]	896 [525;1895]	11.1 [5.1;20.7]	0 (0)	1 (3)	15/7/0/11 (45/22/0/33)
IPSET-Survival	HR n=46	0.92	72.3 [61.2;92.6]	14.3 [11.5;17]	770 [514;1490]	11.6 [4.3;26.4]	20 (43.5)	29 (63)	34/5/2/5 (74/11/4/11)
	IR n=96	0.57	60.4 [18.8;91.2]	14.2 [9.1;17.1]	781 [488;1895]	10 [2.3;21]	17 (17.8)	33 (34.4)	56/13/2/25 (58/14/2/26)
	LR n=48	0.66	49.64 [18.9;81.3]	14.4 [10.9;16.3]	752 [484;1590]	8.3 [4.3;11]	0 (0)	3 (6.25)	26/9/0/13 (54/19/0/27)
IPSET-Thrombosis	HR n=79	0.76	71 [38.9;92.6]	14.6 [10.3;17]	734 [514;1376]	10.7 [4.3;26.4]	33 (41.8)	52 (65.8)	73/2/1/3 (92/3/1/4)
	IR n=55	0.67	49.1 [21.7;87.1]	14.6 [9.1;17.1]	751 [484;1760]	9.9 [5.1;21]	4 (7.3)	12 (21.8)	43/6/1/5 (78/11/2/9)
	LR n=56	0.56	56.3 [18.8;91.2]	13.4 [10.8;16.6]	908 [505;1895]	9 [2.3;19.9]	0 (0)	1 (1.8)	0/19/2/35 (0/34/4/62)

**Supplemental Table S5:** Univariate analysis for survival, thrombosis and transformation using the "ABC" and "A" classifications. Signaling mutations for "A" classification were not tested because only one patient had such mutation

	Survival	Thrombosis	Transformation
Sex	<b>p=0.049</b>	p=0.56	<b>p=0.0047</b>
Age (> 60 years)	<b>p=0.00022</b>	p=0.21	p=0.25
History of thrombosis	p=0.72	p=0.18	p=0.49
Cardiovascular risk	p=0.5	<b>p=0.013</b>	p=0.47
<b>Driver mutations</b>			
JAK2V617F	p=0.36	p=0.92	p=0.14
CALR	p=0.14	p=0.34	p=0.77
MPLW515	p=0.087	p=0.61	<b>p&lt;0.0001</b>
Presence of at least one mutation	<b>p=0.012</b>	p=0.63	p=0.1
<b>Additional mutation ABC classification</b>			
Number of additional mutation (0, 1, ≥2)	<b>p=0.019</b>	p=0.45	p=0.26
HMR mutations	p=0.18	p=0.8	p=0.77
Signaling mutations	p=0.16	p=0.71	p=0.17
Epigenetic mutation	p=0.12	p=0.48	p=0.62
Splice mutation	<b>p=0.00051</b>	p=0.52	<b>p&lt;0.0001</b>
Presence of at least one mutation	<b>p=0.0024</b>	p=0.98	p=0.054
<b>Additional mutation A classification</b>			
Number of additional mutation (0, 1, ≥2)	<b>p=0.00016</b>	p=0.49	p=0.11
HMR mutations	<b>p=0.011</b>	p=0.29	p=0.68
Epigenetic mutation	p=0.059	p=0.85	p=0.6
Splice mutation	<b>p=0.00024</b>	p=0.57	<b>p&lt;0.0001</b>

p values significant (ie < 0.05) indicated in bold

HMR (high-molecular risk) mutations: *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1*, *IDH2* or *SRSF2* mutations (described by Vannuchi et al. in PMF)

**Supplemental Table S6:** Multivariate analysis of risk factors for all events (death+transformation+thrombosis) in the entire cohort (n=190) considering all additional mutations ("ABC" classification)

Parameter	Univariate analysis p value	Multivariate analysis HR [95% CI]	p value
Sex ratio (M/F)	0.27	-	-
ELN classification (High risk/ Low+Int risk)	0.00063	<b>3.72</b> <b>[1.66-8.49]</b>	<b>0.0185</b>
Driver mutations (TN as reference)		<b>0.48</b> <b>[0.24-0.98]</b>	<b>0.046</b>
	<i>JAK2V617F</i>	0.36 [0.13-1.03]	0.57
	<i>CALR</i>	2.3 [0.5-10.7]	0.28
<i>MPLW515</i>	0.0027		
≥ 1 additional mutation (Yes/No)	0.038	<b>2</b> <b>[1.1-3.8]</b>	<b>0.035</b>

TN: triple negative; P value significant (ie, <.05) indicated in bold.

**Supplemental Table S7:** Multivariate analysis of risk factors for all events (death+transformation+thrombosis) in the entire cohort (n=190) considering only pathogenic additional mutations ("A" classification)

Parameter	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	p value	HR [95% CI]	p value	p value
Sex ratio (M/F)	0.27	-	-	-
ELN classification (High risk/ Low+Int risk)	0.00063	<b>3.68</b> <b>[1.61-8.4]</b>	<b>0.00198</b>	<b>0.00198</b>
Driver mutations (TN as reference)	<i>JAK2V617F</i>	0.5 [0.24-1.01]	0.054	0.054
	<i>CALR</i>	0.39 [0.14-1.1]	0.54	0.54
	<i>MPLW515</i>	1.9 [0.4-9.1]	0.42	0.42
≥ 1 additional mutation (Yes/No)	0.01	<b>2.2</b> <b>[1.1-4.5]</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>

TN: triple negative; P value significant (ie, <.05) indicated in bold.

**Supplemental Table S8:** Multivariate analysis of risk factors for overall survival in the entire cohort (n=190) considering all additional mutations ("ABC" classification)

Parameter	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	p value	HR [95% CI]	HR [95% CI]	p value
Sex ratio (M/F)	0.049	-	-	-
ELN classification (High risk/Low+Int risk)	0.0038	<b>9.6</b> <b>[1.26-73.3]</b>		<b>0.029</b>
Driver mutations (TN as reference)	<i>JAK2V617F</i>	0.36	0.39 [0.14-1.12]	0.08
	<i>CALR</i>	0.14	0.17 [0.02-1.4]	0.1
	<i>MPLW515</i>	0.087	1.1 [0.13-9.2]	0.93
≥ 1 additional mutation (Yes/No)	0.012	<b>3.5</b> <b>[1.2-10.2]</b>		<b>0.022</b>

TN: triple negative; P value significant (ie, <.05) indicated in bold.

**Supplemental Table S9:** Multivariate analysis of risk factors for overall survival in the entire cohort (n=190) considering only pathogenic additional mutations ("A" classification)

Parameter	Univariate analysis p value	Multivariate analysis HR [95% CI]	p value
Sex ratio (M/F)	0.27	-	-
ELN classification (High risk/ Low+Int risk)	0.0038	<b>9.4</b> <b>[1.24-71.9]</b>	<b>0.03</b>
Driver mutations (TN as reference)	<i>JAK2V617F</i>	0.39 [0.13-1.13]	0.08
	<i>CALR</i>	0.19 [0.02-1.6]	0.1
	<i>MPLW515</i>	1.1 [0.09-6.9]	0.82
≥ 1 additional mutation (Yes/No)	0.0024	<b>3.6</b> <b>[1.3-10.2]</b>	<b>0.015</b>

TN: triple negative; P value significant (ie, <.05) indicated in bold.

**Supplemental Table S10:** Multivariate analysis of risk factors for hematological transformation in the entire cohort (n=190) considering all additional mutations ("ABC" classification)

Parameter	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	p value	HR [95% CI]	HR [95% CI]	p value
Sex ratio (M/F)	0.0047	<b>5.9</b> <b>[1.2-29]</b>		<b>0.029</b>
ELN classification (High risk/Low+Int risk)	0.068	1.73 [0.42-7.2]		0.45
Driver mutations (TN as reference)				
	<i>JAK2V617F</i>	0.14	0.27 [0.05-1.3]	0.12
	<i>CALR</i>	0.77	0.38 [0.06-2.6]	0.33
	<i>MPLW515</i>	p<0.0001	2.98 [0.9-97.2]	0.088
Additional mutations	Signaling	0.17	5.8 [0.99-34.1]	0.052
	Epigenetic	0.62	-	-
	Splice	p<0.0001	4.8 [0.2-130]	0.34

TN: triple negative; P value significant (ie, <.05) indicated in bold.

**Supplemental Table S11:** Detail of prognostic scores for ET used in the manuscript

Score	ELN (Barbui et al., JCO 2011)	IPSET-SURVIVAL (Passamonti et al., Blood 2012)	IPSET-THROMBOSIS (Barbui et al., Blood 2012)
Risk factors for score calculation	Age $\geq$ 60y	Age $\geq$ 60y = 2 points	Age $\geq$ 60y = 1 point
	History of thrombosis	History of thrombosis = 1 point	History of thrombosis = 2 points
		WBC count $\geq$ 11 G/L = 1 point	
			Cardiovascular risk factor = 1 point
High risk	Age $\geq$ 60y and/or History of thrombosis	Score equal to 0	Score equal to 0-1
Intermediate risk	-	Score equal to 1-2	Score equal to 2
Low risk	Age $<$ 60y and no History of thrombosis	Score equal to 3-4	Score $\geq$ 3

y: years; WBC : white blood cell

### Article 3 : L'évaluation moléculaire répétée de syndromes myéloprolifératifs avec mutation de *CALR* montre une association entre l'augmentation de la charge allélique *CALR* et l'aggravation de la maladie

*Sequential mutational evaluation of CALR-mutated MPN with thrombocytosis reveals an association between CALR allele burden evolution and disease progression*

L. Cottin, J. Riou, C. Orvain, JC Ianotto, F. Boyer, M. Renard, M. Truchan-Graczyk, A. Murati, R. Jouanneau-Courville, O. Allangba, O. Mansier, B. Burroni, MC. Rousselet, I. Quintin-Roué, A. Martin, S. Sadot-Lebouvier, Y. Delneste, JM. Chrétien, M. Hunault-Berger, O. Blanchet, E. Lippert, V. Ugo\* and **D. Luque Paz\***

Publié dans *British Journal of Haematology* (2020), 188: 935-944

Les syndromes myéloprolifératifs avec mutation de *CALR* semblent présenter une évolution plus indolente que les autres syndromes myéloprolifératifs et notamment ceux avec mutation *JAK2V617F*. Au niveau moléculaire, les données disponibles suggéraient une moindre complexité mutationnelle. Enfin, alors que la mesure de la charge allélique de la mutation *JAK2V617F* a largement été étudiée et a montré un impact pronostique, très peu de données étaient disponibles pour la mesure de la charge allélique de *CALR*.

L'objectif de ce travail était d'évaluer le rôle pronostique d'une mesure répétée du profil mutationnel au diagnostic et lors du suivi dans une cohorte de thrombocytémies essentielles avec mutation de *CALR*.

Pour cette étude nous nous sommes appuyés sur la méthodologie que nous avons utilisée pour l'article 1, c'est-à-dire une évaluation séquentielle du profil mutationnel et l'aggravation de la maladie définie par un critère composite clinico-biologique.

Quarante-cinq patients avec un diagnostic de thrombocytémie essentielle ont été étudiés au diagnostic et lors du suivi avec un délai médian de 6 ans. A chaque point analysé, la charge allélique de la mutation de *CALR* était déterminée par analyse de fragment et PCR digitale et un profil mutationnel était obtenu par NGS d'un panel de 52 gènes. Le caractère somatiques des variants de signification indéterminée était validé sur ADN extrait des ongles. Toutes les biopsies médullaires disponibles (n=39) ont été revues par des anatomopathologistes du GEBOM et les patients ont ainsi été reclassés en 22 thrombocytémies essentielles, 14 myélofibroses préfibrotiques et 9 syndromes myéloprolifératifs inclassables selon la classification 2016 de l'OMS.

Vingt-et-une mutations additionnelles étaient détectées chez 15 patients au diagnostic. Le gène le plus souvent muté était *TET2* (11/21). Lors du suivi, 12 nouvelles mutations étaient détectées dont 8 sur le gène *TET2*. Six de ces mutations étaient en fait déjà présentes dès le diagnostic à un très faible taux (<1%). Une aggravation de la maladie selon notre critère composite était observable chez 15/45 patients. En analyse multivariée seul l'augmentation de la charge allélique de *CALR* était associée à l'aggravation de la maladie. Ainsi dans ce travail, ni la présence de mutation additionnelle, ni la quantification de la mutation promotrice au diagnostic n'étaient associées à une évolution péjorative.

Ces résultats suggèrent que l'évolution de la charge allélique de *CALR* est associée à une aggravation de la maladie. Ce travail suggère également que l'impact pronostique des mutations additionnelles peut varier selon la mutation promotrice. Ces résultats devront être confirmés sur de plus larges cohortes afin de recommander un suivi moléculaire chez les patients avec mutation de *CALR*.

# Sequential mutational evaluation of CALR-mutated myeloproliferative neoplasms with thrombocytosis reveals an association between CALR allele burden evolution and disease progression

Laurane Cottin,<sup>1,2,3,4</sup>  Jérémie Riou,<sup>5</sup> Corentin Orvain,<sup>1,2,4,6</sup> Jean Christophe Ianotto,<sup>4,7</sup> Françoise Boyer,<sup>4,6</sup> Maxime Renard,<sup>1,3,4</sup> Matgorzata Truchan-Graczyk,<sup>8</sup> Anne Murati,<sup>9</sup> Rébecca Jouanneau-Courville,<sup>3</sup> Olivier Allangba,<sup>10</sup> Olivier Mansier,<sup>11,12,13</sup> Barbara Burroni,<sup>14</sup> Marie-Christine Rousselet,<sup>2,15</sup> Isabelle Quintin-Roué,<sup>16</sup> Antoine Martin,<sup>17</sup> Sophie Sadot-Lebouvier,<sup>18</sup> Yves Delneste,<sup>1,4,19</sup> Jean-Marie Chrétien,<sup>20</sup> Mathilde Hunault-Berger,<sup>1,2,4,6</sup> Odile Blanchet,<sup>1,2,3,4,21</sup> Eric Lippert,<sup>4,22,23</sup>  Valérie Ugo,<sup>1,2,3,4,†</sup> and Damien Luque Paz<sup>1,2,3,4,†</sup> 

<sup>1</sup>CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, <sup>2</sup>Université d'Angers, UFR Santé, <sup>3</sup>Laboratoire d'Hématologie, CHU Angers, <sup>4</sup>'Grand Ouest Against Leukemia' (FHU GOAL), Fédération Hospitalo-Universitaire, <sup>5</sup>INSERM, UMR 1066, CNRS 6021, MINT, Université d'Angers, <sup>6</sup>Service des Maladies du Sang, CHU Angers, Angers, <sup>7</sup>Service d'Hématologie Clinique, CHRU Brest, Brest, <sup>8</sup>Hématologie Clinique, CH de Saumur, Saumur, <sup>9</sup>Laboratoire d'Hématologie, IPC Marseille, Marseille, <sup>10</sup>Hématologie Clinique, CH Saint-Brieuc, Saint-Brieuc, <sup>11</sup>UFR Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Bordeaux, <sup>12</sup>Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux, <sup>13</sup>INSERM U1034, Université de Bordeaux, Bordeaux, <sup>14</sup>Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, APHP Paris, Hôpital Cochin, Paris, <sup>15</sup>Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU Angers, Angers, <sup>16</sup>Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHRU Brest, Brest, <sup>17</sup>Laboratoire d'Anatomie Pathologie, APHP Paris, Hôpital Avicenne, Paris, <sup>18</sup>Service d'Hématologie, Hôpital

## Summary

In myeloproliferative neoplasms (MPN), *JAK2V617F* allele burden measurement has an impact on prognosis that helps in patient monitoring. Less is known about its usefulness in *CALR*-mutated cases. Additional mutations found by next-generation sequencing have also shown an impact on prognosis that may drive therapeutic choices, especially in myelofibrosis, but few studies focused on *CALR*-mutated patients. We performed a molecular evaluation combining next-generation sequencing with a myeloid panel and *CALR* allele burden measurement at diagnosis and during follow-up in a cohort of 45 patients with *CALR*-mutated essential thrombocythaemia. The bone marrow histology was also blindly reviewed in order to apply the WHO2016 classification. The most frequently mutated gene was *TET2* (11/21 mutations). *CALR* type 1-like patients appear to have a more complex molecular landscape. We found an association between disease progression and *CALR* allele burden increase during follow-up, independently of additional mutations and WHO2016-reviewed diagnosis. Patients with disease progression at the time of follow-up showed a significant increase in *CALR* allele burden (+16.7%,  $P = 0.005$ ) whereas patients without disease progression had a stable allele burden (+3.7%,  $P = 0.194$ ). This result argues for clinical interest in *CALR* allele burden monitoring.

**Keywords:** *CALR*, next-generation sequencing, allele burden, myeloproliferative neoplasms.

Confluent, Nantes, <sup>19</sup>Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, CHU Angers, <sup>20</sup>DRCI Cellule de Gestion des Données et Evaluation, CHU Angers, <sup>21</sup>Centre de Ressources Biologiques, CHU Angers, <sup>22</sup>Laboratoire d'Hématologie, CHRU Brest and <sup>23</sup>Inserm, EFS, UMR 1078, GGB, Université de Brest, Brest, France

Received 19 July 2019; accepted for publication 25 August 2019

Correspondence: Damien Luque Paz, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie en Santé, CHU Angers, 4 Rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France.  
E-mail: damien.luquepaz@chu-angers.fr

†These authors contributed equally to this study.

*BCR-ABL1* negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) mainly include polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET), overt primary myelofibrosis (PMF) and pre-fibrotic primary myelofibrosis (pre-PMF) recently added to the WHO2016 classification (Arber *et al.*, 2016). The distinction between ET and pre-PMF is mainly based on bone marrow histological analysis (Thiele *et al.*, 2011). Pre-PMF seems to evolve more often and/or more rapidly than ET toward overt myelofibrosis and is associated with a poor prognosis (Barbui *et al.*, 2011).

MPNs are characterised by driver mutations (*JAK2V617F*, *MPL* or *CALR*) that lead to the constitutive activation of the *JAK2-STAT5* pathway. *CALR* mutations are found in about 25–30% of ET and PMF. More than 50 different mutations have been described to date. All of them are insertions/deletions in the last exon of the gene leading to a common carboxy-terminal peptide neo-sequence. The two most common *CALR* mutations are type 1 and type 2 mutations characterised by a 52 base pairs (bp) deletion (c.1099\_1150del; p.Leu367fs\*46) and a 5 bp insertion (c.1154\_1155insTTGTC; p.Lys385fs\*47), respectively (Klampfl *et al.*, 2013; Nangalia *et al.*, 2013). Other mutations are classified as type 1-like or type 2-like according to their impact on the carboxy-terminal sequence of the protein (Pietra *et al.*, 2016). Type 1 mutations are more frequent, accounting for about 50% of *CALR*-mutated cases in ET and 70% in PMF, and are associated with a better prognosis in PMF (Cabagnols *et al.*, 2015; Pietra *et al.*, 2016).

Previous studies have shown that *JAK2V617F* allele burden influences the disease phenotype and evolution (Larsen *et al.*, 2007; Tiedt *et al.*, 2008; Passamonti *et al.*, 2010; Alvarez-Larrán *et al.*, 2014). A high allele burden is more frequently

associated with PV and can predict disease progression. Conversely, limited data are available regarding the impact of *CALR*-mutated allele burden.

The complexity of the mutational landscape of MPNs is increasing and additional mutations in many genes can occur at the time of diagnosis or during follow-up (Lundberg *et al.*, 2014). An impact of additional mutations on prognosis has been well established in PMF where they are now integrated into prognostic scores (Guglielmelli *et al.*, 2017). In ET, mutations in additional genes are detected in around 30% of cases and appear to confer worse prognosis (Tefferi *et al.*, 2016; Grinfeld *et al.*, 2018; Luque Paz *et al.*, 2019).

We studied a multicentric cohort of 45 patients with *CALR*-mutated MPN with thrombocytosis at diagnosis and during follow-up by next-generation sequencing (NGS) and *CALR* allele burden quantification. We found an association between an increase in *CALR* allele burden and disease progression during follow-up.

## Material and methods

### Patients and samples

Forty-five *CALR*-mutated patients were included if they had a diagnosis of ET between 2004 and 2016 as defined in the 2001/2008 WHO classifications. Molecular analyses were performed at diagnosis and during follow-up (median of six years after diagnosis) using DNA derived from peripheral blood leucocytes or purified granulocytes.

Disease progression at the time of follow-up was defined by a composite criterion used in a previous study (Luque Paz *et al.*, 2017). Disease progression was defined by the

presence of at least one of the following criteria: (i) leucocytosis >12 G/L or immature granulocytes >10% or erythroblasts >1% in blood; (ii) anaemia not related to treatment toxicity; (iii) thrombocytopenia not related to treatment toxicity; (iv) onset or worsening of splenomegaly; (v) onset of thrombocytosis under cytoreductive treatment; (vi) inadequate control of the patient's condition with treatment (defined by at least one treatment change for reasons other than an adverse event); (vii) transformation to myelofibrosis or acute myeloid leukaemia.

### CALR allele burden quantification

CALR mutations were quantified at diagnosis and during follow-up by fragment analysis (Klampfl *et al.*, 2013) and by digital PCR for type 1 and type 2 mutations (QuantStudio™ 3D, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA) (for details, see Data S1, Figures S7, S8 and Table SVIII). For both fragment analysis and digital PCR, CALR allele burden was corrected according to the percentage of granulocytes in blood leucocytes (Table SI). This correction had been validated in a bicentric series (details in Data S1 and Figures S9 and S10).

### Next-generation sequencing

Next-generation sequencing was performed at diagnosis and at follow-up. All coding exons and intron–exon boundaries of 52 genes were tested using a HaloPlexHS custom panel (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA, Table SII). Library preparation and sequencing using NextSeq500 (Illumina, San Diego, CA, USA) were performed according to the manufacturer's instructions (details provided in Data S1). Non-synonymous coding variants were considered when variant allele frequency (VAF) was greater than 1%; coverage of called regions was set to 50. After removal of known polymorphisms, mutations were classified into three groups according to their putative impact: “adverse”, “probably adverse” and “of undetermined significance” variants (Table SIII). An increase in additional mutations between diagnosis and follow-up was defined by a relative increase of the VAF of at least 20%.

### Somatic validation

Somatic validation by nail DNA sequencing was performed for mutations that had a stable allele frequency between 40% and 60% and that were not confirmed somatic in the COSMIC database (Table SIX).

### Clonal study

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC,  $2 \times 10^5$ /ml) were seeded in a methylcellulose medium with serum and cytokines (IL-3 20 ng/μl, SCF 20 ng/μl, IL6 20 ng/ml and

erythropoietin 1 UI/ml) (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada). After 14 days, erythroid burst-forming units were harvested, and DNA was extracted for genotyping.

### Statistics

Statistical analysis was performed using R software (R Core Team. R: A language and environment for statistical computing, version 3.5.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Comparisons between groups for clinical-biological data were performed using Fisher's exact test for qualitative variables and the Mann–Whitney test for continuous variables. Correlation analysis between digital PCR (dPCR), NGS and fragment analysis for CALR allele burden quantification were performed using a non-parametric Passing–Bablok regression (R package mcr) and using Bland–Altman plots (R package BlandAltmanLeh). The partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) method was used to discriminate disease progression based on correlation analysis among clinical and biological characteristics (details in Data S1), and to understand which variables carry class-separating information (Rohart *et al.*, 2017).

**Table I.** Clinical and biological characteristics of the 45 CALR-mutated patients.

Patient characteristics	<i>n</i> = 45
Sex (M/F)	23/22
Age at diagnosis (year) [range]	59 [18–88]
Leucocytosis at diagnosis ( $10^9/l$ ) [range]	7.35 [4.31–19.53]
Haemoglobin at diagnosis (g/dl) [range]	14.3 [11.9–16.5]
Platelets at diagnosis ( $10^9/l$ ) [range]	762 [534–2436]
CALR mutations % ( <i>n</i> )	
Type 1/1-like	42% (19/45)
Type 2/2-like	49% (22/45)
Others	9% (4/45)
Splenomegaly at diagnosis % ( <i>n</i> )	9% (4/44)
IPSET-survival categories at diagnosis % ( <i>n</i> )	
Low	44% (20/45)
Intermediate	44% (20/45)
High	12% (5/45)
ELN vascular score at diagnosis % ( <i>n</i> )	
Low	42% (19/45)
High	58% (26/45)
IPSET-thrombosis categories at diagnosis (ELN 2016) % ( <i>n</i> )	
Very low	49% (22/45)
Low	0
Intermediate	38% (17/45)
High	13% (6/45)
Clinical-biological progression at follow-up % ( <i>n</i> )	33% (15/45)
Haematologic response to treatment (ELN 2009) % ( <i>n</i> )	
Complete response	27% (12/45)
Partial response	31% (14/45)
No response	27% (12/45)
Patient not treated	15% (7/45)

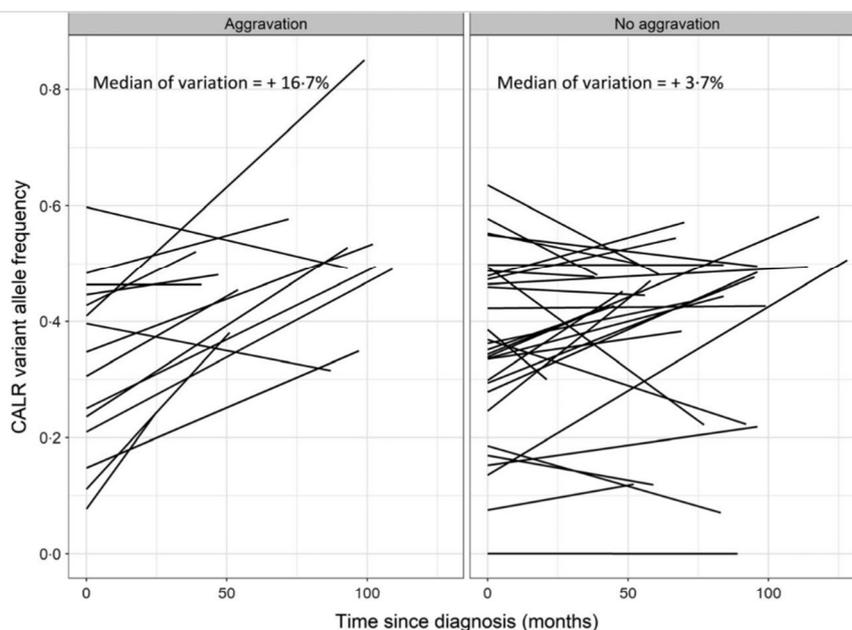


Fig 1. Evolution of *CALR* allele burden between diagnosis and last point follow-up in patients with disease progression (left panel,  $n = 15$ ) and without disease progression (right panel,  $n = 20$ ). Each line represents a patient.

## Results

### Patient characteristics

The clinical and biological characteristics of the 45 *CALR*-mutated patients are summarised in Table I. The 45 *CALR* mutations were divided into 19 type 1 or type 1-like, 22 type 2 or type 2-like and 4 other mutations (Figure S1). Follow-up samples were collected with a median time of six years [min: two years; max: 11 years] after diagnosis. At this point, 15/45 (33%) patients had disease progression according to the composite criterion including eight patients with an evolution to myelofibrosis (Figure S2). Three patients, all with disease progression at the time of follow-up, presented subsequent events: one evolved to a myelodysplastic syndrome two years later (10 years after diagnosis), one with fibrotic transformation evolved to acute leukaemia four years later (12 years after diagnosis) and one patient died five years after fibrotic transformation. The treatments received by patients at the time of follow-up are presented in Table SIV.

All 45 patients were diagnosed as suffering from ET by the local multidisciplinary staff and were then followed and treated as such. Nevertheless, the recent introduction of the pre-PMF entity in the revised WHO classification led us to review bone marrow samples. All available bone marrow biopsies (39/45) were blindly peer-reviewed by four pathologists of the French Bone Marrow Biopsy Study Group (GEBOM, details in Data S1). Results were then compared with clinical-biological data to reclassify patients according to WHO2016 as 22 ET, 14 pre-PMF and 9 unclassifiable MPN (MPN-U) (Figure S3). We observed a trend to more disease progression in patients with a reviewed diagnosis of pre-PMF

and MPN-U (6/14 and 4/9 respectively vs. 5/22 in ET group) but this not reach the threshold of statistical significance ( $P = 0.38$  and  $P = 0.27$ ). We therefore considered our cohort as *CALR*-mutated MPN with thrombocytosis. We also take into account the WHO2016-reviewed diagnosis in the multivariate analysis to test for association with disease aggravation.

### *CALR* variant allele frequency (VAF) evolution

Median *CALR* mutation allele burden at diagnosis was 34.7% (24.6%; 46.4%) [median (1st and 3rd quartiles)] in the whole cohort with no difference between patients with disease progression [34.7% (22.3%; 43.7%)] and without disease progression [34.7% (28.2%; 47.7%);  $P = 0.528$ ]. We found a slight increase in the *CALR* VAF during follow-up across the entire cohort (median difference: +7.2%,  $P = 0.002$ ). Indeed, patients with disease progression during follow-up showed a significant increase in *CALR* VAF (+16.7%,  $P = 0.005$ ) whereas patients without disease progression had a stable VAF (+3.7%,  $P = 0.194$ ) (Fig 1). No difference in *CALR* VAF at diagnosis or follow-up was found between type 1/1-like mutations and type 2/2-like mutations ( $P = 0.578$  and  $P = 0.239$ ). In our study, only one of the nine patients treated with pegylated interferon-alpha (pegIFN) presented a clear decrease in *CALR* VAF. It should be noted that one patient had a very low *CALR* VAF, close to 1%, which remained stable during follow-up (Figure S4). This mutation was initially not detected by fragment analysis in our lab but was found when NGS was performed to search a clonal marker and was confirmed by digital PCR. One other patient had a dramatic increase in *CALR* VAF to

85% at follow-up that was associated with secondary myelofibrosis evolution and four years later, leukaemic transformation (Figure S5). Of note, for this patient, blinded review of the bone marrow biopsy had led to the WHO2016 diagnosis of ET.

From a technical point of view, we showed that fragment analysis and digital PCR were equivalent for *CALR* allele burden quantification (Fig 2A, B). In contrast, NGS induced a systematic underestimation of type 1 mutation because some mutant reads were discarded during bioinformatic analysis (Fig 2C, D). For type 2 and other types of mutation, the quantification by NGS was quite similar to fragment analysis (Fig 2E, F).

### Mutational landscape at diagnosis and during follow-up

At the time of diagnosis, NGS detected 59 putative somatic mutations. Study of nail DNA confirmed six variants as somatic and reclassified 38 variants as germline, including 12 variants already described in myeloid neoplasms (Table SV). In the end, 21 additional mutations were considered at the time of diagnosis in 15 patients (Fig 3A, Table SVI). The most frequently mutated gene was *TET2* with 11 mutations, including two patients with three co-occurrent variants. Notably, 8/11 mutations of *TET2* were found with a low VAF under 10% (median of *TET2* VAF, 4.3%). Of note, one patient presented a type 2 *CALR* mutation coexisting with a *JAK2V617F* mutation with a low VAF (3.5%). The molecular landscape at diagnosis appeared to be more complex in *CALR* type 1/1-like mutations than in other types (Fig 3B, C) ( $P = 0.072$ ).

At follow-up, 12 mutations were newly detected in 8/45 patients including four *TET2* mutations (Fig 3A and Table SVII). Reviewing NGS reads at diagnosis, we found that 6/12 mutations were already present with a very low allele burden below the calling threshold of 1%.

Nine variants already present at diagnosis showed a significant increase at the time of follow-up. Eight of them were *TET2* variants and one was located on *DNMT3A*. For two patients with a large increase in *TET2* mutation above 15%, we studied the clonal architecture using blood-derived erythroid colonies at the time of follow-up. For both, *TET2* mutation was secondarily acquired in the *CALR* clone (Figure S6).

There was no association between the presence at diagnosis or the appearance of additional mutations and disease progression ( $P = 1$  and  $P = 0.699$ ).

### Multivariate analysis

We then performed a supervised analysis with PLS-DA that allowed a good discrimination between patients with or without disease progression (AUC = 0.896, Fig 4A). Of note, the parameter most involved in this distinction was the evolution of *CALR* allele burden (Fig 4B). Finally, we performed a

multivariate analysis considering both *CALR* allele burden at diagnosis and the slope of *CALR* evolution during follow-up. We found that *CALR* allele burden increase during follow-up was associated with disease progression (slope >20%, OR = 1.66,  $P = 0.0073$ ) independently of *CALR* allele burden at diagnosis, *CALR* mutation type, age, presence of additional mutations at diagnosis and WHO2016-reviewed diagnosis (Table II). The slope corresponds to the angle of the monitoring curve of *CALR* allele burden and takes into account the VAF evolution from diagnosis to follow-up and the time lapse.

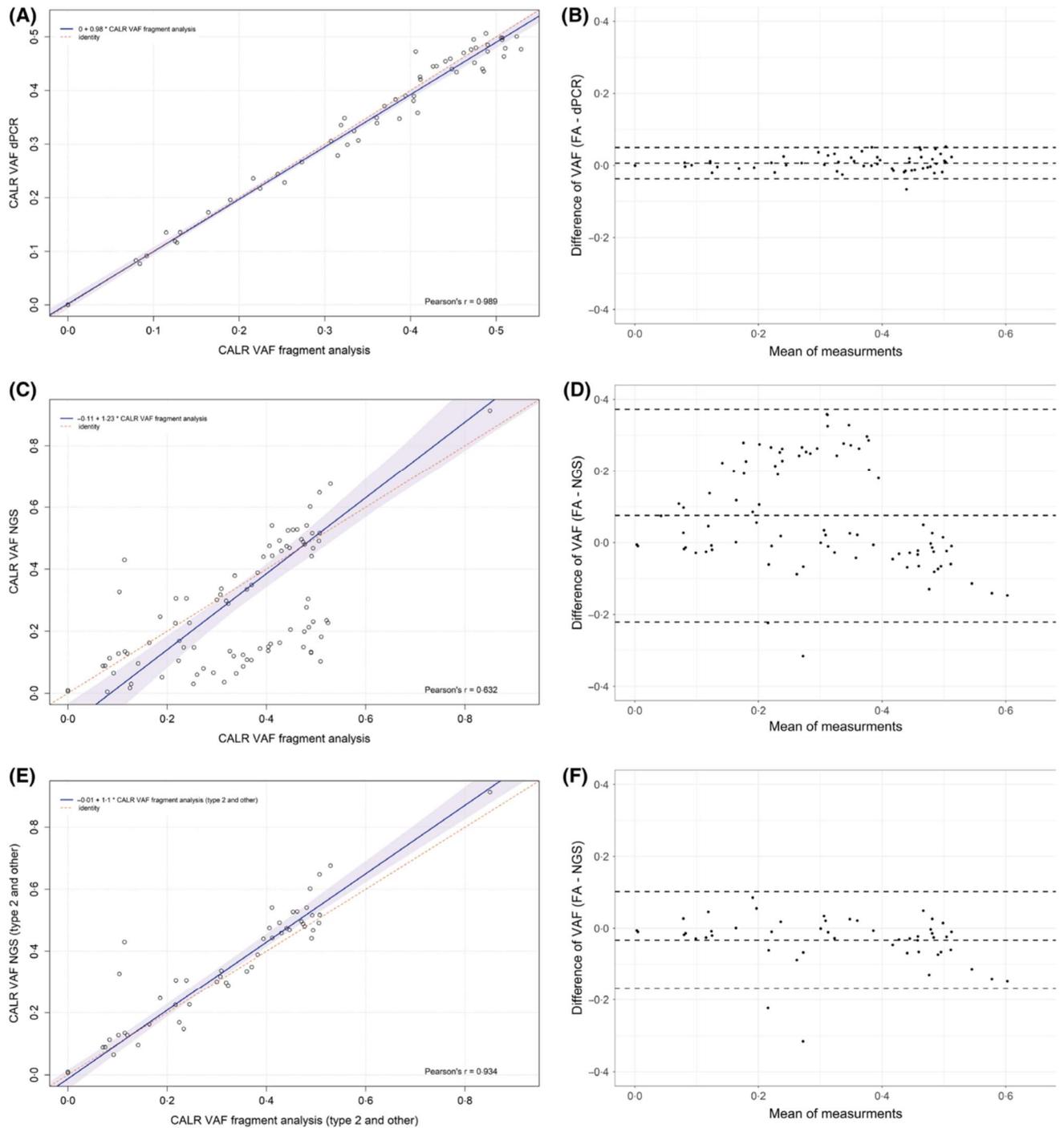
### Discussion

We studied 45 patients with MPN with thrombocytosis by sequential evaluation of the molecular landscape and *CALR* quantification. We found an association between disease progression and *CALR* allele burden increase during follow-up, as already described for *JAK2V617F* driver mutation (Alvarez-Larrán *et al.*, 2014).

*CALR* allele burden is easily obtained by fragment analysis. We showed that fragment analysis produced results similar to absolute quantification by digital PCR, as described previously (Mansier *et al.*, 2016). It should be noted that digital PCR is interesting during follow-up of allografted patients because of its higher sensitivity. In contrast, we showed that NGS should be used with caution for *CALR* type 1 quantification, because we found a systematic underestimation due to our bioinformatic tools. The use of either (i) another NGS method as capture-based library preparation or (ii) specific validated bioinformatic tools could address this issue.

The clinical relevance of *CALR* VAF sequential measurement is not clear. An increase of *CALR* allele burden can be related to (i) an expansion of the driver clone and/or to (ii) the less frequent homozygous transition of the mutation in some cells. Indeed, *CALR* allele burden was higher in PMF than in ET and a recent study showed that MPN with loss of *CALR* homozygosity was associated with disease acceleration (Cabagnols *et al.*, 2015; Stengel *et al.*, 2019). We found that the impact on prognosis of *CALR* allele burden increase was not related to its quantification at diagnosis. In our cohort, only one of the nine patients treated with pegIFN presented a clear decrease in *CALR* VAF, with median follow-up of seven years. A decrease in *CALR* allele burden was previously described in 21/31 *CALR*-mutated ET patients with a median follow-up of 12 years (Verger *et al.*, 2015). A recent study showed a lower rate of molecular response to pegIFN in *CALR*-mutated compared to *JAK2V617F*-mutated MPN (20% of partial molecular response in *CALR* vs. 61% in *JAK2V617F*) despite comparable haematological responses (Czech *et al.*, 2019). In our study, the two patients with disease progression and decreased burden allele (Fig 1) are treated with hydroxycarbamide and pegIFN respectively.

Our results were found using VAF on granulocytes but it can be pointed out that *CALR* mutation can be present in



**Fig 2.** Comparison of *CALR* allele burden quantification by fragment analysis (FA), digital PCR (dPCR) and next-generation sequencing (NGS) represented by Passing–Bablok regression (panels A, C and E) and Bland–Altman plots (panels B, D and F, dashed line representing the 95% confidence interval). (A, B) Fragment analysis *versus* digital PCR. (C, D) Fragment analysis *versus* NGS for all mutation types. (E, F) Fragment analysis *versus* NGS for type 2/2-like and other-type mutations.

monocytes and at a lower level in B cells or T cells (Kjaer *et al.*, 2017). This result may lead to a reconsideration of the purification of granulocytes in MPN and standardization would be necessary in future prospective studies.

Here, we showed that 38/59 of putative additional mutations detected at the time of diagnosis were in fact

constitutional variants. Some of these were previously described in myeloid neoplasms with a COSMIC reference available. This observation underlines the importance of somatic control of some variants, especially since mutations in specific genes (such as *ASXL1*) have a prognostic impact that may modify treatment strategy (particularly in PMF).

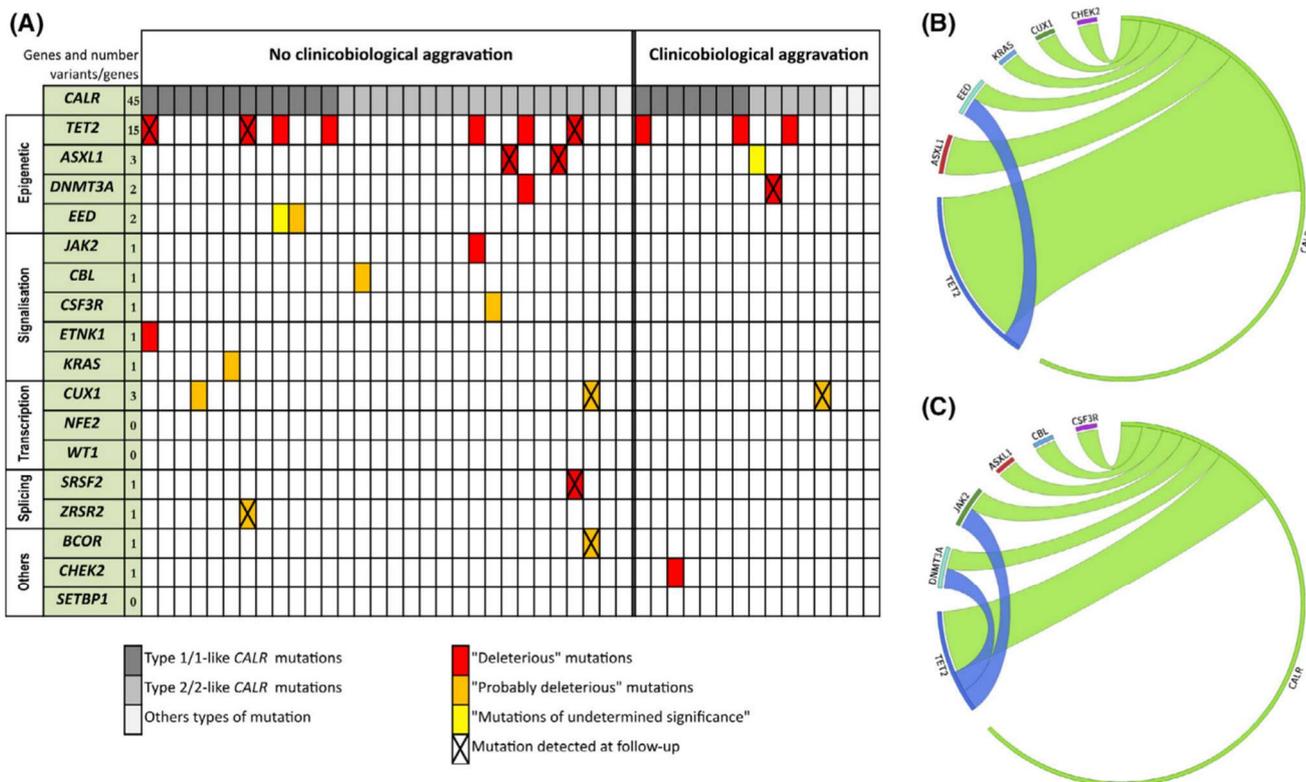


Fig 3. Molecular landscape of the entire cohort at diagnosis and last point follow-up (A). Each column represents a patient. Circos plots show the molecular complexity according to the type of CALR mutation: type 1/1-like (B) or type 2/2-like other types (C).

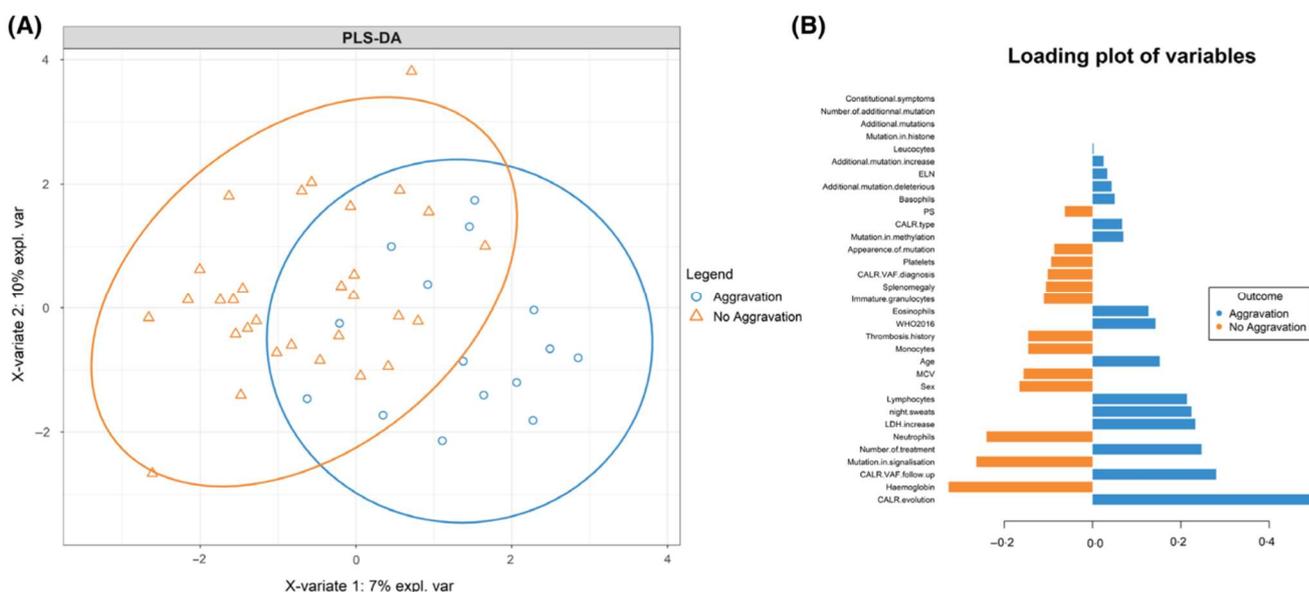


Fig 4. Supervised analysis with partial least-squares discriminant (PLS-DA) analysis for disease progression at the time of follow-up. (A) Global sample plot of PLS-DA with confidence ellipse plots; (B) the loading plot of each variable selected on the first component of PLS-DA with colour indicating the class.

In our study, type 1 mutated cases appear to have a more complex molecular landscape. A previous study found a higher number of additional mutations in patients with type

1 CALR mutations (Agarwal *et al.*, 2017). CALR type 1 mutations are more commonly found in PMF with a frequency of 70–83% vs. 51–57% in ET (Cabagnols *et al.*, 2015;

**Table II.** Multivariate analysis for disease progression at the time of follow-up.

	OR [95% IC]	P value
Age at diagnosis	1 [0.99–1.01]	0.315
CALR VAF at diagnosis	1 [0.99–1.01]	0.524
CALR VAF evolution (slope >20%)	1.66 [1.21–2.27]	0.0073
CALR type 1/type 1-like	1.03 [0.78–1.38]	0.83
Presence of at least one additional mutation	0.96 [0.72–1.28]	0.806
WHO 2016 reviewed diagnosis (essential thrombocythaemia as reference)		
pre-PMF	1.25 [0.92–1.7]	0.355
MPN-U	1.18 [0.83–1.67]	0.158

Pietra *et al.*, 2016). In PMF, only type 1 mutations are associated with a better outcome compared to other driver mutations (Tefferi *et al.*, 2014a). In ET, the type of CALR mutation seemed to influence the phenotype, with higher platelet levels in type 2, but no difference in terms of prognosis was found (Tefferi *et al.*, 2014b). In the present study, the association between disease progression and CALR allele burden increase was independent of CALR mutation type.

Previous studies have described the prognostic impact of additional mutations in ET. These studies considered all mutated ET and not specifically CALR mutated cases (Tefferi *et al.*, 2016; Luque Paz *et al.*, 2019). Furthermore, the most frequently mutated gene in our cohort is *TET2*, for which no prognostic role has been described in MPN to date. A recent study by Campbell's group proposed a molecular prognostic classification into seven classes for all MPN (Grinfeld *et al.*, 2018). When we applied this classification to our cohort, only 3/45 patients were classified as 'MPN with chromatin or spliceosome mutation' at the time of diagnosis. The 42/45 other patients were in the "MPN with CALR mutation" group, which may emphasise the importance of other prognostic markers in deciphering the prognosis in this heterogeneous group.

In two patients studied for clonal hierarchy, we found that *TET2* mutation was secondarily acquired in the CALR clone. Indeed, unlike *JAK2*, CALR mutations seem to appear earlier and their role in genetic instability leading to mutation acquisition remains to be studied (Nangalia *et al.*, 2013; Klampfl *et al.*, 2013; Lundberg *et al.*, 2014). Nevertheless, mutation order in CALR-mutated MPN could influence phenotype and prognosis as previously demonstrated for the *JAK2V617F* mutation (Ortmann *et al.*, 2015). Very recent studies have demonstrated how single-cell approaches coupling genotyping and transcriptome analysis could clarify the role of clonal hierarchy in the physiopathology of MPN (Rodriguez-Meira *et al.*, 2019; Nam *et al.*, 2019).

Patients were selected if they had a diagnosis of ET and a blind review of bone marrow biopsies by expert pathologists led to the WHO2016-revised diagnosis of 14 prePMF, 9 MPN-U and 22 true ET cases. Of note, no overt myelofibrosis was diagnosed. This result highlights that the diagnosis of

pre-PMF can be challenging in day-to-day clinical practice as previously described (Wilkins *et al.*, 2008; Brousseau *et al.*, 2010; Buhr *et al.*, 2012; Madelung *et al.*, 2013; Curto-Garcia *et al.*, 2018). In multivariate analysis, association between CALR allele burden increase and disease progression was independent of the WHO2016-reviewed diagnosis.

In summary, our results suggest that the allele burden increase of CALR mutations is associated with disease progression. Larger clinical studies are needed to confirm the relevance of systematically monitoring CALR mutations.

## Ethics approval and consent to participate

This study was registered with the CNIL (*Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés*, French Data Protection Authority). Patients' data were added to the 'Hemopathies Malignes' biobank at Angers University Hospital (CHU d'Angers), which was approved by the CPP ('Comité de Protection des Personnes', Institutional Review Board) of Angers Ouest II. Written informed consent was obtained from patients for the use of clinical and biological data including DNA sequencing.

## Acknowledgements

The authors thank the local tumour biobanks of Brest and Angers and the French Clinical and Biological Network of Myeloproliferative Neoplasms (FIMBANK) for providing high-quality samples. They also thank the French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) for providing scientific discussions. This work was supported in part by grants from the French National Institute of Cancer (INCa BCB 2013 and INCa TRANSLA CTIM3). LC received a grant from the 'University Hospital of Angers' (Année Recherche, Angers).

## Author contributions

DLP and VU conceived and designed the study. LC, FB and J-CI collected clinical data. OB supervised the biobanking, J-MC conceived and supervised the biological clinical database of the FIMBANK project. LC, DLP, JR, RJC, AMu and MR performed the NGS experiments, analysed and interpreted the data. OM provided data for validation of CALR quantification. CO, FB, J-CI, MTG, OA, SSL, MHB and EL cared for the patients. BB, IQ-R, AMa and MCR analysed the bone marrow biopsies. LC, DLP, and VU analysed the data and wrote the manuscript and CO, JCI, MHB, YD and EL revised it critically.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

**Data S1.** Supplemental data.

**Figure S1.** Change of the C-terminal sequence of CALR mutations and classification into type 1-like (marked in

orange), type 2-like (marked in blue) or other types (marked in grey) of CALR mutation.

**Figure S2.** Details of the clinical-biological criteria present in patients with disease progression. Red: absence of the criterion; green or cross: presence of the criterion; grey; data not available (splenectomy or patient not treated).

**Figure S3.** Histological and clinical-biological data at diagnosis and follow-up. Red: absence of the criterion; green or cross: presence of the criterion; grey; data not available.

**Figure S4.** Evolution of medullary fibrosis and allele burden of variants between diagnosis and follow-up for patient #42.

**Figure S5.** Evolution of medullary fibrosis and allele burden of variants between diagnosis and follow-up for patient #11.

**Figure S6.** Clonogenic studies in the follow-up of two patients with significant increases of the allele frequency of CALR and TET2 mutations.

**Figure S7.** Example of a result obtained from the DNA of a mutated patient amplified on a chip for quantification of type 1 CALR mutation by digital PCR (VAF: 49.3 %).

**Figure S8.** Quantification by digital PCR of a diluted sample with a mutation allele burden from 50% to 0.01% for type 1 and type 2 CALR mutations.

**Figure S9.** Comparison of CALR allele burden of purified granulocytes and CALR allele burden of blood leucocytes

corrected according to the percentage of granulocytes (Passing–Bablok regression).

**Figure S10.** Bland–Altman plot for comparison of digital PCR and fragment analysis for type 1 CALR mutation (FA: fragment analysis, dashed line represents the 95% confidence interval).

**Table SI.** Variant Allele Frequency (VAF) values of CALR mutations with and without correction by the percentage of granulocytes. In grey, the values of the purified PNN.

**Table SII.** Genes studied by next-generation sequencing.

**Table SIII.** Variant classification according to the presumed impact of mutation on protein function (MAF: minor allele frequency; SNP: single-nucleotide polymorphism).

**Table SIV.** Treatment and number of treatment lines received at follow-up.

**Table SV.** Germline variants validated on DNA derived from nails.

**Table SVI.** Somatic mutations identified at diagnosis (excluding CALR ex9) (VAF: variant allele frequency).

**Table SVII.** Somatic mutations newly detected at follow-up (VAF: variant allele frequency).

**Table SVIII.** Primers and probes used for quantification of CALR mutations (bp: base pairs).

**Table SIV.** Primers used for fragment analysis or Sanger validation (bp: base pairs).

## References

- Agarwal, R., Blombery, P., McBean, M., Jones, K., Fellowes, A., Doig, K., Forsyth, C. & Westerman, D.A. (2017) Clinicopathological differences exist between CALR- and JAK2-mutated myeloproliferative neoplasms despite a similar molecular landscape: data from targeted next-generation sequencing in the diagnostic laboratory. *Annals of Hematology*, **96**, 725–732.
- Alvarez-Larrán, A., Bellosillo, B., Pereira, A., Kerguelen, A., Carlos Hernández-Boluda, J., Martínez-Avilés, L., Fernández-Rodríguez, C., Gómez, M., Lombardía, L., Angona, A., Ancochea, Á., Senín, A., Longarón, R., Navarro, B., Collado, M. & Besses, C. (2014) JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events: JAK2 V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *American Journal of Hematology*, **89**, 517–523.
- Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M. & Vardiman, J.W. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, **127**, 2391–2405.
- Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., d'Amore, E.S.G., Randi, M.L., Bertozzi, L., Marino, F., Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Carrai, V., Gisslinger, H., Buxhofer-Ausch, V., Müllauer, L., Carobbio, A., Gianatti, A., Gangat, N., Hanson, C.A. & Tefferi, A. (2011) Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **29**, 3179–3184.
- Brousseau, M., Parot-Schinkel, E., Moles, M.-P., Boyer, F., Hunault, M. & Rousselet, M.-C. (2010) 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*, **56**, 758–767.
- Buhr, T., Hebeda, K., Kaloutsis, V., Porwit, A., der Walt, J.V. & Kreipe, H. (2012) European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis. *Haematologica*, **97**, 360–365.
- Cabagnols, X., Defour, J.P., Ugo, V., Ianotto, J.C., Mossuz, P., Mondet, J., Girodon, F., Alexandre, J.H., Mansier, O., Viillard, J.F., Lippert, E., Murati, A., Mozziconacci, M.J., Saussoy, P., Vekemans, M.C., Knoops, L., Pasquier, F., Ribrag, V., Solary, E., Plo, I., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., Marzac, C. & Bluteau, O. (2015) Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*, **29**, 249–252.
- Curto-García, N., Ianotto, J.-C. & Harrison, C.N. (2018) What is pre-fibrotic myelofibrosis and how should it be managed in 2018? *British Journal of Haematology*, **183**, 23–34.
- Czech, J., Cordua, S., Weinbergerova, B., Baumeister, J., Crepcia, A., Han, L., Maié, T., Costa, I.G., Denecke, B., Maurer, A., Schubert, C., Feldberg, K., Gezer, D., Brümmendorf, T.H., Müller-Newen, G., Mayer, J., Racil, Z., Kubesova, B., Knudsen, T., Sørensen, A.L., Holmström, M., Kjær, L., Skov, V., Larsen, T.S., Hasselbalch, H.C., Chatain, N. & Koschmieder, S. (2019) JAK2V617F but not CALR mutations confer increased molecular responses to interferon- $\alpha$  via JAK1/STAT1 activation. *Leukemia*, **33**, 995–1010.
- Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E.J., Wedge, D.C., Angelopoulos, N., Cantrill, R., Godfrey, A.L., Papaemmanuil, E., Gundem, G., MacLean, C., Cook, J., O'Neil, L., O'Meara, S., Teague, J.W., Butler, A.P., Massie, C.E., Williams, N., Nice, F.L., Andersen, C.L., Hasselbalch, H.C., Guglielmelli, P., McMullin, M.F., Vannucchi, A.M., Harrison, C.N., Gerstung, M., Green, A.R. & Campbell, P.J. (2018) Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, **379**, 1416–1430.

- Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Mudir-eddy, M., Mannarelli, C., Nicolosi, M., Pacilli, A., Pardanani, A., Rumi, E. & Rosti, V. (2017) MIPSS70: mutation-enhanced International Prognostic Score System for transplantation-age patients with primary myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, **36**, 310–318.
- Kjaer, L., Holmström, M.O., Cordua, S., Andersen, M.H., Svane, I.M., Thomassen, M., Kruse, T.A., Pallisgaard, N., Skov, V. & Hasselbalch, H.C. (2017) Sorted peripheral blood cells identify CALR mutations in B- and T-lymphocytes. *Leukemia & Lymphoma*, **59**, 1–5.
- Klampff, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Chen, D., Vladimer, G.I., Bagiński, K., Milanese, C., Casetti, I.C., Sant'Antonio, E., Ferretti, V., Elena, C., Schischlik, F., Cleary, C., Six, M., Schalling, M., Schönegger, A., Bock, C., Malcovati, L., Pascutto, C., Superti-Furga, G., Cazzola, M. & Kralovics, R. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, **369**, 2379–2390.
- Larsen, T.S., Pallisgaard, N., Møller, M.B. & Hasselbalch, H.C. (2007) The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis – impact on disease phenotype. *European Journal of Haematology*, **79**, 508–515.
- Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., Beisel, C., Kralovics, R. & Skoda, R.C. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, **123**, 2220–2228.
- Luque Paz, D., Chauveau, A., Boyer, F., Buors, C., Samaison, L., Cottin, L., Seegers, V., Férec, C., Le Maréchal, C., Gueguen, P., Lippert, E., Ianotto, J.-C. & Ugo, V. (2017) Sequential analysis of 18 genes in polycythemia vera and essential thrombocythemia reveals an association between mutational status and clinical outcome. *Genes, Chromosomes and Cancer*, **56**, 354–362.
- Luque Paz, D., Mansier, O., Riou, J., Conejero, C., Roy, L., Belkhdja, C., Ugo, V. & Giraudier, S. (2019) Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience. *Haematologica*, **104**, e134–e137.
- Madelung, A.B., Bondo, H., Stamp, I., Loevgreen, P., Nielsen, S.L., Falensteen, A., Knudsen, H., Ehinger, M., Dahl-Sørensen, R., Mortensen, N.B., Svendsen, K.D., Lange, T., Ralfkiaer, E., Nielsen, K., Hasselbalch, H.C. & Thiele, J. (2013) World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: morphological reproducibility and clinical correlations—the Danish experience. *American Journal of Hematology*, **88**, 1012–1016.
- Mansier, O., Migeon, M., Saint-Lézer, A., James, C., Verger, E., Robin, M., Socié, G., Bidet, A., Mahon, F.-X., Cassinat, B. & Lippert, E. (2016) Quantification of the mutant CALR allelic burden by digital PCR: application to minimal residual disease evaluation after bone marrow transplantation. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **18**, 68–74.
- Nam, A.S., Kim, K.-T., Chaligne, R., Izzo, F., Ang, C., Taylor, J., Myers, R.M., Abu-Zeinah, G., Brand, R., Omans, N.D., Alonso, A., Sheridan, C., Mariani, M., Dai, X., Harrington, E., Pastore, A., Cubillos-Ruiz, J.R., Tam, W., Hoffman, R., Rabadan, R., Scandura, J.M., Abdel-Wahab, O., Smibert, P. & Landau, D.A. (2019) Somatic mutations and cell identity linked by genotyping of transcriptomes. *Nature*, **571**, 355–360. Available at: <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1367-0> (Accessed July 9, 2019).
- Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., Aziz, A., Godfrey, A.L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H.P., Fitzpatrick, J.D., Goudie, C.T., Ortmann, C.A., Loughran, S.J., Raine, K., Jones, D.R., Butler, A.P., Teague, J.W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D., Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M.Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B.J.P., Harrison, C.N., Cross, N.C.P., Ron, D., Vannucchi, A.M., Papaemmanuil, E., Campbell, P.J. & Green, A.R. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine*, **369**, 2391–2405.
- Ortmann, C.A., Kent, D.G., Nangalia, J., Silber, Y., Wedge, D.C., Grinfeld, J., Baxter, E.J., Massie, C.E., Papaemmanuil, E., Menon, S., Godfrey, A.L., Dimitropoulou, D., Guglielmelli, P., Bellosillo, B., Besses, C., Döhner, K., Harrison, C.N., Vassiliou, G.S., Vannucchi, A., Campbell, P.J., Green, A.R. (2015) Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, **372**, 601–612.
- Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Boveri, E., Arcaini, L., Roncoroni, E., Astori, C., Merli, M., Boggi, S., Pascutto, C., Lazzarino, M. & Cazzola, M. (2010) A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*, **24**, 1574–1579.
- Pietra, D., Rumi, E., Ferretti, V.V., Buduo, C.A.D., Milanese, C., Cavalloni, C., Sant'Antonio, E., Abbonante, V., Moccia, F., Casetti, I.C., Bellini, M., Renna, M.C., Roncoroni, E., Fugazza, E., Astori, C., Boveri, E., Rosti, V., Barosi, G., Balduini, A. & Cazzola, M. (2016) Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, **30**, 431–438.
- Rodriguez-Meira, A., Buck, G., Clark, S.-A., Povernelli, B.J., Alcolea, V., Louka, E., McGowan, S., Hamblin, A., Sousos, N., Barkas, N., Giustacchini, A., Psaila, B., Jacobsen, S.E.W., Thongjuea, S. & Mead, A.J. (2019) Unravelling intratumoral heterogeneity through high-sensitivity single-cell mutational analysis and parallel RNA sequencing. *Molecular Cell*, **73**, 1292–1305.e8.
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A. & Lê Cao, K.-A. (2017) mixOmics: an R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, **13**, e1005752.
- Stengel, A., Jeromin, S., Haferlach, T., Meggendorfer, M., Kern, W. & Haferlach, C. (2019) Detection and characterization of homozygosity of mutated CALR by copy neutral loss of heterozygosity in myeloproliferative neoplasms among cases with high CALR mutation loads or with progressive disease. *Haematologica*, **104**, e187–e190.
- Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Belachew, A.A., Wassie, E.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A. & Pardanani, A. (2014a) Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*, **28**, 1568–1570.
- Tefferi, A., Wassie, E.A., Guglielmelli, P., Gangat, N., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., Wolanskyj, A.P., Maffioli, M., Casalone, R., Pacilli, A., Vannucchi, A.M. & Passamonti, F. (2014b) Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. *American Journal of Hematology*, **89**, E121–E124.
- Tefferi, A., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Finke, C.M., Rotunno, G., Elala, Y., Pacilli, A., Hanson, C.A., Pancrazzi, A. & Ketterling, R.P. (2016) Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances*, **1**, 21–30.
- Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Müllauer, L., Buxhofer-Ausch, V., Gisslinger, B. & Gisslinger, H. (2011) Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*, **117**, 5710–5718.
- Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J. & Skoda, R.C. (2008) Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, **111**, 3931–3940.
- Verger, E., Cassinat, B., Chauveau, A., Dosquet, C., Giraudier, S., Schlageter, M.-H., Ianotto, J.-C., Yassin, M.A., Al-Dewik, N., Carillo, S., Legouffe, E., Ugo, V., Chomienne, C. & Kiladjian, J.-J. (2015) Clinical and molecular response to interferon- $\alpha$  therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood*, **126**, 2585–2591.
- Wilkins, B.S., Erber, W.N., Bareford, D., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Paul, B., Harrison, C.N., Green, A.R. & Campbell, P.J. (2008) Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*, **111**, 60–70.

## Supplemental Data

### ***CALR* mutation quantification**

The search for mutations in exon 9 of *CALR* was done by fragment analysis as previously described (Klampfl et al., 2013) (Table SVIII). Each DNA sample was amplified from 20 ng of DNA in a PCR mix containing DMSO. Amplification included activation of the Taq polymerase for 15 minutes at 95°C and then 29 amplification cycles with a hybridization step at 54°C. The fragment analysis was completed by migration to a capillary sequencer ABI3130 (Applied Biosystems®) with a size marker. The allele burden was calculated by a ratio between the height of the “mutated” peak and the sum of the heights of the two peaks: “wild-type” and “mutated”.

For the digital PCR, 60 ng of genomic DNA was mixed with primers and probes specific for either type 1 or type 2 mutations, (Table SVIII and custom assay from Applied for *CALR* type 2 mutation). Wild-type probes were labelled with VIC and the mutant probes with FAM. For each sample, the chip was prepared with 14.5 µL of mix spread homogeneously. Amplification step was performed on a ProFlex™ 2x Flat PCR System thermocycler (Applied Biosystems). Fluorescence data were obtained using a QuantStudio™ 3D Digital PCR instrument. The number of wells positive for wild-type or mutant *CALR* was determined using Thermo Fisher Scientific™ software (Figure S7). For type 1 and type 2 *CALR* mutations, the level of detection defined from 25 and 21 samples of non-mutated patients was 0.06% and 0.01%, respectively. Quantification of a diluted sample with a mutation allele burden from 50% to 0.01% confirmed the accuracy of the analyses (Figure S8).

For both fragment analysis and digital PCR, *CALR* allele burden was corrected according to the percentage of granulocytes in blood leucocytes. This correction is based on previously published data on JAK2V617F (Hermouet et al. Leukemia 2007; 21:p1128) and was validated on a bi-centric study of 17 samples for whom *CALR*-mutation was quantified on both total leucocytes and purified PNN. We showed a good correlation between the VAF of PNN and the corrected VAF of total leucocytes

(Figure S9). Thus, data analysis was performed using digital PCR quantification for type 1 and type 2 mutations and fragment analysis for other types of mutations.

### **NGS analysis and bioinformatic pipeline**

HaloPlexHS technology uses family reads for demultiplexing that allow a good sensitivity for mutation with low variant allele frequency (VAF) by removing sequencing errors. Libraries were made according to manufacturer recommendation and were pooled and sequenced using a NextSeq500 (Illumina, San Diego, CA, USA). Variants were aligned and called using SureCall software (Agilent). Sequence alignment and variant calling was performed using the SureCall software (Agilent Technology®). In detail, alignment used GenAligners 3.0 tool (Agilent Technology®) with the default settings and variant calling used SNPPET (Agilent Technology®) based on a bayesian model with customized parameters as follow: variant threshold=0.3, minimum quality of base=30, minimum allele frequency=0.02 and minimum mutated reads=4. Integrative Genomics Viewer (IGV, Cambridge, UK) was used to visualise the read alignment and confirm the variant calls. Variants annotation was performed with wAnnovar (Yang and Wang, 2015). The selected rare variants are confronted with COSMIC database and SNPs databases (gnomAD, dbSNP, ExAC, 1000 Genomes, GO-ESP and TOPMED). Nonsynonymous coding variants were considered when Variant Allele Frequency (VAF) was greater than 1% and coverage of called regions was set to 50. Known polymorphisms in gnomAD, Exac and 1000 Genomes databases were removed if the minor allele frequency was greater than 1%. The functional prediction of mutations in exons was accessed using Polymorphism Phenotyping (PolyPhen2) and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) tools. The diagnosis performance of our method was evaluated by the analysis of several samples with known mutations at the time of its implementation and by the participation to the bi-annual control of quality of the French Group of Molecular Biology in Hematology (GBMHM) since 2016.

## NGS quality and complementary analysis

PCR products were indexed using sample-specific barcode primers. The average size of the sequenced fragments was stable between each run, with a median of 117 base pairs (bp) per read. The use of molecular barcodes specific for each DNA fragment of interest allowed the sequencing data to be merged for average of 55.9% of the amplicons. The average coverage for each sample analysed was satisfactory, with a median percentage of uncovered areas of 1.8% [1.4%; 2.6%]. The mean coverage of NGS was 763X [604; 982]. Among the uncovered areas, only the end of *RUNX1* exon 9 and *WT1* exon 9 were described with recurrent mutations. For this reason, these regions were screened for mutations in all samples (diagnosis and follow-up) by Sanger sequencing.

## Validation of NGS mutations

Each variant with a VAF greater than 10% or 5% in case of indel was validated by Sanger sequencing or fragment analysis (ABI3130 capillary sequencer, Applied Biosystems®) (Table SVIII). Thirteen mutations with low variant allele frequency (VAF) under 10% were kept in analysis because of their good quality score, reproductive presence at diagnosis and at follow-up and absence in other samples. Somatic status of mutations detected was validated by Sanger sequencing on DNA derived from nails that required an overnight lysis step to improve extraction (Kit NucleoSpin Tissue Macherey Nagel).

## Bone Marrow Biopsy Review

All available biopsies (39/45) were blindly reviewed by 4 pathologists of the French Group of Study of Bone Marrow Biopsy (GEBOM). Only the patient's age was visible for the pathologists undertaking this review. For 9 patients, the review was not contributory because of the insufficient quality of the histological material. It should be noted that bone marrow biopsy was lacking for 6 patients (3 failures and 3 not performed because of anticoagulant therapy or elderly patient).

## Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and multivariate analysis

Data used in PLS-DA analysis for prediction of disease aggravation at the follow-up were:

Gender (Male/Female)

Age at the time of diagnosis (years)

Complete blood count at diagnosis : WBC (G/L), Haemoglobin (g/dL), MCV (fL), platelets (G/L), polynuclear neutrophils (G/L), polynuclear eosinophils (G/L), polynuclear basophils (G/L), lymphocytes (G/L), monocytes (G/L), immatures granulocytes (%), blasts (%)

LDH increase at diagnosis (Yes/No)

Splenomegaly at diagnosis (Yes/No)

Performance status classification at diagnosis (0/1/2/3)

Constitutional symptoms at diagnosis (Yes/No)

ELN classification at diagnosis (Low risk/High risk)

History of thrombosis at diagnosis (Yes/No)

Number of treatments used (Yes/No)

Presence of additional mutation at diagnosis (Yes/No)

Presence of additional mutation at diagnosis classified as Deleterious (Yes/No)

Number of additional mutations at diagnosis (Yes/No)

Presence of a mutation in gene coding for signaling pathway (Yes/No)

Presence of a mutation in gene coding for DNA methylation (Yes/No)

Presence of a mutation in gene coding for histone modification (Yes/No)

VAF relative increase of additional mutation above 10% between diagnosis and follow-up (Yes/No)

Appearance of a mutation at the follow-up (Yes/No)

*CALR* type 1/1-like mutation (Yes/No)

*CALR* VAF at the time of diagnosis (%)

*CALR* VAF at the follow-up (%)

*CALR* VAF increase between diagnosis and follow-up (%)

WHO2016-reviewed diagnosis (ET / prePMF / MPN-U)

In multivariate analysis, the slope of *CALR* allele burden was calculated by the formula: (VAF follow-up – VAF diagnosis) / (time of follow-up in month).

**Figure S1:** Change of the C-terminal sequence of CALR mutations and classifications into type 1-like (marked in orange), type 2-like (marked in blue) or other types (marked in grey) of CALR mutation.

Type 5	c.1091_1142del	AAEKQMKDKQDEGQRTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
<b>Type 1</b>	c.1092_1143del	AAEKQMKDKQDEEQRTTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
Type 3	c.1095_1140del	AAEKQMKDKQDEEQQRTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
<b>Type 4</b>	c.1102_1135del	AAEKQMKDKQDEEQRLRRRQRTTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
Type 57	c.1114_1144del31	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEQRTTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
Type 22	c.1120_1123delAAGA	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDNAKRRRRQRTTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
	c.1129_1139delinsCTCTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRLCRRQRTTRRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
	c.1132_1154delinsTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRRCRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
	c.[1147_1153del; 1221del]	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAARRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKCPRPGQGRAVERPASRAGLRPERSCRRAGRAKStop
	c.1150_1154delinsACTTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAETCRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
Type 32	c.1153_1154delinsTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDCRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
<b>Type 2</b>	c.1154_1155insTTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDNCRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
Type 34	c.1154_delinsCTTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDTCRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
	c.1153_1154delinsCCTTGTC	AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDPCRRMMRTKMRMRMRRTRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAStop
<b>Wild type /</b>		AAEKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDKEDDEDKDEDEDEEDKDEEEDVPGQAKDELStop

**Figure S2:** Details of the clinical-biological criteria present in patients with disease progression. Red: absence of the criterion; green or cross: presence of the criterion; grey; data not available (splenectomy or patient not treated).

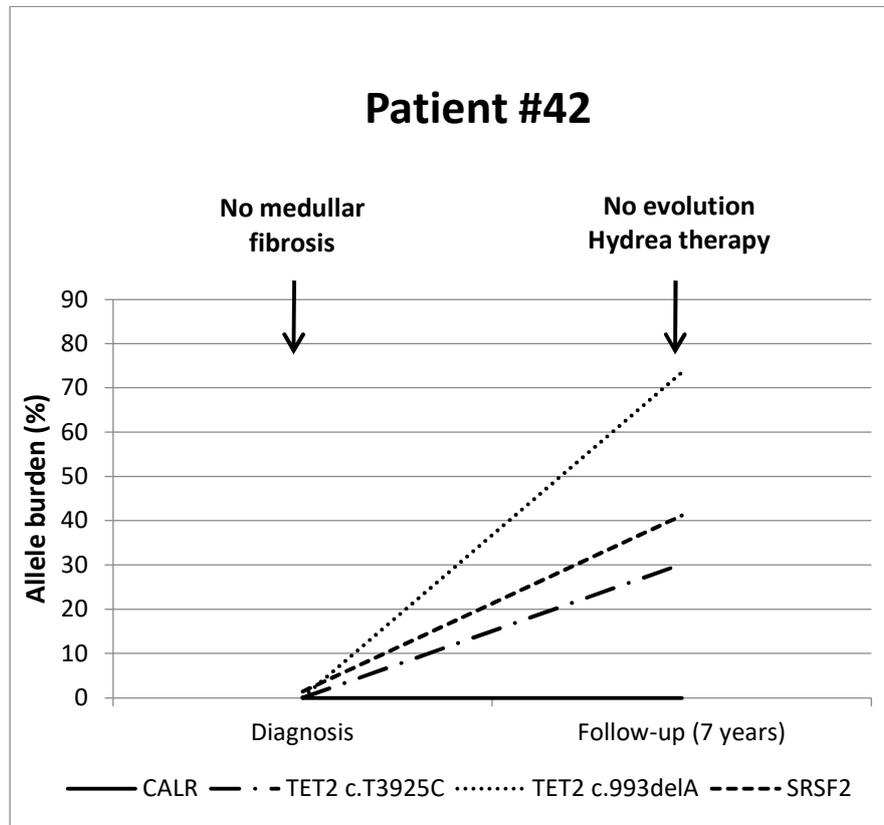
Patient	Leucocytosis > 12 G/L or immatures granulocytes > 10% or erythroblasts >1% in blood	Anaemia not related to treatment toxicity	Thrombocytopenia not related to treatment toxicity	Onset or worsening of splenomegaly	Onset of thrombocytosis under cytoreductive treatment	Inadequate control of the patient's condition with the treatment	Transformation to myelofibrosis
3	Red	Red	Red	Red	Green	Green	
4	Red	Green	Red	Red	Red	Red	X
5	Red	Red	Red	Red	Green	Red	
7	Red	Red	Red	Grey	Green	Red	
9	Red	Green	Red	Red	Red	Red	X
11	Green	Red	Red	Red	Red	Green	X
15	Red	Red	Red	Red	Green	Red	X
17	Green	Green	Red	Green	Grey	Grey	X
20	Green	Green	Red	Red	Green	Red	X
21	Red	Red	Red	Green	Green	Green	X
34	Red	Red	Red	Red	Green	Green	
40	Red	Green	Red	Red	Red	Red	
41	Red	Green	Red	Red	Green	Green	X
45	Green	Green	Red	Red	Grey	Grey	
47	Red	Red	Red	Red	Green	Red	

**Figure S3:** Histological and clinical-biological data at diagnostic and follow-up. Red: absence of the criterion; green or cross: presence of the criterion; grey; data not available.

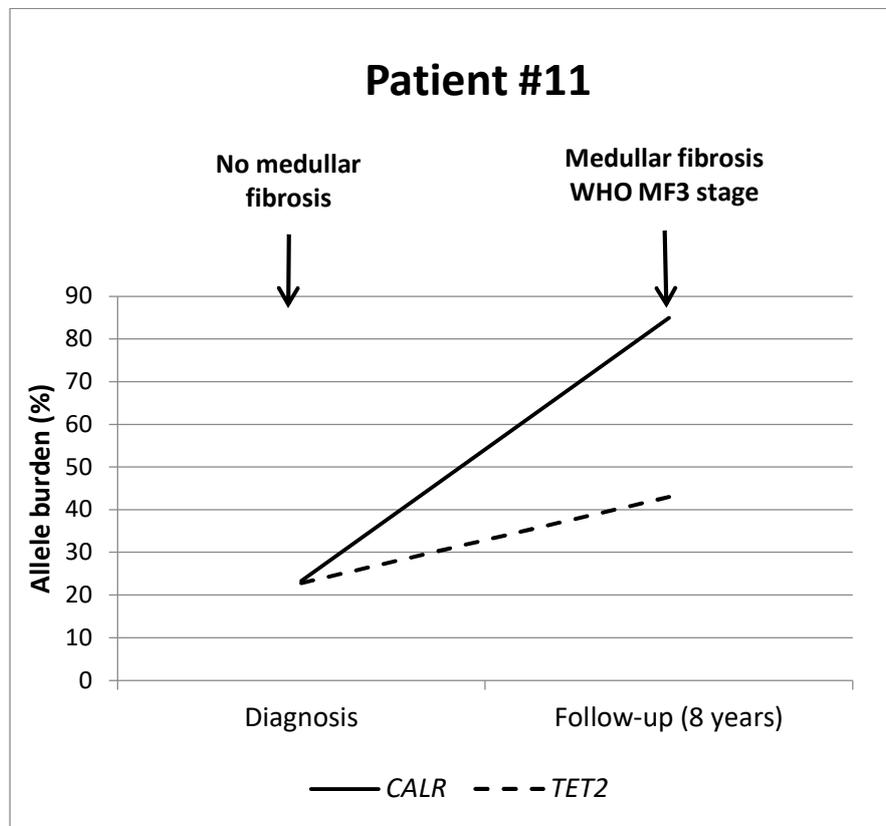
Patient	Diagnosis retained	Histological classification by GEBOM group	Presence of one minor criterion of prePMF	Anemia	Leukocytosis	Splenomegalia	Increased LDH	LDH (xN)	WBC count (G/L)	Hemoglobin (g/dL)	PLT count (G/L)	Circulating CD34+ cells (10 <sup>6</sup> /L)	Type of CALR mutation
5	ET	ET						0,9	8,37	14,0	668		other
8	ET	ET						1,00	6,00	14,7	1018		2 like
12	ET	ET						1,00	6,61	14,7	788	4,83	2 like
14	ET	ET						0,9	7,80	14,8	888	3,86	1 like
18	ET	ET						0,7	9,36	14,5	803	1,95	2 like
23	ET	ET						0,8	7,32	14,2	1248	7,39	2 like
42	ET	ET						0,7	8,41	15,3	553	6,73	2 like
3	ET	ET							4,31	15,1	599		other
11	ET	ET	X					1,3	6,25	15,2	1016		2 like
25	ET	ET	X					1,03	9,10	15,5	644		other
28	ET	ET	X					2,3	8,60	14,7	730		1 like
31	ET	ET	X					1,1	5,20	12,2	560		2 like
33	ET	not available						0,8	7,30	12,5	881		1 like
35	ET	not available						0,9	6,90	14,3	755		2 like
36	ET	not available						0,7	4,70	12,9	651		1 like
45	ET	not available						0,9	6,41	13,8	692	2,93	1 like
46	ET	not available						0,9	11,00	15,1	1125	1,81	2 like
4	ET	not contributory						1,00	5,00	12,9	762	0,98	2 like
6	ET	not contributory						0,7	5,12	14,5	729	2,25	1 like
10	ET	not contributory						0,9	7,35	16,5	973	3,23	1 like
16	ET	not contributory						0,9	5,98	13,7	742	2,37	2 like
30	ET	not contributory						0,96	8,30	13,3	742		1 like
38	MPN-U	not available	X					1,5	7,80	14,0	875		2 like
7	MPN-U	not contributory	X					1,2	7,84	13,3	691	2,33	2 like
37	MPN-U	not contributory	X					1,8	9,60	15,0	661	6,5	2 like
47	MPN-U	not contributory	X					1,4	19,53	13,7	1358	6,02	2 like
48	MPN-U	not contributory	X					1,1	10,16	14,9	886	17,1	2 like
9	MPN-U	prePMF						1,00	6,83	11,9	700		1 like
21	MPN-U	prePMF						0,97	4,96	13,3	638	2,77	1 like

29	MPN-U	prePMF						0,8	8,50	14,3	601		2 like
43	MPN-U	prePMF							7,37	12,4	802	2,21	1 like
13	prePMF	prePMF	X					0,7	7,15	15,6	597	2,15	2 like
15	prePMF	prePMF	X					1,1	6,19	13,3	534	3,8	other
17	prePMF	prePMF	X					1,2	8,39	16,0	663	6,55	1 like
20	prePMF	prePMF	X					2,1	10,96	14,3	738	8,5	1 like
22	prePMF	prePMF	X					1,2	6,28	14,2	953	1,08	1 like
24	prePMF	prePMF	X					1,5	8,00	13,2	865		2 like
26	prePMF	prePMF	X					1,7	5,70	14,3	633	16	1 like
27	prePMF	prePMF	X					2,7	9,50	15,1	1232	2,5	1 like
32	prePMF	prePMF	X					0,7	11,20	15,8	1099	9	2 like
34	prePMF	prePMF	X					1,7	8,40	13,5	788	2,5	2 like
39	prePMF	prePMF	X					1,6	15,20	13,6	2436		2 like
40	prePMF	prePMF	X					1,2	6,90	13,6	1087		1 like
41	prePMF	prePMF	X					1,03	6,90	12,5	954	5,11	1 like
44	prePMF	prePMF	X					1,6	6,34	14,8	857	3,8	1 like

**Figure S4:** Evolution of medullary fibrosis and allele burden of variants between diagnosis and follow-up for patient #42.

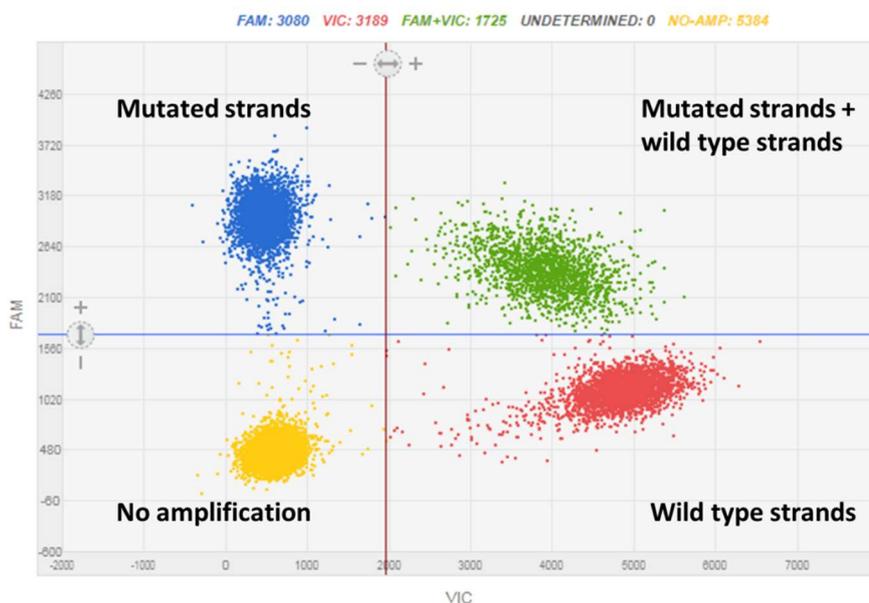


**Figure S5:** Evolution of medullary fibrosis and allele burden of variants between diagnosis and follow-up for patient #11.

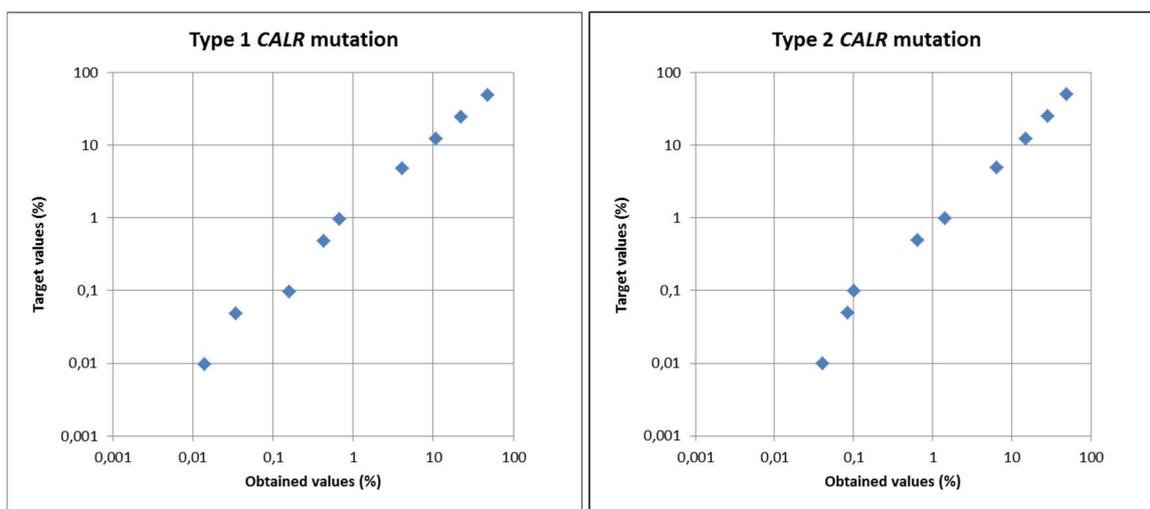




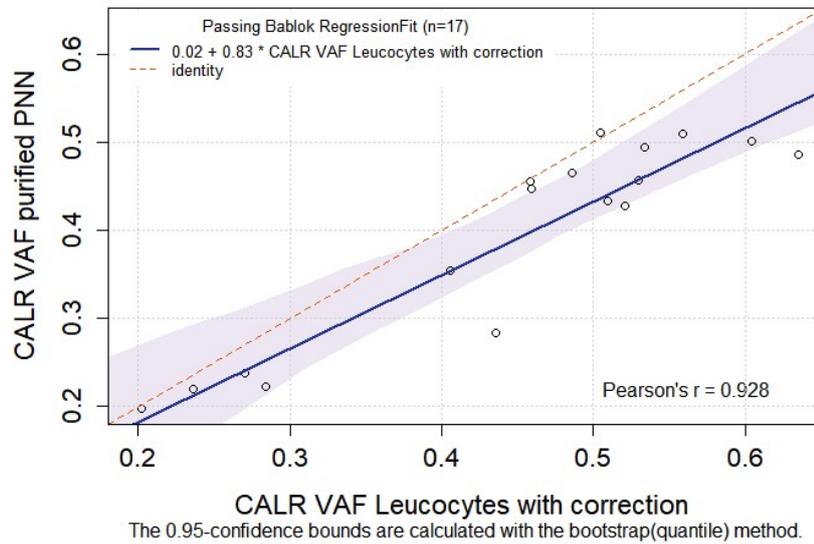
**Figure S7:** Example of a result obtained from the DNA of a mutated patient amplified on a chip for quantification of type 1 *CALR* mutation by digital PCR (VAF: 49.3 %).



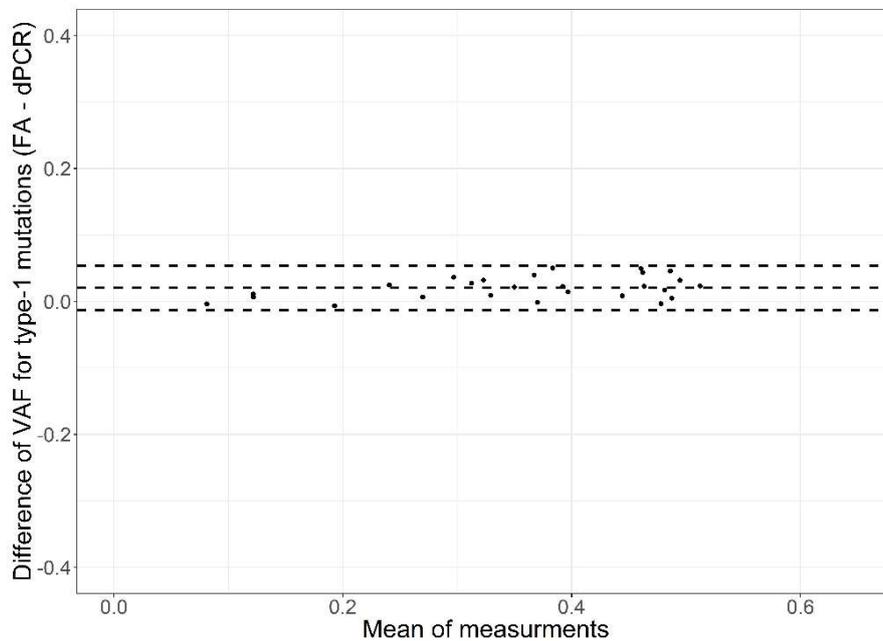
**Figure S8:** Quantification by digital PCR of a diluted sample with a mutation allele burden from 50% to 0.01% for type 1 and type 2 *CALR* mutations



**Figure S9:** Comparison of *CALR* allele burden of purified PNN and *CALR* allele burden of blood leucocytes corrected according to the percentage of granulocytes (Passing-Bablok regression)



**Figure S10:** Bland Altman plot for comparison of digital PCR and fragment analysis for type 1 *CALR* mutation (FA: fragment analysis, dashed line represented the 95% CI)



**Table SI:** VAF values of *CALR* mutations with and without correction by the percentage of granulocytes. In grey, the values from the purified PNN.

Patient	Uncorrected <i>CALR</i> VAF	Corrected <i>CALR</i> VAF
3	0,370	0,598
3	0,492	0,492
4	0,173	0,250
4	0,495	0,495
5	0,142	0,210
5	0,491	0,491
6	0,116	0,169
6	0,119	0,119
7	0,092	0,148
7	0,349	0,349
8	0,135	0,246
8	0,470	0,470
9	0,353	0,446
9	0,481	0,481
10	0,358	0,553
10	0,501	0,501
11	0,233	0,410
11	0,850	0,850
12	0,348	0,464
12	0,495	0,495
13	0,425	0,550
13	0,434	0,496
14	0,228	0,293
14	0,436	0,436
15	0,218	0,396
15	0,239	0,315
16	0,104	0,152
16	0,102	0,218
17	0,353	0,483
17	0,494	0,577
18	0,236	0,344
18	0,420	0,420
20	0,196	0,236
20	0,473	0,528
21	0,083	0,111
21	0,381	0,381
22	0,371	0,578
22	0,480	0,480
23	0,459	0,459
23	0,445	0,445
24	0,498	0,498
24	0,498	0,498
25	0,186	0,186
25	0,071	0,071
26	0,479	0,479
26	0,440	0,572
27	0,293	0,351
27	0,427	0,427
28	0,299	0,299
28	0,452	0,452
29	0,075	0,075
29	0,120	0,120
30	0,339	0,339
30	0,389	0,582
31	0,217	0,294

31	0,476	0,476
32	0,335	0,335
32	0,383	0,383
33	0,336	0,336
33	0,443	0,443
34	0,306	0,306
34	0,455	0,455
35	0,473	0,473
35	0,445	0,545
36	0,267	0,423
36	0,325	0,426
37	0,390	0,487
37	0,477	0,477
38	0,136	0,136
38	0,506	0,506
39	0,494	0,494
39	0,114	0,222
40	0,347	0,347
40	0,440	0,534
41	0,307	0,463
41	0,463	0,463
42	0,009	0,010
42	0,012	0,012
43	0,254	0,369
43	0,223	0,223
44	0,279	0,279
44	0,485	0,485
45	0,260	0,428
45	0,521	0,521
46	0,309	0,386
46	0,300	0,300
47	0,077	0,077
47	0,244	0,244
48	0,477	0,636
48	0,481	0,481

**Table SII:** Genes studied by NGS.

<i>ASXL1</i>	<i>ATM</i>	<i>ATRX</i>	<i>BCOR</i>	<i>BCORL1</i>	<i>CALR</i>	<i>CBL</i>	<i>CEBPa</i>
<i>CHEK2</i>	<i>CSF3R</i>	<i>CUX1</i>	<i>DDX41</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DOT1L</i>	<i>EED</i>	<i>ETNK1</i>
<i>ETV6</i>	<i>EZH2</i>	<i>FLT3</i>	<i>GATA2</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>IKZF1</i>	<i>JAK2</i>
<i>KDM6A</i>	<i>KIT</i>	<i>KMT2A</i>	<i>KRAS</i>	<i>MPL</i>	<i>NF1</i>	<i>NFE2</i>	<i>NPM1</i>
<i>NRAS</i>	<i>PDS5B</i>	<i>PHF6</i>	<i>PTEN</i>	<i>PTPN11</i>	<i>RAD21</i>	<i>RUNX1</i>	<i>SETBP1</i>
<i>SF3B1</i>	<i>SH2B3</i>	<i>SMC1A</i>	<i>SMC3</i>	<i>SRSF2</i>	<i>STAG2</i>	<i>SUZ12</i>	<i>TET2</i>
<i>TP53</i>	<i>U2AF1</i>	<i>WT1</i>	<i>ZRSR2</i>				

**Supplemental Table SIII:** Variant classification according to the presumed impact of mutation on protein function (MAF: minor allele frequency; SNP: single-nucleotide polymorphism).

Type	Signification	Criteria
<b>A</b>	<b>Deleterious</b>	deleterious variant described in myeloid neoplasms in COSMIC and validated somatic
		undescribed variant causing a truncated protein
<b>B</b>	<b>Probably deleterious</b>	variant described in myeloid neoplasms in COSMIC but not validated somatic, absent from the "SNP" bases or with MAF <0.01 (1%)
		variant not described in myeloid neoplasms in COSMIC, with MAF <0.01 (1%) and described as deleterious by Polyphen and / or SIFT
<b>C</b>	<b>Of undetermined significance</b>	variant not described in myeloid neoplasms in COSMIC, with MAF <0.01 (1%) without impact predicted by Polyphen and SIFT

**Table SIV:** Treatment and number of treatment lines received at follow-up

	All patients (n=45)	Patients without clinicobiological aggravation (n=30)	Patients with clinicobiological aggravation (n=15)
Number of treatment lines (n)			
0	4	2	2
1	17	15	2
2	11	8	3
≥3	13	5	8
Treatment at follow-up point (n)			
<i>none</i>	8	6	2
<i>hydroxyurea</i>	20	14	6
<i>interferon</i>	9	5	4
<i>anagrelide</i>	9	4	5
<i>pipobroman</i>	1	0	1

**Table SV:** Germline variants validated on DNA derived from nails.

Patient	Gene	NM used	Mutation (genomic DNA)	Mutation (cordan DNA)	Mutation's type	VAR (%) at diagnosis (N)	Coverage at diagnosis (N)	VAR (%) at follow-up	Coverage at follow-up (N)	Sanger or fragment analysis validation	Somatic validation	Previously described in myeloid neoplasms	COSMIC reference	Described as somatic in COSMIC	Rs reference	Minor allele frequency (gnomad)	Score polyphus2_SFT
5	ATM	NM_000051	p.Arg1853Val	c.A558T	nonsynonymous SNV	49.7	424	51	516	yes	yes	no	COSM42628	yes	rs3801673	0.004883	0.851 P
5	NOTCH1	NM_017617	p.Ty621Cys	c.A262G	nonsynonymous SNV	/	/	16.8	409	yes	yes	no	/	/	/	/	0.999 D
6	SETBP1	NM_015559	p.Trh193Met	c.C584T	nonsynonymous SNV	47.5	385	48.3	238	yes	yes	yes	COSM4623771	no ever confirmed somatic	/	4.256e-5	0.245 B
10	JAK2	NM_004972	p.Ser707Cys	c.C239G	nonsynonymous SNV	53.4	320	48.8	330	yes	yes	yes	COSM277217	yes	rs201992086	0.0001234	0.013 B
10	RUVBL1	NM_007254	p.Pro459Pro	c.C1386G	synonymous SNV	/	/	54.7	170	yes	yes	no	/	/	rs61750222	0.03303	B
10	SETBP1	NM_015559	p.A16630Val	c.C188T	nonsynonymous SNV	48.4	1638	49.6	1142	yes	yes	yes	COSM4973373	yes	rs540861169	0.00005730	0.052 B
11	CDK1	NM_001202543	p.Leu1470Phe	c.C448T	nonsynonymous SNV	44.4	27	61.8	34	yes	yes	no	/	/	/	/	0.022 B
11	MY1	NM_001042492	p.Cys437Ser	c.G413C	nonsynonymous SNV	41.5	217	44.2	215	yes	yes	no	/	/	/	/	0.968 D
14	CHEK2	NM_001005735	p.Arg23Cys	c.C667T	nonsynonymous SNV	43.7	324	43.9	379	yes	yes	no	/	/	rs77130927	0.0009478	1.0 D
15	FBXW7	NM_018315	p.Glu112Ala	c.A335C	nonsynonymous SNV	/	/	56.4	245	yes	yes	no	/	/	rs201015633	0.0002366	0.048 B
15	JAK2	NM_004972	p.Arg110Ser	c.A323G	nonsynonymous SNV	47.8	557	46.3	861	yes	yes	yes	COSM3708	yes	rs14289166	0.01962	0.005 B
15	NOTCH1	NM_017617	p.R53_65del	c.2558_2560del	nonframeshift deletion	/	/	33.1	520	yes	yes	no	/	/	/	/	/
15	PAAS	NM_001280549	p.H4126Gln	c.G857A	nonsynonymous SNV	/	/	47.9	1010	yes	yes	no	/	/	rs159365433	0.00001891	0.0 B
16	UZAF2	NM_007279	p.Leu411Phe	c.C1231T	nonsynonymous SNV	/	/	43.1	780	yes	yes	no	/	/	rs142173906	0.00004965	0.0 B
17	CEL	NM_005388	p.Pro34delinsProHis	c.105_106insCAC	nonframeshift insertion	39	568	33	559	yes	yes	no	/	/	rs397507488	/	/
21	ATM	NM_000051	p.Trh2743Met	c.C828T	nonsynonymous SNV	47.7	1066	43.9	1231	yes	yes	no	/	/	rs750881321	0.00001771	0.099 D
22	ATM	NM_000051	p.Val410Ala	c.T129C	nonsynonymous SNV	33.2	461	31.9	529	yes	yes	yes	COSM459264	no ever confirmed somatic	rs56128736	0.002135	0.434 B
24	TFZ2	NM_001127208	p.Gln108Pro	c.A325C	nonsynonymous SNV	45.6	1885	47.8	2545	yes	yes	no	/	/	rs73956899	0.002828	0.991 D
26	DDX41	NM_016222	p.Arg359Cys	c.C1075T	nonsynonymous SNV	46.1	1620	47.1	2075	yes	yes	yes	COSM4935220	yes	/	/	0.096 D
27	PDS5B	NM_015032	p.Arg234Arg	c.T248G	nonsynonymous SNV	53.4	667	53.8	407	yes	yes	no	/	/	rs200545607	0.00004043	0.031 B
28	ATM	NM_000051	p.Gly2032Arg	c.G607A	nonsynonymous SNV	42.5	372	49.2	415	yes	yes	yes	COSM24635	no ever confirmed somatic	rs11212387	0.01407	1.0 D
30	ASXL1	NM_015338	p.Glu1102Asp	c.G3306T	nonsynonymous SNV	39.5	1066	36.4	887	yes	yes	yes	COSM36205	yes	rs139115934	0.009736	0.779 P
34	CEBPA	NM_004364	p.H4195Gln	c.C583G	nonsynonymous SNV	57.4	727	44.3	368	yes	yes	no	/	/	/	/	0.004 B
36	FBXW7	NM_018315	p.Glu112Ala	c.A335C	nonsynonymous SNV	49.4	579	48.4	403	yes	yes	no	/	/	rs201015633	0.0002866	0.048 B
38	FDPF	NM_000121	p.Gly465Glu	c.G137A	nonsynonymous SNV	66.6	15	50.7	71	yes	yes	no	/	/	rs45516306	0.005282	0.004 B
38	KPNA5	NM_033360	p.Arg305Glu	c.C90A	nonsynonymous SNV	51.6	898	46.6	816	yes	yes	no	/	/	/	/	0.001 B
38	TFRT	NM_138253	p.Val412Ile	c.1321_1325del	nonframeshift deletion	6.4	846	30	327	yes	yes	no	/	/	rs377639087	0.01719	/
39	NOTCH1	NM_017617	p.Glu848Lys	c.G254A	nonsynonymous SNV	51.4	179	52.2	1801	yes	yes	no	/	/	rs35136134	0.002741	0.999 D
41	ATRX	NM_000489	p.H4865Gln	c.C2395G	nonsynonymous SNV	48.1	283	47.6	294	yes	yes	no	/	/	rs61752455	0.00008879	0.0 B
41	ATRX	NM_000489	p.Val1161Leu	c.G3541C	nonsynonymous SNV	48.1	389	49.3	534	yes	yes	no	/	/	rs61758732	0.001629	0.007 B
41	HMG2	NM_009484	p.Lys103Glu	c.A307G	nonsynonymous SNV	44.6	1174	47.4	1355	yes	yes	no	/	/	rs77970919	0.003017	0.001 B
42	TFZ2	NM_001127208	p.Ty67His	c.T259C	nonsynonymous SNV	23.8	147	28.9	149	yes	yes	yes	COSM427337	yes	rs14386291	0.07134	0.999 D
42	TFZ2	NM_001127208	p.Pro173Ser	c.C518T	nonsynonymous SNV	41.9	633	41.9	578	yes	yes	yes	COSM4235472	yes	rs145648065	0.006974	0.134 B
45	CEBPA	NM_004364	p.Pro196_199delinsPro	c.588_590insACCCC	nonframeshift insertion	48.9	556	43.7	485	yes	yes	yes	COSM417007	yes	rs762459325	/	/
45	CSE1R	NM_156089	p.Glu465Lys	c.G123A	nonsynonymous SNV	49.9	847	49.7	974	yes	yes	no	/	/	rs3918019	0.003387	0.915 P
45	NOTCH1	NM_017617	p.Arg21His	c.G1862A	nonsynonymous SNV	46.8	613	46.3	525	yes	yes	no	/	/	rs138504021	0.001023	1.0 D
45	SH2B3	NM_005475	p.Trh986Met	c.C118T	nonsynonymous SNV	48.9	491	52.9	431	yes	yes	no	/	/	rs200956167	0.00003215	1.0 D
45	WFI	NM_024426	p.Pro245Ser	c.C745T	nonsynonymous SNV	42	547	44.1	472	yes	yes	no	/	/	rs2234584	0.003716	0.029 B

**Table SVI:** Somatic mutations identified at diagnosis (excluding *CALR* ex9) (VAF: variant allele frequency).

Patient	Gene	NM Used	Mutation (codant DNA)	Mutation's type	VAF (%) at diagnosis (X)	Coverage at diagnosis (X)	VAF (%) at follow-up (X)	Coverage at follow-up (X)	Sanger or fragment analysis validation	Somatic validation in previous studies	COSMIC reference	Described as somatic in COSMIC	Rs reference	Score SIFT	Score PolyPhen2
4	<i>ASXL1</i>	NM_015338	p.Gln372Lys	nonsynonymous SNV	39,7	940	43,8	481	yes	yes	/	no	rs199846284	0,047 B	1 T
6	<i>ETNK1</i>	NM_018638	p.Asp24Ser	nonsynonymous SNV	6,1	883	2	681	yes	no	COSM210967	yes	rs370316713	0,213 B	0,71 T
9	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Ser1369Leu	nonsynonymous SNV	29,6	372	33,2	313	yes	yes	/	no	/	1,0 D	0 D
11	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Glu4437fs	frame shift dup	22,8	1209	43	1822	yes	yes	COSM4385603	yes	/	/	/
12	<i>CBL</i>	NM_005188	p.Tyr455delInsTyrAsp	nonframeshift insertion	18,7	982	22,3	1473	yes	no	/	no	rs397507494	/	/
20	<i>CHEK2</i>	NM_001005735	p.Asp531fs	frameshift deletion	5,4	1659	4,5	1464	yes	yes	COSM3698069	yes	rs148322402	0,99 D	0,29 T
22	<i>CUX1</i>	NM_181552	p.Val188Ile	nonsynonymous SNV	51	940	51,5	895	yes	yes	/	yes	rs148322402	/	/
27	<i>KRAS</i>	NM_004985	p.L77_178del	nonframeshift deletion	49,8	811	52,6	445	yes	yes	/	no	rs397517043	/	/
31	<i>JAK2</i>	NM_004972	p.Val617Phe	nonsynonymous SNV	3,5	/	3,4	1312	no, qPCR	no	COSM12600	yes	rs77375493	/	/
31	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Pro5166	frameshift deletion	7,6	945	26	768	yes	no	/	no	/	/	/
32	<i>CFE2R</i>	NM_156039	p.Ala119Thr	nonsynonymous SNV	48,9	366	45,2	491	yes	no, not possible	COSM4007513	yes	rs142999683	1,0 D	0,44 T
33	<i>EED</i>	NM_003797	p.Thr50Pro	nonsynonymous SNV	45	331	51,5	410	yes	no, not possible	/	no	rs149126431	0,003 B	0,037 D
33	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Leu144*	stopgain	6,8	989	13,4	744	yes	no	/	no	/	/	/
36	<i>EED</i>	NM_003797	p.Lys20Arg	nonsynonymous SNV	34,6	1674	38,3	1083	yes	no, not possible	/	no	/	0,974 D	0,222 T
37	<i>DNMT3A</i>	NM_022552	p.Ile670fs	frameshift insertion	39,4	791	54,5	77	yes	yes	/	no	/	/	/
37	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Thr940fs	frameshift insertion	1	1559	0	226	no	no	/	no	/	/	/
44	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Gln913Leufs*5	frameshift deletion	4,17	575	8,45	284	yes	no	/	no	/	/	/
44	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Pro194Arg	nonsynonymous SNV	4,28	561	8,33	384	yes	no	COSM15945042	yes	no ever confirmed somatic	1,0 D	0,001 D
44	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Gln1435*	stopgain	4,17	912	9,9	345	yes	no	COSM144519	yes	no ever confirmed somatic	/	/
45	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Ile1873Thr	nonsynonymous SNV	2,8	2295	5	2153	no	no	COSM41741	yes	rs116519313	1,0 D	0,0 D
45	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.Gly1407Glu	nonsynonymous SNV	3,5	694	1,93	727	no	no	/	no	/	0,985 D	0,002 D
45	<i>TET2</i>	NM_001127208	p.His672Trpfs*2	frameshift deletion	18,7	262	44,8	306	yes	no	/	no	/	/	/

**Supplemental Table SVII: Somatic mutations newly detected at follow-up (VAF: variant allele frequency).**

Patient	Gene	NM used	Mutation (genomic DNA)	Mutation (codon/DNA)	Mutation's type	VAF (%) at diagnosis	Coverage at diagnosis (X)	VAF (%) at follow-up	Coverage at follow-up (X)	Sanger or fragment analysis validation	Somatic validation	Previously described in myeloid neoplasms	COSMIC reference	Described as somatic in COSMIC	Rs reference	Score PolyPhen2	Score SIFT
6	TET2	NM_001127208	p.Gln1053*	c.C3157T	stopgain	1	237	6,7	165	yes	no	yes	COSM41645	yes	/	/	0,17 T
7	DNMT3A	NM_022552	p.Trp176*	c.G528A	stopgain	0	238	5,1	156	no	no	no	/	/	/	/	1 T
28	TET2	NM_001127208	p.Cys314fs	c.942delT	frameshift deletion	0,7	1153	1,3	2103	no	no	yes	COSM5944252	no ever confirmed somatic	/	/	/
28	ZRSR2	NM_005089	p.Asp220Tyr	c.G658T	nonsynonymous SNV	0	74	5,6	71	no	no	no	/	/	/	1,0 D	0 D
35	ASXL1	NM_015338	p.Val1374fs	c.4122dupG	frameshift insertion	0,8	753	1	1060	no	no	yes	COSM4385707	yes	/	/	/
39	ASXL1	NM_015338	p.Ser795fs	c.2384delC	frameshift deletion	0	271	1,1	1855	no	no	yes	COSM1716803	yes	n5752828734	/	/
42	SRSF2	NM_003016	p.Pro96Leu	c.C287T	nonsynonymous SNV	1,5	342	41,2	318	yes	no	yes	COSM5786507	yes	/	0,047 B	0,008 D
42	TET2	NM_001127208	p.Cys332Ala1s*14	c.993delA	frameshift deletion	0,1	1718	73,5	1082	yes	no	no	/	/	/	/	/
42	TET2	NM_001127208	p.Phe1309Leu	c.T3925C	nonsynonymous SNV	0,02	1118	30,2	789	yes	no	no	/	/	/	0,995 D	0,002 D
46	BCOR	NM_001123385	p.Asp1090Asn	c.G3268A	nonsynonymous SNV	0	85	2,4	85	n o	no	no	/	/	/	0,9 P	0,162 T
46	CUX1	NM_181552	p.Ala1329Val	c.C398GT	nonsynonymous SNV	0	31	6,7	30	no	no	no	/	/	/	0,006 B	0,012 D
47	CUX1	NM_181552	p.Ala246Thr	c.G736A	nonsynonymous SNV	0	84	2,4	82	no	no	no	/	/	/	1,0 D	0,017 D

**Supplemental Table SVIII:** Primers and probes used for quantification of *CALR* mutations (bp: base pairs).

Mutation type	all types	all types	type 1
Technique	fragment analysis	Sanger sequencing	digital PCR
Forward primer	catacgctgaggagttggc	catacgctgaggagttggc	CAGAGAAACAATGAAGGACAAAC
Reverse primer	ggcctcagtcagccctg	aatccaccccaatecgaac	GGGACA TCTTCC TCCTCATC
Wild type probe	/	/	GGACGAGGAGCAGAGGCTTAAGGAGGA
Mutation probe	/	/	GGACGAGGAGCAGAGGACAAGGAGGA
Length (bp)	359	458	172

**Table SIX: Primers used for fragment analysis or Sanger validation (bp: base pairs).**

Gene	NM used	Exon	Mutation (genomic DNA)	Mutation (codant DNA)	Forward primer	Reverse primer	Length (bp)
<i>ASXL1</i>	NM_015338	11	p.Gln372Lys	c.C1114A	ccactctggcctgaaactga	CAACCCCTGCTTGTCTGAC	263
<i>ASXL1</i>	NM_015338	12	p.Glu1102Asp	c.G3306T	TGCGTCTGGTTACAAGGACA	TGGGGATTCTGACATGCTGT	254
<i>ATM</i>	NM_000051	9	p.Val410Ala	c.T1229C	GTGATTACAGTGTCCCTTGCA	gcctatcagagaccagctcc	368
<i>ATM</i>	NM_000051	37	p.Asp1853Val	c.A5558T	tgtcaacggggcatgaaaat	acatcaagtactatctagtcac	482
<i>ATM</i>	NM_000051	41	p.Gly2023Arg	c.G6067A	ccacatataagttgtcctgcaca	CCCACATTGCTTCGTGTTC	426
<i>ATM</i>	NM_000051	56	p.Thr2743Met	c.C8228T	acagaagtagcgaagggaaa	gacctcaaccaaccaaat	401
<i>ATRX</i>	NM_000489	9	p.His865Gln	c.C2595G	GCTGCAGAACCCACAAAA	CCGAGAAAGCTTATCGACACC	282
<i>ATRX</i>	NM_000489	9	p.Val1181Leu	c.G3541C	ACAAAGTGGCTCATCATCTG	GCACTAAATTTTCAGTCACAGGC	257
<i>CBL</i>	NM_005188	1	p.Pro35delinsProHis	c.105_106insCAC	CTTACGCGCTGCTTCTCT	TTCAGCACTTCTCCACCAT	261
<i>CBL</i>	NM_005188	9	p.Tyr455delinsTyrAsp	c.1363_1364insATG	ctgcttttgggttagtttta	ACAACCTACAATGGATTTGCCA	373
<i>CEBPA</i>	NM_004364	1	p.His195Gln	c.C585G	CCGCTGGTGATCAAGCAGGA	CCGGTACTCGTGTGTCT	390
<i>CEBPA</i>	NM_004364	1	p.Pro196_Pro197insHisPro	c.589_590insACCCGC	CTGAGGCCCTGTACGAG	CGATCTGGAAGCTCAGGTTG	205
<i>CHEK2</i>	NM_001005735	5	p.Arg223Cys	c.C667T	TGCTTTGATGAACCACTGCT	cgccagcaactctactc	461
<i>CHEK2</i>	NM_001005735	15	p.Asp531fs	c.1591delG	ttggaggacattttctc	tggagogaatcaagttaaacag	343
<i>CSF3R</i>	NM_156039	4	p.Alal19Thr	c.G355A	ATCTATCATCACCTGCCCC	aggctgatcatgaactctga	272
<i>CSF3R</i>	NM_156039	10	p.Glu405Lys	c.G1213A	gatccatcccaccacctag	tgaacctgtgtctctctgg	334
<i>CUX1</i>	NM_181552	4	p.Val88Ile	c.G262A	tcctttgtgttcaggca	ttccctccagcccaaatg	427
<i>CUX1</i>	NM_001202543	24	p.Leu1470Phe	c.C4408T	GAGGAGCCCAAGTCTCAGG	GCCCTCAGAAGTCCCAT	467
<i>DDX41</i>	NM_016222	10	p.Arg359Cys	c.C1075T	atacatagggcaggtggtgg	agtatgacagtggttggg	421
<i>DNMT3A</i>	NM_022552	17	p.Ile670fs	c.2007dupC	ccaacagggcagtgagacag	agggtgaagagaagaggcc	466
<i>EED</i>	NM_003797	1	p.Lys20Arg	c.A59G	GAGGGAGCGGAGGAATATG	ttcactccagctctgtaa	171
<i>EED</i>	NM_003797	2	p.Thr50Pro	c.A148C	aggctgacgacattctccc	catcctgcaaacctgtcaca	483
<i>EPOR</i>	NM_000121	2	p.Gly46Glu	c.G137A	ggggacagaagggcagaata	aaacagcagggacatcaga	434
<i>ETNK1</i>	NM_018638	3	p.Asn244Ser	c.A731G	tcggagagctgactaaagttca	ccctatcatgagcaagaatg	296
<i>FBXW7</i>	NM_018315	2	p.Glu112Ala	c.A335C	atacaactgtttctctggat	aacagtcacactgactagtaaca	429
<i>HMG2A</i>	NM_003484	4	p.Lys103Glu	c.A307G	ACCAAGAACCAGCTCAAGA	GGGATGCAGACTCAGTTGG	241
<i>JAK2</i>	NM_004972	18	p.Ser797Cys	c.C2390G	aaaagaaggttgggtgagca	agaggcccaaatgacatca	327
<i>JAK2</i>	NM_004972	25	p.Asn1108Ser	c.A3323G	ctcaaggactcagttcactcc	TTTTACATCTTTGCTGGCTAG	424
<i>KRAS</i>	NM_033360	2	p.Asp30Glu	c.C90A	cgtcgatggagagtttga	acatcatggacctgacatac	548
<i>KRAS</i>	NM_004985	5	p.177_178del	c.531_533del	ectgtacatagaagccatcg	CACCAAAAAGCCCCAAGACAG	447
<i>NF1</i>	NM_001042492	31	p.Cys1373His	c.G4118C	tgtctgtttttgtgttggct	aatgcccaaatgctctt	500
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	11	p.Arg621His	c.G1862A	cgccagctcaagctctcct	TCCAGGTTGATCTCCGAGTT	385
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	15	p.Tyr821Cys	c.A2462G	gctcttgagatgagggagg	actttacctccagctcagg	376
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	16	p.Glu848Lys	c.G2542A	tctgagcgtgacatttggc	gacatcctgacctccatcc	403
<i>NOTCH1</i>	NM_017617	16	p.853_854del	c.2558_2560del	tctgagcgtgacatttggc	gacatcctgacctccatcc	403
<i>PAX5</i>	NM_001280549	7	p.Arg286Gln	c.G857A	tgatgtggacctgacttgc	cccatgaaacacctgtgct	398
<i>PDS5B</i>	NM_015032	22	p.Met823Arg	c.T2468G	gtcccacacagacctgaa	acctatagctcactacagaca	476
<i>SETBP1</i>	NM_015559	4	p.Thr195Met	c.C584T	aaggtgctgtctcaattcgg	TCCCTGCACTGCCTTTCTTA	414
<i>SETBP1</i>	NM_015559	4	p.Ala630Val	c.C1189T	AGCCCTCTCTACACCAACAC	TTGCTTCCAGAGCAACGC	376
<i>SH2B3</i>	NM_005475	6	p.Thr396Met	c.C1187T	TCCAGAGTGAAGCAGCTCA	CTGGAAGTGGTGGAGCATGT	330
<i>SRSF2</i>	NM_003016	1	p.Pro96Leu	c.C287T	CCGCCACTCAGAGCTATGA	gcccggacctttgtag	455
<i>TERT</i>	NM_198253	2	p.441_442del	c.1323_1325del	CTGTTTCTGGAGCTGCTTGG	ttttctgagccctactga	464
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Leu144*	c.T431A	TGGCTCCTTCAGATCAAGA	ATGCGATGGGTGAGTGATCT	496
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Cys332Alafs*14	c.993delA	TCAATTCCGCACAGCTCT-FAM	GCTTTGTGGTTCCTGGATG	216
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Pro516fs	c.1548_1560del	TTCCACAGGTTCTCAGCTT	TTCCGCTTGGTAAAACGAG	494
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.His672Trpfs*2	c.2014_2030del	CAAGGCAAGCTTACACCCAG	GGGATGGTGTGTGTGTGCT	354
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Tyr867His	c.T2599C	CAATGGGACTGGAGGAAGT	TGAGTGTGACTTCCCTCTG	410
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Gln913Leufs*5	c.2736_2742del	TGCAGGAAACAAGACCCAAA	TGAGTGTGACTTCCCTCTG-FAM	255
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Gln1053*	c.C3157T	AGAGAATCCACCTGCAAGCT	acgccatgtctcagtaca	417
<i>TET2</i>	NM_001127208	3	p.Gln1084Pro	c.A3251C	AGAGAATCCACCTGCAAGCT	acgccatgtctcagtaca	417
<i>TET2</i>	NM_001127208	5	p.Pro1194Arg	c.C3581G	atccagttgcttggcgtag	ggcatgagctttgatctggg	356
<i>TET2</i>	NM_001127208	7	p.Phe1309Leu	c.T3925C	GAGAACTTGCCGCTGTGAG	tgaacacctttaaacttgg	398
<i>TET2</i>	NM_001127208	9	p.Ser1369Leu	c.C4106T	agtgagttttgggtgaagagt	acagactcaacagctgtaag	244
<i>TET2</i>	NM_001127208	10	p.Gln1435*	c.C4303T	gtgggtggcgaatgcaatt	TACGTGATGGGGCTGACTTT	534
<i>TET2</i>	NM_001127208	10	p.Glu1437fs	c.4312dupA	TGACGTGGATGAGTTTGGGA	TACGTGATGGGGCTGACTTT	224
<i>TET2</i>	NM_001127208	11	p.Pro1723Ser	c.C5167T	GTGGACAACCTGTCCCCATA	AGGGCATGAAGAGAGCTGTT	425
<i>U2AF2</i>	NM_007279	11	p.Leu411Phe	c.C1231T	cggtctttaggtgtggaag	agagaggaagaaagagcgg	451
<i>WT1</i>	NM_024426	2	p.Pro249Ser	c.C745T	tgtcccaaggtcacatccag	gatagcacggaagagggga	371

## Partie 2 : Phases évoluées de syndrome myéloprolifératif : myélofibrose et transformation leucémique

## Etude génomique par séquençage de nouvelle génération de 500 Myélofibroses de l'observatoire national

Travail réalisé sous l'égide du FIM - Résultats en cours d'analyse

---

Ce travail vise à caractériser le profil mutationnel de 500 patients avec une myélofibrose issus de l'observatoire national du FIM. L'impact sur le pronostic des mutations additionnelles sera étudié ainsi que les performances des scores déjà publiés.

Pour ce projet, soutenu par Force Hémato et l'Association Laurette Fugain, réalisé sous l'égide du FIM (France Intergroupe des syndromes Myéloprolifératifs), les ADN correspondant aux 500 patients ont été centralisés à Angers et un séquençage nouvelle génération d'un panel ciblé de 77 gènes a été réalisé. L'analyse bioinformatique a été réalisée à Angers et un groupe de biologistes moléculaires du FIM a participé à la validation et à l'interprétation des mutations détectées.

Les données de séquençages ont été générées et sont en cours de compilation avec les données cliniques issues du CRF électronique de l'observatoire national du FIM. Les objectifs du travail, la méthodologie et les premiers résultats sont présentés ici.

# Etude génomique par séquençage de nouvelle génération de 500 Myélofibroses de l'observatoire national

## Contexte

Parmi les syndromes myéloprolifératifs, La myélofibrose primitive est associée au pronostic le plus péjoratif avec une médiane de survie allant de 13 mois à 11 ans selon le groupe pronostique. On considère, tous groupes confondus, que la médiane de survie dans la MFP est de 5 ans (Cervantes et al., 2009). Elle est à peu près la même dans les myélofibroses secondaires post-PV ou post-TE, avec souvent la difficulté de dater la transformation fibrotique. Plusieurs classifications pronostiques reposant sur des critères cliniques et biologiques ont été proposées dans la myélofibrose primitive (Dupriez et al., 1996; Cervantes et al., 2009; Gangat et al., 2011). Le risque de transformation en leucémie aiguë est particulièrement important dans la myélofibrose primitive (10 à 20%).

Sur le plan moléculaire, on distingue des mutations dites promotrices (*JAK2*, *CALR* et *MPL*) et des mutations additionnelles qui peuvent co-exister ou apparaître au cours de l'évolution de la maladie. L'impact pronostique de ces mutations additionnelles a été décrit dans la myélofibrose primitive avec l'identification d'une signature de mauvais pronostic (mutations d'*ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* et *SRSF2*) (Vannucchi et al., 2013). Ces mutations ont récemment été intégrées à des scores pronostiques (Guglielmelli et al., 2018). Toutefois à l'heure actuelle ce rôle pronostique a surtout été décrit dans 2 cohortes : l'une Italienne et la seconde de la Mayo Clinic aux Etats-Unis et peu de données sont disponibles quant aux myélofibroses secondaires. Plus récemment une approche de prédiction pronostique personnalisée a été proposée dans les syndromes myéloprolifératifs et devra être validée sur d'autres cohortes (Grinfeld et al., 2018).

L'identification au plus tôt des patients de haut risque évolutif permettra de pouvoir adapter au mieux la prise en charge dans une pathologie ou le traitement peut varier de l'abstention thérapeutique à l'allogreffe de moelle osseuse, ce d'autant que des thérapies ciblées sont disponibles ou en développement.

## Objectifs de l'étude

L'impact pronostique du profil mutationnel dans la myélofibrose reste à préciser afin de pouvoir recommander son étude systématique. En particulier, les travaux publiés à ce jour s'intéressent surtout à la myélofibrose primitive et non à aux myélofibroses secondaires aux PV/TE. De plus le rôle des mutations en fonction de leur caractère pathologique (déjà décrit ou supposé) et de leur charge allélique reste à préciser.

**L'objectif principal de ce travail était d'identifier, par l'utilisation d'un panel NGS myéloïde large, un profil mutationnel associé au pronostic dans la myélofibrose**

Les objectifs secondaires étaient :

- Analyse par sous-groupe de diagnostic (MFP, MFS, MFPTÉ, MFPPV)
- Analyse par sous-groupe de mutation driver (*JAK2 CALR MPL* ou triple négatif)
- Analyse descriptive des données moléculaires et associations clinico-biologiques
- Impact clinique de la détection de petits clones (VAF  $\pm$  5%) : TP53 et autres
- Confirmer ou infirmer la signature « 5 gènes » précédemment décrite (Vanucchi et al.) et les scores pronostiques en découlant
- Confirmer ou infirmer l'approche personnalisée du pronostic proposée par Grinfeld et al.

## Patients et Méthodes

### Patients et échantillons

Il s'agit d'une étude de cohorte multicentrique non interventionnelle avec utilisation d'une collection biologique ayant pour objectif l'identification de mutations dans un but pronostique.

Les patients inclus dans ce travail étaient tous inclus dans l'observatoire français des myélofibroses qui regroupe à ce jour plus de 900 myélofibroses primitives ou secondaires et dans FIMBANK qui est une base de données clinico-biologiques multicentrique nationale des syndromes myéloprolifératifs avec référencement des ressources biologiques disponibles. Les ADN de 497 patients ont ainsi été identifiés parmi 19 CRB ou tumorothèques (correspondant à 24 centres ayant inclus les patients) et ont été centralisés au CHU d'Angers (figure 18).

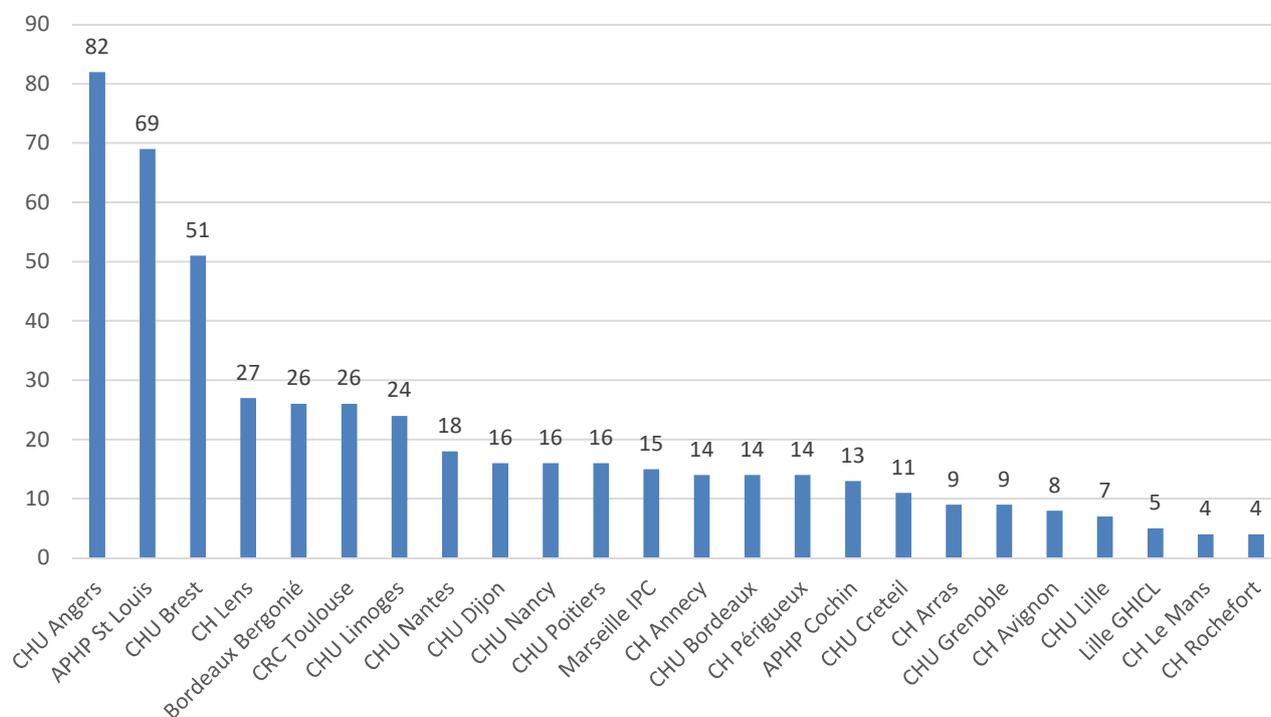


Figure 18 : Centres d'origine des patients inclus

L'ensemble des données cliniques et biologiques des patients inclus dans l'observatoire des myélofibroses au diagnostic sont disponibles (base hébergée SBIM, AP-HP) et ont été extraites de manière sécurisée et anonymisée (numéro d'anonymisation issu de l'observatoire) pour être croisées aux données mutationnelles.

### Séquençage de nouvelle génération et analyse bioinformatique

Le séquençage NGS était réalisé au laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers à l'aide d'un design à façon couvrant l'ensemble des exons de 77 gènes d'intérêt sélectionnés pour leur fréquence de mutation dans les syndromes myéloprolifératifs ou leur rôle dans les hémopathies myéloïdes (tableau XI). Les ADN étaient quantifiés par fluorométrie à l'aide du Qubit® (Thermo-Fisher®) puis les bibliothèques étaient générées par technique de capture en suivant les recommandations du fournisseur (SureSelectQXT, Agilent). La bonne qualité des bibliothèques était vérifiée par réalisation des profils Bioanalyseur 2100 (Agilent). Les bibliothèques étaient ensuite poolées par 48 pour être séquençées sur une High-Output Flowcell 2x150pb avec l'automate NextSeq 500 (Illumina®) pour une profondeur théorique de 5000X.

Tableau XI : Gènes du design NGS

ABL1	CALR	EED	HRAS	KMT2C	PAX5	SH2B3	TET2
ACD	CBL	ETNK1	IDH1	KMT2D	PDS5B	SMC1A	TP53
ANKRD26	CEBPα	ETV6	IDH2	KRAS	PHF6	SMC3	U2AF1
ASXL1	CHEK2	EZH2	IKZF1	MAD1L1	PPM1D	SRP72	U2AF2
ASXL2	CSF3R	FBXW7	JAK1	MPL	PTEN	SRSF2	WT1
ATM	CTCF	FLT3	JAK2	NF1	PTPN11	STAG1	ZBTB33
ATRX	CUX1	GATA1	KDM6A	NFE2	RAD21	STAG2	ZRSR2
BCL11A	DDX41	GATA2	KIT	NOTCH1	RUNX1	SUZ12	
BCOR	DNMT3A	GNAS	KMT2A	NPM1	SETBP1	TERC	
BCORL1	DOT1L	HMGA2	KMT2B	NRAS	SF3B1	TERT	

L'analyse bioinformatique des données a été réalisée à l'aide d'un pipeline spécialement développé pour ce projet (SMPHD, Maxime Renard). Les grandes étapes de ce pipeline sont reprises dans la figure 19.

Le pipeline bioinformatique utilise 4 outils différents pour l'appel de variant :

- GATK Haplotype Caller v4.1
- Mutect2 v4.1 (caller spécifique pour les mutations somatiques)
- VarScan2 (caller spécifique pour les mutations somatiques)
- Pindel v0.2

L'outil Pindel permet la détection de grandes insertions ou délétions grâce à un réalignement des reads non mappés. En particulier dans notre pipeline, cet outil permet la détection de duplication en tandem du gène *FLT3* (*FLT3-ITD*) jusqu'à 300pb et la quantification plus précise de la charge allélique des mutations de *CALR* avec délétion de 52pb.

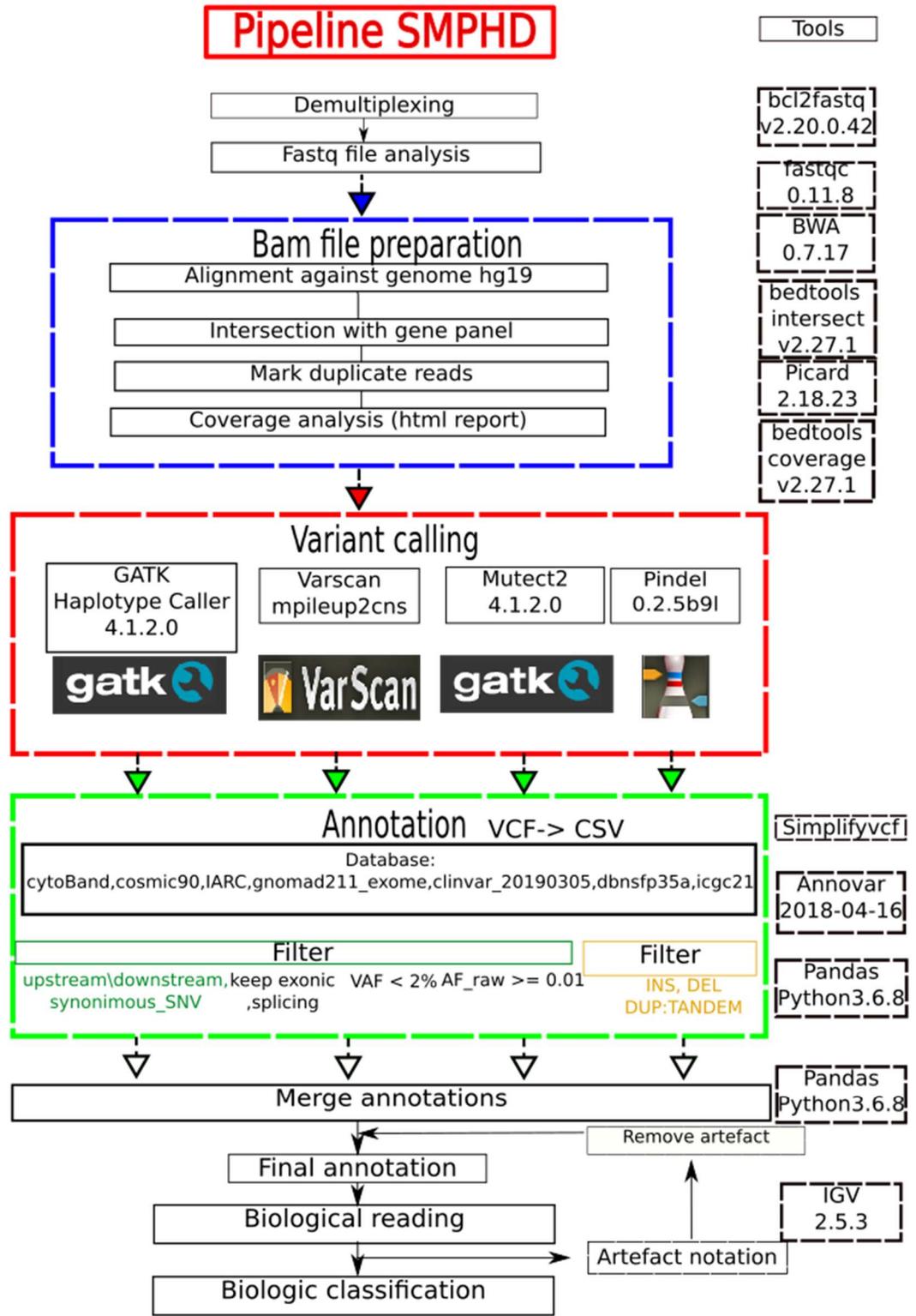


Figure 19 : Pipeline dédié au projet de NGS des myélofibroses

Les variants retenus correspondaient à la fusion des variants détectés par chaque outil d'appel de variant. Les mutations étaient ensuite annotées avec les bases de données suivantes : COSMIC v89 et v90, gnomADv2, Clinvar, dbSNP et IARC TP53. Des filtres étaient enfin appliqués pour ne retenir que les mutations exoniques non synonymes ou dans une région d'épissage (site donneur/accepteur) avec une charge allélique supérieure ou égale à 2%. Les polymorphismes retrouvés chez plus de 1% de la population étaient exclus de l'analyse.

Un fichier récapitulatif des statistiques de qualité est également généré par le pipeline d'analyse avec la distribution de couverture, les couvertures médiane et moyenne et la liste des exons avec des couvertures inférieure à 500X. Des critères de reséquençage ont été définis en cas (i) de profondeur médiane inférieure à 800X, (ii) de moins de 98% de couverture à 200X ou (iii) en cas de couverture <500X sur une région hotspot.

Les bonnes performances du séquençage et de l'analyse bioinformatique étaient vérifiées à chaque run par l'analyse d'un contrôle interne de qualité commercial regroupant plus de 20 mutations somatiques à détecter dont des variants de charge allélique faible et des insertions/délétions (Horizon Myeloid).

### *Révision et classification des variants*

La révision des mutations et leur classification selon leur pathogénicité suspectée ont été réalisées par un groupe de biologistes moléculaires membres du FIM :

- CHU Angers (D. Luque Paz, L. Cottin et A. Beucher)
- CHU Brest (A. Chauveau et E. Lippert)
- CHU Bordeaux (O. Mansier)
- APHP St Louis (E. Verger et B. Cassinat)
- APHP Créteil (I. Sloma)
- Marseille Institut Paoli Calmette (A. Murati et A. Guille)

La révision consistait à vérifier que les mutations détectées n'étaient pas des artéfacts en visualisant les alignements des fichiers BAM sur le logiciel IGV. Pour la classification des variants, un consensus sur les critères de pathogénicité a été défini lors d'une réunion du groupe d'analyse (tableau XII).

Pour cette analyse multicentrique, la gestion des données et leur envoi de manière sécurisée était coordonnée par Angers. Les données de séquençage (fichier BAM, fichier de qualité et tableau de variants) étaient envoyées par groupe de 15 à 20 patients à chaque centre du groupe d'analyse. A chaque envoi, au moins 2 patients étaient communs pour tous les centres afin de valider la reproductibilité de cette analyse.

Les fichiers avec les variants revus et classés étaient enfin renvoyer au CHU d'Angers où une dernière vérification/harmonisation était manuellement réalisée avant la compilation de toutes les mutations de l'ensemble de la cohorte. Pour les cas difficiles à classer, des réunions d'harmonisation du groupe d'analyse étaient prévues.

Tableau XII : Classification des variants selon leur pathogénicité suspectée

<p>Probablement délétère A</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variant non-sens ou frameshift entraînant une protéine tronquée</li> <li>- Variant décrit dans les hémopathies myéloïdes (COSMIC) comme somatique</li> <li>- Variant avec effet fonctionnel démontré (y compris épissage)</li> </ul>
<p>Possiblement délétère B</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variant non probablement délétère, avec une MAF &lt;0,1% et une VAF &lt;40% ou &gt;60% (origine somatique probable)</li> </ul>
<p>Variant de signification indéterminé C</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Variant non probablement délétère avec VAF entre 40 et 60% (probable SNP rare)</li> <li>- Variant avec MAF &gt; 0,1%</li> </ul>

MAF : minor allele frequency (fréquence de l'allèle dans les populations de gnomAD)

## Statistiques

Pour les variables qualitatives, les résultats sont rapportés en effectifs et pourcentages puis ont été comparés en utilisant le test de Chi-deux de Pearson (ou le test exact de Fisher). Pour les variables quantitatives, les résultats sont rapportés en moyenne et écart-type (ou en médiane avec 25° et 75° centile) puis ont été comparés en utilisant le test t de Student (ou le test non paramétrique de Mann-Whitney). Les variables étaient représentées graphiquement par des violins plots qui associent un boxplot avec la médiane et les premier et troisième interquartiles à un diagramme de densité de Kernel pour la distribution de la variable. Les associations entre les mutations et avec les caractéristiques clinico-biologiques ont été étudiées par différentes méthodes : PLS-DA, random forest et modélisation par réseau bayésien. Les courbes de survie étaient réalisées selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées par un test de log-rank. L'estimation des relations entre les mutations et les critères de jugement est basée sur les modèles de régressions univariées et multivariées pour traiter les facteurs de confusion potentiels. Chaque modèle a été adapté à la nature du critère de jugement. Dans chaque cas, l'ensemble des covariables, sélectionnées par les modèles univariés comme étant liés au devenir au seuil de 10%, a été pris en compte dans les modèles multivariés. Les termes d'interaction ont été inclus et testés à l'aide de tests d'interaction qualitative et quantitative développés par Gail et Simon. Pour les critères censurés (progression), l'association a été testée en utilisant le test du log-rank et la mesure d'effet (log HR) estimée par des modèles de Cox ; en cas de risques concurrents (compétitifs), les approches non paramétriques pour risques concurrents ont été utilisées (estimations de la fonction de l'incidence cumulative non paramétriques avec test de Gray, modèles de Cox cause spécifique). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

## Résultats

### Echantillons et qualité de Séquençage

Les données de séquençage de 479 échantillons de patients de l'observatoire des myélofibroses ont finalement été retenus pour l'analyse statistique sur les 497 échantillons centralisés à Angers. Les patients exclus correspondent soit à des diagnostics de myélofibrose réfutés après relecture des biopsies ostéo-médullaires par le GEBOM (Groupe d'Etude des Biopsies Ostéo-Médullaires), révision du dossier clinique et des résultats de NGS ou à des échecs de séquençage. La figure 20 résume les patients retenus et exclus.

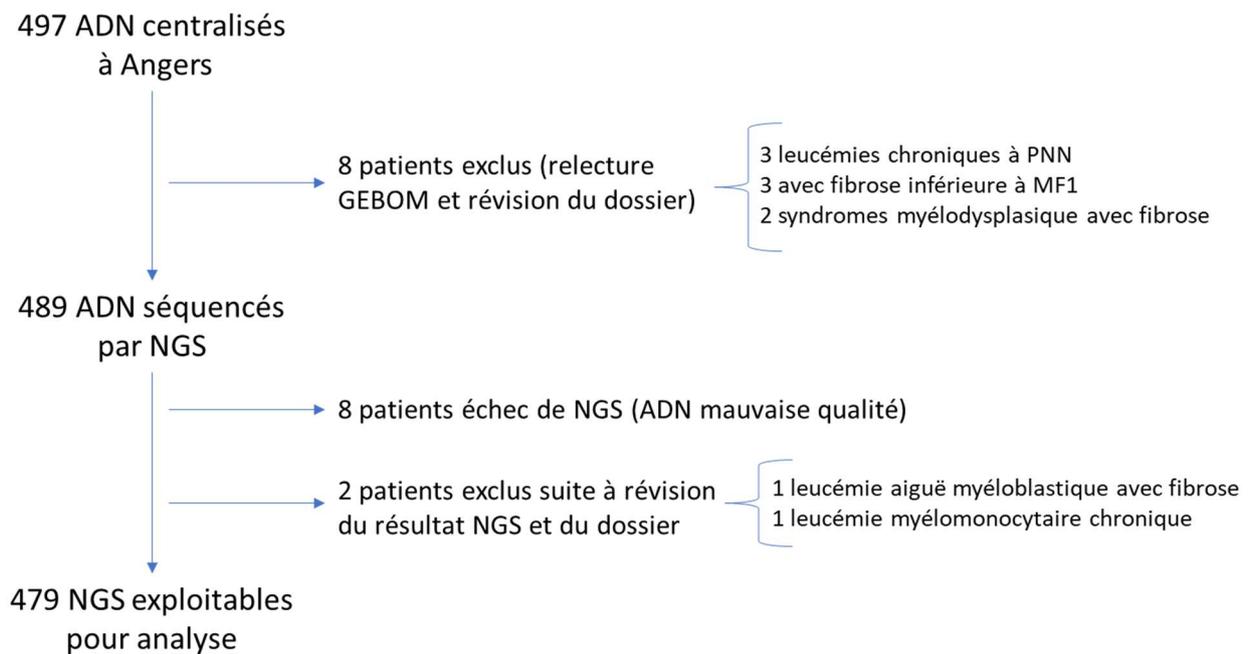


Figure 20 : Flow-chart résumant les échantillons retenus dans l'analyse

La qualité des séquençages générés était très satisfaisante avec une profondeur médiane de 4873X (1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles : [3859-5895]) et un pourcentage médian de base supérieures à 200X de 99.84% [99.72-99.88] dans l'ensemble de la cohorte (figures 21 et 22).

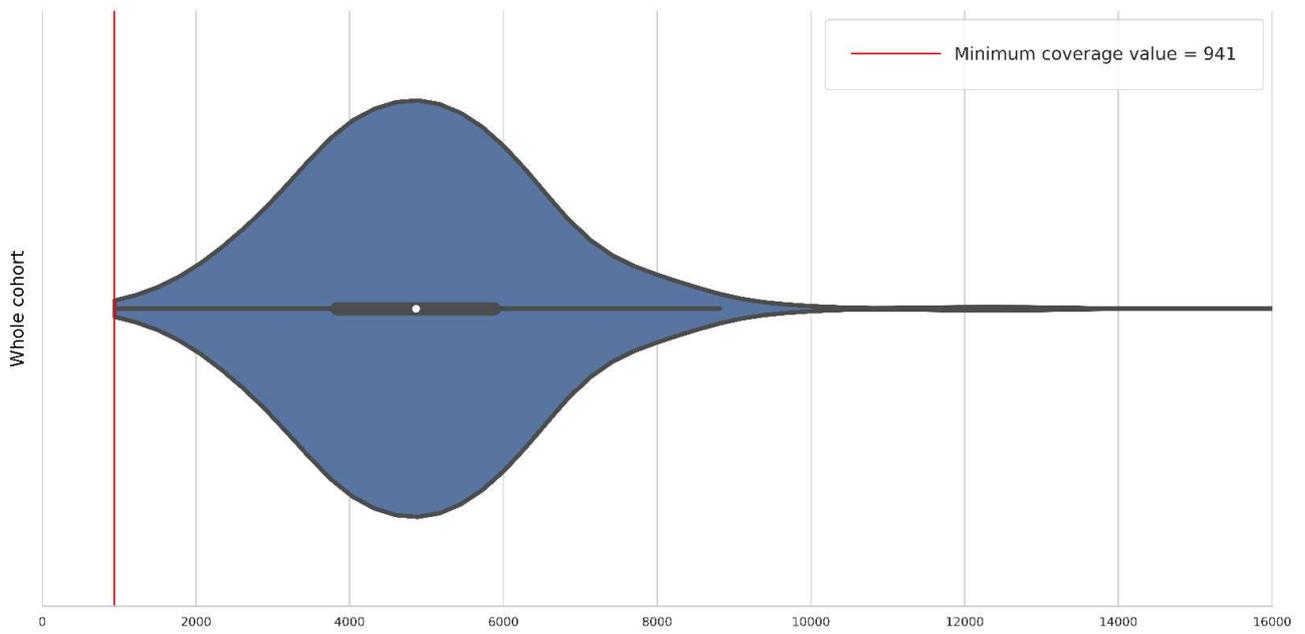


Figure 21 : Distribution de la couverture médiane pour l'ensemble de la cohorte

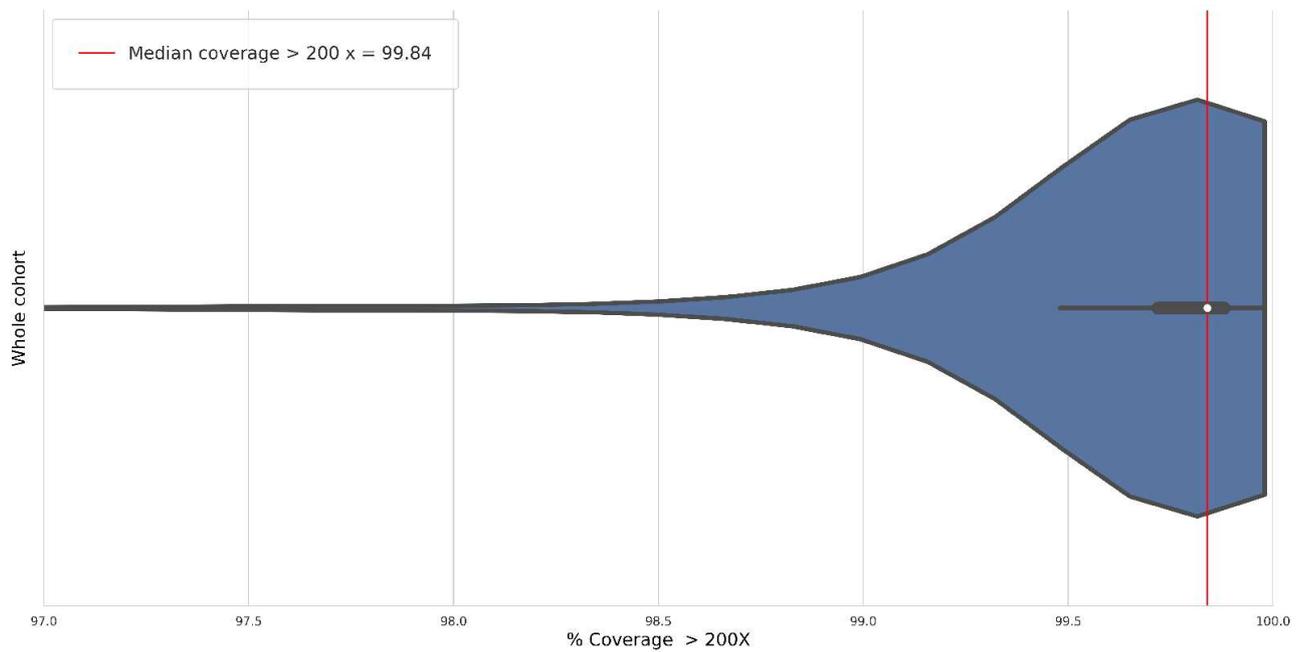


Figure 22 : Distribution de la proportion de bases > 200X pour l'ensemble de la cohorte

## Analyse des données NGS par le groupe des biologistes du FIM

Six échantillons ont été analysés par l'ensemble des centres du groupe d'analyse pour un total de 59 variants. Nous avons retrouvé une concordance de 97% pour l'identification des mutations ou des artéfacts. La seule discordance concernait un faible variant de BCORL1 noté artéfact par un centre alors que tous les autres le retenait. Cette discordance a eu lieu lors du premier envoi de fichier et donc avant les réunions d'harmonisation du groupe qui ont pu contribuer à améliorer la concordance.

Concernant la concordance dans la classification de la pathogénicité des variants, celle-ci était de 87% auquel on peut ajouter 8% de variants classés 'à discuter'. Les discordances portaient sur des cas mineur avec souvent une extrapolation de la pathogénicité de variants d'après les données de la littérature non prise en compte dans les critères de la classification. Par exemple, le variant non décrit de *CBL* c.12222T>G ; p.W408G à 35% de charge allélique classé B ('Possiblement délétère') par 5 centre et A ('Probablement délétère') par 1 centre. La justification de cette discordance était que la position W408 de *CBL* présente des mutations récurrentes dans les syndromes myéloprolifératifs. Ce variant a été discuté en réunion d'harmonisation et a été reclassé en A ('Probablement délétère') tout comme les autres variants de la cohorte à cette position. La classification de l'ensemble des variant a été vérifiée dans un second temps de manière centralisé au CHU d'Angers.

Un total de 1865 mutations additionnelles étaient détectées dans l'ensemble de la cohorte avec 1332 mutations uniques. Ces mutations se répartissaient selon notre classification de pathogénicité en 861 probablement délétères, 179 possiblement délétères et 825 de signification indéterminée.

Après discussion du groupe de moléculaires, il a été décidé d'exclure, parmi les mutations de signification indéterminée, les variants ayant une fréquence d'allèle supérieure ou égale à 0,01% dans une population de la base gnomAD (figure 23). Ce choix a pour but d'éliminer les polymorphismes certains de cette catégorie.

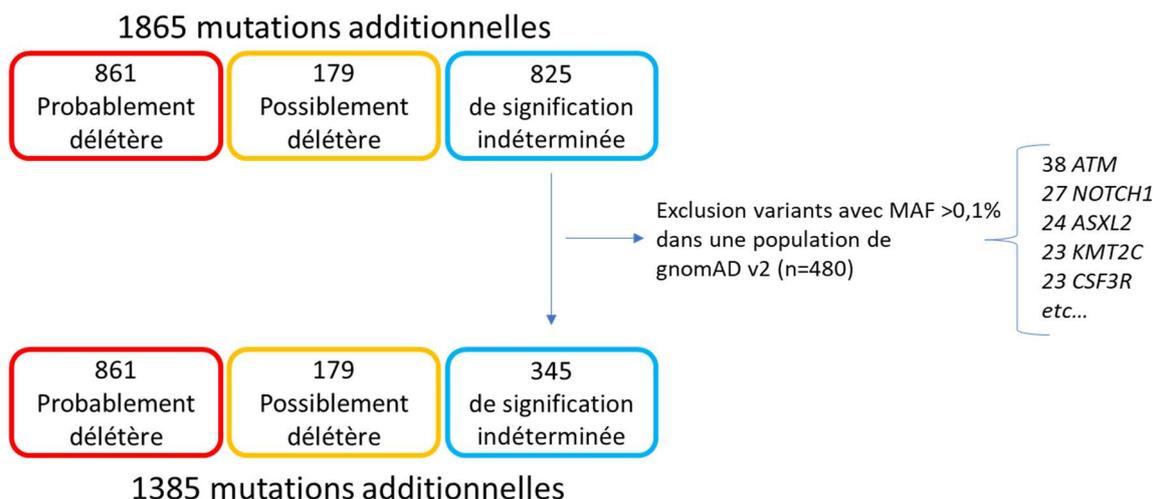


Figure 23 : Classification des variants détectés par NGS

## Données clinico-biologiques de la cohorte

Les 479 patients retenus dans l'analyse se répartissaient en 306 cas de myélofibrose primitive et 173 cas de myélofibrose secondaire (69 post-PV et 104 post-TE). Les principales données clinico-biologiques décrivant la cohorte sont présentées dans le tableau XIII. Avec 4 ans de suivi médian, 56 évolutions en leucémie aiguë et 194 décès ont été observés. Le risque de décès était constant au cours du suivi tandis que les transformations leucémiques survenaient surtout à partir de 50 mois de suivi (figure 24).

Tableau XIII : Description de la cohorte de myélofibroses

Patient characteristics	Whole cohort (n=479)	Primary myelofibrosis (n=306)	Secondary myelofibrosis (n=173)
Post-PV myelofibrosis (n) Post-ET myelofibrosis (n)	-	-	69 104
Sex (M/F)	306/173	217/89	89/84
Age at diagnosis (year) [range]	66 [18-89]	66 [18-88]	66 [30-89]
Hemoglobin at diagnosis (g/dL) [range]	11,1 [6,2-18]	11,1 [6,3-18]	11,3 [6,2-17,7]
Platelets at diagnosis (10 <sup>9</sup> /L) [range]	272 [16-999]	250 [16-999]	326 [19-999]
Leucocytes at diagnosis (10 <sup>9</sup> /L) [range]	9,7 [1,3-76]	9,5 [1,7-76]	9,8 [1,3-68]
Driver mutation n(%)			
<i>JAK2V617F</i>	309 (65%)	188 (61%)	121 (70%)
<i>CALR</i>	110 (23%)	73 (24%)	37 (21%)
<i>MPL</i>	25 (5%)	19 (6%)	6 (3%)
Double mutation	8 (2%)	4 (1%)	4 (2%)
Triple negative	27 (6%)	22 (7%)	5 (3%)
Lille Score n(%)			
Low risk		190 (62%)	
Intermediate risk		91 (30%)	
High risk		25 (8%)	
IPSS classification n(%)			
Low risk		53 (17%)	
Intermediate-1 risk		104 (34%)	
Intermediate-2 risk		89 (29%)	
High risk		60 (20%)	
Events			
Follow-up (median, years)	4 [0,5-15]	5 [0,5-15]	4 [0,5-13]
AML transformation n(%)	56 (12%)	40 (13%)	16 (9%)
Deaths n(%)	194 (41%)	131 (43%)	63 (36%)
Allograft n(%)	50 (10%)	35 (11%)	15 (9%)

PV: polycythemia Vera; ET: essential thrombocythemia; AML: acute myeloid leukemia

All values were reported as mean [range]

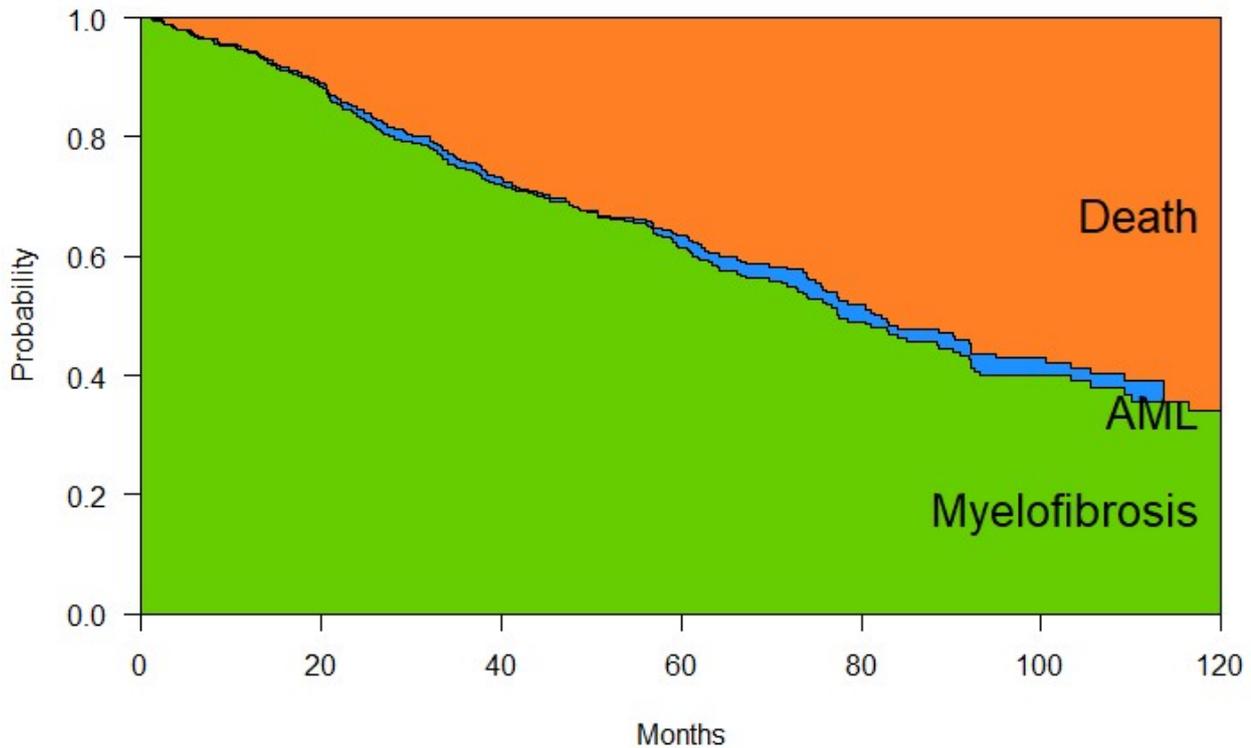


Figure 24 : Evènements (Décès et transformation en leucémie aiguë) dans la cohorte

AML : Leucémie aiguë myéloblastique

### Profil mutationnel

Les mutations promotrices chez les 479 patients étudiés se distribuaient en 309 *JAK2V617F* (65%), 110 *CALR* (29%), 25 *MPLW515* (5%) et 8 doubles mutés (2%, 4 *JAK2V617F* + *MPL*, 2 *CALR* + *MPL*, 1 *JAK2 V617F* + *JAK2* Exon12 et 1 *JAK2 V617F* + *CALR*). Vingt-sept patients étaient triple négatifs. Pour les analyses de survie, les patients doubles mutés sont considérés comme ayant la mutation promotrice avec la plus forte charge allélique. La distribution de la charge allélique des mutations promotrices selon le type de myélofibrose est représentée sur la figure 25. On observait une distribution bimodale de la charge allélique de la mutation *JAK2V617F* avec des valeurs plus élevées dans les myélofibroses secondaires. Les mutations de *CALR* avec une charge allélique supérieure à 50%, ce qui correspondait à la présence certaine d'un clone homozygote, étaient uniquement retrouvées dans des cas de myélofibrose secondaire.

En termes de mutations additionnelles, les gènes les plus souvent mutés sont les gènes *ASXL1*, *TET2*, *SRSF2* et *U2AF1* (figure 26). Certains gènes comme *ATM*, *KMT2D*, *KMT2C* ou *NOTCH1* présentent très majoritairement des mutations de signification indéterminée (figure 26). *ASXL1* était le gène le plus muté dans la cohorte puisque 38% des patients présentaient au moins une mutation de ce gène (figure 26). Quarante-six patients (9.6%) n'avaient aucune mutation additionnelle détectable. Concernant les patients triple négatifs, au moins une mutation additionnelle a pu être détectée dans 85% des cas (23/27).

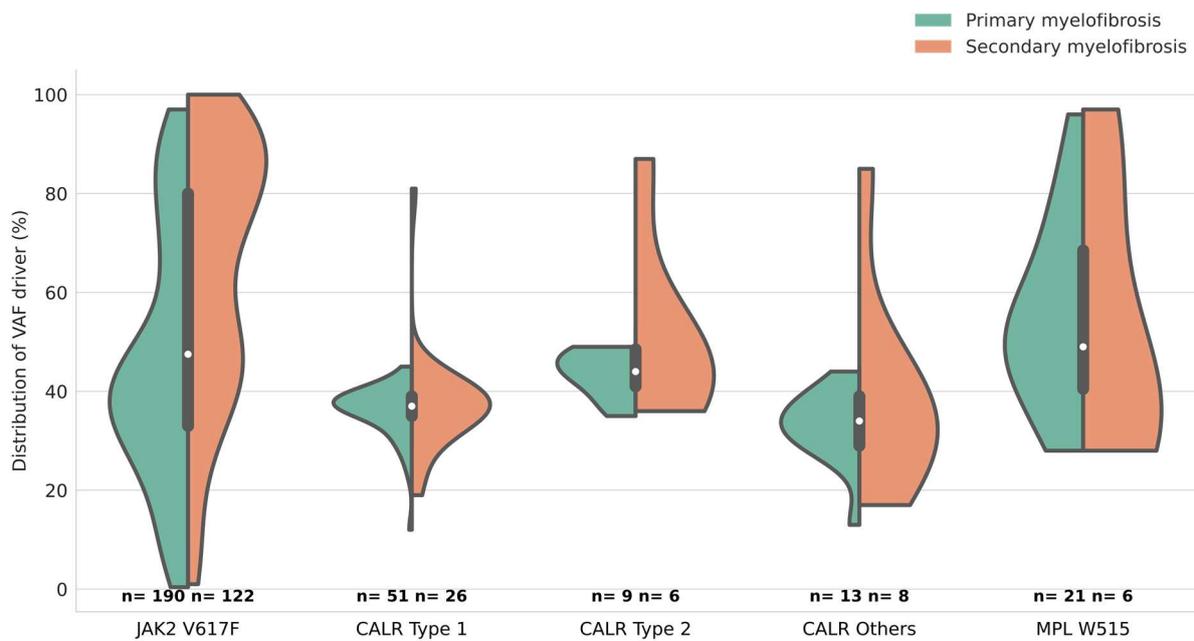


Figure 25 : Charges alléliques des mutations promotrices selon le type de myélobiose

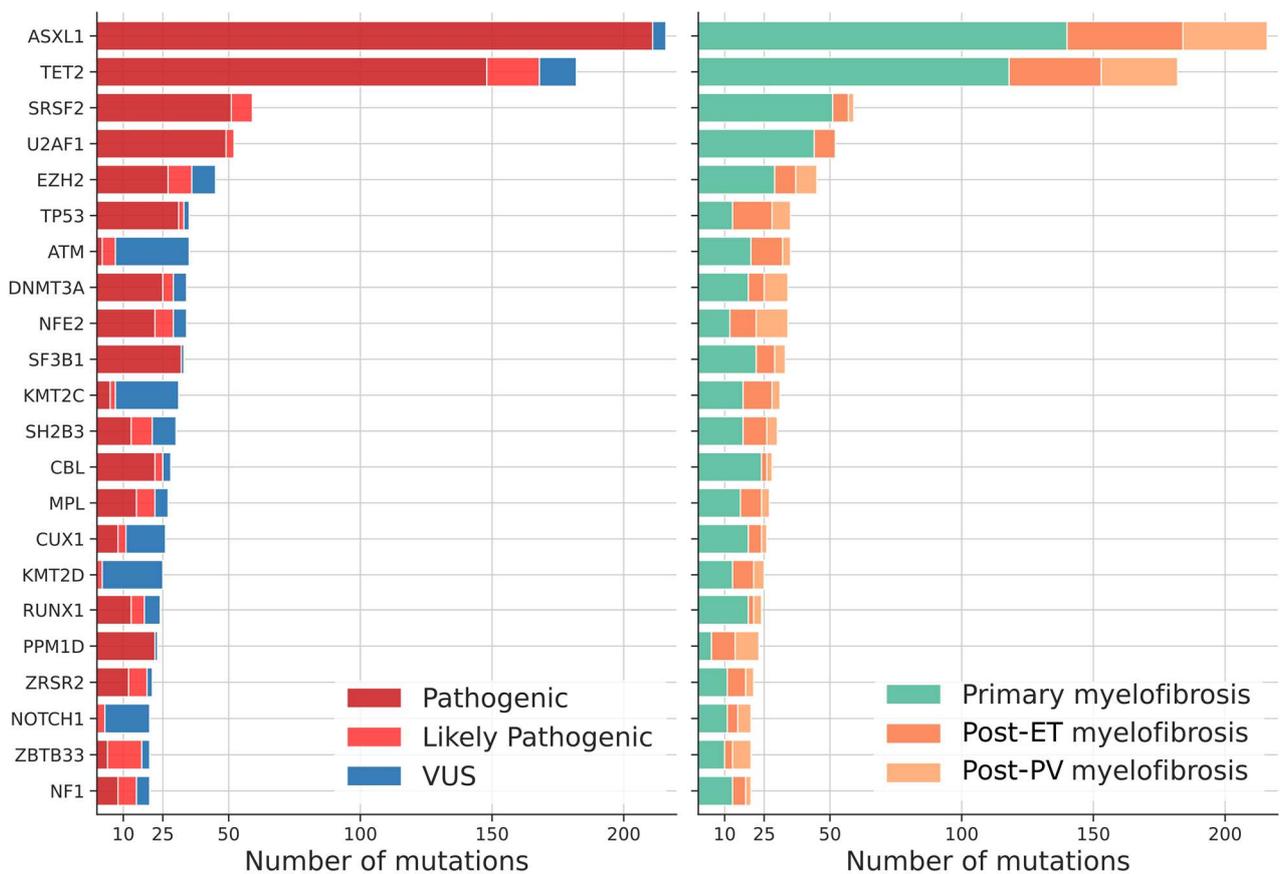


Figure 26 : Nombre de mutation additionnelles par gène

Seuls les gènes avec 20 mutations ou plus dans l'ensemble de la cohorte sont représentés. Le panel de gauche montre la répartition des mutations selon la classification de pathogénicité et le panel de droite selon le type de myélobiose.

La distribution des charges alléliques des mutations additionnelles présentait des profils différents selon les gènes (figure 27). Pour certains gènes les charges alléliques étaient surtout centrées autour de 50%, c'est le cas pour *ATM* ou *KMT2C* pour lesquels la majorité des mutations étaient classées comme de signification inconnue et donc potentiellement des polymorphismes rares mais aussi pour des gènes comme *SRSF2* ou *U2AF1* où les variants étaient des mutations récurrentes sur les hotspots connus. La présence de mutation avec une charge allélique supérieure à 50%, ce qui signe le passage à l'homozygotie, n'était pas observée pour tous les gènes. Ce phénomène était en particulier retrouvé pour les mutations de *EZH2*, *SH2B3*, *MPL* et *TP53* (figure 27). Enfin certaines gènes présentaient une distribution bimodale de la charge allélique de leurs mutations comme *ASXL1*, *TET2* et *DNMT3A*. Pour ces gènes certaines mutations étaient détectées à un faible charge allélique et représentaient un sous-clone tandis que d'autres étaient détectées à une charge allélique entre 30 et 50% et correspondaient donc vraisemblablement au clone tumoral majoritaire.

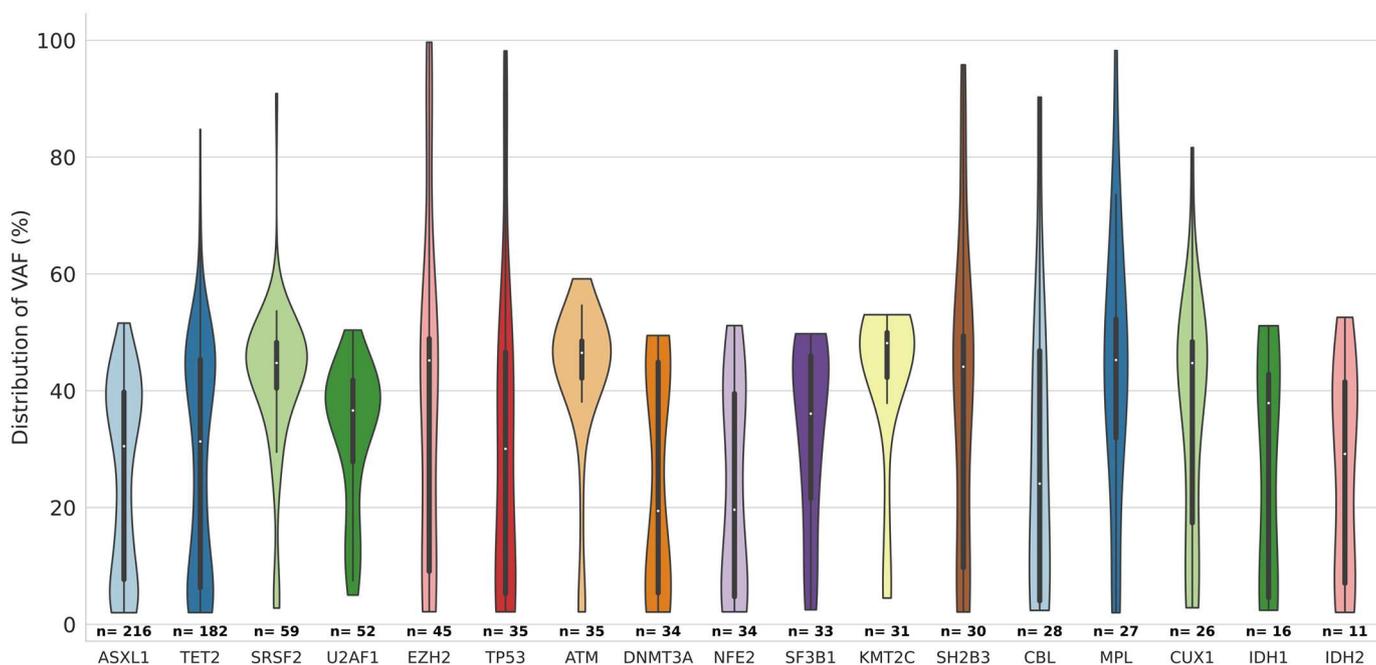


Figure 27 : Distribution de la charge allélique des mutations additionnelles selon le gène muté

Les gènes avec plus de 25 mutations dans la cohorte sont représentés ainsi que les gènes *IDH1* et *IDH2* du fait de leur rôle pronostique décrit.

Les associations entre les mutations sont représentées à l'aide d'un réseau bayésien sur la figure 28. Les mutations promotrices étaient mutuellement exclusives. Les mutations d'*ASXL1* étaient fréquemment associées aux mutations d'*EZH2*, *U2AF1* et *SRSF2*. Les mutations de *TP53* n'étaient associées à aucune mutation en dehors de *SH2B3* et formaient donc un groupe mutationnel distinct.

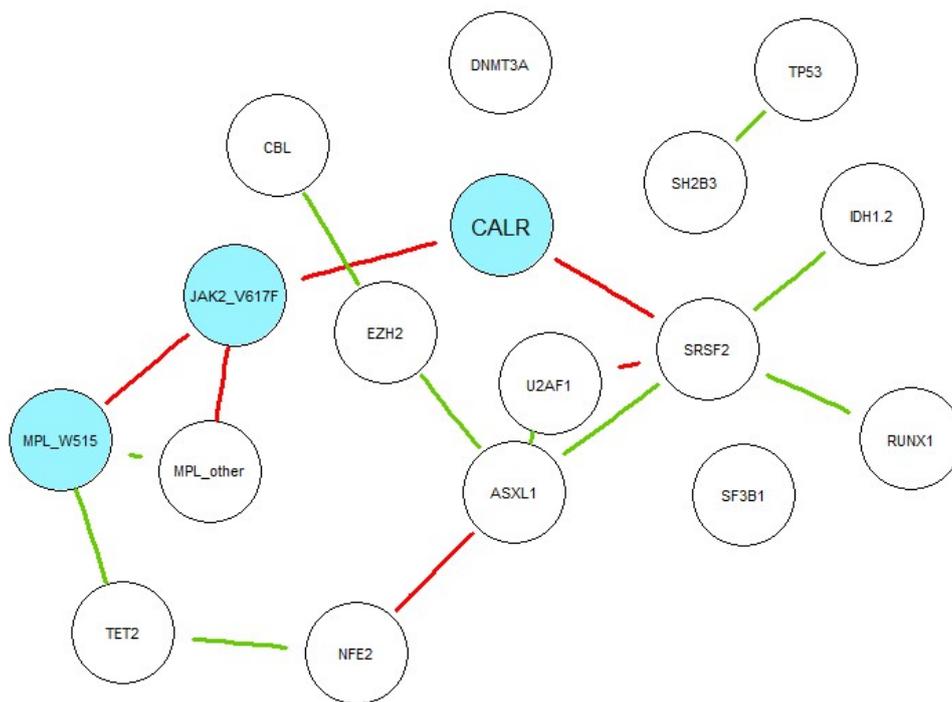


Figure 28 : Réseau bayésien du profil mutationnel de l'ensemble de la cohorte

Les traits rouges représentent les mutations mutuellement exclusives tandis que les traits verts représentent les mutations associées. Les cercles bleus correspondent aux mutations promotrices

### Association entre le profil mutationnel et le phénotype

Nous avons retrouvé une association significative entre l'âge au diagnostic plus élevé et le nombre de mutation additionnelles (figure 29,  $p < 0.001$ ).

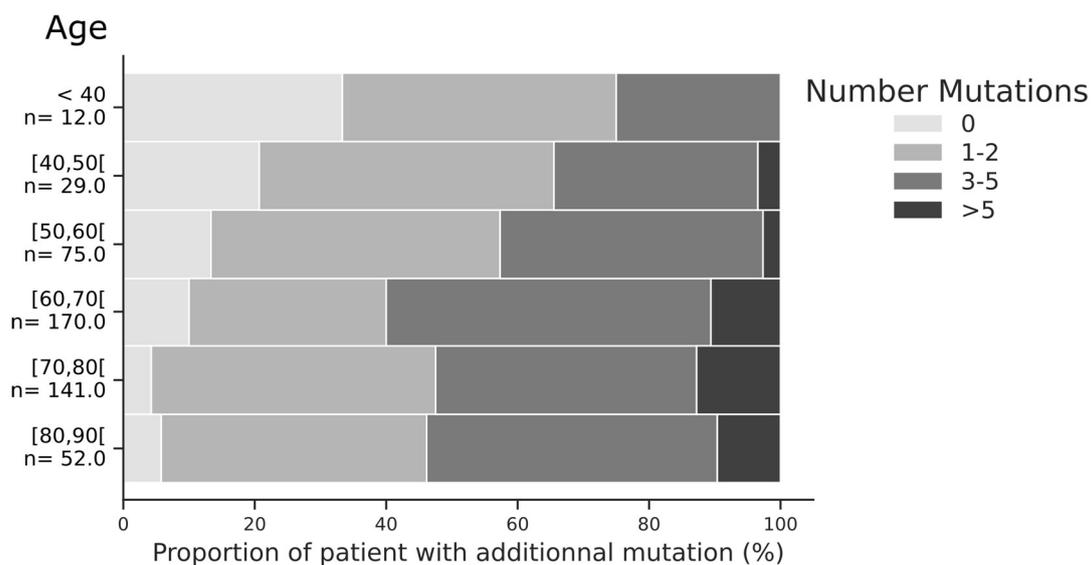


Figure 29 : Nombre de mutation additionnelles selon l'âge dans l'ensemble de la cohorte

Pour évaluer notre hypothèse d'un impact pronostique de la charge allélique des mutations additionnelles nous avons représenté celle-ci pour les gènes connus avec un impact pronostique et selon que les patients aient présenté ou non un évènement (figure 30). Ainsi la charge allélique au diagnostic pour certains gènes était différente entre les patients n'ayant pas eu d'évènement et ceux ayant eu un évènement. Par exemple, elle était plus élevée chez les patients décédés au cours du suivi pour les gènes *ASXL1*, *BCOR* ou *ZRSR2* (figure 30).

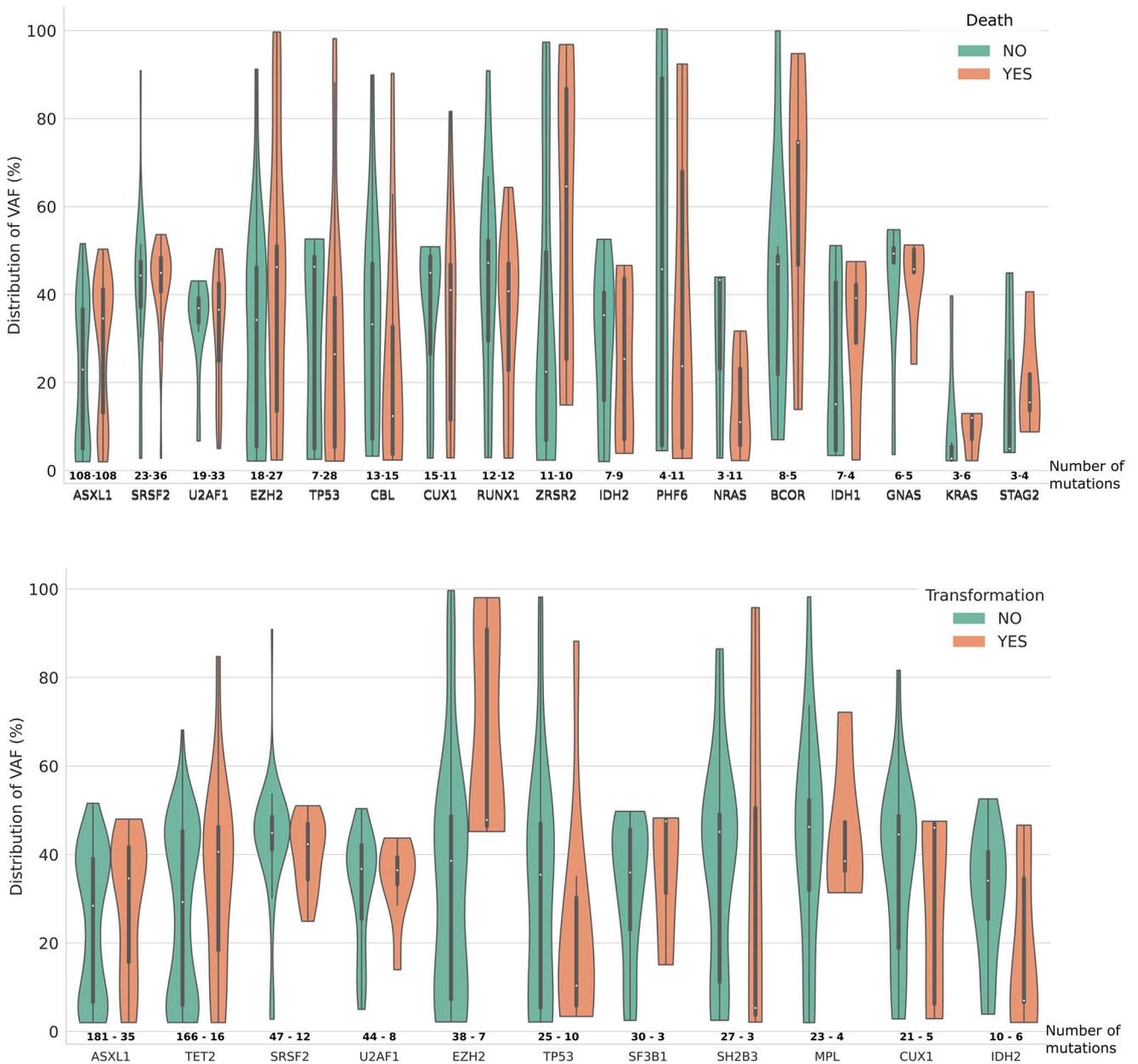


Figure 30 : Distribution de la charge allélique des mutations additionnelles selon la survenue ou non d'un évènement (décès ou transformation leucémique)

## Discussion et perspectives

Les premiers résultats présentés montrent un profil mutationnel complexe dans cette cohorte avec un nombre médian de 3 mutations additionnelles par patient. Les gènes le plus souvent mutés correspondent à ceux décrit dans la littérature hormis les gènes *ATM*, *KMT2C* et *KMT2D* que nous retrouvons plus souvent mutés. Cependant ces mutations correspondent pour la plupart à des variants de signification inconnue. La prise en compte de la classification des variants dans l'étude du pronostic sera nécessaire pour préciser le rôle de ces mutations.

Pour l'étude de l'impact pronostique des mutations additionnelles nous réaliserons une analyse de survie par un modèle multi-état prenant ou pas en compte l'allogreffe. Les états et les transitions de ces modèles sont représentés sur les figures 31 et 32. Pour la sélection des gènes inclus comme variables dans ce modèle, deux stratégies sont en cours de réalisation : la première qui consiste à une sélection classique par des tests univariés (Cox) et la seconde qui vise à sélectionner les profils génétiques d'après notre réseau Bayésien et celui proposé par Grinfeld et al. La charge allélique sera également prise en compte lors de ces analyses.

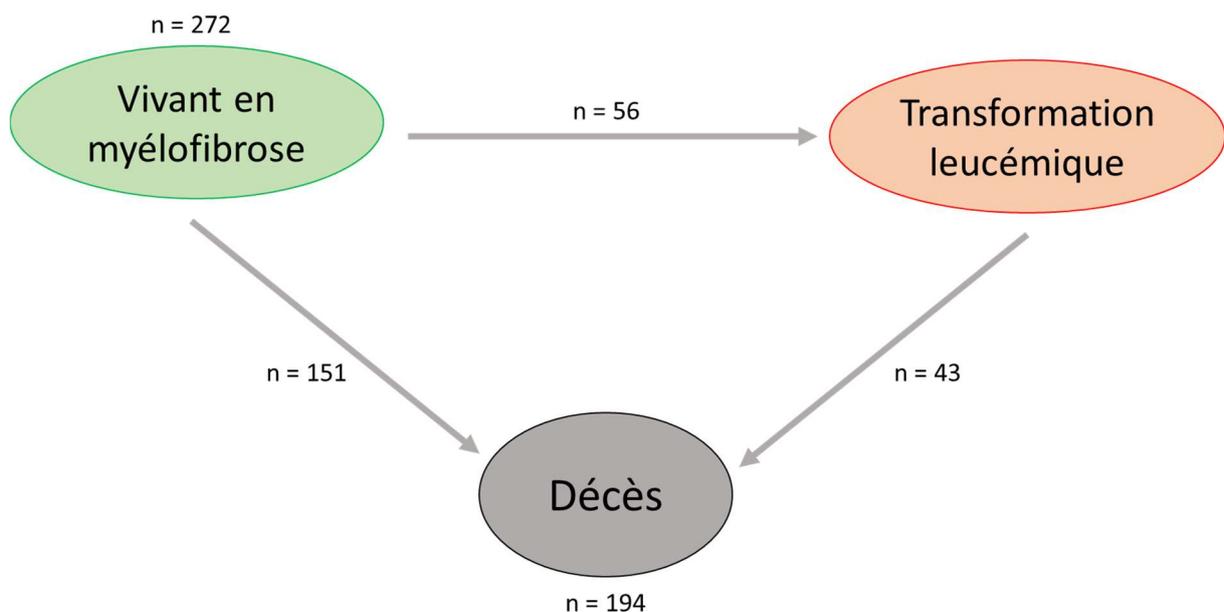


Figure 31 : Transitions du modèle multi-état avec la transformation leucémique et le décès

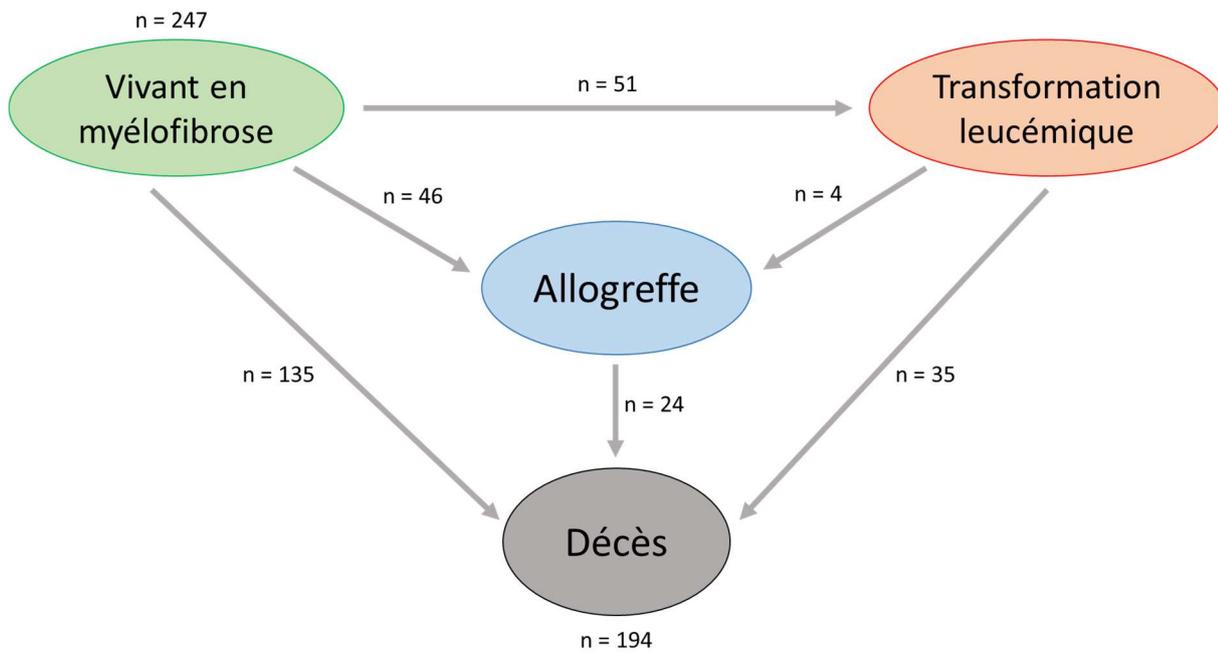


Figure 32 : Transitions du modèle multi-état avec la transformation leucémique, l'allogreffe et le décès

## Article 4 : L'étude génomique des transformations leucémiques de polyglobulies de Vaquez et de thrombocytémies essentielles montre une association entre les profils moléculaires et le délai de survenue de la transformation

*Leukemic Evolution of Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia: Genomic Profiles Predict Time to Transformation*

**D. Luque Paz**, R. Jouanneau-Courville, J. Riou, JC. Ianotto, F. Boyer, A. Chauveau, M. Renard, JC. Chomel, E. Cayssals, P. Gallego-Hernanz, C. Pastoret, L. Cottin, C. Orvain, S. Thépot, JM. Chrétien, A. Deslile, N. Ifrah, O. Blanchet, E. Lippert, M. Hunault-Berger and V. Ugo

Article soumis

Les transformations leucémiques des syndromes myéloprolifératifs sont des complications graves associées à un pronostic très péjoratif. Ces complications sont rares dans la polyglobulie de Vaquez et la thrombocytémie essentielle avec une incidence cumulée de 2 à 3% à 10 ans de suivi. Toutefois, le délai de transformation leucémique est très variable d'un patient à un autre et l'identification des patients à haut risque d'évolution est un des enjeux actuels afin de pouvoir adapter le traitement et le suivi.

Dans ce travail, soutenu par l'appel d'offre interne du CHU d'Angers, nous avons étudié le profil mutationnel de 49 transformations leucémiques de polyglobulie de Vaquez ou de thrombocytémie essentielle par séquençage NGS d'un panel de 52 gènes. En utilisant une classification hiérarchique basée sur la charge allélique des mutations additionnelles, nous avons identifié trois groupes moléculaires associés à différents délais de transformation leucémique.

Les transformations à court terme étaient associées à un profil mutationnel complexe avec des mutations des gènes *IDH1/2*, *RUNX1* et *U2AF1*. A l'inverse, les transformations survenant le plus tardivement (au-delà de 12 ans de suivi) étaient associées à un profil mutationnel moins complexe avec des mutations de *TP53*, *ATM* et *BCORL1*. Chez 29 patients nous avons également étudié le profil mutationnel au diagnostic ou à défaut lors de la phase chronique. Certaines mutations étaient déjà présentes dès le diagnostic en particulier les mutations des gènes *IDH1/2*, *DNMT3A*, *SRSF2* et *U2AF1* ce qui correspondait donc à un profil moléculaire de haut risque dès la phase chronique. D'autres mutations comme celles de *TP53* étaient également parfois présentes dès le diagnostic mais à une très faible charge allélique le plus souvent inférieure à 2%.

Nos résultats suggèrent que l'évolution leucémique de la PV et de la TE est médiée par des mécanismes moléculaires différents dans les transformations à court terme ou à long terme.

# Leukemic Evolution of Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia: Genomic Profiles Predict Time to Transformation.

Damien Luque Paz<sup>1,2,3,4</sup>, Rébecca Jouanneau-Courville<sup>3,4</sup>, Jérémie Riou<sup>5</sup>, Jean-Christophe Ianotto<sup>4,6</sup>, Françoise Boyer<sup>4,7</sup>, Aurélie Chauveau<sup>4,8,9</sup>, Maxime Renard<sup>1,2,3,4</sup>, Jean-Claude Chomel<sup>4,10</sup>, Emilie Cayssals<sup>4,11</sup>, Pilar Gallego-Hernanz<sup>4,11</sup>, Cédric Pastoret<sup>4,12</sup>, Laurane Cottin<sup>1,2,3,4</sup>, Corentin Orvain<sup>4,7</sup>, Sylvain Thépot<sup>1,4,7</sup>, Jean-Marie Chrétien<sup>13</sup>, Alicia Deslile<sup>1,3,4</sup>, Norbert Ifrah<sup>1,2,4,7</sup>, Odile Blanchet<sup>1,2,3,4,14</sup>, Eric Lippert<sup>4,8,9</sup>, Mathilde Hunault-Berger<sup>1,2,4,7</sup>, Valérie Ugo<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Université d'Angers, Inserm, CRCINA, F-49000 Angers ;

<sup>2</sup> Université d'Angers, UFR Santé, Angers, France ;

<sup>3</sup> CHU Angers, Laboratoire d'hématologie, Angers, France ;

<sup>4</sup> Fédération Hospitalo-Universitaire 'Grand Ouest Against Leukemia' (FHU GOAL), France ;

<sup>5</sup> Université d'Angers, INSERM 1066 MINT, Angers, France ;

<sup>6</sup> CHRU Brest, Service d'hématologie clinique, Brest, France ;

<sup>7</sup> CHU Angers, Service des maladies du sang, Angers, France ;

<sup>8</sup> CHU Brest, Laboratoire d'Hématologie, Brest, France ;

<sup>9</sup> Université de Bretagne Occidentale, Brest, France ;

<sup>10</sup> CHU de Poitiers, Service de Cancérologie Biologique, Poitiers, France ;

<sup>11</sup> CHU de Poitiers, Service d'Oncologie Hématologique et Thérapie Cellulaire, Poitiers, France ;

<sup>12</sup> Laboratoire d'Hématologie, Pôle de Biologie, CHU de Rennes, France ;

<sup>13</sup> CHU Angers, DRCI Cellule de Gestion des Données et Evaluation, Angers, France

<sup>14</sup> CHU Angers, Centre de ressources biologiques, BB-0033-00038, Angers, France.

## Corresponding author:

Damien Luque Paz

Laboratoire d'Hématologie

Institut de Biologie en Santé, 4 Rue Larrey

CHU ANGERS : 49933 ANGERS Cedex 9 France

Tel: 0033241355353

Fax: 0033241355599

Mail: damien.luquepaz@chu-angers.fr

Keywords: myeloproliferative neoplasms, acute myeloid leukemia, somatic mutations, TP53

Number of Table: 2; Number of Figures: 4

Number of words: 3057

## Abstract

While among myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera and essential thrombocythemia are the two entities associated with the most chronic course, leukemic evolution occurs rarely but have a grim prognosis. The interval between diagnosis and leukemic evolution is highly variable from few years to more than 20 years. We performed a molecular evaluation of 49 leukemic transformation of polycythemia vera and essential thrombocythemia by targeted next generation sequencing. Using a hierarchical classification, we identified three molecular groups associated with distinct time to leukemic transformation. Short-term transformations were mostly characterized by a complex molecular landscape and mutations in *IDH1/2*, *RUNX1* and *U2AF1* genes whereas long-term transformations were associated to mutations in *TP53*, *ATM* and *BCORL1* genes. Studying paired chronic phase and transformation samples, we detected some mutations of leukemic transformation at the chronic phase either at a significant allele burden (short-term transformation) or at a very low-allele burden (especially *TP53* mutations). However, other mutations were not detected even 1 year before leukemic transformation. Our results suggest that leukemic transformation of PV and ET might be driven by distinct time-dependent molecular mechanisms.

## Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are acquired clonal disorders characterized by a proliferation and an accumulation of mature blood cells. Classic Philadelphia-negative MPN include polycythemia Vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). PV and ET are the most indolent diseases with a median overall survival over 12 and 15 years, respectively (Tefferi et al., 2014a). The prognostic of these diseases is related to two major complications: (i) thrombosis in the short and mid-term and (ii) hematological transformations on the long-term. Among hematological transformations, evolution to secondary acute myeloid leukemia (AML) is associated with an extremely poor prognosis with a median overall survival below 6 months (Mesa et al., 2005; Tam et al., 2008; Tefferi et al., 2018a). The incidence of leukemic transformation of PV and ET lies between 2 to 5% at 15 years (Passamonti et al., 2008; Tefferi et al., 2013). The interval between diagnosis and leukemic progression is highly variable from one patient to another, from few months/years to more than 20 years and the identification of high risk patients is a current unsolved issue (Cuthbert and Stein, 2019; Mesa et al., 2005; Mollard et al., 2018; Tam et al., 2008).

Previously reported risk factors for leukemic transformation in PV and ET include older age (>60, 65 or 70 according to studies), anemia, leukocytosis, thrombocytopenia, thrombocytosis >1000G/L or abnormal karyotype (Finazzi et al., 2005; Gangat et al., 2007b; Passamonti et al., 2008; Tefferi et al., 2013, 2018a). In ET, triple negative patients seem to have a slightly higher risk of leukemic evolution compared to classical driver mutations (Alvarez-Larrán et al., 2017). Some additional mutations at diagnosis has also been associated with leukemic evolution. Recently, Campbell's group has proposed a molecular prognostic classification in eight classes for all MPN (Grinfeld et al., 2018), where both *TP53* mutations and mutations in chromatin/spliceosome (including *ASXL1*, *EZH2*, and *SRSF2*) were associated with a higher risk of leukemic evolution. In another recent study, a high risk group included patients with PV and ET with mutations of *SRSF2* for PV and *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* and *TP53* for ET (Tefferi et al., 2020).

Leukemic transformations are characterized by mutations in *TP53*, *ASXL1*, *RUNX1*, *EZH2*, *IDH1/2* and *SH2B3* genes (Courtier et al., 2017; Harutyunyan et al., 2011; Lasho et al., 2018; Pardanani et al., 2010). These mutations may be acquired only at leukemic transformation or could already be detectable at the chronic phase although at a very low level (Lundberg et al., 2014b; Rampal et al., 2014b). The driver mutation *JAK2V617F* can also disappear during the leukemic transformation and thus reflect a clonal evolution (Beer et al., 2010). However, the genetic mechanisms driving this evolution are not completely clarified.

We studied a multicentric cohort of 49 post-PV/ET AML at the time of leukemic transformation and at the chronic phase by next-generation sequencing (NGS). We identified a molecular classification of leukemic transformation associated with different time to transformation.

# Material and Methods

## *Patients and samples*

Patients from 3 French university hospitals (Angers, Brest and Poitiers) were included if they had PV or ET with leukemic evolution and DNA sample available at the time of leukemic evolution. The leukemic evolution was defined by marrow or peripheral blood blast counts above 20%. Patients treated either with busulfan or phosphorus 32 were excluded. A total of 49 patients were included in the study. Molecular analyses were performed at the leukemic transformation and a paired diagnostic or chronic phase was also analysed, if available. Chronic phase was defined as patient without progression to myelofibrosis or myelodysplasia and without cytopenia or circulating blast. If the diagnostic sample was not available, the oldest sample in chronic phase was studied. For leukemic stage, the sample with the highest blast's infiltration was studied. For 7 patients, additional samples obtained during follow-up, before leukemic transformation, were also analysed.

## *Next Generation Sequencing*

NGS for all coding exons of 52 genes was performed using a HaloPlexHS custom panel (Agilent Technology, Santa Clara, USA). Library preparation and sequencing using NextSeq500 (Illumina, San Diego, CA, USA) were performed according to the manufacturer's instructions (details in Supplemental Data). Nonsynonymous coding variants were retained when Variant Allele Frequency (VAF) was greater than 2% and coverage of called regions was set to 50. Somatic mutations were then classified according to their putative impact in three groups: "deleterious", "probably deleterious" and "variant of undetermined significance" variant (according to the recommendations of the American Society of Genetics (Richards et al., 2015) ; Table SI).

## *Statistics*

Statistical analysis was performed using R software (version 3.5.1, [www.R-project.org](http://www.R-project.org), Vienna, Austria). Subjects' characteristics were reported as numbers and percentages for qualitative variables, and as means  $\pm$  standard deviations or medians [Inter-Quartile Range (IQR)], as appropriated, for continuous variables. Data were compared using the Fisher exact test for categorical variables and Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests for continuous variables. Violin plot aimed to compare the allele burden distribution of mutations, the boxes indicating the 75th percentile (upper horizontal line), median (black bold horizontal line), and the 25th (lower horizontal line) percentiles of the distribution, while a rotated kernel density plot surrounded the boxed (shaded area) on each side. The sparse partial least squares discriminant analysis (sPLS) method was used to predict time to AML progression and to evaluate which additional mutation allows class-separating information (Lê Cao et al., 2009; Tenenhaus, 1998). Then a hierarchical clustering classification was performed on the 2 major's axis of the sPLS using the Euclidean distance (Eisen et al., 1998; Weinstein et al., 1997). Survival analyses were performed using multivariate Cox modeling. Kaplan Meyer estimate for graphical representation of univariate approach was used.

# Results

## *Patient characteristics at the time of diagnosis and at the leukemic transformation*

The clinical and biological characteristics of the 49 MPN patients (24 with PV and 25 with ET, **Figure S1**) are summarized in **Table I**. There was a slight male predominance (61% of patients), especially in PV patients (75% of patients). The median age at the time of MPN diagnosis was 63 years and the time to leukemic progression ranged from 1 to 30 years (median of 12 years). The distribution of driver mutations was as expected for both PV and ET patients (Zoi and Cross, 2017). Of note, all *CALR*-mutated ET showed late transformation beyond 12 years of follow-up. At leukemic transformation, the median age was 74 years-old (range: [38-88]). The blood counts at leukemic transformation showed anemia in 87% (median: 8.6g/dL [4.2-14.1]), thrombocytopenia in 69% (80G/L [9-630]) and neutropenia in 27% of cases (1.85G/L [0.08-38]). High leukocyte count was observed in 39% of cases of leukemic transformation (7.7G/L [0.75-101]). Karyotype was normal in 37 % (13/35) and complex in 26% (9/13) of cases.

## *Mutational landscape of post PV/ET-AML*

A total of 191 additional mutations were detected at the time of leukemic transformation in the whole cohort. All patients carried at least one additional mutation. The median number of additional mutations was 4 [range; 1-8]. The most frequently mutated genes were *TP53*, *TET2*, *RUNX1*, *ASXL1* and *EZH2* (**Figure 1A**). No difference was found in mutated genes between post-PV and post-ET patients. Variant allele frequencies (VAF) were plotted in **Figure 1B**. The median VAF of *TP53* mutations was 47%, 37% of which had a VAF above 60%, indicating loss of heterozygosity. Five patients harbored two *TP53* mutations and for 3 of them the 2 mutations were close together, thus corresponding to different clones or to separate alleles in the same clone. Five of the 9 mutations of *EZH2* had an allele burden above 50%.

Since time to transformation varied significantly between patients, we wondered if this could be related to the genes affected by additional mutations. For this purpose, we performed a sPLS analysis comparing all additional mutations to predict the time to leukemic progression. Each mutation was considered as a quantitative variable based on his allelic burden. This analysis allowed clustering patients according to the time to leukemic transformation. In particular mutations of *TP53*, *BCORL1* and *NRAS* were associated with late transformations whereas mutations of *U2AF1*, *IDH1*, *IDH2*, *EZH2* and *DNMT3A* were associated with an earlier time to transformation (**Figure S2**). Using a hierarchical classification on the sPLS data, we identified three groups of patients associated with different time to leukemic transformation (**Figures 2 and 3A**). Indeed, the median time to transformation was 3, 10 and 21 years for the short-term, intermediate and long-term groups, respectively (**Table II**). For the short-term group, all except one transformation occurred within 5 years of diagnosis whereas for the long-term group no transformation occurred with 12 years of follow-up.

The three groups of leukemic transformation exhibited distinct molecular landscapes as shown in the circos plots (**Figure 3B**). Patients with short-term transformation exhibited a complex molecular landscape with a median of 7

additional mutations. In this group, mutations occurred more specifically in *RUNX1*, *IDH1/2*, *U2AF1* and *TET2* genes (**Table II**). On the other hand, patients with a long-term transformation presented, on the contrary, a less complex molecular landscape with preferential mutations in the *TP53* and *NRAS* genes. Of note no *TP53* mutation was found in short-term transformation while no mutations of *IDH1/2*, *EZH2*, *U2AF1* and *TET2* were found in late transformations. Mutations of *ASXL1* were equally distributed in all three groups.

### ***Mutational landscape of matched diagnosis/chronic phase***

The matched sample harvested at diagnosis or during the chronic phase was studied for 29/49 patients. In detail, DNA from a diagnosis sample was available for 21 patients. For the 8 other patients, we analyzed a sample harvested during the chronic phase of ET or PV that met the criteria described in the material and method section. The driver mutation *JAK2V617F* disappeared at leukemic transformation in 8/23 cases (35%). In the 29 patients studied at diagnosis/chronic phase, a total of 149 mutations were detected at leukemic transformation including 83 (56%) already detected at diagnosis (**Figure S3**). In addition, 14 mutations were also present at diagnosis, but with a low allelic burden and have been identified retrospectively by examination of the bam sequencing files. Mutations of *IDH1/2*, *TET2*, *DNMT3A* and splicing (*SRSF2*, *U2AF1* and *ZRSR2*) genes were frequently present from diagnosis (68% of cases, **Table SII and Figure 4**), whereas mutations in *NRAS* and *RUNX1* were rarely detected at diagnosis. Half the *TP53* mutations were already present at diagnosis/chronic phase, but at low levels: all had a VAF < 5% except for one ET patient with a VAF of 26% at diagnosis. The patient was then treated by pipobroman during the chronic phase and evolved into acute leukemia over 8 years with a marked increase of the *TP53* allele burden (76%). The evolution of allelic burdens between diagnosis/chronic phases and leukemic transformations showed a significant increase in *TP53*, *RUNX1*, *BCOR*, *EZH2* and *ASXL1* mutations (**Figure 4**).

Finally, for 7 patients we analyzed intermediate samples (total of 9 samples) between diagnosis and leukemic transformation to track the onset or increase of mutations (**Table SIII**). For 5 of these patients, several mutations that appeared at leukemic transformation were not detectable 1 to 2 years earlier, in particular in the *TP53* (3 variants) and *RUNX1* (2 variants) genes. In another patient the acquisition of 3 mutations in *ASXL1*, *EZH2* and *NRAS* was detectable 1 year before the evolution to acute leukemia (**Figure S4**). At this time, the patient had an unexplained anemia not related to treatment and bone marrow examination did not fit with a myelodysplastic syndrome.

A patient had 2 *TP53* mutations at the time of diagnosis with very low allele burdens (1.4 and 3%) with one of them increasing 11 years of follow-up to 13% while the other remained stable at 3%. At leukemic transformation one year later, the low-level mutation had disappeared whereas the second increased dramatically to 84%.

### ***Prognosis of post PV/ET-AML***

The median overall survival (OS) of leukemic transformation for the study cohort was 8 months. For patients treated with best supportive care, non-intensive therapy and hematopoietic stem cell transplantation (SCT), the 18-month OS was 9%, 15% and 50% respectively ( $p=0.015$ , **Figure S5**). Patients who received intensive therapy without SCT had a

comparable prognosis to patients treated with best supportive care. The median overall survival between the 3 transformation time groups was 4, 8 and 19 months for intermediate, long-term and short-term groups respectively ( $p=0.24$ , **Figure S6**). Finally, we examined the prognostic impact of additional mutations for genes mutated in at least 10 patients at leukemic transformation (*TET2*, *ASXL1*, *RUNX1* and *TP53*). We observed a decreased survival in patients with *TP53* mutations with a 12-month OS of 18% (vs 48% for *TP53* wild type,  $p=0.05$ , **Figure S7**).

## Discussion

We studied 49 patients with polycythemia Vera or essential thrombocythemia evolving to acute myeloid leukemia and we analyzed the molecular landscape of both leukemic transformation and matched diagnosis or chronic phase if available.

In the present study, *TP53* was the most mutated gene at leukemic transformation with 45% of patients mutated. *TP53* mutations have been previously described in post-MPN acute leukemia and the involvement of p53 inactivation in leukemogenesis has been supported in a mouse model (Harutyunyan et al., 2011; Rampal et al., 2014b). The rate of *TP53* mutations found here is higher than in previous studies (16 to 34%) (Courtier et al., 2017; Lasho et al., 2018; McNamara et al., 2018). This result may be explained by the fact that we studied PV and ET patients and not patients with PMF. Indeed, Courtier et al. found *TP53* mutations in 42% of post-PV/ET AML and in 0/7 post-PMF AML (Courtier et al., 2017). We focused our study in PV and ET because leukemic transformation is a rare and usually late complication and has been less documented. We also assumed that myelofibrosis is a molecularly more complex disease and that the mechanisms of leukemic transformation would be different.

In this study, we propose a classification based on the mutations at the leukemic transformation that considers not only the presence/absence of mutations but also their allelic burden. We assume that VAF of additional mutations better reflects the oncogenic role of each mutation in the leukemic transformation process. Indeed, mutations at a low allelic burden would rather be passenger whereas mutations with high allelic burden would rather be drivers of leukemic transformation. Nevertheless, the only allelic burden could not be sufficient to characterize a driver mutation (Bailey et al., 2018). Using this methodology, we identified three distinct genomic groups associated with distinct transformation times.

For short-term transformations, the molecular landscape was mostly complex with combination of mutations in genes involved in different functions (epigenetic, signalization, splicing or transcription factors). Part of these mutations has been present since the diagnosis, which is consistent with more complex molecular diseases. This observation fit with previous reports which aimed to identify patients with a molecular high-risk disease (Grinfeld et al., 2018; Lundberg et al., 2014b; Luque Paz et al., 2019; Tefferi et al., 2020). All 7 patients of the short-term group exhibited at least one mutation of the chromatin/spliceosome category associated with a higher risk of leukemic evolution in the classification proposed by Campbell group (Grinfeld et al., 2018). In addition to these additional mutations that were present at the time of diagnosis, other mutations were also acquired at the leukemic transformation suggesting a role of these secondary

events as triggers of the transformation. Indeed, *RUNXI* mutations were often acquired at leukemic transformation and are involved in leukemogenesis by inducing a myeloid differentiation block (Gerritsen et al., 2019).

For the intermediate and long-term groups, the molecular landscape was less complex with more specifically mutations on *TP53*, *ATM*, *NRAS* or *BCORL1*. These mutations could be present since diagnosis often at a low level or they could appear during leukemic transformation. Moreover, in some cases, these mutations were not detectable even a few months before the leukemic transformation within the sensitivity limit of our technology which range from 0.1 to 0.5%. The presence of *TP53* mutations at a low level in the chronic phase of MPN has been previously described (Kubesova et al., 2018; Lundberg et al., 2014b; Rampal et al., 2014b). The association between *TP53* mutations and long-term transformation could be due to the necessary inactivation of the second allele of *TP53* for leukemic transformation (Rampal et al., 2014b). Indeed, we found an allele burden higher than 50% or a second mutation in the majority of leukemic transformations with *TP53* mutation.

On the basis of therapy-related AML, the putative role of the cytoreductive treatment in the advantage of selection of *TP53* mutated clone is still discussed (Wong et al., 2014). To date, there is no sufficient argument for this hypothesis in post-MPN AML. In a previous study, *TP53* mutations were found to be associated with hydroxycarbamide > 4 years treatment but this association was lost after age-adjustment (Kubesova et al., 2018). Our finding of *TP53* mutations associated with later transformation could support a role of long-term treatment but it could also be related to other mechanisms such disease-associated genetic instability or a role for the bone marrow niche (Arranz et al., 2014; Plo et al., 2008).

Leukemic evolution of myeloproliferative neoplasms is associated with a very poor prognosis. In this study we found a median OS of 8 months consistently with previous studies (McNamara et al., 2018; Mesa et al., 2005; Ruggiu et al., 2020; Tam et al., 2008; Tefferi et al., 2018a; Venton et al., 2018). As previously described, the benefit of intensive therapy seems restricted to patient receiving allogenic SCT (McNamara et al., 2018; Tam et al., 2008). Nevertheless, survival of transplanted patients was also very poor suggesting that allogenic SCT should be considered before transformation in high-risk patients (McNamara et al., 2018; Ruggiu et al., 2020). In our study, non-intensive therapy by low dose aracytine or azacytidine is associated with a better outcome than BSC or intensive therapy without transplant. Several mutations associated with an adverse prognostic at the leukemic transformation have been described in particular in *TP53*, *RUNXI*, *SRSF2* genes ((Lasho et al., 2018; McNamara et al., 2018; Venton et al., 2018; Zhang et al., 2012). The slightly better prognosis of the patients of the short-term transformation group could be due to the absence of *TP53* mutation, the younger age at the time of leukemic evolution and the slightest use of supportive care.

In summary, our results suggest that the leukemic evolution of PV and ET involve different mutations according to time to transformation. Both larger cohorts and functional studies are needed to further clarify molecular mechanisms associated to short-term or long-term transformation.

## Ethics approval and consent to participate

This study was registered with the CNIL (*Commission nationale de l'informatique et des libertés*, French Data Protection Authority). Patients' data were added to the 'Hemopathies Malignes' biobank at Angers University Hospital (CHU d'Angers), which was approved by the CPP (*Comité de Protection des Personnes*, Institutional Review Board) of Angers Ouest II.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Prof. Gérard Socié for helpful scientific discussions and critical reading of the manuscript. The authors thank the local tumour biobanks of Brest and Angers and the French Clinical and Biological Network of Myeloproliferative Neoplasms (FIMBANK) for providing high-quality samples. They also thank the French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) for providing scientific discussions. This work was supported by grants from the University Hospital of Angers (AO Interne 2016) and the Ligue against Cancer (Ligue Contre le Cancer 49, appel d'offre régional 2018).

## Author's contributions

DLP and VU conceived and designed the study.

DLP, RJC and AD collected clinical data; OB supervised the biobanking, JMC conceived and supervised the biological clinical database of the FIMBANK project.

DLP, RJC, AC, JCC, LC, CP and MR performed the NGS experiments, analysed and interpreted the data; JCI, FB, EC, MPH, CO, ST, NI and MH cared for the patients; DLP, RJC, JR and MR analysed the data.

DLP, RJC and VU wrote the manuscript and JCI, CO, NI, EL and MH revised it critically.

## References

- Alvarez-Larrán, A., Senín, A., Fernández-Rodríguez, C., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Gómez, M., Ferrer-Marin, F., Martínez-López, J., Camacho, L., Colomer, D., Angona, A., Navarro, B., Cervantes, F., Besses, C., Bellosillo, B. & Hernández-Boluda, J.C. (2017) Impact of genotype on leukaemic transformation in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*, 175, 764–771.
- Arranz, L., Sánchez-Aguilera, A., Martín-Pérez, D., Isern, J., Langa, X., Tzankov, A., Lundberg, P., Muntión, S., Tzeng, Y.-S., Lai, D.-M., Schwaller, J., Skoda, R.C. & Méndez-Ferrer, S. (2014) Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*, 512, 78–81.
- Bailey, M.H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M.C., Kim, J., Reardon, B., Ng, P.K.-S., Jeong, K.J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E.M., Mularoni, L., Rubio-Perez, C., et al (2018) Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 173, 371–385.e18.
- Beer, P.A., Delhommeau, F., LeCouedic, J.P., Dawson, M.A., Chen, E., Bareford, D., Kusec, R., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., Vainchenker, W. & Green, A.R. (2010) Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*, 115, 2891–2900.
- Courtier, F., Carbuccia, N., Garnier, S., Guille, A., Adélaïde, J., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Mozziconacci, M.-J., Rey, J., Vey, N., Chaffanet, M., Birnbaum, D. & Murati, A. (2017) Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica*, 102, e11–e14.
- Cuthbert, D. & Stein, B.L. (2019) Therapy-associated leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms – What do we know? *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 32, 65–73.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. & Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14863–14868.
- Finazzi, G. (2005) Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*, 105, 2664–2670.
- Gangat, N., Wolanskyj, A.P., McClure, R.F., Li, C.Y., Schwager, S., Wu, W. & Tefferi, A. (2007) Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia*, 21, 270–276.
- Gerritsen, M., Yi, G., Tijchon, E., Kuster, J., Schuringa, J.J., Martens, J.H.A. & Vellenga, E. (2019) RUNX1 mutations enhance self-renewal and block granulocytic differentiation in human in vitro models and primary AMLs. *Blood Advances*, 3, 320–332.
- Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E.J., Wedge, D.C., Angelopoulos, N., Cantrill, R., Godfrey, A.L., Papaemmanuil, E., Gundem, G., MacLean, C., Cook, J., O’Neil, L., O’Meara, S., Teague, J.W., Butler, A.P., Massie, C.E., Williams, N., Nice, F.L., Andersen, C.L., Hasselbalch, H.C., et al (2018) Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 379, 1416–1430.
- Harutyunyan, A., Klampfl, T., Cazzola, M. & Kralovics, R. (2011) p53 Lesions in Leukemic Transformation. *New England Journal of Medicine*, 364, 488–490.
- Kubesova, B., Pavlova, S., Malcikova, J., Kabathova, J., Radova, L., Tom, N., Tichy, B., Plevova, K., Kantorova, B., Fiedorova, K., Slavikova, M., Bystry, V., Kissova, J., Gisslinger, B., Gisslinger, H., Penka, M., Mayer, J., Kralovics, R., Pospisilova, S. & Doubek, M. (2018) Low-burden TP53 mutations in chronic phase of myeloproliferative neoplasms: association with age, hydroxyurea administration, disease type and JAK2 mutational status. *Leukemia*, 32, 450–461.
- Lasho, T.L., Mudireddy, M., Finke, C.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Szuber, N., Begna, K.H., Patnaik, M.M., Gangat, N., Pardanani, A. & Tefferi, A. (2018) Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Advances*, 2, 370–380.
- Lê Cao, K.-A., Martin, P.G., Robert-Granié, C. & Besse, P. (2009) Sparse canonical methods for biological data integration: application to a cross-platform study. *BMC Bioinformatics*, 10, 34.
- Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., Beisel, C., Kralovics, R. & Skoda, R.C. (2014) Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123, 2220–2228.
- Luque Paz, D., Mansier, O., Riou, J., Conejero, C., Roy, L., Belkhodja, C., Ugo, V. & Giraudier, S. (2019) Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience. *Haematologica*, 104, e134–e137.

- McNamara, C.J., Panzarella, T., Kennedy, J.A., Arruda, A., Claudio, J.O., Daher-Reyes, G., Ho, J., Siddiq, N., Devlin, R., Tsui, H., Su, J., Stockley, T., Sukhai, M., Kanwar, N., Chan, S., Maze, D., Schimmer, A., Schuh, A., Sibai, H., Viswabandya, A., et al (2018) The mutational landscape of accelerated- and blast-phase myeloproliferative neoplasms impacts patient outcomes. *Blood*, 130, 2812–2820.
- Mesa, R.A., Li, C.-Y., Ketterling, R.P., Schroeder, G.S., Knudson, R.A. & Tefferi, A. (2005) Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood*, 105, 973–977.
- Mollard, L.-M., Chauveau, A., Boyer-Perrard, F., Douet-Guilbert, N., Houot, R., Quintin-Roué, I., Couturier, M.-A., Dagorne, A., Malou, M., Le Calloch, R., Luyckx, O., Thepot, S., Hunault, M., Guillermin, G., Berthou, C., Ugo, V., Lippert, É. & Ianotto, J.-C. (2018) Outcome of Ph negative myeloproliferative neoplasms transforming to accelerated or leukemic phase. *Leukemia & Lymphoma*, 59, 2812–2820.
- Pardanani, A., Lasho, T., Finke, C., Oh, S.T., Gotlib, J. & Tefferi, A. (2010) LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*, 24, 1713–1718.
- Passamonti, F., Rumi, E., Arcaini, L., Boveri, E., Elena, C., Pietra, D., Boggi, S., Astori, C., Bernasconi, P., Varettoni, M., Brusamolino, E., Pascutto, C. & Lazzarino, M. (2008) Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*, 93, 1645–1651.
- Plo, I., Nakatake, M., Malivert, L., de Villartay, J.-P., Giraudier, S., Villeval, J.-L., Wiesmuller, L. & Vainchenker, W. (2008) JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood*, 112, 1402–1412.
- Rampal, R., Ahn, J., Abdel-Wahab, O., Nahas, M., Wang, K., Lipson, D., Otto, G.A., Yelensky, R., Hricik, T., McKenney, A.S., Chiosis, G., Chung, Y.R., Pandey, S., Brink, M.R.M. van den, Armstrong, S.A., Dogan, A., Intlekofer, A., Manshouri, T., Park, C.Y., Verstovsek, S., et al (2014) Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E5401–E5410.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K. & Rehm, H.L. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17, 405–423.
- Ruggiu, M., Cassinat, B., Kiladjian, J.-J., Raffoux, E., Giraudier, S., Robin, M., Itzykson, R., Clappier, E., Michonneau, D., de Fontbrune, F.S., de Latour, R.P., Ades, L. & Socié, G. (2020) Should transplantation still be considered for Ph1-negative myeloproliferative neoplasms in transformation? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, S1083879120301051.
- Tam, C.S., Nussenzweig, R.M., Papat, U., Bueso-Ramos, C.E., Thomas, D.A., Cortes, J.A., Champlin, R.E., Ciurea, S.E., Manshouri, T., Pierce, S.M., Kantarjian, H.M. & Verstovsek, S. (2008) The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL- myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 112, 1628–1637.
- Tefferi, A., Guglielmelli, P., Larson, D.R., Finke, C., Wassie, E.A., Pieri, L., Gangat, N., Fjerza, R., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Rambaldi, A., Finazzi, G., Thiele, J., Barbui, T., Pardanani, A. & Vannucchi, A.M. (2014) Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*, 124, 2507–2513.
- Tefferi, A., Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Coltro, G., Finke, C.M., Loscocco, G.G., Sordi, B., Szuber, N., Rotunno, G., Pacilli, A., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Pardanani, A., Gangat, N. & Vannucchi, A.M. (2020) Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythemia and polycythemia vera. *British Journal of Haematology* Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.16380> [Accessed February 13, 2020].
- Tefferi, A., Mudireddy, M., Mannelli, F., Begna, K.H., Patnaik, M.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Gangat, N., Yogarajah, M., De Stefano, V., Passamonti, F., Rosti, V., Finazzi, M.C., Rambaldi, A., Bosi, A., Guglielmelli, P., Pardanani, A. & Vannucchi, A.M. (2018) Blast phase myeloproliferative neoplasm: Mayo-AGIMM study of 410 patients from two separate cohorts. *Leukemia*, 32, 1200–1210.
- Tefferi, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Vannucchi, A.M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Vaidya, R., Cazzola, M., Rambaldi, A., Gisslinger, B., Pieri, L., Ruggeri, M., Bertozzi, I., Sulai, N.H., Casetti, I., Carobbio, A., Jerczynski, G., Larson, D.R., Müllauer, L., et al (2013) Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*, 27, 1874–1881.
- Tenenhaus, M. (1998) La régression PLS, théorie et pratique. In *La régression PLS, théorie et pratique* Paris: Editions Technic.

Venton, G., Courtier, F., Charbonnier, A., D'incan, E., Saillard, C., Mohty, B., Mozziconacci, M.-J., Birnbaum, D., Murati, A., Vey, N. & Rey, J. (2018) Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology*, 93, 330–338.

Weinstein, J.N., Myers, T.G., O'Connor, P.M., Friend, S.H., Fornace, A.J., Kohn, K.W., Fojo, T., Bates, S.E., Rubinstein, L.V., Anderson, N.L., Buolamwini, J.K., van Osdol, W.W., Monks, A.P., Scudiero, D.A., Sausville, E.A., Zaharevitz, D.W., Bunow, B., Viswanadhan, V.N., Johnson, G.S., Wittes, R.E., et al (1997) An Information-Intensive Approach to the Molecular Pharmacology of Cancer. *Science*, 275, 343–349.

Wong, T.N., Ramsingh, G., Young, A.L., Miller, C.A., Touma, W., Welch, J.S., Lamprecht, T.L., Shen, D., Hundal, J., Fulton, R.S., Heath, S., Baty, J.D., Klco, J.M., Ding, L., Mardis, E.R., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Walter, M.J., Graubert, T.A., Ley, T.J., et al (2014) Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*, 518, 552–555.

Zhang, S.-J., Rampal, R., Manshouri, T., Patel, J., Mensah, N., Kayserian, A., Hricik, T., Heguy, A., Hedvat, C., Gonen, M., Kantarjian, H., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O. & Verstovsek, S. (2012) Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood*, 119, 4480–4485.

Zoi, K. & Cross, N.C.P. (2017) Genomics of Myeloproliferative Neoplasms. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 947–954.

## Figures captions

### Figure 1 : Genes mutated at the leukemic evolution of MPN

(A) The total number of mutations is represented. Mutations in post-PV AML are in red and in post-ET AML in green. (B) Violin plot of the VAF distribution for genes with more than 6 mutations. IDH1 and IDH2 have been summed for this figure.

### Figure 2: Classification of post-PV/ET AML according to their mutational landscape

Heatmap based on the Euclidean distance displaying the VAF of additional mutations. Genes are listed in the X axis and each row correspond to a patient. The color scale represents the scaled abundance of each variable and is proportionnal to the allelic burden (darker red represent higher allelic burden). Three group were identified for short-term transformation (orange), long-term transformation (green) and intermediate (blue).

### Figure 3: Time to leukemic transformation and molecular landscape of the three groups of post-PV/ET AML

(A) Kaplan-Meier curve of the leukemia-free survival of the entire cohort according to the groups identified in the classification. (B) Circos plots showed the molecular complexity of these three groups.

### Figure 4: Allele burden comparaison of matched diagnosis/chronic phases and leukemic transformations

Violin plots displaying the allele burden distribution of additionnal mutations at the diagnosis/chronic phase (blue) and at the time of leukemic transformation (orange). These evolutions were tested by paired Wilcoxon tests (ns: non significant, \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ )

**Table I: Characteristics of the entire cohort**

PV:

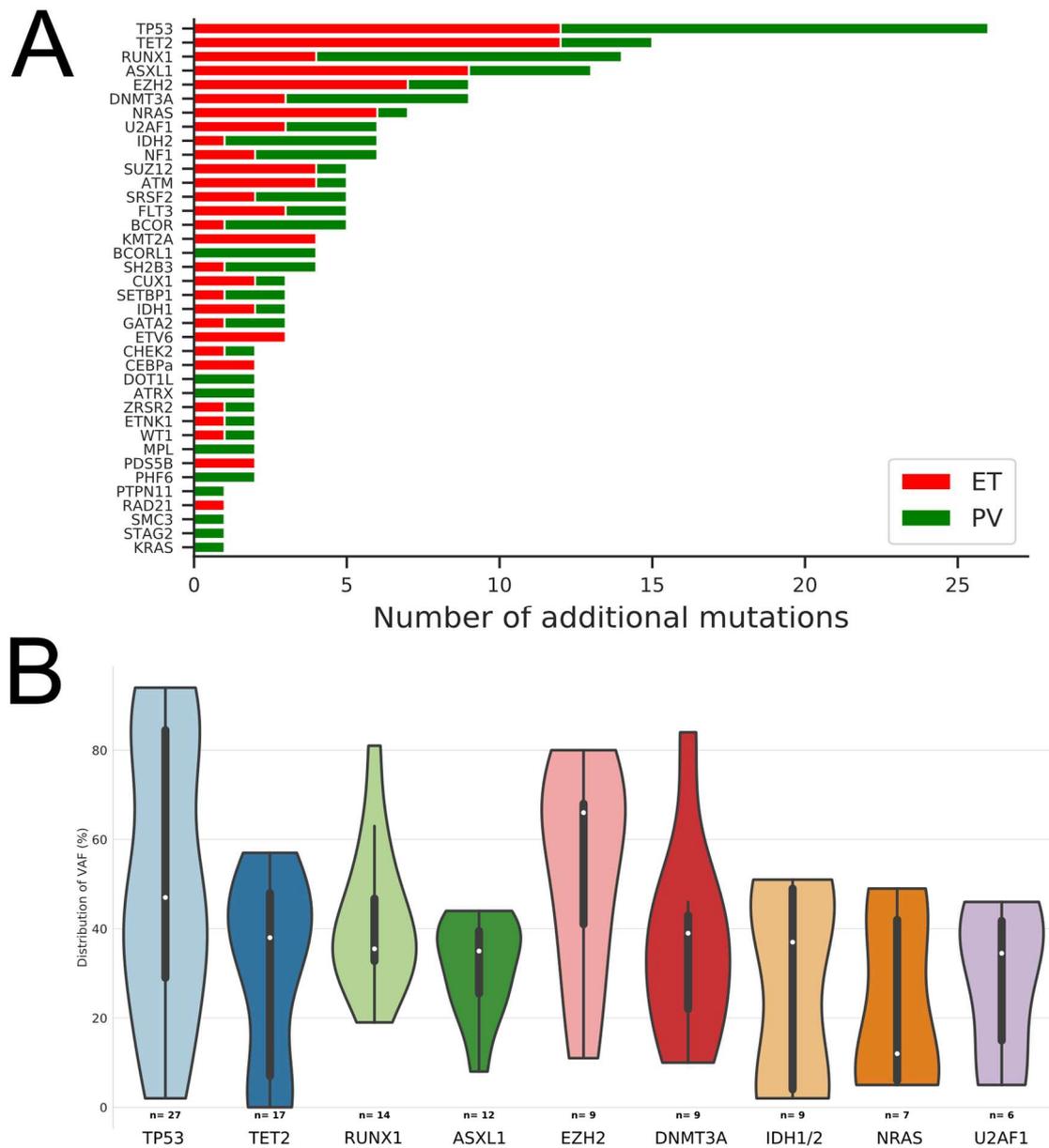
Patient characteristics	Entire cohort (n=49)	PV (n=24)	ET (n=25)
Sex (M/F)	30/19	18/6	12/13
Age at diagnosis (year) [range]	63 [26-82]	65 [42-81]	59 [26-82]
Hemoglobin at diagnosis (g/dL) [range]	16 [10-20.7]	18.1 [16-20.7]	14.4 [10-16.6]
Platelets at diagnosis (10 <sup>9</sup> /L) [range]	624 [139-1575]	404 [139-748]	800 [471-1575]
Leucocytes at diagnosis (10 <sup>9</sup> /L) [range]	9.17 [3-27.8]	10.6 [5.1-27.8]	8.4 [3-17.3]
Driver mutation n(%)			
<i>JAK2V617F</i>	39 (80%)	24 (100%)	15 (60%)
<i>CALR</i>	6 (12%)		6 (24%)
<i>MPL</i>	2 (4%)		2 (8%)
Triple negative	2 (4%)		2 (8%)
Treatment of chronic phase			
Number of treatments [range]	1 [1-5]	1 [1-4]	1 [1-5]
Hydroxycarbamide n(%)	39 (80%)	20 (83%)	19 (76%)
Pipobroman n(%)	17 (35%)	10 (42%)	7 (28%)
Peg IFN- $\alpha$ n(%)	6 (12%)	2 (8%)	4 (16%)
Ruxolitinib n(%)	5 (10%)	4 (17%)	1 (4%)
Evolution to secondary myelofibrosis n(%)	8 (16%)	3 (13%)	5 (20%)
Time to leukemic transformation (years) [range]	12 [1-30]	11 [2-30]	12 [1-30]
Karyotype at leukemic transformation	n=35	n=17	n=18
Normal n(%)	13 (37%)	6 (35%)	7 (39%)
Abnormal not complex n(%)	6 (17%)	4 (24%)	2 (11%)
Complex n(%)	9 (26%)	5 (29%)	4 (22%)
Monosomal n(%)	7 (20%)	2 (12%)	5 (28%)
Post-AML treatment			
Best Supportive care n(%)	23 (47%)	13 (54%)	10 (40%)
Low-dose cytarabine n(%)	2 (4%)	1 (4%)	1 (4%)
Azacytidine n(%)	14 (29%)	6 (25%)	8 (32%)
Intensive chemotherapy n(%)	10 (20%)	4 (17%)	6 (24%)
Allograft n(%)	7 (14%)	3 (13%)	4 (16%)
Post-AML events			
Deaths n(%)	37 (82%)	19 (79%)	18 (79%)
Median survival (months)	8	6	8

polycythemia Vera; ET: essential thrombocythemia; AML: acute myeloid leukemia

**Table II: Characteristics of the three molecular groups of post-ET/PV AML**

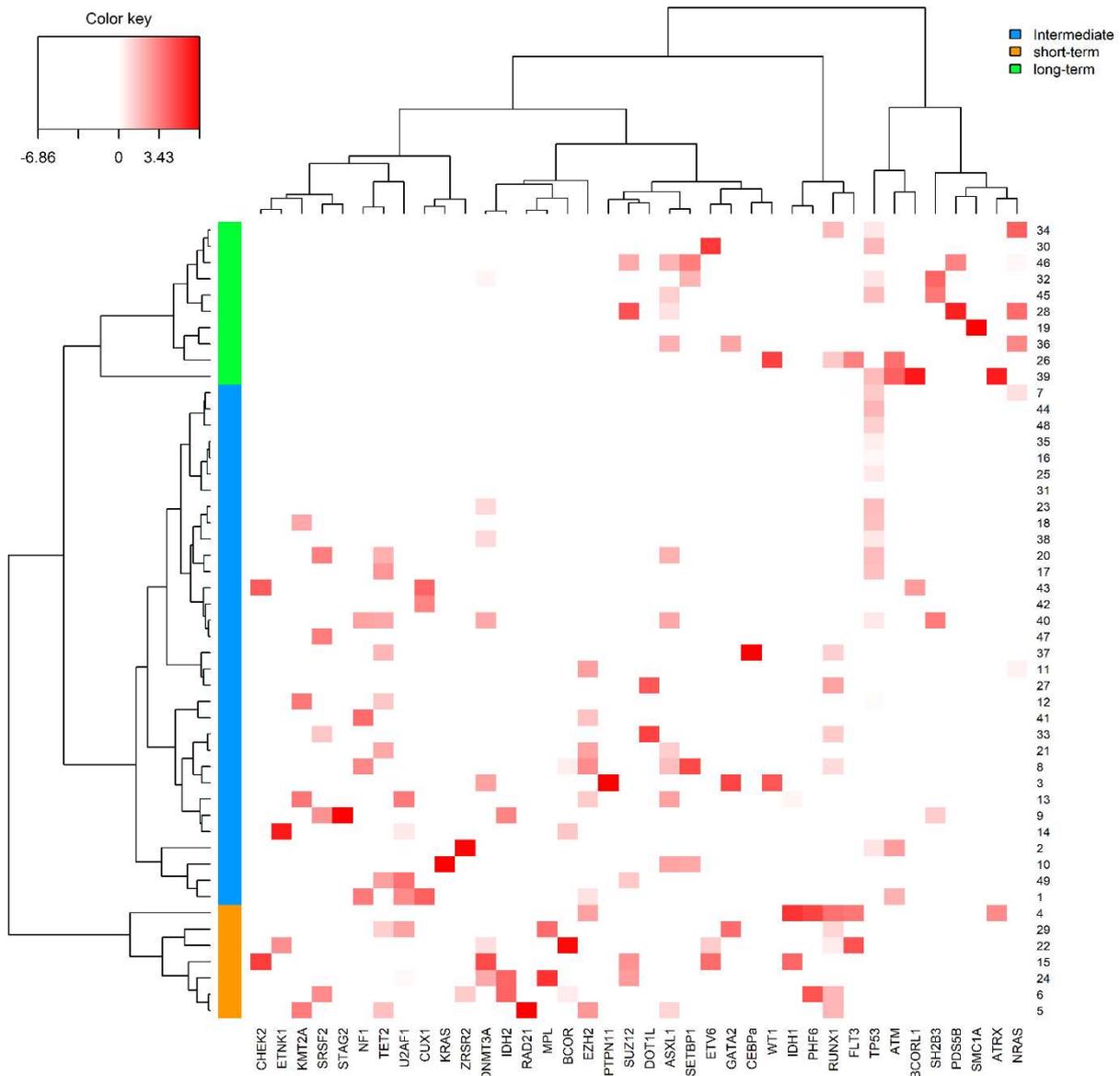
Patient characteristics	Short-term transformation (n=7)	Intermediate transformations (n=32)	Long-term transformation (n=10)	p-value
Sex (M/F)	4/3	17/15	9/1	0.12
Diagnosis (PV/ET)	4/3	16/16	4/6	0.84
Age at diagnosis of chronic phase (year) [range]	66 [60-69]	65 [26-82]	53 [26-68]	0.05
Driver mutation n(%)				0.08
<i>JAK2V617F</i>	7 (100%)	27 (84%)	5 (50%)	
<i>CALR</i>		2 (6%)	4 (40%)	
<i>MPL</i>		2 (6%)		
Triple negative		1 (4%)	1 (10%)	
Time to leukemic transformation (years) [range]	3 [1-12]	10 [2-20]	21 [12-30]	NT
Age at diagnosis of leukemic transformation (year) [range]	67 [55-79]	74 [38-88]	75 [54-86]	NT
Additional mutations at the AML stage				
Number of mutations [range]	7 [5-8]	3 [1-8]	4 [1-5]	<b>0.001</b>
<i>TP53</i> n(%)	<b>0</b>	17 (53%)	5 (50%)	<b>0.03</b>
<i>TET2</i> n(%)	3 (42%)	8 (25%)	<b>0</b>	0.10
<i>RUNX1</i> n(%)	5 (71%)	4 (13%)	2 (20%)	<b>0.004</b>
<i>ASXL1</i> n(%)	1 (14%)	7 (22%)	4 (40%)	0.49
<i>EZH2</i> n(%)	2 (28%)	6 (19%)	<b>0</b>	0.22
<i>DNMT3A</i> n(%)	3 (42%)	4 (13%)	1 (10%)	0.17
<i>NRAS</i> n(%)	<b>0</b>	2 (9%)	4 (40%)	<b>0.02</b>
<i>U2AF1</i> n(%)	2 (28%)	4 (13%)	<b>0</b>	0.2
<i>IDH1/2</i> n(%)	4 (57%)	3 (9%)	<b>0</b>	<b>0.01</b>
Karyotype at the AML stage	n=6	n=23	n=6	
Normal n(%)	4 (66%)	7 (30%)	2 (33%)	
Abnormal not complex n(%)	1 (17%)	3 (13%)	2 (33%)	0.31
Complex n(%)	1 (17%)	8 (35%)	0	
Monosomal n(%)	0	5 (22%)	2 (33%)	
Post-AML treatment				
Best Supportive care n(%)	2 (29%)	17 (53%)	4 (40%)	
Low-dose cytarabine n(%)	0	2 (6%)	0	0.09
Azacytidine n(%)	3 (42%)	6 (19%)	5 (50%)	
Intensive chemotherapy n(%)	2 (29%)	7 (22%)	1 (10%)	
Allograft n(%)	2 (29%)	3 (9%)	2 (20%)	
Post-AML events				
Deaths n(%)	4 (57%)	26 (91%)	7 (70%)	NT
Median survival (months)	19	4	8	

PV: polycythemia Vera; ET: essential thrombocythemia; AML: acute myeloid leukemia; sAML secondary AML; NT: not tested



**Figure 1: Genes mutated at the leukemic evolution of MPN**

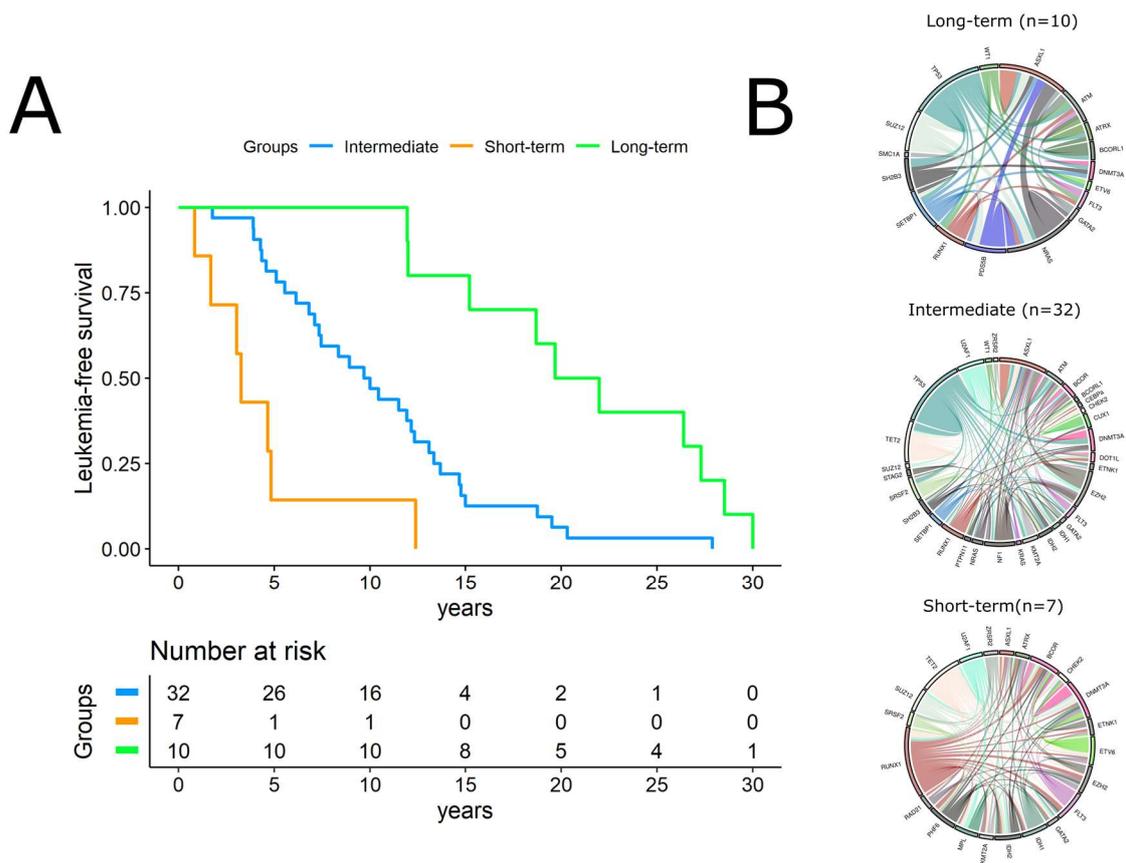
(A) Total number of mutations. Mutations in post-PV AML are in red and in post-ET AML in green. (B) Violin plot of the VAF distribution for genes found mutated more than 6 times. *IDH1* and *IDH2* have been grouped.



Figure

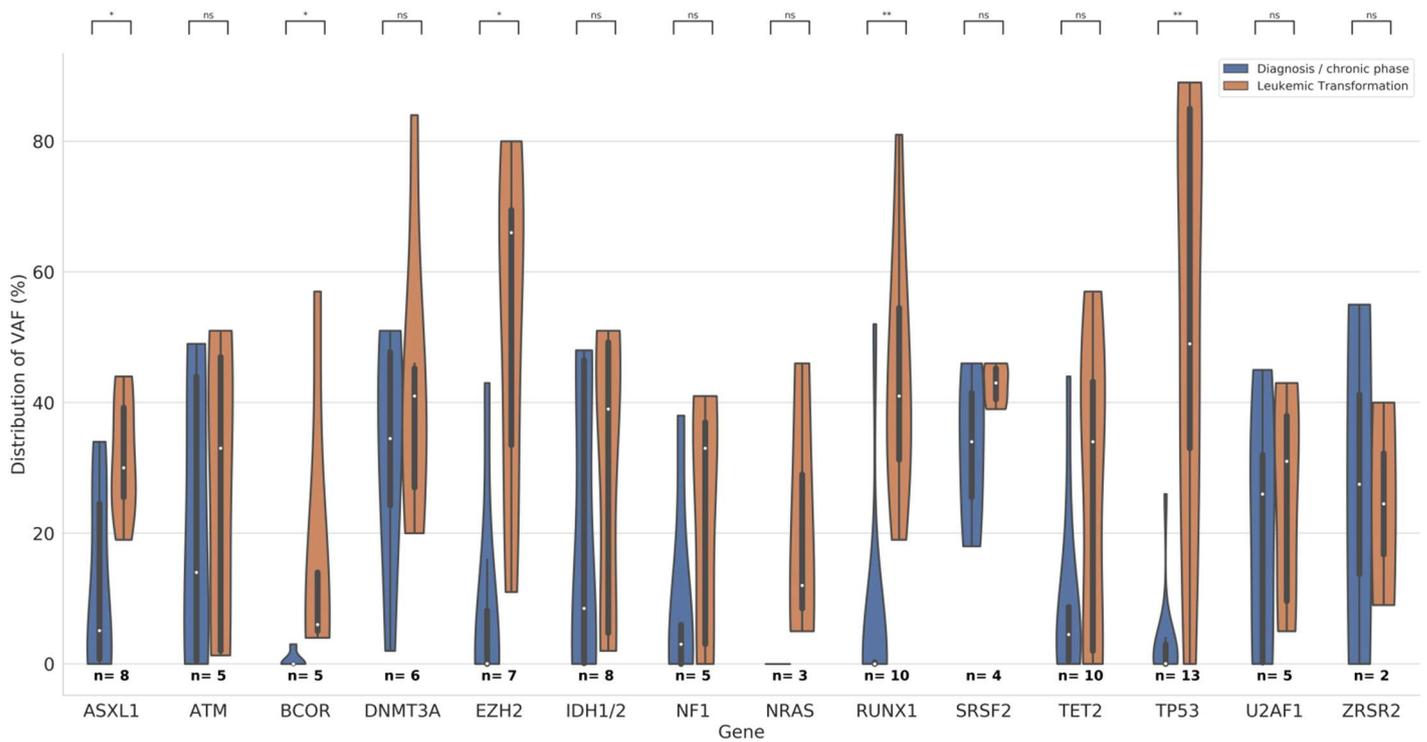
## 2: Classification of post-PV/ET AML according to their mutational landscape

Heatmap displaying the VAF of additional mutations. Genes are listed in the X axis and each row correspond to a patient. The color scale represent the scaled abundance of each variable and is proportionnal of the allelic burden (darker red represnet higher allelic burden). Three group were identified for short-term transformation (orange), long-term transformation (green) and intermediate (blue).



**Figure 3: Time to leukemic transformation and molecular landscape of the three groups of pst-PV/ET AML**

(A) Kaplan-Meier curve of the leukemia-free survival of the entire cohort according to the groups identified in the classification. (B) Circos plots showed the molecular complexity of these three groups.



**Figure 4: Allele burden comparison of matched diagnosis/chronic phases and leukemic transformations**

Violin plots displaying the allele burden distribution of additional mutations at the diagnosis/chronic phase (blue) and at the time of leukemic transformation (orange). These evolutions were tested by paired Wilcoxon tests (ns: non significant, \*:  $p < 0.01$ , \*\*:  $p < 0.001$ )

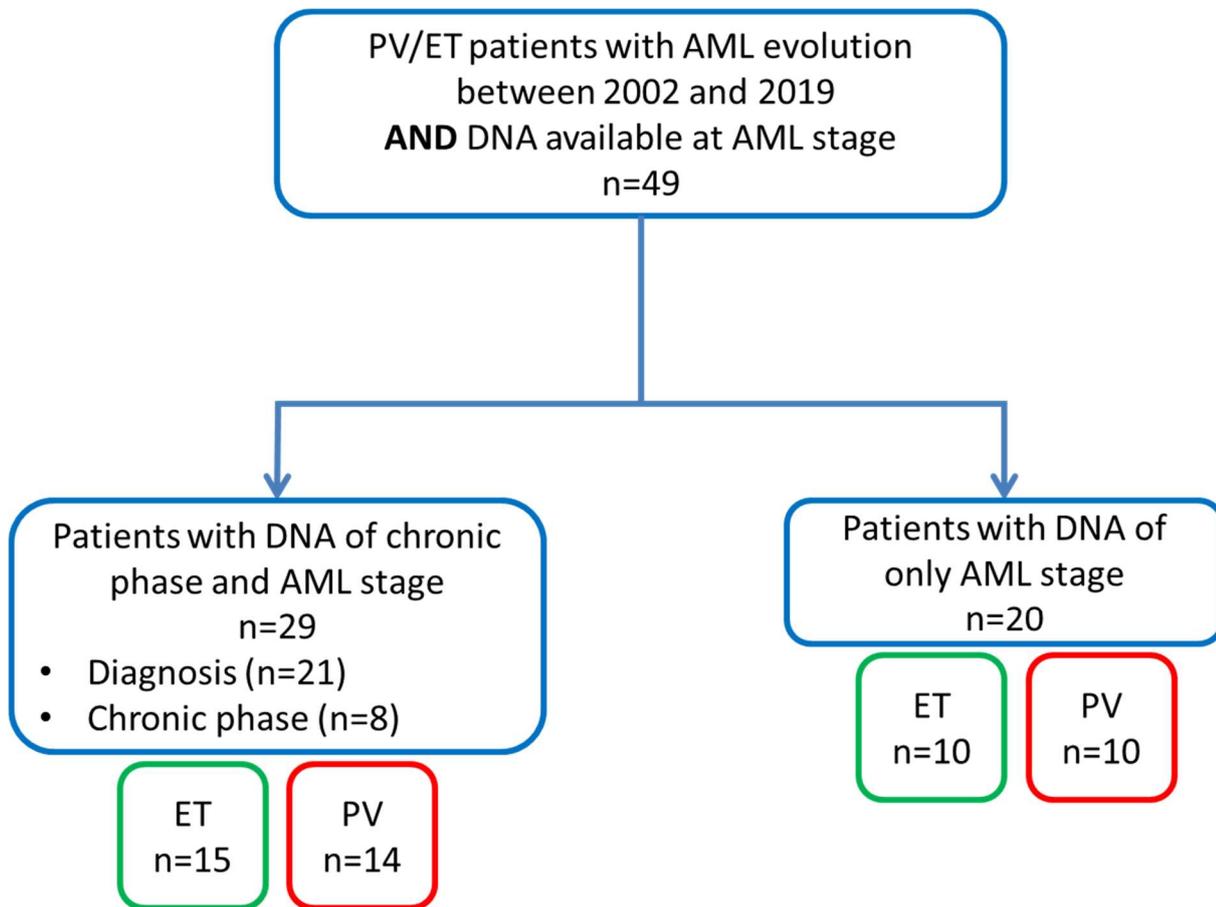
# Supplemental data

## NGS analysis an bioinformatic pipeline

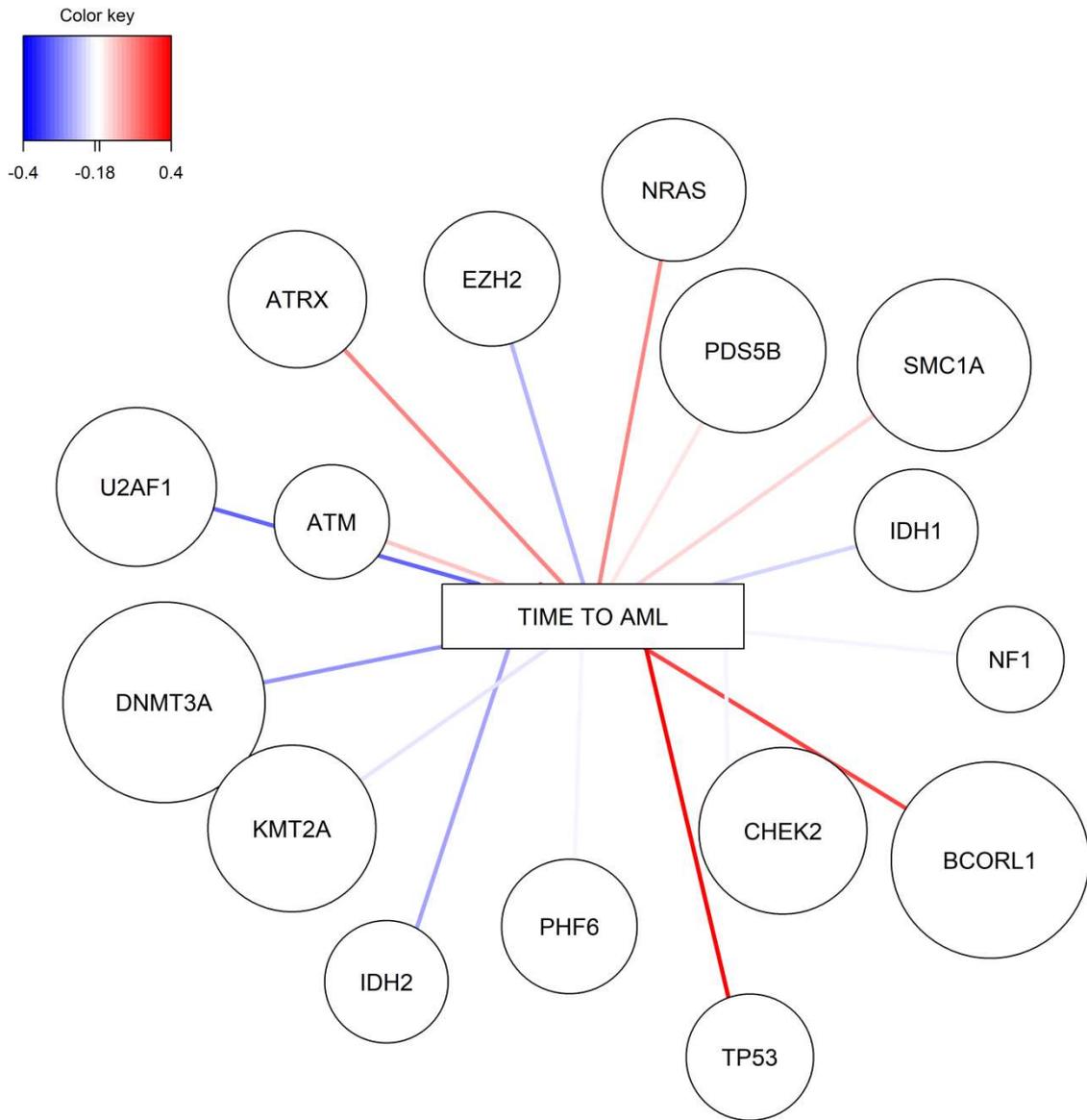
Libraries were made using HaloplexHS technology, according to manufacturer recommendation. The workflow consists of a digestion and a denaturation of the sample DNA, an hybridization of the probe library to the DNA targets, a ligation and capture of uniquely barcoded targets and an amplification of the enriched fragments by PCR. These libraries are pooled, then clusters are created and sequenced with an Illumina SBS chemistry on a NextSeq500 (Illumina, San Diego, CA, USA). Family reads used for demultiplexing allow a good sensitivity for mutation with low variant allele frequency (VAF) by removing sequencing errors. Sequence alignment and variant calling was performed with SureCall software (Agilent Technology®) using GenAligners 3.0 tool (Agilent Technology®) with the default settings and SNPPEP (Agilent Technology®). Customized parameters were applied on this bayesian based model as follow : minimum allele frequency = 0.02, minimum quality of base = 30, minimum mutated reads = 4, variant threshold = 0.3. We used Integrative Genomics Viewer (IGV, Cambridge, UK) to visualize the read alignment, allowing us to confirm the variant calls. wAnnovar (Yang and Wang, 2015) annotated the variants, confronting the rare ones with COSMIC database and SNPs databases (gnomAD, dbSNP, ExAC, 1000 Genomes, GO-ESP and TOPMED). We considered nonsynonymous coding variants when Variant Allele Frequency (VAF) was higher than 1% and coverage of called regions reached 50. Known polymorphisms in 1000 Genomes, gnomAD, and Exac databases were excluded when the minor allele frequency was higher than 1%. Polymorphism Phenotyping (PolyPhen2) and Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) tools gave us the functional prediction of mutations. Mutations were then classified according to their putative pathogenic effect in three classes described in the Table SI. We evaluated the diagnosis performance of our method by analyzing several samples with known mutations, and by participating since 2016 to the bi-annual control of quality of the French Group of molecular Biology in hematology (GBMHM).

## NGS quality and complementary analysis

Sample specific-barcodes primers were used to index PCR products. We used molecular barcodes specific to each DNA fragment of interest, allowing us to obtain a median of 60.8% of duplicate amplicons. The median coverage of NGS was 585X [129; 1671]. The median percentage of uncovered areas was 2.6% [1.1%; 21.7%], which give evidence of a satisfactory average coverage for each sample analyzed.

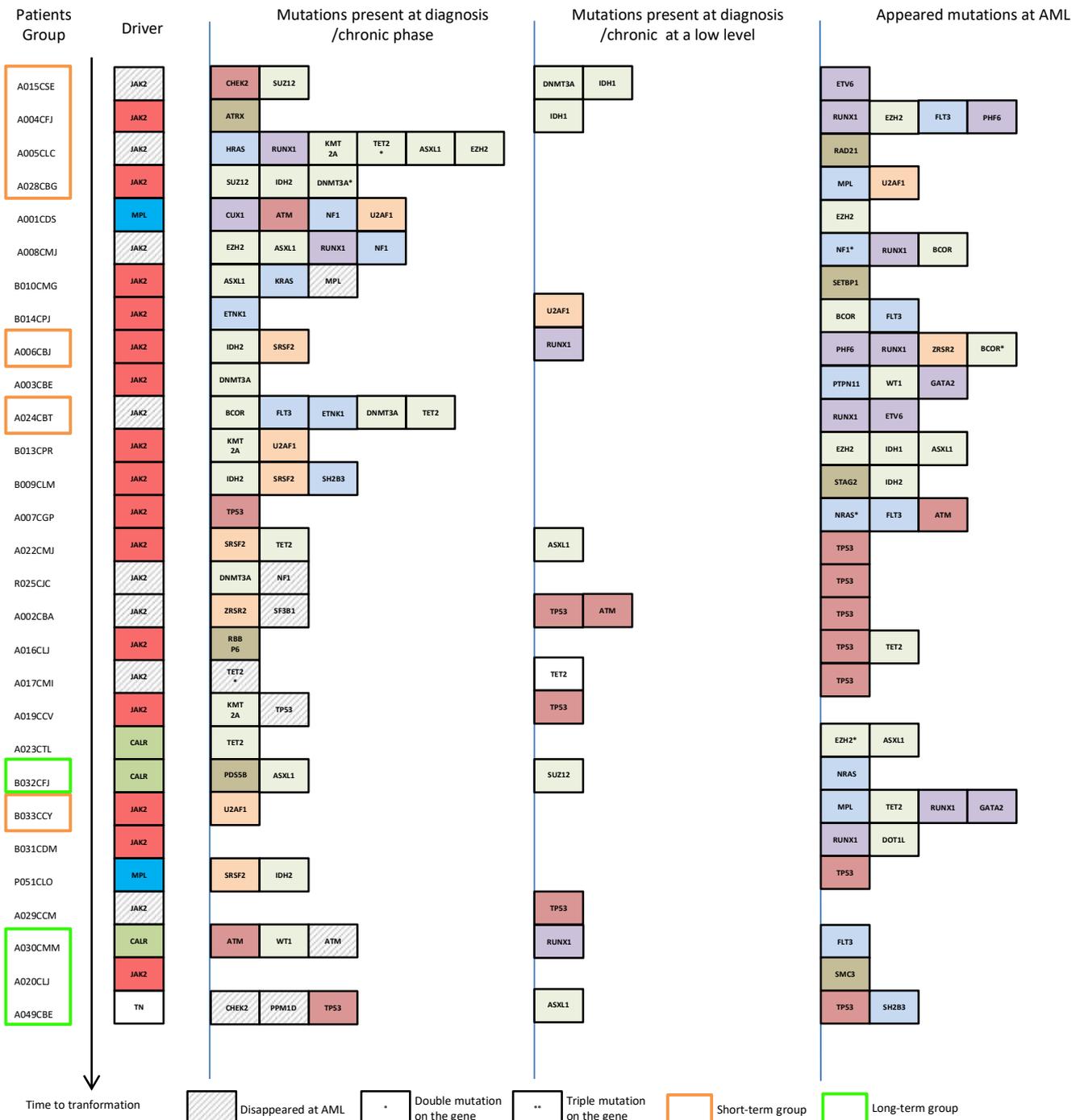


**Figure S1: Flow chart description of the cohort**



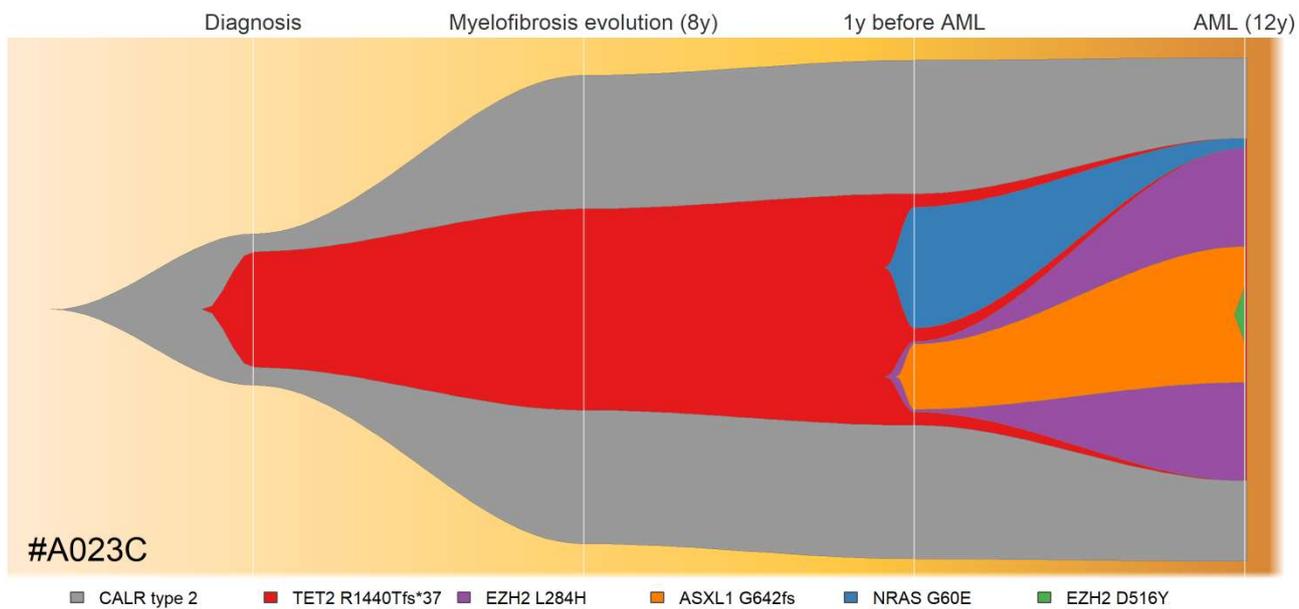
**Figure S2: Network of mutated genes associated with the interval of leukemic transformation**

Result from the first axis of the sPLS analysis. Genes with a correlation coefficient above 0.18 were represented. The color indicated the correlation between mutations and the time to leukemic transformation. Red color was for positive correlation (ie a later transformation) whereas blue color was for negative correlation (ie a early transformation). Circle sizes are arbitrary



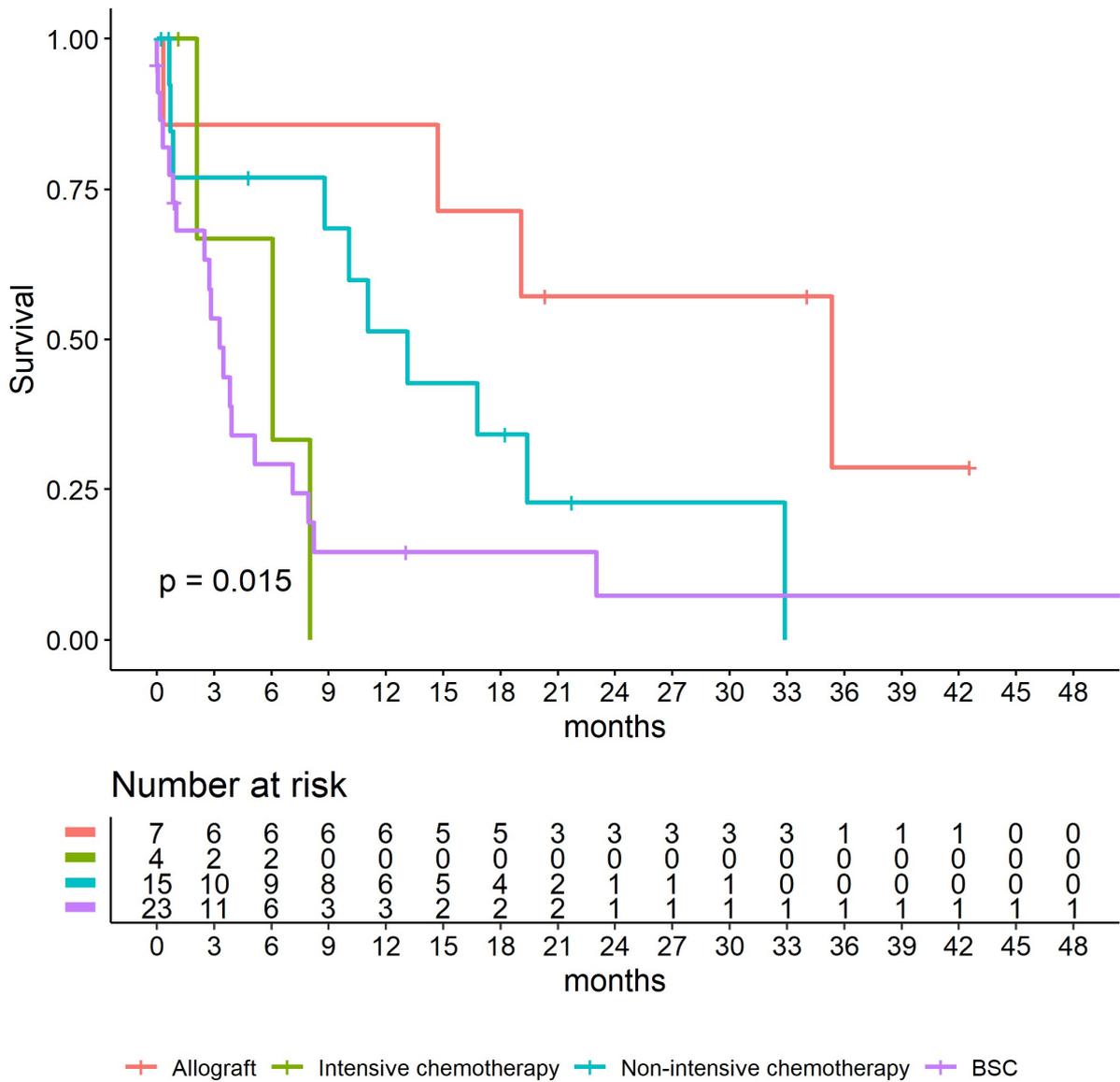
**Figure S3: Mutations landscape of leukemic transformation and matched diagnosis/chronic phase**

Rows represented patients ordered according to time to leukemic progression. Driver mutations were represented in the first column. Additional mutations were classified into 3 columns for (i) mutation already present at the diagnosis/chronic phase, (ii) mutation present at the diagnosis/chronic phase but not detected and (iii) mutations that appeared at leukemic transformation. Each box represented a mutation and the color were attributed to gene's functions (epigenetic=green, cycle cell=red, splicing=orange, signalization=blue and transcription factors=purple).



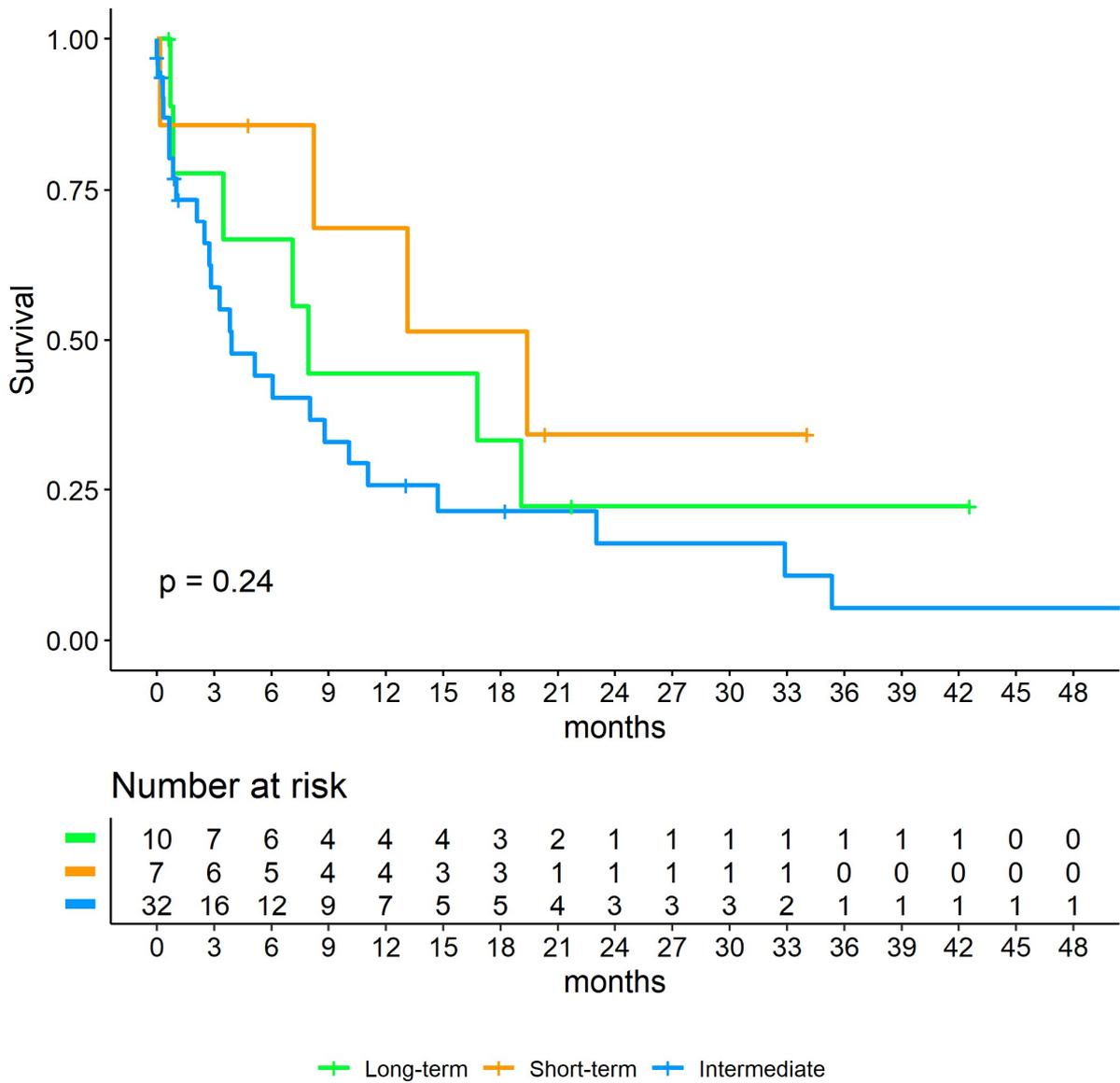
**Figure S4: Plotfish showing clonal evolution inferred from NGS sequencing of 4 iterative samples**

AML: Acute Myeloid Leukemia, y: years of follow-up

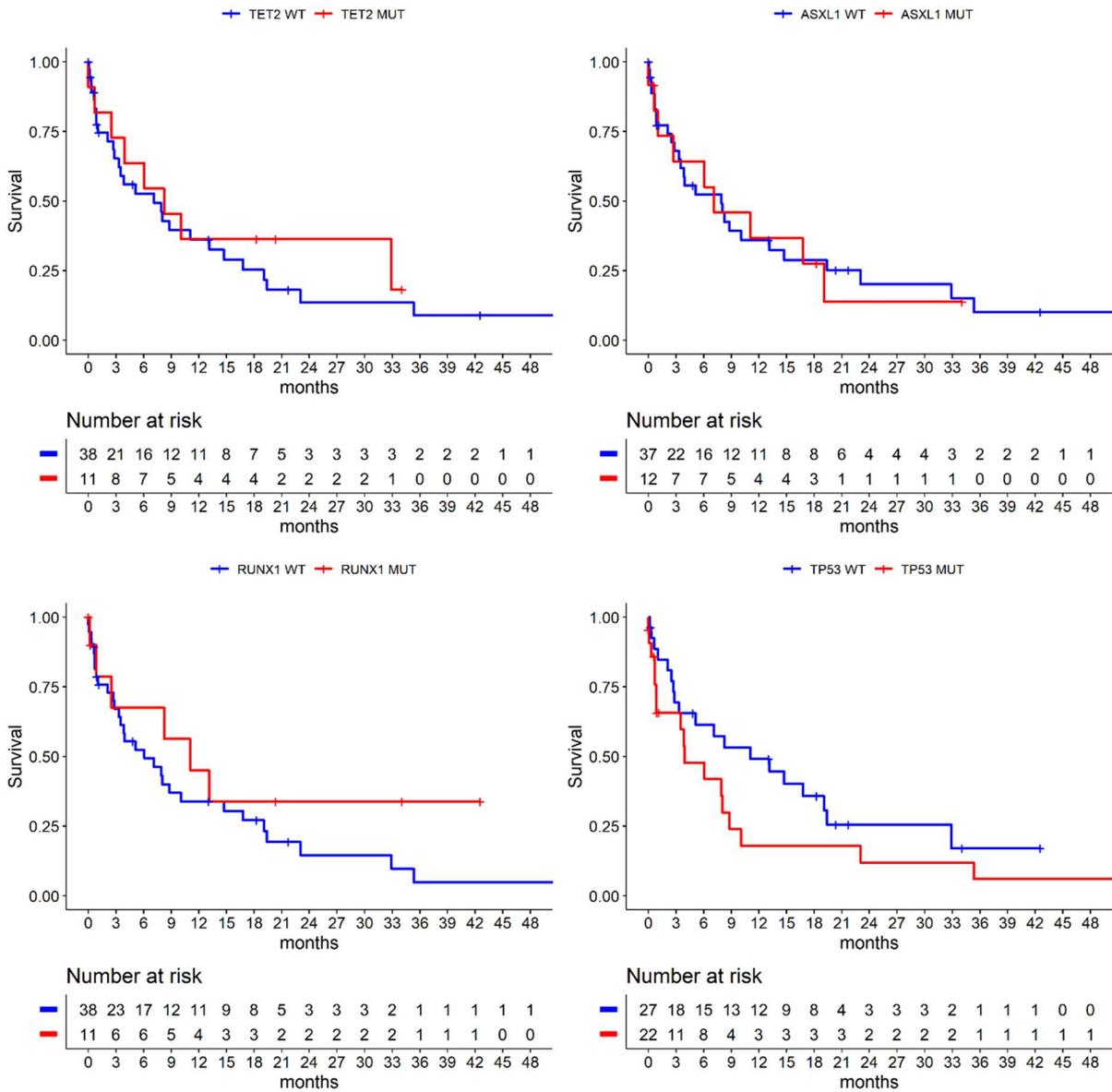


**Figure S5: Overall Survival of leukemic transformation according to treatment**

BSC: Best Supportive Care.



**Figure S6: Overall Survival of leukemic transformation according to the groups of time to transformation**



**Figure S7: Overall Survival of leukemic transformation according to the presence of additional mutations in *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1* or *TP53***

Table SI: Variant classification according to the presumed impact of mutation on protein function

Type	Signification	Criteria
<b>A</b>	<b>Deleterious</b>	deleterious variant described in myeloid neoplasms in COSMIC and validated somatic undescribed variant causing a truncated protein
<b>B</b>	<b>Probably deleterious</b>	variant described in myeloid neoplasms in COSMIC but not validated somatic, absent from the "SNP" bases or with MAF <0.01 (1%) variant not described in myeloid neoplasms in COSMIC, with MAF <0.01 (1%) and described as deleterious by Polyphen and / or SIFT
<b>C</b>	<b>Of undetermined significance</b>	variant not described in myeloid neoplasms in COSMIC, with MAF <0.01 (1%) without impact predicted by Polyphen and SIFT

MAF: minor allele frequency; SNP: single-nucleotide polymorphism

Table SII: Distribution by gene and allele burden of frequently mutated genes in leukemic transformation and matched diagnosis/chronic phase

<b>Gene mutated</b>	<b>Number of mutations</b>	<b>Present at diagnosis [VAF(%)]</b>	<b>Present at diagnosis at a low level and not detected [VAF(%)]</b>	<b>Appeared at leukemic transformation</b>
<i>TP53</i>	12	3 [2; 3; 4; 26]	3 [0.05; 1.4; 3]	6
<i>NRAS</i>	3	0	0	3
<i>RUNX1</i>	10	2 [7;52]	2 [0.14; 0.3]	6
<i>IDH1/2</i>	8	4 [15; 46; 48; 48]	2 [0.12]	2
<i>TET2</i>	9	6 [3; 6; 8; 9; 44]	1 [0.5]	2
<i>DNMT3A</i>	6	5 [23; 28; 41; 50; 51]	1 [2]	0
<i>ASXL1</i>	8	4 [9; 23; 29; 34]	2 [1; 1.2]	2
<b>Splicing genes</b>	11	8 [18; 26; 28; 32; 40; 45; 46; 55]	1 [0.2]	2

Table SIII: Results of NGS sequencing of additional samples between diagnosis and leukemic transformation

Patient	Mutations	Diagnosis	Additional samples	Leukemic Transformation	
A023CTL	Duration of follow-up (years)	0	8	11	12
	TET2:NM_001127208:exon10:c.4312dupA:p.R1440Tfs*37	23	40	46	59
	CALR Type 2	15	93	99	100
	ASXL1:NM_015338:exon12:c.1934dupG:p.G642fs	0	0	13	27
	EZH2:NM_004456:exon8:c.T851A:p.L284H	0	0	10	66
	NRAS:NM_002524:exon3:c.G179A:p.G60E	0	0	24	1,6
	EZH2:NM_004456:exon13:c.G1546T:p.D516Y	0	0	0	11
A006CBJ	Duration of follow-up (years)	0	4		5
	JAK2 V617F	88	9		89
	IDH2:NM_002168:exon4:c.G419A:p.R140Q	45,5	20		51
	SRSF2:NM_003016:exon1:c.C284A:p.P95H	40	20		41
	PHF6:NM_032458:exon9:c.T962G:p.I321S	0	0		37
	RUNX1:NM_001754:exon9:c.T1047A:p.Y349X	0	0		35
	RUNX1:NM_001754:exon8:c.C958T:p.R320X	0,14	0,27		46
	ZRSR2:NM_005089:exon11:c.A989G:p.H330R	0	0		9
	BCOR:NM_001123385:exon4:c.2236_2237ins14:p.R746fs	0	0		4,1
BCOR:NM_001123385:exon4:c.2211_2212ins5:p.T738fs	0	0		5,6	
A019CCV	Duration of follow-up (years)	0	11		12
	JAK2 V617F	25	88		94
	TP53:NM_001276761:exon7:c.G626A:p.R209Q	3	3		0
TP53:NM_001276761:exon7:c.G594A:p.M198I	1,4	13		84	
B031CDM	Duration of follow-up (years)	0	4		6
	JAK2 V617F	68	62		57
	DOT1L:NM_032482:exon24:c.C3271T:p.R1091X	0	0		47
RUNX1:NM_001754:exon5:c.A484G:p.R162G	0	0		57	
B032CFJ	Duration of follow-up (years)	0	3		4
	CALR Type 2	55	58		54
	ASXL1:NM_015338:exon12:c.1927dupG:p.G642fs	8,9	11		19
	PDS5B:NM_015032:exon30:c.A3488G:p.N1163S	50	50		49
	SUZ12:NM_015355:exon15:c.A1814T:p.D605V	0,4	32		86
NRAS:NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0	0		45,6	
A016CLJ	Duration of follow-up (years)	0	11		12
	JAK2 V617F	25	3,8		2,3
	TET2:NM_001127208:exon6:c.C3646T:p.R1216X	0	22		2,3
TP53:NM_000546:exon6:c.A578T:p.H193L	0	0		33	
A017CMI	Duration of follow-up (years)	0	8	9	10
	JAK2 V617F	44	80	60	1,4
	TET2:NM_001127208:exon10:c.4293delT:p.S1431Rfs*16	0,6	0	0,8	0
	TET2:NM_017628:exon3:c.G3410T:p.G1137V	3	0	0	0
	TET2:NM_001127208:exon7:c.G3893A:p.C1298Y	0,5	0,26	0,4	57
TP53:NM_000546:exon5:c.T526A:p.C176S	0	0	0	85	

Table SIV: List of mutations found in leukemic transformation and matched diagnosis/chronic phases

N° Patient	Disease	Gene	Transcript	Exon	Mutation on		COSMIC	Classification	Chronic phase		Leukemic transformation	
					cDNA	Proteic change			VAF %	Depth (X)	VAF %	Depth (X)
A001CDS	TE	MPL	NM_005373	10	c.G1544T	p.W515L	COSM3719407;COSM18918	A	8	719	27	973
A001CDS	TE	ATM	NM_000051	15	c.T2289A	p.F763L	-	C	49	639	51	494
A001CDS	TE	CUX1	NM_001202543	10	c.A815G	p.N272S	-	C	53	240	57	332
A001CDS	TE	NF1	NM_001042492	4	c.A442G	p.N148D	-	B	38	830	41	600
A001CDS	TE	U2AF1	NM_006758	6	c.A470C	p.Q157P	-	A	32	2712	38	2212
A001CDS	TE	EZH2	NM_004456	17	c.1986_1987del	p.V662fs	-	A	0	1316	26	864
A002CBA	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	34	2055	0,57	494
A002CBA	TE	SF3B1	NM_012433	15	c.A2098G	p.K700E	COSM84677	A	8	2374	0	622
A002CBA	TE	ZRSR2	NM_005089	7	c.G441C	p.L147F	-	C	55	1798	40	731
A002CBA	TE	TP53	NM_000546	6	c.A641G	p.H214R	COSM307279	A	5	4172	49	473
A002CBA	TE	TP53	NM_000546	6	c.T613G	p.Y205D	COSM43687	A	0	4259	39	1820
A002CBA	TE	ATM	NM_000051	50	c.G7328A	p.R2443Q	COSM20404	B	0,5	1984	33	570
A003CBE	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	96	1748	98	934
A003CBE	PV	DNMT3A	NM_022552	3	c.A89C	p.E30A	COSM307361	B	50	2690	46	1323
A003CBE	PV	PTPN11	NM_002834	13	c.G1508A	p.G503E	COSM13021	A	0	2470	45	1493
A003CBE	PV	WT1	NM_024426	7	c.1139_1148dup	p.R380fs	-	A	0	2270	39	831
A003CBE	PV	GATA2	NM_032638	6	c.1160_1171del	p.387_391del	-	A	0	2110	14	911
A004CFJ	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	82	825	38	472
A004CFJ	PV	ATRX	NM_000489	13	c.G4156A	p.E1386K	-	B	52	1546	52	550
A004CFJ	PV	RUNX1	NM_001754	6	c.G602A	p.R201Q	COSM24805	A	0	1937	81	368
A004CFJ	PV	EZH2	NM_004456	18	c.C2084T	p.S695L	-	B	0	394	67	136
A004CFJ	PV	IDH1	NM_005896	4	c.C394T	p.R132C	COSM28747	A	2	3408	49	401
A004CFJ	PV	FLT3	NM_004119	20	c.G2503T	p.D835Y	COSM783	A	0	4736	44	370
A004CFJ	PV	PHF6	NM_032458	9	c.T941C	p.I314T	-	B	0	6646	40	478

A005CLC	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	27	2161	0,5	734
A005CLC	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.1927dupG	p.G642fs	COSM4170082;COSM1411076	A	23	1499	24	542
A005CLC	TE	EZH2	NM_004456	15	c.A1720G	p.K574E	COSM5879093;COSM5879094	A	16	373	72	230
A005CLC	TE	HRAS	NM_176795	5	c.500dupC	p.P167fs	-	A	62	616	59	153
A005CLC	TE	KMT2A	NM_001197104	27	c.G6572A	p.R2191Q	-	C	50	431	47	271
A005CLC	TE	RUNX1	NM_001754	4	c.T155A	p.M52K	COSM42095	A	52	2065	47	505
A005CLC	TE	TET2	NM_001127208	3	c.558delG	p.E186fs	-	A	9	3382	38	1227
A005CLC	TE	TET2	NM_001127208	6	c.G3662A	p.C1221Y	COSM211717	A	44	963	38	894
A005CLC	TE	RAD21	NM_006265	6	c.559_560insG C	p.T187fs	-	A	0	765	32	271
A006CBJ	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	88	1128	89	638
A006CBJ	PV	IDH2	NM_002168	4	c.G419A	p.R140Q	COSM41590	A	46	1641	51	1232
A006CBJ	PV	SRSF2	NM_003016	1	c.C284A	p.P95H	COSM211505;COSM211029;COSM211504	A	40	393	41	534
A006CBJ	PV	PHF6	NM_032458	9	c.T962G	p.I321S	-	B	0	711	37	393
A006CBJ	PV	RUNX1	NM_001754	9	c.T1047A	p.Y349X	-	A	0	1885	35	1528
A006CBJ	PV	RUNX1	NM_001754	8	c.C958T	p.R320X	COSM41699	A	0,1 4	1849	46	1741
A006CBJ	PV	ZRSR2	NM_005089	11	c.A989G	p.H330R	-	B	0	418	9	308
A006CBJ	PV	BCOR	NM_001123385	4	c.2236_2237in sCCAAAGGGG GGGGT	p.R746fs	-	A	0	432	4	316
A006CBJ	PV	BCOR	NM_001123385	4	c.2211_2212in sCGGCC	p.T738fs	-	A	0	573	6	445
A007CGP	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	19	1247	1,4	717
A007CGP	TE	TP53	NM_000546	6	c.T584C	p.I195T	COSM3421936;COSM116924	A	26	1979	76	628
A007CGP	TE	ATM	NM_000051	26	c.G3752T	p.C1251F	-	C	0	697	2	478
A007CGP	TE	FLT3	NM_004119	10	c.G1273T	p.A425S	-	C	0	658	3	367
A007CGP	TE	NRAS	NM_002524	3	c.C181A	p.Q61K	COSM580	A	0	1031	12	399
A007CGP	TE	NRAS	NM_002524	2	c.G37C	p.G13R	COSM569	A	0	1494	5	771
A008CMJ	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	23	1182	0	1196
A008CMJ	PV	ASXL1	NM_015338	12	c.1901_1923d el	p.E635Rfs*13	-	A	29	658	33	740
A008CMJ	PV	EZH2	NM_004456	19	c.G2128T	p.D710Y	-	B	43	491	80	802
A008CMJ	PV	NF1	NM_001042492	40	c.5950_5972d el	p.N1984Yfs*17	-	A	6	973	37	763

A008CMJ	PV	RUNX1	NM_001754	7	c.725_737del	p.H242Rfs*7	-	A	7	261	63	401
A008CMJ	PV	BCOR	NM_001123385	4	c.C2428T	p.R810X	COSM2150191;COSM2150192	A	0	683	5	614
A008CMJ	PV	NF1	NM_001042492	27	c.G3649T	p.D1217Y	-	B	0	641	33	530
A008CMJ	PV	NF1	NM_001042492	5	c.T536A	p.L179X	-	A	0	734	3	526
A008CMJ	PV	RUNX1	NM_001754	9	c.G1420A	p.E474K	-	B	0	391	27	249
B009CLM	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	38	543	16	391
B009CLM	PV	IDH2	NM_002168	4	c.G419A	p.R140Q	COSM41590	A	48	374	41	202
B009CLM	PV	SH2B3	NM_005475	6	c.G1159A	p.G387R	COSM6022915	A	15	311	17	105
B009CLM	PV	SRSF2	NM_003016	1	c.C284T	p.P95L	COSM146288;COSM211506;COSM211028	A	46	186	39	44
B009CLM	PV	IDH2	NM_002168	5	c.A536T	p.Y179F	-	B	0	771	5	386
B009CLM	PV	STAG2	NM_001042749	11	c.947_959del	p.K317Mfs*8	-	A	0	285	23	123
B010CMG	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	39	275	49	243
B010CMG	PV	ASXL1	NM_015338	12	c.2343dupG	p.H782Afs*4	-	A	34	122	43	51
B010CMG	PV	KRAS	NM_033360	3	c.G178C	p.G60R	COSM4384680;COSM4384681	A	29	485	11	247
B010CMG	PV	MPL	NM_005373	10	c.1543TG>GC	p.W515A	OCM27289	A	8	979	0	506
B010CMG	PV	SETBP1	NM_015559	4	c.A2605C	p.S869R	COSM1716867	A	0	11647	32	338
B011CNA	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.1888_1910del	p.E635Rfs*13	-	A	NA	NA	8	220
B011CNA	TE	NRAS	NM_002524	2	c.G37T	p.G13C	COSM570	A	NA	NA	7	601
B011CNA	TE	EZH2	NM_004456	14	c.G1650T	p.K550N	-	B	NA	NA	68	347
B012CPL	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	33	1274
B012CPL	TE	KMT2A	NM_001197104	27	c.G8432A	p.R2811H	-	C	NA	NA	48	1857
B012CPL	TE	TET2	NM_001127208	11	c.5526_5538del	p.N1843Gfs*39	-	A	NA	NA	35	1971
B012CPL	TE	TP53	NM_000546	8	c.C844G	p.R282G	COSM10992;COSM3675520;COSM99934; COSM1725698	A	NA	NA	20	2620
B012CPL	TE	TP53	NM_000546	4	c.G273A	p.W91X	COSM562611;COSM562612;COSM44492; COSM1646881;COSM3958856	A	NA	NA	29	2531
B013CPR	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	47	5490	40	455
B013CPR	TE	KMT2A	NM_005933	3	c.C2401T	p.H801Y	-	B	50	2258	49	600
B013CPR	TE	U2AF1	NM_006758	6	c.A470C	p.Q157P	COSM211534;COSM1318797	A	45	7886	43	836
B013CPR	TE	EZH2	NM_004456	19	c.T2191G	p.Y731D	COSM4384242;COSM53021	A	0,0 3	8465	41	386
B013CPR	TE	IDH1	NM_005896	4	c.C394T	p.R132C	COSM28747	A	0	576	4	247

B013CPR	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.C2485T	p.Q829X	COSM97040;COSM5989689	A	0	1314	44	554
B014CPJ	PV	ETNK1	NM_018638	1	c.124delG	p.A42Pfs*40	-	A	52	1141	50	307
B014CPJ	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	17	2419	14	2138
B014CPJ	PV	BCOR	NM_001123385	11	c.T4448G	p.L1483X	-	A	0	2784	14	609
B014CPJ	PV	U2AF1	NM_006758	2	c.C101T	p.S34F	-	A	0,2	4393	9,6	785
B014CPJ	PV	FLT3	NM_004119	14	c.1802_1803insGGGGAGAGA ATATGAATATG ATCT	p.L601_K602insG REYEYDL	-	A	0	11433	1,5	3168
A015CSE	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	10	666	0	1254
A015CSE	TE	CHEK2	NM_001005735	2	c.A148G	p.S50G	-	B	59	326	54	756
A015CSE	TE	SUZ12	NM_015355	1	c.A151G	p.S51G	-	C	48	211	56	416
A015CSE	TE	IDH1	NM_005896	4	c.C394G	p.R132G	COSM28749	A	2	951	37	348
A015CSE	TE	DNMT3A	NM_022552	19	c.T2306A	p.I769N	-	B	2	624	84	1645
A015CSE	TE	ETV6	NM_001987	3	c.G271A	p.G91S	-	B	0	873	42	1353
A016CLJ	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	25	1284	2	1023
A016CLJ	TE	RBBP6	NM_006910	18	c.C4705T	p.R1569C	-	B	46	934	48	723
A016CLJ	TE	TET2	NM_001127208	6	c.C3646T	p.R1216X	COSM42029	A	0	712	2	512
A016CLJ	TE	TP53	NM_000546	6	c.A578T	p.H193L	COSM11066;COSM99918;COSM2744772	A	0	889	33	833
A017CMI	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	44	1010	1,4	1244
A017CMI	PV	TET2	NM_001127208	10	c.4293delT	p.S1431Rfs*16	-	A	0,6	1681	0	2149
A017CMI	PV	TET2	NM_017628	3	c.G3410T	p.G1137V	COSM3735043	B	3	631	0	1274
A017CMI	PV	TET2	NM_001127208	7	c.G3893A	p.C1298Y	COSM87138	B	0,5	1626	57	2550
A017CMI	PV	TP53	NM_000546	5	c.T526A	p.C176S	COSM44146;COSM1324781	A	0	1050	85	924
A019CCV	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	25	1284	94	373
A019CCV	TE	KMT2A	NM_001197104	27	c.T8168C	p.V2723A	-	C	46	376	32	41
A019CCV	TE	TP53	NM_001276761	7	c.G626A	p.R209Q	COSM99602;COSM99021;COSM99020	A	3	1102	0	286
A019CCV	TE	TP53	NM_001276761	7	c.G594A	p.M198I	COSM1640835;COSM99646;COSM10834	A	1,4	1973	84	366
A020CLJ	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	94	400	90	976
A020CLJ	PV	SMC3	NM_005445	24	c.2799_2801del	p.K936del	-	B	0	150	41	464
A022CMJ	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	16	972	92	296

A022CMJ	TE	SRSF2	NM_003016	1	c.C284A	p.P95H	COSM211505;COSM211029;COSM211504	A	18	227	45	22
A022CMJ	TE	TET2	NM_001127208	11	c.G5633A	p.R1878H	-	C	8	1311	45	218
A022CMJ	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.2591delA	p.D864Afs*2	-	A	1,2	896	38	189
A022CMJ	TE	TP53	NM_000546	5	c.G524A	p.R175H	COSM10648;COSM3355994;COSM99022	A	0	745	88	192
A023CTL	TE	CALR	NM_004343	9	c.1153_1154delinsTGTC	p.Lys385Cysfs*46	-	A	15	8022	100	316
A023CTL	TE	TET2	NM_001127208	10	c.4312dupA	p.E1437fs	COSM4385603	A	23	11980	49	1199
A023CTL	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.1934dupG	p.G642fs	COSM4170082;COSM1411076	A	0	16217	27	973
A023CTL	TE	EZH2	NM_004456	13	c.G1546T	p.D516Y	-	B	0	5875	11	135
A023CTL	TE	EZH2	NM_004456	8	c.T851A	p.L284H	-	B	0,3 6	37714	66	1808
A024CBT	TE	BCOR	NM_001123385	12	c.G4741T	p.D1581Y	COSM4109395;COSM4109396;COSM4109397	B	3	354	57	286
A024CBT	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	9	610	0	837
A024CBT	TE	DNMT3A	NM_022552	23	c.C2644T	p.R882C	COSM53042;COSM1166704	A	28	359	20	294
A024CBT	TE	ETNK1	NM_018638	3	c.G734A	p.G245D	-	C	3	692	25	651
A024CBT	TE	ETV6	NM_001987	3	c.302_303insCTTGGGTCT	p.D101_F102insLGL	-	B	0	627	16	592
A024CBT	TE	FLT3	NM_004119	9	c.C1197A	p.N399K	-	C	49	406	55	242
A024CBT	TE	RUNX1	NM_001754	9	c.1036delC	p.R346Afs*247	-	A	0	721	19	711
A024CBT	TE	TET2	NM_001127208	4	c.A3467T	p.N1156I	-	B	6	420	2	401
R025CJC	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	39	1366	0	796
R025CJC	PV	DNMT3A	NM_022552	23	c.C2644T	p.R882C	COSM53042;COSM1166704	A	23	860	23	405
R025CJC	PV	NF1	NM_001042492	40	c.C5902T	p.R1968X	COSM3402748;COSM30766	A	3	949	0	185
R025CJC	PV	TP53	NM_000546	7	c.G743A	p.R248Q	COSM99602;COSM99021;COSM99020	A	0	1167	87	672
A028CBG	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	47	591	47	561
A028CBG	PV	DNMT3A	NM_022552	23	c.C2701G	p.L901V	-	B	41	297	43	284
A028CBG	PV	DNMT3A	NM_022552	15	c.G1685A	p.C562Y	COSM249136;COSM5878817	A	51	370	39	268
A028CBG	PV	IDH2	NM_002168	4	c.G419A	p.R140Q	COSM41590	A	48	408	50	458
A028CBG	PV	MPL	NM_005373	12	c.G1775A	p.R592Q	COSM2170465	A	0	456	42	434
A028CBG	PV	SUZ12	NM_015355	16	c.G2016A	p.M672I	-	C	49	629	52	511
A028CBG	PV	U2AF1	NM_006758	6	c.A470C	p.Q157P	COSM211534;COSM1318797	A	0	897	5	900
A029CCM	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	10	1894	1,6	818

A029CCM	PV	TP53	NM_000546	7	c.G734A	p.G245D	COSM3388189	B	3	1464	45	882
A030CMM	TE	CALR	NM_004343	9	c.1154_1155in sTTGTC	p.K385fs	COSM1738056	A	57	1415	37	881
A030CMM	TE	ATM	NM_000051	34	c.A5071C	p.S1691R	COSM6005491 COSM5611197;COSM5611198;COSM2196	C	44	424	47	358
A030CMM	TE	WT1	NM_024426	2	c.C745T	p.P249S	3	C	40	932	43	684
A030CMM	TE	ATM	NM_000051	61	c.G8845A c.1808_1819d	p.V2949I p.603insFDREYE	-	B	14	4032	1,3	1306
A030CMM	TE	FLT3	NM_004119	14	up	YDLK	-	A	0	1162	41	1570
A030CMM	TE	RUNX1	NM_001754	6	c.A580G	p.K194E	-	B	0,3	3107	36	2518
B031CDM	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	68	868	57	976
B031CDM	PV	DOT1L	NM_032482	24	c.C3271T	p.R1091X	-	A	0	450	47	437
B031CDM	PV	RUNX1	NM_001754	5	c.A484G	p.R162G	COSM4385181;COSM24718	A	0	491	57	825
B032CFJ	TE	CALR	NM_004343	9	c.1154_1155in sTTGTC	p.K385fs	COSM1738056	A	55	183	54	356
B032CFJ	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.1927dupG	p.G646Wfs*10	COSM1411076	A	9	179	19	260
B032CFJ	TE	PDS5B	NM_015032	30	c.A3488G	p.N1163S	-	B	50	940	49	726
B032CFJ	TE	SUZ12	NM_015355	15	c.A1814T	p.D605V	COSM4745721	B	0,4	484	86	84
B032CFJ	TE	NRAS	NM_002524	2	c.G35A	p.G12D	COSM564	A	0	870	46	804
B033CCY	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	31	1422	11	926
B033CCY	PV	U2AF1	NM_006758	6	c.A470G	p.Q157R	COSM1724986;COSM211532	A	26	11502	31	2157
B033CCY	PV	GATA2	NM_001145661	4	c.635_636insT CAA	p.K212Nfs*70	-	A	0	3689	11	1426
B033CCY	PV	RUNX1	NM_001754	5	c.459_460insA C	p.Q154Tfs*22	-	A	0	2299	30	1186
B033CCY	PV	MPL	NM_005373	12	c.1844delC	p.C616Afs*13	-	A	0	3025	31	1607
B033CCY	PV	TET2	NM_001127208	8	c.G4021C	p.A1341P	-	B	0	2829	30	480
A034CSP	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	42	557
A034CSP	TE	TP53	NM_000546	5	c.A536G	p.H179R	COSM1645241	A	NA	NA	93	638
A034CSP	TE	ETV6	NM_001987	5	c.T602C	p.L201P	-	C	NA	NA	56	197
A035CMM	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	73	603
A035CMM	PV	TP53	NM_000546	5	c.T487C	p.Y163H	COSM1522497	A	NA	NA	6	298
A036CJA	PV	TP53	NM_000546	6	c.A659G	p.Y220C	COSM10758	A	NA	NA	49	614
A036CJA	PV	SH2B3	NM_005475	2	c.A197G	p.Q66R	-	C	NA	NA	45	143

A036CJA	PV	SETBP1	NM_015559	4	c.A2738C c.2307_2315d	p.N913T	-	C	NA	NA	28	393
A036CJA	PV	DNMT3A	NM_022552	19	el	p.769_772del	-	B	NA	NA	10	1311
L037CRP	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	76	683
L037CRP	PV	RUNX1	NM_001754	6	c.A593G	p.D198G	COSM4816274;COSM24799	A	NA	NA	35	920
L037CRP	PV	RUNX1	NM_001754	5	c.G493T	p.G165C	COSM5030995;COSM96547	A	NA	NA	35	516
L037CRP	PV	SRSF2	NM_003016	1	c.C284T	p.P95L	COSM146288;COSM211506;COSM211028	A	NA	NA	22	103
L037CRP	PV	TP53	NM_000546	5	c.460_461insT CC	p.G154delinsVR	-	A	NA	NA	2	508
L037CRP	PV	HMGA2	NM_003484	4	c.A307G	p.K103E	-	C	NA	NA	48	943
L037CRP	PV	DOT1L	NM_032482	13	c.C1058G	p.A353G	-	C	NA	NA	52	190
B038CLL	PV	NRAS	NM_002524	2	c.G37C	p.G13R	COSM569	A	NA	NA	49	591
B038CLL	PV	RUNX1	NM_001754	4	c.C332A	p.T111N	COSM42101	A	NA	NA	44	318
B038CLL	PV	TP53	NM_000546	7	c.C742T	p.R248W	1	A	NA	NA	47	494
B038CLL	PV	TP53	NM_000546	7	c.719_781deli nsTC	p.(Ser240Ilefs*8 5)	COSM3356966;COSM984905;COSM984907	A	NA	NA	29	623
B039CLJ	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	11	526
B039CLJ	PV	IDH2	NM_002168	4	c.G419A	p.R140Q	COSM41590	A	NA	NA	2,5	2655
B039CLJ	PV	TP53	NM_000546	6	c.A641G	p.H214R	40	A	NA	NA	16	3420
B039CLJ	PV	TP53	NM_000546	5	c.384_385del c.1154_1155in	p.A129Pfs*18	-	A	NA	NA	40	676
B040CPJ	TE	CALR	NM_004343	9	sTTGTC	p.K385Nfs*46	COSM1738056	A	NA	NA	44	288
B040CPJ	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.2672dupT	p.S892Ffs*1	-	A	NA	NA	39	293
B040CPJ	TE	GATA2	NM_032638	6	c.C1186T	p.R396W	-	A	NA	NA	7	1520
B040CPJ	TE	NRAS	NM_002524	2	c.G38A	p.G13D	COSM573	A	NA	NA	38	1096
B041CRM	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	55	790
B041CRM	TE	CEBPA	NM_004364	1	c.G866A	p.R289H	-	B	NA	NA	29	906
B041CRM	TE	CEBPA	NM_004364	1	c.541_542insC CTT	p.Y181Sfs*140	-	A	NA	NA	26	174
B041CRM	TE	RUNX1	NM_001754	5	c.460_462del	p.Q154del	-	B	NA	NA	32	638
B041CRM	TE	TET2	NM_001127208	9	c.C4100G	p.P1367R	COSM4170044	B	NA	NA	41	193
B041CRM	TE	TET2	NM_001127208	11	c.G5644C	p.A1882P	COSM87185	A	NA	NA	28	749
B041CRM	TE	TET2	NM_001127208	3	c.1643dupA	p.T549Nfs*17	-	A	NA	NA	7	515

A042CGJ	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	14	561
A042CGJ	TE	TP53	NM_000546	5	c.T487C	p.Y163H	COSM1522497	A	NA	NA	48	170
A042CGJ	TE	DNMT3A	NM_022552	23	c.G2645A	p.R882H	COSM442676	A	NA	NA	22	176
A043CBM	PV	ATRX	NM_000489	9	c.T3364A	p.C1122S	-	C	NA	NA	99	413
A043CBM	PV	BCORL1	NM_021946	3	c.A3158G	p.K1053R	-	B	NA	NA	99	373
A043CBM	PV	TP53	NM_000546	8	c.G841A	p.D281N	COSM3932743;COSM43596;COSM164934 1;COSM146336	A	NA	NA	90	1049
A043CBM	PV	ATM	NM_000051	8	c.C998T	p.S333F	COSM5020962;COSM5020963	B	NA	NA	52	509
A044CMM	PV	ASXL1	NM_015338	12	c.2894_2896del	p.965_966del	-	B	NA	NA	41	664
A044CMM	PV	DNMT3A	NM_022552	23	c.G2645A	p.R882H	COSM52944;COSM442676	A	NA	NA	43	419
A044CMM	PV	NF1	NM_001042492	4	c.T7010C	p.L2337P	-	B	NA	NA	29	70
A044CMM	PV	SH2B3	NM_005475	8	c.C1696T	p.R566W	-	B	NA	NA	39	217
A044CMM	PV	TET2	NM_001127208	3	c.A1355C	p.E452A	-	B	NA	NA	48	456
A044CMM	PV	TP53	NM_000546	10	c.C1009T	p.R337C	COSM117591;COSM11071	A	NA	NA	47	695
A045CVB	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	58	848
A045CVB	TE	EZH2	NM_004456	8	c.G857A	p.C286Y	-	B	NA	NA	46	972
A045CVB	TE	NF1	NM_001042492	37	c.A5039G	p.Y1680C	-	B	NA	NA	45	464
A046CBN	TE	CALR	NM_004343	9	c.1154_1155insTTGTC	p.K385Nfs*46	COSM1738056	A	NA	NA	48	311
A046CBN	TE	CUX1	NM_001202543	18	c.G2206A	p.D736N	-	C	NA	NA	45	110
A047CRG	PV	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	5	489
A047CRG	PV	BCORL1	NM_021946	3	c.A1003C	p.T335P	-	B	NA	NA	23	266
A047CRG	PV	BCORL1	NM_021946	3	c.C2752T	p.Q918X	-	A	NA	NA	6	463
A047CRG	PV	BCORL1	NM_021946	6	c.G3969C	p.E1323D	-	B	NA	NA	44	50
A047CRG	PV	CHEK2	NM_001005735	5	c.720delA	p.V241Ffs*6	-	A	NA	NA	46	164
A047CRG	PV	CUX1	NM_001202543	18	c.G2206A	p.D736N	-	C	NA	NA	56	143
A048CBA	PV	TP53	NM_000546	5	c.A395G	p.K132R	COSM3388223;COSM1646844;COSM1158 2	A	NA	NA	94	50
A049CBE	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.1927dupG	p.G646Wfs*10	COSM4170082;COSM1411076	A	1	392	26	164
A049CBE	TE	CHEK2	NM_001005735	16	c.1696delC	p.R566Vfs*41	-	A	7	171	0	680
A049CBE	TE	PPMD1	NM_003620	6	c.1427delA	p.N477Ifs*5	-	A	7	801	0	460
A049CBE	TE	TP53	NM_000546	7	c.G734A	p.G245D	COSM3388189;COSM43606;COSM179807	A	4	540	3	72

A049CBE	TE	SH2B3	NM_005475	7	c.C1298T	p.S433L	-	B	93	212	40	126	
A049CBE	TE	TP53	NM_000546	7	c.C742T	p.R248W	COSM120006;COSM120005	A	2	456	89	56	
P050CGR	TE	CALR	NM_004343	9	c.1092_1143del	p.Glu364fs	COSM1738057	A	NA	NA	16	64	
P050CGR	TE	ASXL1	NM_015338	12	c.3150dupG	p.R1051Afs*35	-	A	NA	NA	37	633	
P050CGR	TE	NRAS	NM_002524	2	c.G35T	p.G12V	COSM566	A	NA	NA	5	967	
P050CGR	TE	PDS5B	NM_015032	12	c.G1355A	p.R452Q	-	B	NA	NA	28	334	
P050CGR	TE	SETBP1	NM_015559	4	c.G1933A	p.E645K	-	B	NA	NA	46	1334	
P050CGR	TE	SUZ12	NM_015355	15	c.T1808G	p.F603C	-	B	NA	NA	44	296	
P051CLO	TE	MPL	NM_005373	10	c.G1544T	p.W515L	COSM3719407;COSM18918	A	6	128	16	307	
P051CLO	TE	IDH2	NM_002168	4	c.G419A	p.R140Q	COSM41590	A	15	492	2	431	
P051CLO	TE	SRSF2	NM_003016	1	c.C284G	p.P95R	COSM211661;COSM4385016	A	28	241	46	442	
P051CLO	TE	TP53	NM_000546	7	c.A736G	p.M246V	COSM251431;COSM251429;COSM172638	A	2	0	677	18	1061
A053CFJ	PV	TP53	NM_000546	7	c.G743A	p.R248Q	COSM99602;COSM99021;COSM99020	A	NA	NA	69	503	
P054CRP	TE	JAK2	NM_004972	14	c.G1849T	p.V617F	COSM12600	A	NA	NA	50	828	
P054CRP	TE	SUZ12	NM_015355	9	c.A1009G	p.I337V	-	B	NA	NA	30	503	
P054CRP	TE	TET2	NM_001127208	3	c.2064delT	p.S689Pfs*10	-	A	NA	NA	49	471	
P054CRP	TE	TET2	NM_001127208	3	c.3348dupA	p.N1118Kfs*10	COSM4613615;COSM4613616	A	NA	NA	53	341	
P054CRP	TE	U2AF1	NM_006758	2	c.C101A	p.S34Y	COSM1190367;COSM146287	A	NA	NA	46	347	

## Les mutations additionnelles dans les syndromes myéloprolifératifs

### *Association des mutations avec le phénotype*

Nos résultats n'ont pas montré de différence entre le profil mutationnel des polyglobulies de Vaquez et des thrombocytémies essentielles avec mutation promotrice de *JAK2* (Article 1). A l'inverse, le profil mutationnel des TE avec mutation de *CALR* était moins complexe avec surtout des mutations de *TET2* (Article 3). Ces résultats sont en accord avec la littérature et une vision moléculaire de la classification des syndromes myéloprolifératifs (Grinfeld et al., 2017).

Au sein des TE avec mutation de *CALR* nous avons retrouvé un profil moléculaire plus complexe chez les patients avec mutation de type 1 ou de type 1-like (Article 3). Ces résultats, également retrouvés dans un précédent travail, pourraient en partie expliquer la surreprésentation des mutations de type 1 dans la myélofibrose (Agarwal et al., 2017). Toutefois le profil mutationnel seul n'explique pas les différences de distribution des mutations de type 1 et 2 entre TE et MFP puisque les observations des modèles murins nous montrent que les différentes mutations sont elles-mêmes déterminantes dans le développement de la fibrose médullaire (Marty et al., 2016).

Nous avons montré une association entre la présence de mutations additionnelles de *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A* et *SRSF2* et un âge plus élevé au diagnostic dans notre étude du profil mutationnel d'une cohorte de 190 TE (Article 2). Cette association était également retrouvée dans le travail de Grinfeld et al portant sur plus de 2000 patients (Grinfeld et al., 2018). Cette association peut être le reflet de l'acquisition de mutations promotrices à l'origine du SMP au sein d'une hématopoïèse clonale de signification indéterminée chez des sujets plus âgés. Il est également possible que chez les patients diagnostiqués à un âge plus élevé, le temps de latence entre l'acquisition de la mutation promotrice et le développement du SMP soit plus long et donc plus propice à l'acquisition de mutations additionnelles du fait de l'augmentation de la prolifération cellulaire du clone tumoral. En effet ce temps de latence est estimé en médiane à 10 ans et peut aller jusqu'à plus de 15 ans (Gerstung et al., 2020; McKerrell et al., 2017).

Des associations entre mutations additionnelles et présentation clinico-biologique ont également été décrites dans la myélofibrose primitive comme par exemple les mutations d'*U2AF1* qui sont associées à une anémie et à une thrombopénie. De telles associations seront recherchées lors de l'analyse de la cohorte de 479 myélofibroses du FIM.

L'effet des mutations additionnelles sur le phénotype semble différer selon l'ordre d'acquisition des mutations comme montré avec les mutations de *TET2* et de *JAK2V617F* (Ortmann et al., 2015). De futurs travaux étudiant la hiérarchie clonale par séquençage sur cellule unique ou par séquençage de colonies hématopoïétique permettront de préciser l'association entre l'ordre d'acquisition des mutations et les caractéristiques clinico-biologiques.

Dans les syndromes myéloprolifératifs sans mutation promotrice, l'étude par NGS permet dans environ 30% des cas de mettre en évidence un marqueur de clonalité (Article 4 et Grinfeld *et al*, 2018). Ces mutations sont souvent localisées sur les gènes *JAK2* et *MPL* en dehors des positions canoniques. Toutefois lors de la mise en évidence d'une nouvelle mutation non décrite chez un patient triple négatif, la question de l'impact fonctionnel se pose et la mise en œuvre de modèles cellulaires permettant d'y répondre n'est pas toujours possible. Un très récent travail a utilisé une approche de screening haut débit pour étudier l'effet de toutes les substitutions possibles des 29 acides aminés de l'exon 10 de *MPL* (Bridgford *et al.*, 2020). Des cellules Ba/F3 ont été transfectées avec une librairie des différents cDNA possibles et après des étapes de sélection, la croissance en présence d'IL-3, de TPO et en endogène était mesurée. Ce screening a permis d'identifier les variants avec une croissance indépendante des cytokines. Un second screening a été réalisé dans des cellules Ba/F3 exprimant déjà le variant S505N de *MPL*, ce qui a permis de montrer une coopération entre ce variant et certaines substitutions qui seules étaient dépourvues d'effet.

Le phénotype des SMP est influencé par d'autres facteurs que les mutations additionnelles comme par exemple l'inflammation ou le micro-environnement. De nombreux paramètres ont montré leur intérêt pour différencier les syndromes myéloprolifératifs et en particulier la thrombocytémie essentielle de la myélofibrose primitive (CD34 circulants, dosage LDH...). Dans une étude prospective en cours nous visons à développer un score diagnostique non invasif permettant de différencier la TE, la prémyélofibrose et la myélofibrose primitive. Pour développer ce score, nous réalisons des dosages biochimiques (LDH,  $\beta$ 2-microglobuline...), une étude du profil mutationnel (panel 77 gènes), un dosage de 30 cytokines plasmatiques, un dosage des cellules CD34 circulantes et une mesure de la rigidité splénique par élastographie (étude BioScoreSMP, IP : D. Luque Paz, NCT03869476).

## *Evolution du profil mutationnel dans le suivi des syndromes myéloprolifératifs*

### *Lors de la phase chronique*

Dans ce travail nous avons étudié de manière systématique le profil mutationnel lors du suivi de 95 patients avec une polyglobulie de Vaquez ou une thrombocytémie essentielle (Articles 1 et 3). Chez 50 patients avec une PV ou une TE avec mutation promotrice *JAK2V617F*, nous avons détecté 4 nouvelles mutations à 3 ans de suivi soit un taux de 2 nouvelles mutations par an pour 100 patients suivis (2 muts/an/100 patients). Ce taux de nouvelles mutations était de 4 mutations par an pour 100 patients chez les 45 patients avec une TE et mutation de *CALR* et un suivi médian de 6 ans. Dans la littérature un taux de mutation assez proche a été décrit (1,5 à 1,7 mutations / an / 100 patients) (Lundberg *et al.*, 2014b; Senín *et al.*, 2018). Ces résultats sont en opposition avec l'instabilité génétique décrite dans les cellules porteuses de la mutation promotrice *JAK2V617F*. Cette instabilité est médiée par une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et une augmentation des cassures double brin de l'ADN (Chen *et al.*, 2014; Marty *et al.*, 2013; Plo *et al.*, 2008). Certains mécanismes compensatoires pourraient expliquer cette relative stabilité génétique comme la voie de signalisation de p53 ou l'activité de RECQL5, une hélicase dont l'expression est augmentée dans les SMP et qui est associée à une diminution des cassures de l'ADN (Chen *et al.*, 2014, 2015). Ce faible taux de nouvelles mutations concerne les patients 'stables' en phase chronique et non ceux présentant une évolution hématologique. Concernant les mutations promotrices de *CALR*, aucune donnée n'est disponible quant à une éventuelle instabilité mutationnelle. Nos travaux ont montré

un taux de nouvelles mutations similaire aux patients avec mutation de *JAK2*. Ces mutations intéressaient en particulier le gène *TET2*.

Dans une majorité de cas (9/16) les mutations nouvellement détectées dans le suivi étaient en fait déjà présentes dès le diagnostic à un faible taux ne permettant pas leur détection. Elles pouvaient être rétrospectivement visualisées sur les fichiers de séquençage avec une charge allélique pouvant aller jusqu'à des valeurs minimales de 0,1%. Pour les mutations non vues au diagnostic, on ne peut exclure qu'elles soient tout de même présentes à un très faible taux inférieur aux capacités de détection de nos technologies de séquençage nouvelle génération. En effet, la limite de détection du séquençage de nouvelle génération est de l'ordre de 1 % et peut être abaissé lorsque la mutation recherchée est connue ou lorsque l'on utilise une technologie avec des barre-codes moléculaires uniques (UMI) comme nous l'avons fait dans le travail sur les TE avec mutation de *CALR* (Article 3). De plus une limite à la détection des faibles mutations est la quantité d'ADN utilisé. Dans nos travaux nous utilisons 10 ou 50 ng d'ADN soit 3000 ou 15 000 copies de génome.

De précédents travaux avaient également montré qu'une partie des mutations nouvellement détectées étaient en fait déjà présentes dès le diagnostic de la maladie (Lundberg et al., 2014b). Ces observations indiquent donc que les mutations nouvellement détectées correspondent plus à l'émergence d'un clone préexistant qu'à une réelle acquisition de mutation. L'émergence de clones est un reflet de l'hétérogénéité clonale des syndromes myéloprolifératifs où des clones avec des mutations peuvent coexister et évoluer lors du suivi. En dehors des mutations nouvellement acquises, nos travaux ont pu montrer une évolution des mutations lors du suivi avec certaines mutations qui restent stables, certaines qui sont en diminution et enfin d'autres en augmentation. Ces observations sont parfois le reflet d'une compétition clonale puisque chez certains patients la diminution de la charge allélique de la mutation promotrice était associée à une augmentation de la charge allélique d'une mutation additionnelle. Ces évolutions clonales correspondent vraisemblablement à l'histoire naturelle des syndromes myéloprolifératifs mais l'influence possible des traitements est peu connue. L'interféron- $\alpha$  a montré son efficacité sur les clones portant les mutations promotrices mais semble non efficace sur les clones avec certaines mutations additionnelles (Kiladjian et al., 2010; Verger et al., 2015). A l'inverse, l'effet de l'hydroxyurée, médicament le plus prescrit dans les syndromes myéloprolifératifs, sur les évolutions clonales n'est pas connu.

L'étude sériée du profil mutationnel de plus grandes cohortes de patients avec un SMP permettra de préciser le rôle du traitement dans l'évolution clonale. Nous souhaitons poursuivre nos recherches en ce sens avec notamment le recours aux technologies de séquençage sur cellule unique (technologie 10X Genomics en cours d'équipement) qui permettent d'étudier simultanément la hiérarchie clonale et le transcriptome (Nam et al., 2019).

### Lors des transformations leucémiques

A l'inverse des phases chroniques, les évolutions hématologiques et en particulier les transformations leucémiques sont caractérisées par l'acquisition de mutations. Dans ce travail, nous avons étudié le profil mutationnel de 49 transformations leucémiques de polyglobulies de Vaquez ou de thrombocytémies essentielles (Article 4). Nous avons volontairement exclu les transformations leucémiques de myélofibroses primitives de ce travail car le délai d'évolution est plus court et que la myélofibrose primitive est une maladie moléculairement plus complexe. Ce

choix explique la plus grande fréquence de mutation de *TP53* par rapport à la littérature puisque ces mutations sont rares dans les transformations leucémiques de myélofibrose primitive suggérant la participation d'autres mécanismes oncogénétiques de transformation (Courtier et al., 2017). Du fait de la grande hétérogénéité du délai de transformation, nous avons spécifiquement étudié l'association entre le délai et les mutations additionnelles à la transformation leucémique. Nous avons identifié trois profils mutationnels associés à des transformations à court, moyen et long terme. Nous avons également pu étudier le profil mutationnel sur le prélèvement du diagnostic ou de la phase chronique chez 29/49 patients. Le profil mutationnel retrouvé chez les patients avec une transformation à court terme était complexe avec des mutations de gènes impliqués dans l'épigénétique ou la signalisation dès la phase chronique. Ce profil mutationnel correspond aux patients de haut risque moléculaire avec un risque augmenté d'évolution vers la leucémie aiguë selon les classifications récemment proposées (Grinfeld et al., 2018). Chez ces patients, un second évènement mutationnel semble nécessaire à la transformation leucémique puisque des mutations notamment de *RUNX1* ou d'*ETV6* apparaissaient à ce moment.

Afin de préciser l'impact du profil mutationnel au diagnostic sur le risque de transformation leucémique nous souhaitons utiliser nos données dans une étude cas-témoins. En effet la transformation leucémique étant un évènement rare dans la PV et la TE, les études de cohortes ne rapportent que quelques cas et une étude cas-témoins paraît adaptée.

Dans le cas des transformations leucémiques tardives, les mécanismes moléculaires semblent différents et impliquent souvent des mutations de *TP53*. Les mutations de *TP53* sont dans environ la moitié des cas déjà présentes plusieurs années avant la transformation leucémique à une faible charge allélique (Rampal et al., 2014b). A l'inverse, dans certains cas nous n'avons pas pu détecter les mutations de *TP53* jusqu'à un an avant la transformation leucémique avec les limites de sensibilité de nos techniques comme décrit précédemment. Le fait que les mutations de *TP53* soient associées à des transformations tardives peut s'expliquer par le fait qu'une inactivation du second allèle semble nécessaire pour conférer un avantage de prolifération et promouvoir la transformation leucémique (Lundberg et al., 2014b; Rampal et al., 2014b). Cette inactivation peut être une seconde mutation ou une perte d'hétérozygotie. Le rôle du traitement cytoréducteur et notamment de l'hydroxyurée dans la sélection des clones portant la mutation de *TP53* sur le modèle des leucémies secondaires aux chimiothérapies est une question toujours en suspens. Ainsi l'hydroxyurée n'est pas associée à un risque plus élevé de transformation leucémique dans les plus grandes séries rapportées (Bjorkholm et al., 2011). Toutefois au niveau cellulaire, l'hydroxyurée induit des cassures double brins de l'ADN et une apoptose dépendante de p53 ce qui peut suggérer un potentiel avantage de sélection de clone p53-/- avec une instabilité génétique associée (Chen et al., 2015; Gottifredi et al., 2001; Nayak and Das, 2002). A ce jour, une seule étude s'est intéressée à l'association entre les faibles mutations de *TP53* en phase chronique et le traitement par hydroxyurée (Kubesova et al., 2018). Dans ce travail une association était retrouvée mais la significativité statistique était perdue après ajustement sur l'âge des patients. Ce résultat s'explique par le fait que l'âge est un critère confondant puisque les sujets jeunes sont plus souvent traités par interféron- $\alpha$  et les plus âgés par hydroxyurée. De plus, le suivi moléculaire de la charge allélique des mutations de *TP53* chez les patients traités ou non traités par hydroxyurée serait nécessaire pour conclure.

Sur cette thématique, nous menons actuellement une étude cas-témoins visant à rechercher une association entre le traitement par hydroxyurée et la sélection des mutations *TP53* (Rôle du Traitement par HydroxyUrée sur

la sélection des mutations TP53 impliquées dans la Transformation Aiguë des syndromes myéloprolifératifs (THUTA) ; financement AO Ligue Contre le Cancer 49). Nous étudions la présence des mutations de *TP53* chez des patients suivi depuis au moins 8 ans pour une PV ou une TE en phase chronique et traités (cas) ou non traités (témoin) par hydroxyurée. La technologie utilisée est un NGS avec UMI permettant d'obtenir une sensibilité de 0,1 à 0,5% de charge allélique (Qiagen QIAact DNA UMI). Dans un second temps, les patients présentant une mutation de *TP53* auront un second prélèvement étudié afin de tester l'association entre le traitement et l'évolution de la charge allélique de ces mutations.

## *Rôle de la génétique constitutionnelle*

Nos travaux se sont concentrés sur les anomalies somatiques des syndromes myéloprolifératifs mais les mutations constitutionnelles peuvent également jouer un rôle dans l'initiation ou dans le phénotype de la maladie. Une partie des SMP correspond à des formes familiales avec une pénétrance très variable. On distingue des facteurs de risques génétiques soit (i) rares et associés à un fort risque comme par exemple la duplication *ATG2B/GSKIP* ou (ii) fréquents dans la population générale et associés à un risque modéré (odds ratio entre 1.5 et 4) comme par exemple l'haplotype 46/1 de *JAK2* ou des variants de *TET2*, *TERT*... (Jones et al., 2009; Saliba et al., 2015; Tapper et al., 2015). Certains variants constitutionnels semblent également avoir un impact sur le phénotype de la maladie en termes d'association avec une pathologie distincte ou en termes de NFS au diagnostic (Grinfeld et al., 2018). L'exploitation de nos données de séquençage afin d'étudier les polymorphismes et leurs associations avec le phénotype pourra faire l'objet de futurs travaux.

## **Rôle pronostique des mutations additionnelles**

### *Impact pronostique selon le type de syndrome myéloprolifératif*

Depuis 2013 et la signature moléculaire de mauvais pronostic proposée par Vannucchi et al dans la MFP, de nombreux travaux ont rapporté un rôle pronostic des mutations additionnelles dans les syndromes myéloprolifératifs et en particulier dans la myélofibrose.

Deux types d'approches peuvent être proposées pour prendre en compte les mutations additionnelles dans l'évaluation pronostique des patients. D'une part une approche par pathologie avec un score pronostic développé pour chaque maladie. Ainsi, plusieurs scores pronostiques ont été développés récemment dans la myélofibrose et également dans la PV et la TE (Guglielmelli et al., 2018; Tefferi et al., 2020). L'autre type d'approche correspond à une classification pronostique basée sur la génomique tous SMP confondus (Grinfeld et al., 2018). Cette dernière approche est attrayante car elle permet une plus grande personnalisation de l'évaluation pronostique puisque l'impact pronostique d'un gène sera pondéré selon les mutations présentes sur tous les autres gènes. Dans les deux cas, les classifications pronostiques devront être validées sur des nouvelles cohortes. Nous avons prévu de comparer les différents scores pronostiques lors de l'analyse du NGS des 479 myélofibroses du FIM.

Nous avons confirmé l'utilité pronostique des mutations additionnelles dans une cohorte de 190 TE puisque l'impact pronostique était indépendant de la classification de l'ELN (Article 2). Toutefois, l'impact pronostique des

mutations additionnelles pourrait varier selon la mutation pronostique car nous ne retrouvons pas d'influence sur le pronostic chez une cohorte de 45 patients avec une TE et une mutation promotrice de *CALR* (Article 3). Ce résultat peut être vu étant comme en contradiction avec les résultats de l'article 2. Cependant, dans ce dernier, il n'y avait que 23 patients avec mutation de *CALR* et un seul évènement (décès) chez ces patients. Les patients avec mutation de *CALR* ont un pronostic globalement meilleur avec une plus faible incidence de thrombose et de transformation leucémique. Ces patients présentent également moins de mutations de mauvais pronostic. Ainsi d'autres marqueurs pronostiques pourraient être identifiés chez ces patients comme par exemple le suivi de la charge allélique de *CALR* (Article 3).

## *Implications cliniques*

### *Difficultés d'interprétation possibles des données de NGS*

La réalisation d'un séquençage nouvelle génération à but pronostique dans les syndromes myéloprolifératifs implique une interprétation biologique des résultats qui peut parfois être difficile. En effet, des nuances pourraient exister quant à l'impact pronostique d'un gène selon le type de mutation, la description ou non de son caractère pathogénique et sa charge allélique.

Par exemple, les mutations de *SRSF2* sont associées à un pronostic péjoratif dans tous les syndromes myéloprolifératifs d'après la grande majorité des études (Grinfeld et al., 2017; Tefferi et al., 2020). La majorité des mutations de *SRSF2* concerne la position P95 et est associée à un défaut d'épissage spécifique avec une modification des séquences ESE reconnues (Kim et al., 2015). Certaines mutations en dehors de cette position P95 peuvent être détectées et donc être d'interprétation difficile. Dans un article publié en janvier 2020, une équipe a étudié 14 mutations rares touchant les gènes de l'épissage (*SF3B1*, *SRSF2* et *U2AF1*) et a montré que 11 d'entre-elles induisaient des anomalies de l'épissage similaires aux mutations habituelles de ces gènes (Pangallo et al., 2020). Un autre exemple est l'interprétation des mutations d'*ASXL1* qui sont très majoritairement des mutations entraînant une protéine tronquée mais quelques rares mutations faux-sens sont également décrites. Dans une étude, l'impact pronostique défavorable des mutations d'*ASXL1* dans la myélofibrose était le même quel que soit le type de mutation (Tefferi et al., 2018d). Toutefois ces mutations faux-sens peuvent parfois correspondre à des polymorphismes rares surtout lorsqu'elles ne sont pas décrites dans les hémopathies et rarement décrites dans la population générale. Dans nos travaux, l'utilisation de matériel contrôle germlinal permettait l'élimination de nombreux variants constitutionnels (Articles 1 et 3). Lorsque du matériel germlinal n'est pas disponible, la classification des mutations selon leur pathogénicité suspectée peut être utile. Nous avons proposé une classification en trois classes : pathologique, possiblement pathologique et variant de signification indéterminée (Articles 2 et 3). Cette classification a été légèrement modifiée à la suite du consensus du groupe FIM pour l'analyse des myélofibroses (tableau XII). Ces classifications sont inspirées de celle proposée par l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) (Li et al., 2017). En étudiant une cohorte de 190 patients, nous avons montré que les mutations additionnelles avaient un impact pronostique défavorable en prenant en compte toutes les mutations ou uniquement les mutations 'pathologiques' (Article 2). Ces résultats devront être confirmés et un consensus sur la classification des mutations de mauvais pronostic serait souhaitable avec l'utilisation croissante du NGS et l'impact possible des résultats dans la prise en charge des patients.

Dans leur étude portant sur 2035 patients, l'équipe de P.J. Campbell a choisi d'exclure les mutations non décrites dans la base COSMIC (mutation exacte ou position protéique) et ayant une charge allélique supérieure à 40% afin de réduire les potentiels variants rares constitutionnels. Selon le même objectif, nous avons choisi d'exclure les variants avec une fréquence allélique supérieure à 0,1% parmi ceux classés comme étant de signification indéterminée dans notre travail en cours sur les myélofibroses. Nous prévoyons lors de l'analyse statistique de ce travail de tester l'impact de la classification pathologique et de la charge allélique des mutations sur le pronostic pour chaque gène.

En effet, la charge allélique des mutations additionnelles pourrait influencer le pronostic de manière différente selon le gène avec un impact pronostique soit :

- (i) Indépendant de la charge allélique comme cela a été montré pour les mutations de *TP53* dans la leucémie lymphoïde chronique (Landau et al., 2013; Rossi et al., 2014) ;
- (ii) Dépendant de la charge allélique avec un effet on/off à un seuil donné de charge allélique (par exemple : pronostic péjoratif au-dessus de 20 % de charge allélique) ;
- (iii) Dépendant de la charge allélique avec une relation linéaire entre le pronostic et la charge allélique.

Très peu de données sont disponibles quant à l'impact de la charge allélique sur le pronostic. Les seules données disponibles sont discordantes puisque les mutations d'*ASXL1* étaient pronostiques indépendamment de leurs charges alléliques dans une étude portant sur 480 myélofibroses tandis que la charge allélique avait un impact pronostique dans l'étude de Grinfeld et al. portant sur 2035 patients (Grinfeld et al., 2018; Tefferi et al., 2018d).

### Adaptation du traitement selon le profil moléculaire

L'interféron- $\alpha$  est le seul traitement permettant une diminution voire une extinction des mutations promotrices (Cassinat et al., 2014; Kiladjian et al., 2006). Son effet sur les mutations additionnelles est peu connu et il semble que certaines mutations additionnelles confèrent une résistance (Kiladjian et al., 2010; Verger et al., 2015). L'étude de l'évolution à l'échelon clonal des différentes mutations des patients sous interféron permettra de préciser les mécanismes de résistance et pourra guider les patients à traiter par interféron (Etude en cours par B. Cassinat, AO Force Hemato 2019). De plus, l'arrivée prochaine de nouveaux inhibiteurs de JAK1/2 et d'autres thérapies ciblées dans l'arsenal thérapeutique pose la question de leur efficacité selon le type de mutation additionnelle.

Le pronostic des transformations leucémiques de SMP est très péjoratif, y compris pour les patients allogreffés (Ruggiu et al., 2020). Ainsi l'identification au plus tôt des patients de haut risque est un enjeu important dans la prise en charge des patients avec un syndrome myéloprolifératif avec le développement de thérapies ciblées et le recours possible à l'allogreffe avant la transformation leucémique.

La réponse au traitement est également un élément pronostique important puisque deux études ont montré que la résistance à l'hydroxyurée était prédictive d'une diminution de survie et associée à une augmentation du risque de transformation en myélofibrose ou en leucémie aiguë (Alvarez-Larrán et al., 2012; Hernández-Boluda et al., 2011). Les mécanismes de résistance au traitement des SMP restent à ce jour en partie inconnus. Il est néanmoins

évoqué l'implication de mutations additionnelles et de cytokines pro-inflammatoires dans la résistance au traitement. En effet, certaines cytokines, dont le TNF $\alpha$ , sont élevées au cours de la PV et de la TE et seraient impliquées dans l'expansion clonale des cellules hématopoïétiques comportant la mutation JAK2. Alors qu'un traitement par hydroxyurée ne modifie pas l'expression de TNF $\alpha$ , une diminution nette est observée au cours du traitement par interféron- $\alpha$ . Le niveau d'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires ne semble pas modifié (Tashi et al., 2018). Nous avons le projet de développer un score prédictif de la réponse au traitement de première ligne dans la PV et la TE en combinant l'étude du profil mutationnel et le dosage de cytokines plasmatiques (BioPredictorSMP, AO déposé).

### Intérêt du suivi moléculaire

Des scores pronostiques dynamiques basés sur des données cliniques et biologiques existent dans la myélofibrose (DIPSS) mais à ce jour aucun score utilisable dans le suivi et utilisant les mutations additionnelles n'a été proposé. La réévaluation pronostique par séquençage NGS peut être réalisée lors du suivi des patients, en particulier chez les patients avec une myélofibrose chez qui l'allogreffe est envisagée ou encore chez les patients avec une polyglobulie de Vaquez ou une thrombocytémie essentielle présentant des signes d'évolutivité. Dans ces cas, l'acquisition de mutations est un reflet de l'évolution clonale et de l'instabilité génétique de la maladie. Un impact pronostique péjoratif peut être suspecté si les gènes touchés ont un rôle pronostique déjà décrit au diagnostic.

Dans nos travaux sur les phases chroniques de SMP, l'acquisition de mutations additionnelles n'était pas associée à une aggravation de la maladie (Articles 1 et 3). Toutefois, certaines de ces mutations apparaissaient avec une faible charge allélique et le suivi de ces patients était limité. Nous poursuivons le suivi de ces deux cohortes et d'autres points de séquençage NGS sont prévus afin de préciser si l'évolution des nouvelles mutations est pronostique. Dans notre étude sur 50 SMP avec mutation JAK2V617F, l'augmentation de la charge allélique d'au moins une mutation entre le diagnostic et le suivi à 3 ans (JAK2V617F comprise) était associée à une aggravation de la maladie (Article 1). Le suivi des charges alléliques des mutations additionnelles pourrait donc avoir une valeur pronostique. De plus, ce suivi permettrait également d'objectiver l'efficacité des traitements et en particulier de l'interféron- $\alpha$  sur les clones tumoraux. Au CHU d'Angers, nous réalisons des suivis annuels ou biannuels par NGS chez certains patients jeunes avec des mutations de mauvais pronostic (ex : ASXL1) et traités par interféron- $\alpha$ . Un suivi par PCR digitale est également envisageable mais l'avantage du NGS est de pouvoir détecter des mutations nouvellement acquises.

Dans l'article 3, nous avons montré pour la première fois l'intérêt pronostique du suivi de la charge allélique des mutations de CALR. Ces résultats sont en cours de validation au laboratoire sur une cohorte élargie de 110 patients avec plusieurs points de suivis (thèse d'exercice de G. Sueur). Le profil mutationnel de ces patients sera également étudié lors des suivis (AO Ligue Contre Cancer 49 2019, IP : Laurane Cottin).

### Article I : Caractérisation clinique et biologique des syndromes myéloprolifératifs avec double mutation promotrice, une étude du FIM

*Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study*

O. Mansier\*, **D. Luque Paz\***, J.C. Ianotto, Y. Le Bris, A. Chauveau, F. Boyer, C. Conejero, O. Fitoussi, J. Riou, D. Adiko, M. Touati, J. Chauzeix, JF. Viillard, MC. Béné, S. Giraudier, V. Ugo and E. Lippert

Publié dans American Journal of Hematology (2018), 93: e84-e86

---

Les mutations promotrices *JAK2V617F*, *CALR* et *MPL* ont initialement été décrites comme mutuellement exclusives. Par la suite de rares cas avec coexistence de 2 mutations promotrices ont été décrits dans des cas cliniques ou de petites séries de patients. Ces premiers résultats suggéraient qu'une seconde mutation promotrice est plus fréquentes chez les patients avec une mutation *JAK2V617F* de faible charge allélique.

Dans ce travail réalisé sous l'égide du FIM (France Intergroupe des syndromes Myéloprolifératifs), nous rapportons une série de 47 cas de syndromes myéloprolifératifs avec double mutation promotrice. Les patients avec double mutation étaient significativement plus âgés que les patients avec simple mutation. Par la suite nous avons comparé les caractéristiques phénotypiques des patients double mutés avec des patients simple mutés appariés. Nous avons montré que la présentation sur la NFS des patients double mutés *JAK2-CALR* et *JAK2-MPL* était proche des patients simple mutés *CALR* et *MPL*. C'est-à-dire que chez les double mutés, la mutation avec la charge allélique prédominante dictait la présentation au niveau de la NFS. Aucune différence en termes de survenue de thrombose ou d'évolution hématologique n'était observable.

# Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study

## To the Editor:

Mutations in “driver” genes (*JAK2*, *MPL*, or *CALR*) are found in the vast majority of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms (MPN): *JAK2V617F* or exon 12 mutations in polycythemia vera (PV), *JAK2V617F*, *CALR* exon 9, or *MPL* exon 10 mutations in essential thrombocythemia (ET) or primary myelofibrosis (PMF). In the latter, phenotypic presentation and evolutive course vary according to the mutation, eg, higher platelet counts in *CALR* mutated ET patients and higher hemoglobin, white blood cell counts and higher risk of thrombosis in *JAK2*-mutated ET.<sup>1</sup>

Driver mutations were initially described as mutually exclusive, but can co-exist in rare “doubly mutated” (DM) patients.<sup>2–4</sup> We have previously shown that double mutations were more frequently encountered in patients with low (<5%) *JAK2V617F* allelic burdens.<sup>5</sup> However, due to the limited reports of DM patients, it is unclear how co-occurrence of driver mutations affects the presentation or evolution of MPN.

In order to confirm DM frequency in a multicentric fashion, two additional cohorts of *JAK2*-mutated MPN were screened for *CALR* mutations: 134 *JAK2V617F*-mutated ET from the University Hospital of Créteil (France) and a cohort of 31 MPN with a low *JAK2V617F* allele burden (<2%) from the University Hospital of Nantes (France). Five of 49 patients with a *JAK2V617F* allele burden <5% also had a *CALR* mutation (10.2%), similar to our previous findings (14.3%) versus none of the 119 patients with *JAK2V617F* > 5%. This confirms the relatively high frequency of DM in patients with low *JAK2V617F* burden.

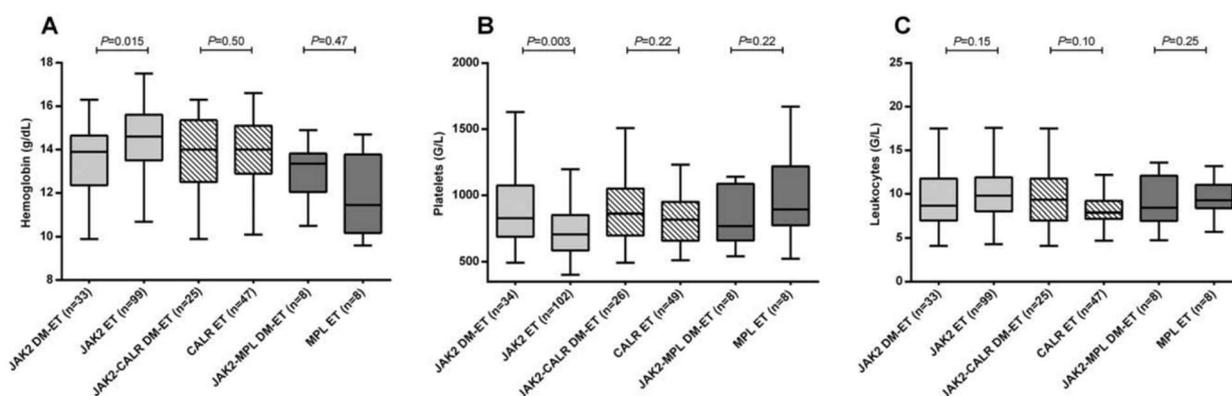
In addition, clinical and biological data were gathered on 21 DM patients discovered fortuitously in 4 other French centers. Overall, 47 cases of DM patients (Supporting Information Figure 1) were analyzed, of which 28 harbored a *JAK2V617F* allele burden equal to or below 1% (60%) while only 2 (5%) had a *JAK2V617F* allele burden above 5%. Among the 47 DM patients, 40 were diagnosed with ET, 5 with PMF, 1 with PV, and 1 with MDS/MPN-RS-T. Thirty-two patients (68%) presented with *JAK2V617F* and *CALR* mutations, 11 (23%) with *JAK2V617F* and *MPL* mutations, 2 with *CALR* and *MPL* mutations, 1 PV

patient had *JAK2V617F* and *JAK2* exon 12 mutations, and 1 patient had an association of two different *CALR* mutations.

In order to know whether a double mutation impacts the clinical presentation or the evolutive course, the 40 DM patients with ET were compared to a control cohort comprising 577 “classical” ET patients from OBENE cohort, NCT02897297. Patients’ characteristics were compared using Fisher exact test for categorical variables as well as Mann and Whitney and Kruskal–Wallis (followed by Dunn tests for multiples comparisons) tests for continuous variables. For multiple tests, *P*-values were adjusted with Hochberg’s method. Survival estimates were obtained with the Kaplan–Meier method, and statistical analyses were performed with Log-rank test and Cox model.

DM-ET patients were more often males (M/F sex ratio 1.4 [23/17] vs. 0.68 [233/344], *P* = .045) and significantly older than control ET patients (median: 72 vs. 61 years old, *P* < .001), especially compared to *JAK2*-singly mutated (SM) (63 years old, *P* = .006), *CALR*-SM (59 years old, *P* < .001) or triple-negative (56 years old, *P* < .001) ET patients. For clinical comparisons, the 37 DM-ET patients with a *JAK2V617F* mutation (29 with *JAK2*-*CALR* and 8 with *JAK2*-*MPL*) were compared to age- and sex-matched ET patients (Supporting Information Table 1): each *CALR*-*JAK2V617F* DM patient was matched with 3 *JAK2V617F* and 2 *CALR*; *MPL*-*JAK2V617F* DM with 3 *JAK2V617F* and 1 *MPL*-SM ET patients. At diagnosis, DM-ET and *CALR* or *MPL*-SM matched control patients had similar hemoglobin and platelet counts, but lower hemoglobin and higher platelet counts than *JAK2*-SM controls (Figure 1A,B). Leukocyte counts of *JAK2*-*CALR* DM-ET patients were intermediate between those of *CALR* and *JAK2*-mutated controls, without statistically significant difference (Figure 1C). Splenomegaly at diagnosis was observed in 17% (4/24) of *JAK2*-*CALR* DM-ET patients and none of the 6 *JAK2*-*MPL* DM-ET for whom this data was available. These frequencies were not significantly different from those observed in respective *JAK2*, *CALR*, or *MPL* SM control groups (Supporting Information Table 1). A history of thrombosis before or at diagnosis was found in 3/16 (19%) of *JAK2*-*CALR* DM-ET, which is equivalent to the proportion observed in *CALR* mutated controls (21%), but lower than that in *JAK2* mutated controls (41%), without reaching statistical significance (*P* = .27).

The *JAK2V617F* allele burden was much lower in DM-ET patients than in matched controls (median 1% vs. 26%, *P* < .001, Supporting Information Figure 2A). The relatively frequent discovery of low *JAK2V617F* burdens in DM patients might be explained by a pre-existing clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP), followed by the acquisition of a second oncogenic event (*CALR* or *MPL* mutation) leading to the MPN phenotype.<sup>6</sup> This would be supported by the fact that DM patients were older. On the other hand, *CALR* mutations in *JAK2*-*CALR* DM-ET patients were also found at a lower allelic



**FIGURE 1** Biological presentation at diagnosis of doubly mutated ET (DM-ET) compared to matched patients: hemoglobin (A), platelets (B), and leukocytes (C)

burden than in matched *CALR*-mutated patients: median 40% vs. 47%,  $P = .014$  for fragment analysis (Supporting Information Figure 2B), 30% vs. 45%, and  $P = .009$  for digital PCR (Supporting Information Figure 2C), consistent with a competition between two different clones.

The occurrence of thrombosis during follow-up (median 36 months) in the 40 DM-ET patients was not different from *JAK2*- and *CALR*-SM matched ET-patients (Supporting Information Figure 3A). The long-term (over 90 months) risk of thrombosis in DM-ET patients appeared to be close to that observed in *CALR*-mutated patients and lower than in *JAK2*-mutated patients (Supporting Information Figure 3B), but the population was too small to reach clear statistical significance.

Only two patients, one with *JAK2-CALR* and one with *JAK2-MPL* co-mutations, evolved to secondary myelofibrosis after 4 and 14 years, respectively. This was not different from the evolution in *JAK2*- and *CALR*-SM patients (Supporting Information Figure 3C). Only one patient with *JAK2-MPL* co-mutation transformed to secondary acute myeloid leukemia 93 months after diagnosis and died 9 months later. No other DM-patient died during the follow-up period.

In conclusion, screening for a second driver mutation in patients with a low *JAK2V617F* allele burden (particularly if  $<1\%$ ) can be helpful to confirm the MPN diagnosis. At least in ET, the disease phenotype of DM patients seems to be dictated by the predominant mutation.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Authors acknowledge the physicians who gave medical information: Pr Frédéric Bauduer and Dr. Fanny Menard (CH de Bayonne), Dr. Gabriel Etienne (CLCC Bergonié), Dr. François Lifermann and Dr. Bruno Le Pluart (CH de Dax), Dr. Corinne Dagada (CH de Pau), Dr. Anne Solanilla (Clinique mutualiste du Médoc), Dr. Le Coz Marie-Francoise (CH de Lorient), Dr. Marion Loirat (CH de Saint Nazaire), Dr. Cédric Pastoret (CHU de Rennes). The authors would also like to thank all local tumor biobanks for providing high-quality samples and the French clinical and biological network of myeloproliferative neoplasms (FIMBANK) supported by a grant from the French National

Institute of Cancer (INCa BCB 2013). OM was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

**CONFLICT OF INTEREST**

Nothing to report.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

OM, DLP, JCI, YLB, AC, CC, OF, MCB and SG collected the data; OM and DLP analyzed the data; OM, DLP, CC, SG and YLB performed molecular testing; OM, DLP and JR performed statistical analysis; VU and EL designed the study; OM, DLP, VU and EL wrote the paper.

**ORCID**

Stéphane Giraudier <http://orcid.org/0000-0002-1817-2236>  
 Eric Lippert <http://orcid.org/0000-0002-2312-6584>  
 Jérémie Riou <http://orcid.org/0000-0002-7056-9257>

Olivier Mansier<sup>1,2,3</sup>, Damien Luque Paz<sup>4,5,6,7</sup>,  
 Jean-Christophe Ianotto<sup>7,8</sup>, Yannick Le Bris<sup>7,9</sup>,  
 Aurélie Chauveau<sup>7,10,11,12</sup>, Françoise Boyer<sup>7,13</sup>, Carole Conejero<sup>14</sup>,  
 Olivier Fitoussi<sup>15</sup>, Jérémie Riou<sup>16</sup> , Didier Adiko<sup>17</sup>,  
 Mohamed Touati<sup>18</sup>, Jasmine Chauzeix<sup>19,20</sup>, Jean-François Viallard<sup>21</sup>,  
 Marie C. Béné<sup>7,9</sup>, Stéphane Giraudier<sup>14</sup> , Valérie Ugo<sup>4,5,6,7</sup>,  
 Eric Lippert<sup>7,10,11,12</sup>

<sup>1</sup>UFR Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>2</sup>CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie, Bordeaux, France

<sup>3</sup>INSERM U1218, ACTION, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>4</sup>Université Angers, UFR Santé, Angers, France

<sup>5</sup>CHU d'Angers, Laboratoire d'Hématologie, Angers, France

<sup>6</sup>CRCINA, INSERM, Université d'Angers, Angers, France

<sup>7</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire 'Grand Ouest Against Leukemia' (FHU GOAL), Angers, France

<sup>8</sup>CHU de Brest, Service d'Hématologie Clinique, Brest, France

<sup>9</sup>CHU de Nantes, Laboratoire d'Hématologie, Nantes, France

<sup>10</sup>CHU de Brest, Laboratoire d'Hématologie, Brest, France

<sup>11</sup>INSERM U1078, CHRU Brest, Brest, France

<sup>12</sup>Université de Bretagne Occidentale, UFR Médecine, Brest, France

<sup>13</sup>CHU d'Angers, Service des Maladies du Sang, Angers, France

<sup>14</sup>AP-HP, CHU Henri Mondor, Laboratoire d'Hématologie, Créteil, France

<sup>15</sup>Polyclinique Bordeaux Nord Aquitaine, Service d'hémo-oncologie, Bordeaux, France

<sup>16</sup>INSERM 1066 MINT, Université d'Angers, Angers, France

<sup>17</sup>Service de Médecine-Hématologie, CH Robert Boulin, Libourne, France

<sup>18</sup>CHU de Limoges, Service d'Hématologie, Limoges, France

<sup>19</sup>CHU de Limoges, Laboratoire d'Hématologie, CRBS, Limoges, France

<sup>20</sup>UMR CNRS 7276, Limoges, France

<sup>21</sup>Service de Médecine Interne-Maladies Infectieuses, CHU de Bordeaux, Pessac, France

#### Correspondence

Eric Lippert, MD, PhD, Laboratoire d'Hématologie, CHU de BREST, Boulevard Tanguy Prigent, 29200 BREST, France.  
Email: eric.lippert@chu-brest.fr

Olivier Mansier and Damien Luque Paz contributed equally to this work

#### Funding information

French National Institute of Cancer, Award/grant number: INCa BCB 2013; Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

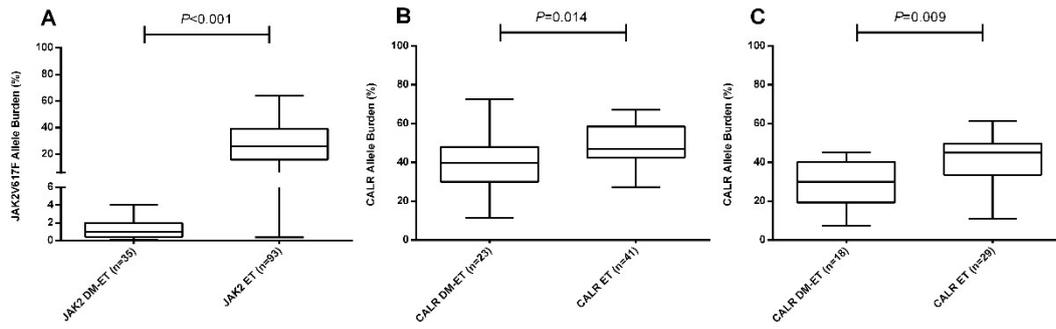
#### REFERENCES

- [1] Langabeer SE, Andrikovics H, Asp J, et al. Molecular diagnostics of myeloproliferative neoplasms. *Eur J Haematol*. 2015;95(4):270–279.
- [2] Xu N, Ding L, Yin C, et al. A report on the co-occurrence of JAK2V617F and CALR mutations in myeloproliferative neoplasm patients. *Ann Hematol*. 2015;94(5):865–867.
- [3] Usseglio F, Beaufils N, Calleja A, Raynaud S, Gabert J. Detection of CALR and MPL mutations in low allelic burden JAK2 V617F essential thrombocythemia. *J Mol Diagn*. 2017;19(1):92–98.
- [4] McGaffin G, Harper K, Stirling D, McLintock L. JAK2 V617F and CALR mutations are not mutually exclusive; findings from retrospective analysis of a small patient cohort. *Br J Haematol*. 2014;167(2):276–278.
- [5] Mansier O, Migeon M, Etienne G, Bidet A, Lippert E. JAK2V617F and CALR double mutations are more frequently encountered in patients with low JAK2V617F allelic burdens. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(8):1949–1951.
- [6] Nielsen C, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Kofoed KF, Birgens HS. JAK2V617F somatic mutation in the general population: myeloproliferative neoplasm development and progression rate. *Haematologica*. 2014;99(9):1448–1455.

#### SUPPORTING INFORMATION

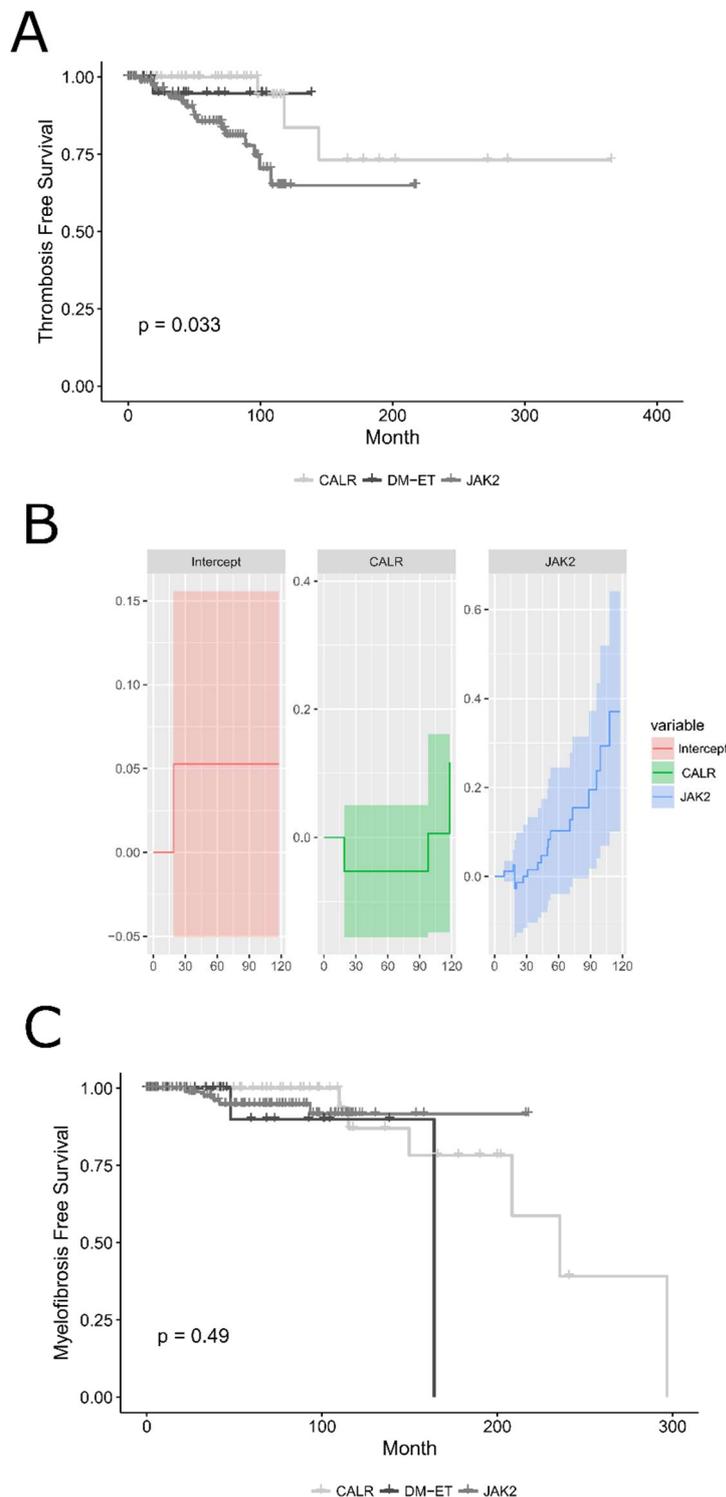
Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.





**Supplemental Figure 2:** Allele burden of driver mutations in doubly mutated ET (DM-ET) and matched patients.

*JAK2V617F* allele burdens were compared between *JAK2* DM-ET (including *JAK2-CALR* and *JAK2-MPL* DM-ET) and matched *JAK2*-ET (**A**). *CALR* allele burdens, determined either by fragment analysis (**B**) or digital PCR (**C**) were compared between *JAK2-CALR* DM-ET and matched *CALR*-ET



**Supplemental Figure 3:** (A) Thrombosis-free survival of DM-ET and matched *JAK2* and *CALR* ET. No significant difference was observed between DM-ET and *JAK2* or *CALR* groups. The significance was due to the difference between *CALR* and *JAK2* groups. (B) Graphic visualization of the Cox model comparison of thrombosis risk between DM-ET (as reference, n= 31), *CALR* (p=0.766, n=46) and *JAK2* (p=0.279, n=88) matched patients. Intercept represents the thrombotic risk of DM-ET. *CALR* and *JAK2* represent the difference of the thrombotic risk between DM-ET and *CALR* or *JAK2* groups respectively. (C) myelofibrosis-free survival of DM-ET and matched *JAK2* and *CALR* ET. No significant difference was observed between DM-ET and *JAK2* or *CALR* groups.

**Supplemental Table I:** Clinical and biological presentation at diagnosis of DM-ET and their matched SM controls.

DM-ET groups		Hemoglobin (g/dL) median (n) [range]	Platelets (10 <sup>9</sup> /L) median (n) [range]	Leukocytes (10 <sup>9</sup> /L) median (n) [range]	Splenomegaly % (n)	Thrombosis history % (n)
<b>JAK2-CALR DM ET (n=28)</b>		<b>14</b> (25) [9.9-16.3]	<b>864</b> (26) [494-1692]	<b>9.4</b> (25) [4.1-19.9]	<b>17%</b> (4/24)	<b>19%</b> (3/16)
Matched Patients	<i>JAK2</i> (n=84)	14.7 (75) [9.7-17.5]	707 (78) [452-1409]	9.7 (75) [4.9-16.1]	8% (5/65)	41% (19/46)
	<i>CALR</i> (n=53)	14 (47) [10.1-16.6]	820 (49) [511-1941]	8.2 (47) [4.7-12.2]	11% (4/38)	21% (5/24)
<b>JAK2-MPL DM ET (n=8)</b>		<b>13.4</b> (8) [10.5-14.9]	<b>771</b> (8) [542-1140]	<b>8.4</b> (8) [4.7-13.6]	<b>0%</b> (0/6)	<b>0%</b> (0/4)
Matched Patients	<i>JAK2</i> (n=24)	14.2 (24) [9.6-17.1]	732 (24) [541-1487]	11.9 (24) [4.3-18.2]	0% (0/12)	63% (5/8)
	<i>MPL</i> (n=8)	11.5 (8) [9.6-14.7]	894 (8) [524-1670]	9.3 (8) [5.7-13.2]	0% (0/5)	<b>50%</b> (2/4)

## Article II : Cas clinique décrivant l'association de mutations de *CALR* et de *LNK* conduisant à un phénotype de thrombocytémie essentielle avec érythrocytose

*Concomitant CALR and LNK mutations leading to essential thrombocythemia with erythrocytosis*

**D. Luque Paz**, F. Boyer, A. Beucher, A. Bouvier, R. Jouanneau-Courville, P. Guardiola, D. Lambert, Y. Delneste, M. Hunault, O. Blanchet and V. Ugo

Publié dans *Blood Cells, Molecules and diseases* (2018), 71: 75-76

---

Nous rapportons le cas d'un patient présentant une thrombocytose chez qui le diagnostic de thrombocytémie essentielle est portée grâce notamment à la mise en évidence d'une mutation de *CALR*. Par ailleurs, ce patient présentait un taux d'hémoglobine à 15.2 g/dL avec un dosage de l'EPO sérique effondré. Une mesure du volume isotypique a confirmé la polyglobulie.

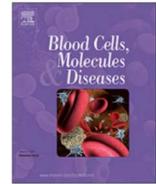
En l'absence de mutation *JAK2 V617F* associée, un séquençage de nouvelle génération avec un panel myéloïde a été réalisé et a détecté une mutation de *LNK* dont le caractère constitutionnel a été confirmé par étude de l'ADN extrait des ongles. Ce patient présentait donc l'association d'un syndrome myéloprolifératif *CALR*-muté et d'une érythrocytose constitutionnelle liée à un variant de *LNK*.

Cette description montre l'intérêt d'explorations complémentaires chez des patients avec mutation de *CALR* et polyglobulie.



Contents lists available at ScienceDirect

## Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bcmd](http://www.elsevier.com/locate/bcmd)

## Letter to the Editor

Concomitant *CALR* and *LNK* mutations leading to essential thrombocythemia with erythrocytosis

## ARTICLE INFO

Editor: Mohandas Narla

## Keywords:

Myeloproliferative neoplasms  
*CALR*  
*LNK*  
 Essential thrombocythemia  
 Erythrocytosis

## To the editor,

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are characterized by a clonal expansion of mature blood cells and mainly include 3 diseases: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). Their diagnosis has been simplified by the discovery of driver mutations (*JAK2V617F*, *MPL* and *CALR*) that allow detection of a molecular marker in more than 80% of cases. First described in 2005, the *JAK2V617F* mutation is found in more than 96% of PV and around half of ET and PMF. Mutations of *JAK2* exon 12 and *MPL* gene may also, rarely, be found in PV and TE or MPF, respectively. In 2013, a novel type of mutations affecting the *CALR* gene was described in *JAK2V617F* no mutated ET or PMF. *CALR* gene encodes calreticulin, a calcium-binding chaperone protein that promotes folding and quality control in the endoplasmic reticulum. All *CALR* mutations are insertion or deletion localized in the exon 9 that result in a frameshift with a common C-terminal sequence. First described only in ET and PMF, *CALR* frameshift mutations were then found in very few patients with erythrocytosis [1,2]. The mutated protein interacts with *MPL* receptor for *JAK2/STAT5* pathway activation but not with the erythropoietin receptor [3]. When introduced in murine hematopoietic cells, it induces thrombocytosis without erythrocytosis. In a previous report, we identified 2 *CALR* mutated patients within a large cohort of unexplained polycythemia without *JAK2* mutation and reclassified them as (i) ET associated to a minimal polycythemia probably induced by chronic hypoxia and as (ii) an idiopathic erythrocytosis without any clue for MPN [4]. To date, screening for *CALR* mutation for the diagnosis of PV is not advisable and, if such mutation is found, it should not be considered as a convincing explanation for erythrocytosis.

Here we report a case of an 80-years old man that was referred to our lab for a chronic thrombocytosis. The patient had a history of heart arrhythmia and was treated by vitamin K antagonists. The initial examination showed no splenomegaly, mild leukocytosis ( $11.9 \times 10^9/L$ ), thrombocytosis ( $902 \times 10^9/L$ ) and normal hemoglobin and hematocrit (15.2 g/dL and 44.2% respectively). Nevertheless, a low serum erythropoietin (EPO) level (3.5 UI/L) motivated the measure of red cell mass that was increased (126%), without evidence for secondary

erythrocytosis. This argues for the usefulness of the red mass measure in some cases of MPN as previously demonstrated. At the same time a classical molecular screening found no V617F or exon 12 mutation of *JAK2* but a previously described type 2-like mutation of *CALR* (c.1154\_1155insATGTC; p.Glu386Cysfs\*46; type 33 according Klampfl et al.). To better understand the molecular landscape of this case we performed a 64-genes custom next generation sequencing (Haloplex HS, Illumina NextSeq500) that confirmed the *CALR* mutation with a variant allele frequency (VAF) of 52%. It was associated to a *LNK* mutation (c.639C > A; p.Ser213Arg) with a VAF of 48% that was validated by Sanger sequencing. This mutation of *LNK* occurred in the “hotspot” of the exon 2 coding for the PH domain of the protein and was predicted to be deleterious by both SIFT, Polyphen2 and MutationTaster tools. The Ser213Arg mutation of *LNK* was previously described in a case of *JAK2*-negative erythrocytosis without somatic validation (COSM1685386) [5]. In this previous report the patient had a hemoglobin of 17 g/dL, a hematocrit of 50.4% and a low EPO level (4 UI/L) as in the patient reported herein. This *LNK* variant had a minor allele frequency of 0.063% in gnomAD database (rs111360561). For this reason we controlled the mutation on germinal DNA derived from nails and found that it was indeed a constitutional variant. *LNK* (SH2B3) is an adaptor protein that, after binding, inhibits *JAK2* signaling. *LNK* deficient mice display marked changes of the hematopoiesis, including splenomegaly and a great increase of number of hematopoietic progenitors that have in vitro high proliferative capacities in part due to hypersensitivity to several cytokines [6]. Most of *LNK* mutations identified are missense mutations and occur predominantly in exon 2 coding for the PH domain of *LNK*. *LNK* mutations were found in MPN, especially at leukemic transformation and in idiopathic erythrocytosis (IE) [7]. In particular the mutation Glu208Gln, which is located near the mutation described herein, can be found in both MPN and IE and had a minor allele frequency of 0.099% in gnomAD database.

We therefore retained the diagnosis of *CALR*-mutated ET associated to a *LNK*-mutated constitutional mild erythrocytosis. Bone marrow biopsy was not feasible because of oral anticoagulation. The exclusion of PMF was based on absence of tear drop cells on the blood smear and

<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2018.04.002>

Received 19 April 2018; Accepted 21 April 2018

Available online 23 April 2018

1079-9796/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

a normal circulating CD34 cells count at 2/ $\mu$ L [8]. A treatment by hydroxycarbamide was started with a complete clinicohematological response at 18 months of follow-up.

This report emphasizes the interest of a NGS research for other mutations (such *LNK* or non-V617F *JAK2* mutations) when *CALR* MPN is associated to erythrocytosis. Other causes of erythrocytosis as high oxygen-affinity hemoglobin, *R-EPO* mutations or pathologic EPO production by tumors should also be considered in such cases.

#### Acknowledgements

This study is part of the clinical and biological database “FIMBANK” project supported by a grant of the French National Cancer Institute (INCa-BCB-2013).

#### Ethics approval and consent to participate

The patient was enrolled into the collection “Hémopathies Malignes” of the hospital of Angers who was approved by the CPP (Comité de Protection des Personnes) of Angers (France) Ouest II. A written informed consent was obtained from the patient for the use of clinical and biological data including DNA sequencing.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- [1] J. Broséus, J.-H. Park, S. Carillo, et al., Presence of calreticulin mutations in *JAK2*-negative polycythemia vera, *Blood* 124 (2014) 3964–3966 (<https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-583161>).
- [2] S.E. Langabeer, K. Haslam, C.M. Flynn, Isolated erythrocytosis associated with a *CALR* mutation, *Blood Cells Mol. Dis.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.07.001>.
- [3] I. Chachoua, C. Pecquet, M. El-Khoury, et al., Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants, *Blood* (2015), <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2015-11-681932>.
- [4] A. Chauveau, O. Nibourel, S. Tondeur, et al., Absence of *CALR* mutations in *JAK2*-negative polycythemia, *Haematologica* 102 (2017) e15–e16, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2016.154799>.
- [5] A. Spolverini, L. Pieri, P. Guglielmelli, et al., Infrequent occurrence of mutations in the PH domain of *LNK* in patients with *JAK2* mutation-negative “idiopathic” erythrocytosis, *Haematologica* 98 (2013) e101–e102, <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2013.090175>.
- [6] L. Velazquez, Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in *LNK*-deficient mice, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 1599–1611, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20011883>.
- [7] N. Maslah, B. Cassinat, E. Verger, et al., The role of *LNK*/*SH2B3* genetic alterations in myeloproliferative neoplasms and other hematological disorders, *Leukemia* 31 (2017) 1661–1670, <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2017.139>.
- [8] C. Orvain, D. Luque Paz, I. Dobo, et al., Circulating Cd34+ cell count differentiates primary myelofibrosis from other Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: a pragmatic study, *Ann. Hematol.* 95 (2016) 1819–1823, <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2784-x>.

Damien Luque Paz<sup>a,b,c,d</sup>, Françoise Boyer<sup>e</sup>, Annaëlle Beucher<sup>a</sup>,  
Anne Bouvier<sup>a,c,d</sup>, Rebecca Jouanneau-Courville<sup>a,d</sup>,  
Philippe Guardiola<sup>b,c,d,f</sup>, Diane Lambert<sup>f</sup>, Yves Delneste<sup>c</sup>,  
Mathilde Hunault<sup>b,c,d,e</sup>, Odile Blanchet<sup>a,b,c,d,g</sup>, Valérie Ugo<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> CHU Angers, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie en Santé, Angers, France

<sup>b</sup> Université d'Angers, UFR Santé, Angers, France

<sup>c</sup> CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

<sup>d</sup> Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) GOAL, 'Grand Ouest Against Leukemia', France

<sup>e</sup> CHU Angers, Service des Maladies du Sang, Angers, France

<sup>f</sup> CHU Angers, Service de Génomique Onco-Hématologique, Angers, France

<sup>g</sup> CHU Angers, Centre de Ressources Biologiques, BB-0033-00038, Angers, France

E-mail address: [valerie.ugo@univ-angers.fr](mailto:valerie.ugo@univ-angers.fr)

\* Corresponding author at: Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie en Santé, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France.

## Article III : Cas clinique décrivant l'association de mutations rares des hotspots *JAK2V617* et *MPLW515* chez un patient avec thrombocytémie essentielle triple négative

*Next generation sequencing redefines a triple negative essential thrombocythaemia as double-positive with rare mutations on *JAK2 V617* and *MPL W515* hotspots*

A. Beucher, M. Dib, C. Orvain, A. Bouvier, R. Jouanneau-Courville, I. Dobo, L. Cottin, P. Guardiola, MC. Rousselet, O. Blanchet, M. Hunault, V. Ugo and **D. Luque Paz**

Publié dans *British Journal of Haematology* (2019), 186: 785-788

Nous rapportons ici le cas d'une patiente avec un diagnostic de thrombocytémie essentielle triple négative (*JAK2V617F*, *CALR* et *MPLW515K/L*) qui a été étudiée par séquençage de nouvelle génération myéloïde dans le but de mettre en évidence un marqueur de clonalité.

Le séquençage a mis en évidence quatre mutations dont 2 variants rares des hotspots de *JAK2* et *MPL* : *JAK2V617I* et *MPLW515S*. Le variant *JAK2V617I* a été précédemment décrit dans une famille avec thrombocytose constitutionnelle. Ici, une étude de l'ADN extrait des ongles a prouvé le caractère somatique de cette mutation. Enfin nous avons réalisé à un an de suivi une étude de la hiérarchie clonale et ainsi mis en évidence que le variant de *JAK2* était secondairement acquis dans le clone avec mutation de *TET2* et *MPL*.

## Next generation sequencing redefines a triple negative essential thrombocythaemia as double-positive with rare mutations on *JAK2* V617 and *MPL* W515 hotspots

Classical BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) are clonal haematopoietic disorders, which include polycythaemia vera (PV), essential thrombocythaemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) that are characterized by the presence of somatic driver mutations (*JAK2* V617F or exon 12, *CALR* exon 9 and *MPL* W515). ET and PMF cases with none of these driver mutations are called triple negative. Triple negative MPN can express other rare *JAK2* or *MPL* mutations, as well as mutations in other genes, thus confirming the clonal character of the disease. Despite thorough investigations, a clonal mutation cannot be found in some triple negative ET cases (Cabagnols *et al*, 2016). On the other hand, in some cases, germline mutations of *JAK2* (other than V617F) or *MPL* can lead to familial thrombocytosis (Marty *et al*, 2014).

Here, we report a case of a triple negative ET studied by next generation sequencing (NGS) which appeared to be double-positive for rare variants in *JAK2* V617 and *MPL* W515 hotspots associated with *TET2* and *SF3B1* mutations. We studied the clonal architecture and measured allele burden of mutations at diagnosis and during the follow-up of this case.

The patient, a 78-year-old female, was referred for an isolated thrombocytosis (platelet count:  $779 \times 10^9/l$ , haemoglobin: 142 g/l and leucocyte count:  $9 \times 10^9/l$ ) with no evidence for a reactive thrombocytosis. No splenomegaly was palpable and the patient had no history of thrombosis. Initial standard molecular screening was negative for *JAK2* V617F, *MPL* W515 and *CALR* mutations and *BCR-ABL1* transcript. No dysplasia or ring sideroblasts were found on bone marrow smear. We then searched for clonal markers of 69 myeloid genes by NGS [HaloplexHS library (Agilent, Santa Clara, CA) and NextSeq500 2  $\times$  150 bp paired-end Illumina, San Diego, CA)].

NGS found 4 mutations in the *TET2*, *JAK2*, *MPL* and *SF3B1* genes (Table I). Surprisingly, the 2 mutations in *MPL* and *JAK2* were located in the classical hotspot: *JAK2* V617 and *MPL* W515. The *JAK2* V617I mutation was first reported to be a rare non-V617F *JAK2* mutation in MPN (1 V617I out of 4280 V617F in a large study) (Ma *et al*, 2009). Thereafter, *JAK2* V617I was described as a germline mutation in a family with hereditary thrombocytosis (Mead *et al*, 2012). Ma *et al* (2009) did not confirm the somatic status of the mutation. Here, we confirmed the somatic status of all mutations including *JAK2* V617I by sequencing DNA derived from CD3+ blood cells. The ability of *JAK2* V617I to confer

a constitutive activation of JAK-STAT pathway was described in cellular models (Dusa *et al*, 2008) and an expansion of haematopoietic stem cells was observed in patients with *JAK2* V617I hereditary thrombocytosis (Mead *et al*, 2013). No leukaemic transformation has been observed in the family that carries this germline mutation (Mead *et al*, 2012). The *MPL* W515S mutation is a very rare mutation on the W515 hotspot, the most frequent variants being W515R and W515K (Ma *et al*, 2011). This mutation causes an oncogenic activation of the thrombopoietin receptor (Defour *et al*, 2016).

Finally, bone marrow biopsy confirmed the diagnosis of ET with an increased number of megakaryocytes with some having hyperlobulated nuclei and a very rarely minor increase of reticulin fibres (focal grade 1 fibrosis).

After 1 year of hydroxycarbamide treatment, the patient was resampled to study the clonal hierarchy of these mutations by sequencing and fragment analysis of blood-derived erythroid colonies (14-day erythroid burst-forming units in methylcellulose with interleukin (IL)3, stem cell factor, IL6 and erythropoietin; Stemcell Technologies, Vancouver, Canada; Fig 1A). Eighty-eight of the 102 colonies collected were wild type for all mutations and 14 presented a heterozygous *TET2* mutation. Moreover, 12 of these colonies harboured heterozygous *MPL* and *JAK2* mutations and the remaining 2 had a homozygous *MPL* mutation. Nevertheless, we cannot establish whether the homozygous *MPL* mutation was present at diagnosis. We found that *JAK2* V617I was secondarily acquired in the *TET2/MPL* W515S clone and the patient's mutational hierarchy is summarised in Fig 1B, based on clonal study and on the variant allele frequency evolution of mutations.

Follow-up of mutations showed that *TET2*, *MPL* W515S and *JAK2* V617I allele burden (measured by NGS) decreased dramatically after 1 year of hydroxycarbamide treatment (Table I). The effect of hydroxycarbamide on the *JAK2* V617F allelic burden varies in the literature from a moderate decrease to no influence (Antonioli *et al*, 2010; Besses *et al*, 2011). But such a rapid decrease is unusual. In our patient, this decrease of the three mutations could reflect a clonal competition because it is associated with an increase in *SF3B1* mutation. This mutation was not found in the clonogenic study that may be related (i) to a selection of cells with MPN's driver mutations leading to a proliferation advantage during the culture and/or (ii) to the presence of the *SF3B1*

Table I. Summary of the four mutations found by next generation sequencing at diagnosis and follow-up

Gene	cDNA	Protein	Cosmic ID	VAF diagnosis (%)	VAF follow-up (%)
<i>TET2</i> (NM_001127208)	c.3901_3905delinsC	p.Ala1301fs	–	31	5
<i>JAK2</i> (NM_004972)	c.G1849A	p.Val617Ile	COSM29117	12	4
<i>MPL</i> (NM_005373)	c.G1544C	p.Trp515Ser	COSM142839	21	3
<i>SF3B1</i> (NM_012433)	c.G2225A	p.Gly742Asp	COSM145923	7	11

COSMIC, catalogue of somatic mutations in cancer (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>); ID, identification number; VAF, variant allele frequency.

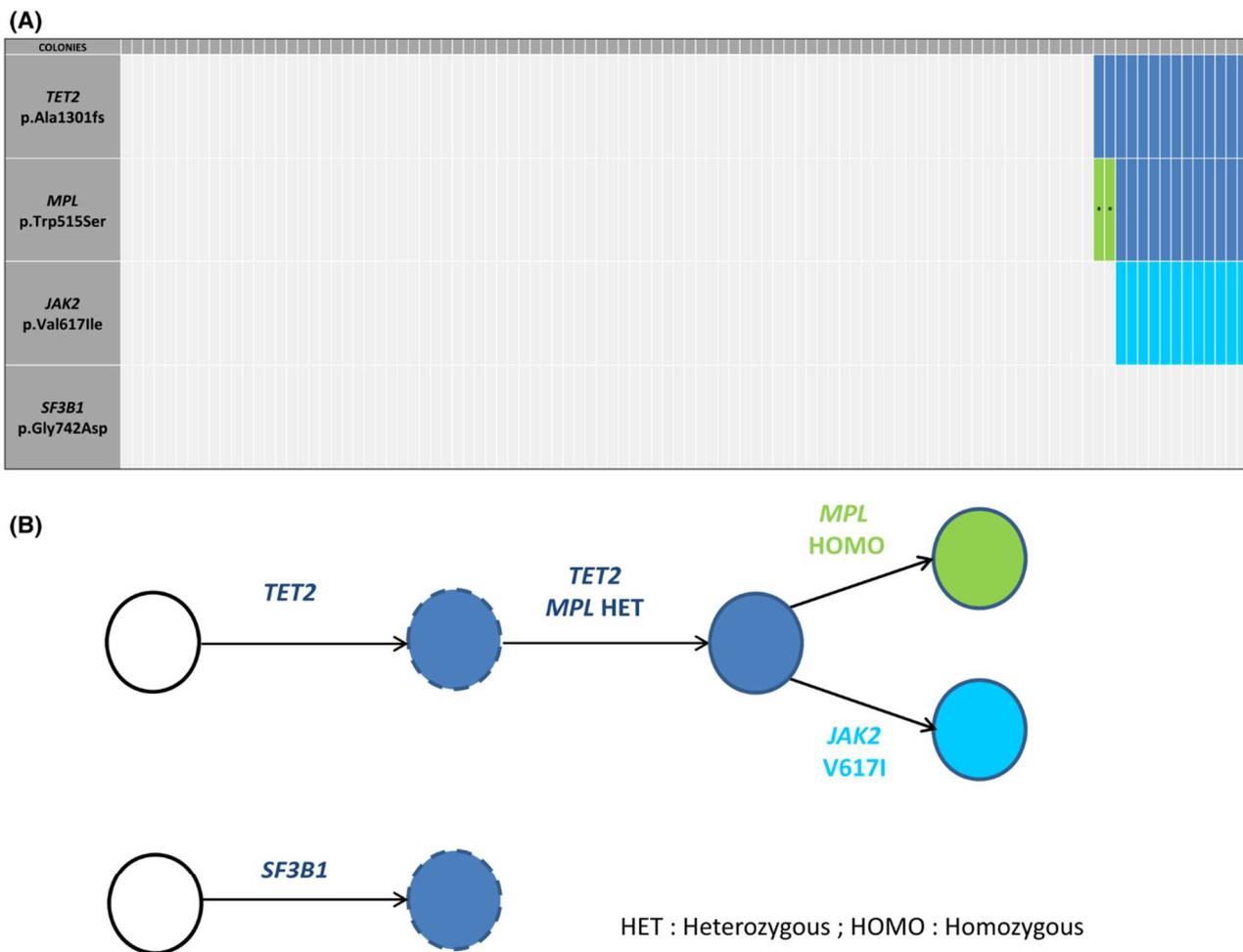


Fig 1. Clonogenic studies at 1 year of follow-up. (A) Analysis results (rows) in 102 colonies (columns). Mutant colonies are indicated by coloured boxes and boxes with a star represent the presence of a homozygous mutation (B) Mutational hierarchy of the patient. Dashed circles indicate positions assumed by the evolution of variant allele frequency. [Colour figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

mutation in a myelodysplastic clone that had not grown during the cell culture.

At 3 years of follow-up, the patient is continuing hydroxycarbamide treatment and is in complete haematological response without any thrombotic or haematological event.

This report emphasizes the input of NGS for the identification of a clonal marker in triple-negative ET. Moreover, this case shows that the same mutation may be constitutional in some cases while somatic in others, underlining the importance of germinal material control. In this case, the

monitoring of allelic burden and clonogenic studies enabled the assessment of the clonal hierarchy and its evolution under therapy. The onset or increase of a clone could warrant a modification in the patient's follow-up or treatment.

#### Author contributions

ANB, RJC, LC, ID and PG performed the research; ANB, ABO, LC and DLP analysed the data; MCR analysed the bone marrow biopsy; MD followed the patient; ANB, VU

and DLP wrote the paper; CO, OB and MH revised the paper; all authors approved the final version.

## Acknowledgements

This study is part of the clinical and biological database “FIMBANK” project supported by a grant of the French National Cancer Institute (INCa).

## Ethics approval and consent to participate

The patient was enrolled into the collection “Hémopathies Malignes” of the University Hospital of Angers, which was approved by the CPP (Comité de Protection des Personnes) of Angers (France) Ouest II. A written informed consent was obtained from the patient for the use of clinical and biological data including DNA sequencing.

Annaëlle Beucher<sup>1,2</sup> 

Mammoun Dib<sup>2,3</sup>

Corentin Orvain<sup>2,3,4,5</sup>

Anne Bouvier<sup>1,2,4,5</sup>

Rebecca Jouanneau-Courville<sup>1,2</sup>

Irène Dobo<sup>1,2</sup>

Laurane Cottin<sup>1,2,5</sup>

Philippe Guardiola<sup>2,4,5,6</sup>

Marie-Christine Rousselet<sup>4,7</sup>

Odile Blanchet<sup>1,2,4,5,8</sup>

Mathilde Hunault<sup>2,3,4,5</sup>

Valérie Ugo<sup>1,2,4,5</sup>

Damien Luque Paz<sup>1,2,4,5</sup> 

<sup>1</sup>Laboratoire d'Hématologie, CHU d'Angers, Angers, France, <sup>2</sup>Fédération Hospitalo-Universitaire 'Grand Ouest Against Leukemia' (FHU GOAL), Angers, France, <sup>3</sup>Service des Maladies du Sang, CHU Angers, Angers, France, <sup>4</sup>UFR Santé, Université Angers, Angers, France, <sup>5</sup>CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France, <sup>6</sup>Service de Génomique Onco-Hématologique (SERGOH), CHU Angers, Angers, France, <sup>7</sup>Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU Angers, Angers, France and <sup>8</sup>Centre de Ressources Biologiques, CHU Angers, Angers, France.

E-mail: damien.luquepaz@chu-angers.fr

**Keywords:** myeloproliferative disease, molecular biology, molecular haematology, essential thrombocythaemia, next generation sequencing

## References

- Antonioni, E., Carobbio, A., Pieri, L., Pancrazzi, A., Guglielmelli, P., Delaini, F., Ponziani, V., Bartalucci, N., Tozzi, L., Bosi, A., Rambaldi, A., Barbui, T. & Vannucchi, A.M. (2010) Hydroxyurea does not appreciably reduce JAK2 V617F allele burden in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*, **95**, 1435–1438.
- Besses, C., Álvarez-Larrán, A., Martínez-Avilés, L., Mojal, S., Longarón, R., Salar, A., Florensa, L., Serrano, S. & Bellosillo, B. (2011) Modulation of JAK2 V617F allele burden dynamics by hydroxycarbamide in polycythemia vera and essential thrombocythaemia patients: JAK2 V617F Modulation by Hydroxyurea. *British Journal of Haematology*, **152**, 413–419.
- Cabagnols, X., Favale, F., Pasquier, F., Messaoudi, K., Defour, J.P., Ianotto, J.C., Marzac, C., Le Couédic, J.P., Droin, N., Chachoua, I., Favier, R., Diop, M.K., Ugo, V., Casadevall, N., Debili, N., Raslova, H., Bellanné-Chantelot, C., Constantinescu, S.N., Bluteau, O., Plo, I. & Vainchenker, W. (2016) Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*, **127**, 333–342.
- Defour, J.-P., Chachoua, I., Pecquet, C. & Constantinescu, S.N. (2016) Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, **30**, 1214–1216.
- Dusa, A., Staerk, J., Elliott, J., Pecquet, C., Poirel, H.A., Johnston, J.A. & Constantinescu, S.N. (2008) Substitution of pseudokinase domain residue Val-617 by large non-polar amino acids causes activation of JAK2. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 12941–12948.
- Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, X., Yeh, C.-H., Zhang, Z.J., Verstovsek, S. & Albitar, M. (2009) Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **11**, 49–53.
- Ma, W., Zhang, X., Wang, X., Zhang, Z., Yeh, C.-H., Uyeji, J. & Albitar, M. (2011) MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagnostic Molecular Pathology*, **20**, 34–39.
- Marty, C., Saint-Martin, C., Pecquet, C., Grosjean, S., Saliba, J., Mouton, C., Leroy, E., Harutyunyan, A.S., Abgrall, J.-F., Favier, R., Toussaint, A., Solary, E., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., Najman, A., Vainchenker, W., Plo, I. & Bellanné-Chantelot, C. (2014) Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood*, **123**, 1372–1383.
- Mead, A.J., Rugless, M.J., Jacobsen, S.E.W. & Schuh, A. (2012) Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *The New England Journal of Medicine*, **366**, 967–969.
- Mead, A.J., Chowdhury, O., Pecquet, C., Dusa, A., Woll, P., Atkinson, D., Burns, A., Score, J., Rugless, M., Clifford, R., Moule, S., Bienz, N., Vyas, P., Cross, N., Gale, R.E., Henderson, S., Constantinescu, S.N., Schuh, A. & Jacobsen, S.E. (2013) Impact of isolated germline JAK2V617I mutation on human hematopoiesis. *Blood*, **121**, 4156–4165.

## Bibliographie

---

Abdelhamid, E., Figeac, M., Renneville, A., Quief, S., Villenet, C., Boyer, T., Nibourel, O., Coiteux, V., Cassinat, B., Lippert, E., et al. (2013). Quantification of JAK2V617F mutation by next-generation sequencing technology. *American Journal of Hematology*, 88: 536–537.

Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Patel, J., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., Heguy, A., Bueso-Ramos, C., Kantarjian, H., Levine, R.L., et al. (2010a). Genetic Analysis of Transforming Events That Convert Chronic Myeloproliferative Neoplasms to Leukemias. *Cancer Research*, 70: 447–452.

Abdel-Wahab, O., Kilpivaara, O., Patel, J., Busque, L., and Levine, R.L. (2010b). The most commonly reported variant in ASXL1 (c. 1934dupG; p. Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. *Leukemia*, 24: 1656–1657.

Abdel-Wahab, O., Adli, M., LaFave, L.M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A.H., Pandey, S., Patel, J.P., Chung, Y.R., Koche, R., et al. (2012). ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell*, 22: 180–193.

Agarwal, R., Blombery, P., McBean, M., Jones, K., Fellowes, A., Doig, K., Forsyth, C., and Westerman, D.A. (2017). Clinicopathological differences exist between CALR- and JAK2-mutated myeloproliferative neoplasms despite a similar molecular landscape: data from targeted next-generation sequencing in the diagnostic laboratory. *Annals of Hematology*, 96: 1–8.

AL Assaf, C., Van Obbergh, F., Billiet, J., Lierman, E., Devos, T., Graux, C., Hervent, A.-S., Emmerechts, J., Tousseyn, T., De Paepe, P., et al. (2015). Analysis of Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*, 100: 893–897.

Albiero, E., Madeo, D., Ruggeri, M., Bernardi, M., Giorgetti, A., and Rodeghiero, F. (2008). Loss of the JAK2 intramolecular auto-inhibition mechanism is predicted by structural modelling of a novel exon 12 insertion mutation in a case of idiopathic erythrocytosis. *British Journal of Haematology*, 142: 986–990.

Ali, H., Aldoss, I., Yang, D., Mokhtari, S., Khaled, S., Aribi, A., Afkhami, M., Al Malki, M.M., Cao, T., Mei, M., et al. (2019). MIPSS70+ v2.0 predicts long-term survival in myelofibrosis after allogeneic HCT with the Flu/Mel conditioning regimen. *Blood Advances*, 3: 83–95.

Alvarez-Larrán, A., Cervantes, F., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Pérez-Andreu, V., Hernández-Boluda, J.-C., Ayats, R., Salvador, C., Muntañola, A., Bellosillo, B., et al. (2010). Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*, 116: 1205–1210.

Alvarez-Larrán, A., Pereira, A., Cervantes, F., Arellano-Rodrigo, E., Hernández-Boluda, J.-C., Ferrer-Marín, F., Angona, A., Gómez, M., Muiña, B., Guillén, H., et al. (2012). Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood*, 119: 1363–1369.

Alvarez-Larrán, A., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Hernández-Boluda, J.-C., Cervantes, F., and Besses, C. (2013). Cyto-reduction plus low-dose aspirin versus cyto-reduction alone as primary prophylaxis of thrombosis in patients with high-risk essential thrombocythaemia: an observational study. *British Journal of Haematology*, 161: 865–871.

Alvarez-Larrán, A., Bellosillo, B., Pereira, A., Kerguelen, A., Carlos Hernández-Boluda, J., Martínez-Avilés, L., Fernández-Rodríguez, C., Gómez, M., Lombardía, L., Angona, A., et al. (2014). JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events: JAK2 V617F Monitoring in Polycythemia vera and Essential Thrombocythemia. *American Journal of Hematology*, 89: 517–523.

Alvarez-Larrán, A., Pereira, A., Guglielmelli, P., Hernández-Boluda, J.C., Arellano-Rodrigo, E., Ferrer-Marín, F., Samah, A., Griesshammer, M., Kerguelen, A., Andreasson, B., et al. (2016). Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. *Haematologica*, 101: 926–931.

Alvarez-Larrán, A., Senín, A., Fernández-Rodríguez, C., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Gómez, M., Ferrer-Marin, F., Martínez-López, J., Camacho, L., Colomer, D., et al. (2017). Impact of genotype on leukaemic transformation in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*, 175: 764–771.

Andréasson, B., Pettersson, H., Wasslavik, C., Johansson, P., Palmqvist, L., and Asp, J. (2020). *ASXL1* mutations, previous vascular complications and age at diagnosis predict survival in 85 WHO-defined polycythaemia vera patients. *British Journal of Haematology*, ahead of print.

Andrikovics, H., Krahling, T., Balassa, K., Halm, G., Bors, A., Koszarska, M., Batai, A., Dolgos, J., Csomor, J., Egyed, M., et al. (2014). Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*, 99: 1184–1190.

Antonioli, E., Guglielmelli, P., Poli, G., Bogani, C., Pancrazzi, A., Longo, G., Ponziani, V., Tozzi, L., Pieri, L., Santini, V., et al. (2008). Influence of *JAK2V617F* allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica*, 93: 41–48.

Araki, M., Yang, Y., Masubuchi, N., Hironaka, Y., Takei, H., Morishita, S., Mizukami, Y., Kan, S., Shirane, S., Edahiro, Y., et al. (2016). Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in *CALR*-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 127: 1307–1316.

Araki, M., Yang, Y., Imai, M., Mizukami, Y., Kihara, Y., Sunami, Y., Masubuchi, N., Edahiro, Y., Hironaka, Y., Osaga, S., et al. (2019). Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for *MPL* binding and activation. *Leukemia*, 33: 122–131.

Aral, B., Courtois, M., Ragot, S., Bourgeois, V., Bottolier-Lemallaz, E., Briandet, C., and Girodon, F. (2018). Germline *JAK2* L611S mutation in a child with thrombocytosis. *Haematologica*, 103: e372–e373.

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M.J., Le Beau, M.M., Bloomfield, C.D., Cazzola, M., and Vardiman, J.W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127: 2391–2405.

Arranz, L., Sánchez-Aguilera, A., Martín-Pérez, D., Isern, J., Langa, X., Tzankov, A., Lundberg, P., Muntión, S., Tzeng, Y.-S., Lai, D.-M., et al. (2014). Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*, 512: 78–81.

Asp, J., Andréasson, B., Hansson, U., Wasslavik, C., Abelson, J., Johansson, P., and Palmqvist, L. (2016). Mutation status of essential thrombocythemia and primary myelofibrosis defines clinical outcome. *Haematologica*, 101: e129–e132.

Bailey, M.H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M.C., Kim, J., Reardon, B., et al. (2018). Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*, 173: 371–385.

Balasubramani, A., Larjo, A., Bassein, J.A., Chang, X., Hastie, R.B., Togher, S.M., Lähdesmäki, H., and Rao, A. (2015). Cancer-associated *ASXL1* mutations may act as gain-of-function mutations of the *ASXL1*–*BAP1* complex. *Nature Communications*, 6: 7307–7322.

Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., d'Amore, E.S.G., Randi, M.L., Bertozzi, I., et al. (2011a). Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 3179–3184.

Barbui, T., Barosi, G., Birgegard, G., Cervantes, F., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H.C., Hehlmann, R., Hoffman, R., et al. (2011b). Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 761–770.

Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Randi, M.L., Bertozzi, I., Marino, F., Vannucchi, A.M., Pieri, L., et al. (2012a). Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood*, 119: 2239–2241.

Barbui, T., Finazzi, G., Carobbio, A., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Bertozzi, I., et al. (2012b). Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization–essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*, 120: 5128–5133.

Barbui, T., Carobbio, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Rambaldi, A., Gisslinger, B., Pieri, L., et al. (2014). In contemporary patients with polycythemia vera, rates of thrombosis and risk factors delineate a new clinical epidemiology. *Blood*, 124: 3021–3023.

Barbui, T., Vannucchi, A.M., Buxhofer-Ausch, V., Stefano, V.D., Betti, S., Rambaldi, A., Rumi, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., et al. (2015). Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer Journal*, 5: e369.

Bartels, S., Lehmann, U., Büsche, G., Schlue, J., Mozer, M., Trivai, I., Alchalby, H., Kröger, N., and Kreipe, H. (2015). SRSF2 and U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are associated with JAK2 and MPL but not calreticulin mutation and may independently re-occur after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 29: 253–255.

Bartels, S., Faisal, M., Büsche, G., Schlue, J., Kreipe, H., and Lehmann, U. (2018). Fibrotic progression in Polycythemia vera is associated with early concomitant driver-mutations besides JAK2. *Leukemia*, 32: 556–558.

Bartels, S., Faisal, M., Büsche, G., Schlue, J., Hasemeier, B., Schipper, E., Vogtmann, J., Westphal, L., Lehmann, U., and Kreipe, H. (2020). Mutations associated with age-related clonal hematopoiesis in PMF patients with rapid progression to myelofibrosis. *Leukemia*, 34: 1364–1372.

Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., et al. (2005). Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 365: 1054–1061.

Beer, P.A., Delhommeau, F., LeCouedic, J.P., Dawson, M.A., Chen, E., Bareford, D., Kusec, R., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., et al. (2010). Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*, 115: 2891–2900.

Bjorkholm, M., Derolf, A.R., Hultcrantz, M., Kristinsson, S.Y., Ekstrand, C., Goldin, L.R., Andreasson, B., Birgegard, G., Linder, O., Malm, C., et al. (2011). Treatment-Related Risk Factors for Transformation to Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Myeloproliferative Neoplasms. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 2410–2415.

Boulais, P.E., and Frenette, P.S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125: 2621–2629.

Boyd, E.M., Bench, A.J., Goday-Fernández, A., Anand, S., Vaghela, K.J., Beer, P., Scott, M.A., Bareford, D., Green, A.R., Huntly, B., et al. (2010). Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *British Journal of Haematology*, 149: 250–257.

Brecqueville, M., Rey, J., Bertucci, F., Coppin, E., Finetti, P., Carbuccia, N., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Arnoulet, C., Gisserot, O., et al. (2012). Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12 and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51: 743–755.

Brecqueville, M., Rey, J., Devillier, R., Guille, A., Gillet, R., Adelaide, J., Gelsi-Boyer, V., Arnoulet, C., Chaffanet, M., Mozziconacci, M.-J., et al. (2014). Array comparative genomic hybridization and sequencing of 23 genes in 80 patients with myelofibrosis at chronic or acute phase. *Haematologica*, 99: 37–45.

Bridgford, J.L., Lee, S.M., Lee, C.M.M., Guglielmelli, P., Rumi, E., Pietra, D., Wilcox, S., Chhabra, Y., Rubin, A.F., Cazzola, M., et al. (2020). Novel Drivers and Modifiers of MPL-dependent Oncogenic Transformation Identified by Deep Mutational Scanning. *Blood*, 135: 287–292.

- Brousseau, M., Parot-Schinkel, E., Moles, M.-P., Boyer, F., Hunault, M., and Rousselet, M.-C. (2010). 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*, 56: 758–767.
- Brusson, M., De Grandis, M., Cochet, S., Bigot, S., Marin, M., Leduc, M., Guillonnet, F., Mayeux, P., Peyrard, T., Chomienne, C., et al. (2018). Impact of hydroxycarbamide and interferon- $\alpha$  on red cell adhesion and membrane protein expression in polycythemia vera. *Haematologica*, 103: 972–981.
- Buhr, T., Hebeda, K., Kaloutsi, V., Porwit, A., Walt, J.V. der, and Kreipe, H. (2012). European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis. *Haematologica*, 97: 360–365.
- Busque, L., Patel, J.P., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., et al. (2012). Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature Genetics*, 44: 1179–1181.
- Cabagnols, X., Defour, J.P., Ugo, V., Ianotto, J.C., Mossuz, P., Mondet, J., Girodon, F., Alexandre, J.H., Mansier, O., Viillard, J.F., et al. (2015). Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*, 29: 249–252.
- Cabagnols, X., Favale, F., Pasquier, F., Messaoudi, K., Defour, J.P., Ianotto, J.C., Marzac, C., Le Couédic, J.P., Droin, N., Chachoua, I., et al. (2016). Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*, 127: 333–342.
- Cassinat, B., Laguillier, C., Gardin, C., de Beco, V., Burcheri, S., Fenaux, P., Chomienne, C., and Kiladjian, J.-J. (2007). Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass? *Leukemia*, 22: 452–453.
- Cassinat, B., Verger, E., and Kiladjian, J.-J. (2014). Interferon Alfa Therapy in CALR -Mutated Essential Thrombocythemia. *New England Journal of Medicine*, 371: 188–189.
- Cervantes, F., Dupriez, B., Pereira, A., Passamonti, F., Reilly, J.T., Morra, E., Vannucchi, A.M., Mesa, R.A., Demory, J.-L., Barosi, G., et al. (2009). New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*, 113: 2895–2901.
- Chachoua, I., Pecquet, C., El-Khoury, M., Nivarthi, H., Albu, R.-I., Marty, C., Gryshkova, V., Defour, J.-P., Vertenoil, G., Ngo, A., et al. (2015). Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*, 127: 1325–1335.
- Chaligné, R., Tonetti, C., Besancenot, R., Roy, L., Marty, C., Mossuz, P., Kiladjian, J.-J., Socié, G., Bordessoule, D., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., et al. (2008). New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*, 22: 1557–1566.
- Chauveau, A., Nibourel, O., Tondeur, S., Paz, D.L., Mansier, O., Paul, F., Wemeau, M., Preudhomme, C., Lippert, E., and Ugo, V. (2017). Absence of CALR mutations in JAK2-negative polycythemia. *Haematologica*, 102: e15–e16.
- Chen, E., Ahn, J.S., Massie, C.E., Clynes, D., Godfrey, A.L., Li, J., Park, H.J., Nangalia, J., Silber, Y., Mullally, A., et al. (2014). JAK2V617F promotes replication fork stalling with disease-restricted impairment of the intra-S checkpoint response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 15190–15195.
- Chen, E., Ahn, J.S., Sykes, D.B., Breyfogle, L.J., Godfrey, A.L., Nangalia, J., Ko, A., DeAngelo, D.J., Green, A.R., and Mullally, A. (2015). RECQL5 Suppresses Oncogenic JAK2-Induced Replication Stress and Genomic Instability. *Cell Reports*, 13: 2345–2352.
- Courtier, F., Carbuccia, N., Garnier, S., Guille, A., Adélaïde, J., Cervera, N., Gelsi-Boyer, V., Mozziconacci, M.-J., Rey, J., Vey, N., et al. (2017). Genomic analysis of myeloproliferative neoplasms in chronic and acute phases. *Haematologica*, 102: e11–e14.

Courtier, F., Garnier, S., Carbuccia, N., Guille, A., Adélaïde, J., Chaffanet, M., Hirsch, P., Paz, D.L., Slama, B., Vey, N., et al. (2020). Targeted molecular characterization shows differences between primary and secondary myelofibrosis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 59: 30–39.

Curto-Garcia, N., Ianotto, J.-C., and Harrison, C.N. (2018). What is pre-fibrotic myelofibrosis and how should it be managed in 2018? *British Journal of Haematology*, 183: 23–34.

Cuthbert, D., and Stein, B.L. (2019). Therapy-associated leukemic transformation in myeloproliferative neoplasms – What do we know? *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 32: 65–73.

Czech, J., Cordua, S., Weinbergerova, B., Baumeister, J., Crepcia, A., Han, L., Maié, T., Costa, I.G., Denecke, B., Maurer, A., et al. (2019). JAK2V617F but not CALR mutations confer increased molecular responses to interferon- $\alpha$  via JAK1/STAT1 activation. *Leukemia*, 33: 995–1010.

Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6: 372–375.

Dawson, M.A., Bannister, A.J., Göttgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., and Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 $\alpha$  from chromatin. *Nature*, 461: 819–822.

De Stefano, V., Za, T., Rossi, E., Vannucchi, A.M., Ruggeri, M., Elli, E., Mico, C., Tieghi, A., Cacciola, R.R., Santoro, C., et al. (2008). Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. *Haematologica*, 93: 372–380.

De Stefano, V., Ruggeri, M., Cervantes, F., Alvarez-Larrán, A., Iurlo, A., Randi, M.L., Elli, E., Finazzi, M.C., Finazzi, G., Zetterberg, E., et al. (2016). High rate of recurrent venous thromboembolism in patients with myeloproliferative neoplasms and effect of prophylaxis with vitamin K antagonists. *Leukemia*, 30: 2032–2038.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*, 360: 2289–2301.

Delic, S., Rose, D., Kern, W., Nadarajah, N., Haferlach, C., Haferlach, T., and Meggendorfer, M. (2016). Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, 175: 419–426.

Ding, J., Komatsu, H., Wakita, A., Kato-Uranishi, M., Ito, M., Satoh, A., Tsuboi, K., Nitta, M., Miyazaki, H., Iida, S., et al. (2004). Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*, 103: 4198–4200.

Dupriez, B., Morel, P., Demory, J.L., Lai, J.L., Simon, M., Plantier, I., and Bauters, F. (1996). Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*, 88: 1013–1018.

Eder-Azanza, L., Hurtado, C., Navarro-Herrera, D., Aranaz, P., Novo, F.J., and Vizmanos, J.L. (2017). p.Y317H is a new JAK2 gain-of-function mutation affecting the FERM domain in a myelofibrosis patient with CALR mutation. *Haematologica*, 102: 328–331.

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 14863–14868.

Elf, S., Abdelfattah, N.S., Chen, E., Perales-Paton, J., Rosen, E.A., Ko, A., Peisker, F., Florescu, N., Giannini, S., Wolach, O., et al. (2016). Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discovery*, 6: 368–381.

El-Harith, E.-H.A., Roesl, C., Ballmaier, M., Germeshausen, M., Frye-Boukhriess, H., von Neuhoff, N., Becker, C., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Ahmed, M.A.M., et al. (2009). Familial thrombocytosis caused by the novel germline mutation p.Pro106Leu in the MPL gene. *British Journal of Haematology*, 144: 185–194.

Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., et al. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics*, 42: 722–726.

Etheridge, S.L., Cosgrove, M.E., Sangkhae, V., Corbo, L.M., Roh, M.E., Seeliger, M.A., Chan, E.L., and Hitchcock, I.S. (2014). A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocythemia. *Blood*, 123: 1059–1068.

Figuerola, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, 18: 553–567.

Finazzi, G., Caruso, V., Marchioli, R., Capnist, G., Chisesi, T., Finelli, C., Gugliotta, L., Landolfi, R., Kutti, J., Gisslinger, H., et al. (2005). Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. *Blood*, 105: 2664–2670.

Gagelmann, N., Ditschkowski, M., Bogdanov, R., Bredin, S., Robin, M., Cassinat, B., Shahswar, R., Thol, F., Heuser, M., Socié, G., et al. (2019). Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation. *Blood*, 133: 2233–2242.

Gangat, N., Strand, J., Li, C.-Y., Wu, W., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2007a). Leucocytosis in polycythemia vera predicts both inferior survival and leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, 138: 354–358.

Gangat, N., Wolanskyj, A.P., McClure, R.F., Li, C.Y., Schwager, S., Wu, W., and Tefferi, A. (2007b). Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. *Leukemia*, 21: 270–276.

Gangat, N., Strand, J., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., Pardanani, A., Li, C.-Y., Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2008). Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *European Journal of Haematology*, 80: 197–200.

Gangat, N., Caramazza, D., Vaidya, R., George, G., Begna, K., Schwager, S., Dyke, D.V., Hanson, C., Wu, W., Pardanani, A., et al. (2011). DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 392–397.

Gelsi-Boyer, V., Brecqueville, M., Devillier, R., Murati, A., Mozziconacci, M.-J., and Birnbaum, D. (2012). Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*, 5: 12.

Genovese, G., Kähler, A.K., Handsaker, R.E., Lindberg, J., Rose, S.A., Bakhoum, S.F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B.M., Fromer, M., et al. (2014). Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *New England Journal of Medicine*, 371: 2477–2487.

Gerritsen, M., Yi, G., Tijchon, E., Kuster, J., Schuringa, J.J., Martens, J.H.A., and Vellenga, E. (2019). RUNX1 mutations enhance self-renewal and block granulocytic differentiation in human in vitro models and primary AMLs. *Blood Advances*, 3: 320–332.

Gerstung, M., Papaemmanuil, E., Martincorena, I., Bullinger, L., Gaidzik, V.I., Paschka, P., Heuser, M., Thol, F., Bolli, N., Ganly, P., et al. (2017). Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nature Genetics*, 49: 322–340.

Gerstung, M., Jolly, C., Leshchiner, I., Dentre, S.C., Gonzalez, S., Rosebrock, D., Mitchell, T.J., Rubanova, Y., Anur, P., Yu, K., et al. (2020). The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature*, 578: 122–128.

Gisslinger, H., Jeryczynski, G., Gisslinger, B., Wölfler, A., Burgstaller, S., Buxhofer-Ausch, V., Schalling, M., Krauth, M.-T., Schiefer, A.-I., Kornauth, C., et al. (2016). Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria. *Leukemia*, 30: 1126–1132.

Gisslinger, H., Klade, C., Georgiev, P., Krochmalczyk, D., Gercheva-Kyuchukova, L., Egyed, M., Rossiev, V., Dulicek, P., Illes, A., Pylypenko, H., et al. (2020). Ropoginterferon alfa-2b versus standard therapy for polycythaemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. *The Lancet Haematology*, 7: e196–e208.

Gottifredi, V., Shieh, S.-Y., Taya, Y., and Prives, C. (2001). p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 1036–1041.

Gowin, K., Thapaliya, P., Samuelson, J., Harrison, C., Radia, D., Andreasson, B., Mascarenhas, J., Rambaldi, A., Barbui, T., Rea, C.J., et al. (2012). Experience with pegylated interferon -2a in advanced myeloproliferative neoplasms in an international cohort of 118 patients. *Haematologica*, 97: 1570–1573.

Green, A.R., and Beer, P.A. (2010). Somatic Mutations of IDH1 and IDH2 in the Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 362: 368.

Grinfeld, J., Nangalia, J., and Green, A.R. (2017). Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 102: 7–17.

Grinfeld, J., Nangalia, J., Baxter, E.J., Wedge, D.C., Angelopoulos, N., Cantrill, R., Godfrey, A.L., Papaemmanuil, E., Gundem, G., MacLean, C., et al. (2018). Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 379: 1416–1430.

Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Score, J., Mannarelli, C., Pancrazzi, A., Biamonte, F., Pardanani, A., Zoi, K., Reiter, A., et al. (2014a). The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia*, 28: 1804–1810.

Guglielmelli, P., Biamonte, F., Rotunno, G., Artusi, V., Artuso, L., Bernardis, I., Tenedini, E., Pieri, L., Paoli, C., Mannarelli, C., et al. (2014b). Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. *Blood*, 123: 2157–2160.

Guglielmelli, P., Rotunno, G., Bogani, C., Mannarelli, C., Giunti, L., Provenzano, A., Giglio, S., Squires, M., Stalbovska, V., Gopalakrishna, P., et al. (2016). Ruxolitinib is an effective treatment for *CALR* -positive patients with myelofibrosis. *British Journal of Haematology*, 173: 938–940.

Guglielmelli, P., Pacilli, A., Rotunno, G., Rumi, E., Rosti, V., Delaini, F., Maffioli, M., Fanelli, T., Pancrazzi, A., Pietra, D., et al. (2017). Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood*, 129: 3227–3236.

Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Rotunno, G., Mudireddy, M., Mannarelli, C., Nicolosi, M., Pacilli, A., Pardanani, A., Rumi, E., and Rosti, V. (2018). MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 36: 310–318.

Guy, A., and James, C. (2019). La thrombose au cours des néoplasies myéloprolifératives: Influence de la mutation JAK2V617F. *médecine/sciences*, 35: 651–658.

Haider, M., Gangat, N., Lasho, T., Abou Hussein, A.K., Elala, Y.C., Hanson, C., and Tefferi, A. (2016). Validation of the revised international prognostic score of thrombosis for essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis) in 585 Mayo clinic patients: Validation of the Revised IPSET-Thrombosis. *American Journal of Hematology*, 91: 390–394.

Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., Kiladjian, J.-J., Al-Ali, H.K., Gisslinger, H., Knoop, L., Cervantes, F., Jones, M.M., Sun, K., McQuitty, M., et al. (2016). Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*, 30: 1701–1707.

Harutyunyan, A., Klampfl, T., Cazzola, M., and Kralovics, R. (2011). p53 Lesions in Leukemic Transformation. *New England Journal of Medicine*, 364: 488–490.

Hasan, S., Lacout, C., Marty, C., Cuingnet, M., Solary, E., Vainchenker, W., and Villeval, J.-L. (2013). JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN $\alpha$ . *Blood*, 122: 1464–1477.

Hernández-Boluda, J.-C., Alvarez-Larrán, A., Gómez, M., Angona, A., Amat, P., Bellosillo, B., Martínez-Avilés, L., Navarro, B., Teruel, A., Martínez-Ruiz, F., et al. (2011). Clinical evaluation of the European LeukaemiaNet criteria for clinicohaematological response and resistance/intolerance to hydroxycarbamide in essential thrombocythaemia: Hydroxycarbamide in Essential Thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*, 152: 81–88.

Ianotto, J.-C., Kiladjian, J.-J., Demory, J.-L., Roy, L., Boyer, F., Rey, J., Dupriez, B., Berthou, C., and Abgrall, J.-F. (2009). PEG-IFN- $\alpha$ 2a therapy in patients with myelofibrosis. *British Journal of Haematology*, 146: 223–225.

Itzykson, R., Kosmider, O., Renneville, A., Morabito, M., Preudhomme, C., Berthon, C., Adès, L., Fenaux, P., Platzbecker, U., Gagey, O., et al. (2013). Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*, 121: 2186–2198.

Jacquelin, S., Straube, J., Cooper, L., Vu, T., Song, A., Bywater, M., Baxter, E., Heidecker, M., Wackrow, B., Porter, A., et al. (2018). Jak2V617F and Dnmt3a loss cooperate to induce myelofibrosis through activated enhancer-driven inflammation. *Blood*, 132: 2707–2721.

Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P.V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., et al. (2014). Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *New England Journal of Medicine*, 371: 2488–2498.

Jaiswal, S., Natarajan, P., Silver, A.J., Gibson, C.J., Bick, A.G., Shvartz, E., McConkey, M., Gupta, N., Gabriel, S., Ardissino, D., et al. (2017). Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 377: 111–121.

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

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

Kagoya, Y., Yoshimi, A., Tsuruta-Kishino, T., Arai, S., Satoh, T., Akira, S., and Kurokawa, M. (2014). JAK2V617F1 myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. *Blood*, 124: 2996–3006.

Kameda, T., Shide, K., Yamaji, T., Kamiunten, A., Sekine, M., Taniguchi, Y., Hidaka, T., Kubuki, Y., Shimoda, H., Marutsuka, K., et al. (2015). Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood*, 125: 304–315.

Kapralova, K., Horvathova, M., Pecquet, C., Kucerova, J.F., Pospisilova, D., Leroy, E., Kralova, B., Feenstra, J.D.M., Schischlik, F., Kralovics, R., et al. (2016). Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. *Blood*, 128: 1418–1423.

Kiladjian, J.-J., Cassinat, B., Turlure, P., Cambier, N., Roussel, M., Bellucci, S., Menot, M.-L., Massonnet, G., Dutel, J.-L., Ghomari, K., et al. (2006). High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood*, 108: 2037–2040.

Kiladjian, J.-J., Massé, A., Cassinat, B., Mokrani, H., Teyssandier, I., le Couédic, J.-P., Cambier, N., Almire, C., Pronier, E., Casadevall, N., et al. (2010). Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon alpha-2a treatment targets JAK2V617F clones without affecting TET2 mutant cells. *Leukemia*, 24: 1519–1523.

Kiladjian, J.-J., Chevret, S., Dosquet, C., Chomienne, C., and Rain, J.-D. (2011). Treatment of Polycythemia Vera With Hydroxyurea and Pipobroman: Final Results of a Randomized Trial Initiated in 1980. *Journal of Clinical Oncology*, 29: 3907–3913.

Kim, E., Ilagan, J.O., Liang, Y., Daubner, G.M., Lee, S.C.-W., Ramakrishnan, A., Li, Y., Chung, Y.R., Micol, J.-B., Murphy, M.E., et al. (2015). SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell*, 27: 617–630.

Kjær, L., Cordua, S., Holmström, M.O., Thomassen, M., Kruse, T.A., Pallisgaard, N., Larsen, T.S., Stricker, K. de, Skov, V., and Hasselbalch, H.C. (2016). Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment. *PLOS ONE*, 11: e0165336.

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., et al. (2013). Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 369: 2379–2390.

Koopmans, S.M., Bot, F.J., Lam, K.H., van Marion, A.M.W., de Raeve, H., and Hebeda, K.M. (2011). Reproducibility of histologic classification in nonfibrotic myeloproliferative neoplasia. *American Journal of Clinical Pathology*, 136: 618–624.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England Journal of Medicine*, 352: 1779–1790.

Kralovics, R., Teo, S.-S., Li, S., Theocharides, A., Buser, A.S., Tichelli, A., and Skoda, R.C. (2006). Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, 108: 1377–1380.

Kubesova, B., Pavlova, S., Malcikova, J., Kabathova, J., Radova, L., Tom, N., Tichy, B., Plevova, K., Kantorova, B., Fiedorova, K., et al. (2018). Low-burden TP53 mutations in chronic phase of myeloproliferative neoplasms: association with age, hydroxyurea administration, disease type and JAK2 mutational status. *Leukemia*, 32: 450–461.

Lacout, C., Pisani, D., Tulliez, M., Moreau Gachelin, F., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*, 108: 1652–1660.

Lambert, M.P., Jiang, J., Batra, V., Wu, C., and Tong, W. (2012). A novel mutation in MPL (Y252H) results in increased thrombopoietin sensitivity in essential thrombocythemia. *American Journal of Hematology*, 87: 532–534.

Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., et al. (2013). Evolution and Impact of Subclonal Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell*, 152: 714–726.

Landolfi, R., Marchioli, R., Kutti, J., Gisslinger, H., Tognoni, G., Patrono, C., and Barbui, T. (2004). Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. *The New England Journal of Medicine*, 350: 114–124.

Larsen, T.S., Pallisgaard, N., Møller, M.B., and Hasselbalch, H.C. (2007a). The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis – impact on disease phenotype. *European Journal of Haematology*, 79: 508–515.

Larsen, T.S., Christensen, J.H., Hasselbalch, H.C., and Pallisgaard, N. (2007b). The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *British Journal of Haematology*, 136: 745–751.

Lasho, T.L., Mudireddy, M., Finke, C.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Szuber, N., Begna, K.H., Patnaik, M.M., Gangat, N., Pardanani, A., et al. (2018). Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Advances*, 2: 370–380.

Lawrence, M.S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G.V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S.L., Stewart, C., Mermel, C.H., Roberts, S.A., et al. (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499: 214–218.

Lê Cao, K.-A., Martin, P.G., Robert-Granié, C., and Besse, P. (2009). Sparse canonical methods for biological data integration: application to a cross-platform study. *BMC Bioinformatics*, 10: 34.

Leroy, E., Balligand, T., Pecquet, C., Mouton, C., Colau, D., Shiau, A.K., Dusa, A., and Constantinescu, S.N. (2019). Differential effect of inhibitory strategies of the V617 mutant of JAK2 on cytokine receptor signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144: 224–235.

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

Li, J., Kent, D.G., Chen, E., and Green, A.R. (2011). Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Disease Models & Mechanisms*, 4: 311–317.

Li, M.M., Datto, M., Duncavage, E.J., Kulkarni, S., Lindeman, N.I., Roy, S., Tsimberidou, A.M., Vnencak-Jones, C.L., Wolff, D.J., Younes, A., et al. (2017). Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19: 4–23.

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

Losman, J.-A., Looper, R.E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R.K., McMahon, C., Cowley, G.S., Root, D.E., Ebert, B.L., and Kaelin, W.G. (2013). (R)-2-Hydroxyglutarate Is Sufficient to Promote Leukemogenesis and Its Effects Are Reversible. *Science*, 339: 1621–1625.

Lu, C., Ward, P.S., Kapoor, G.S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C.R., Khanin, R., Figueroa, M.E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*, 483: 474–478.

Lundberg, P., Takizawa, H., Kubovcakova, L., Guo, G., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Orkin, S.H., Manz, M.G., and Skoda, R.C. (2014a). Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *Journal of Experimental Medicine*, 211: 2213–2230.

Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., et al. (2014b). Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 123: 2220–2228.

Luque Paz, D., Chauveau, A., Boyer, F., Buors, C., Samaison, L., Cottin, L., Seegers, V., Férec, C., Le Maréchal, C., Gueguen, P., et al. (2017). Sequential analysis of 18 genes in polycythemia vera and essential thrombocythemia reveals an association between mutational status and clinical outcome. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 56: 354–362.

Luque Paz, D., Mansier, O., Riou, J., Conejero, C., Roy, L., Belkhodja, C., Ugo, V., and Giraudier, S. (2019). Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience. *Haematologica*, 104: e134–e137.

Lussana, F., Carobbio, A., Randi, M.L., Elena, C., Rumi, E., Finazzi, G., Bertozzi, I., Pieri, L., Ruggeri, M., Palandri, F., et al. (2014). A lower intensity of treatment may underlie the increased risk of thrombosis in young patients with masked polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, 167: 541–546.

Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, X., Yeh, C.-H., Zhang, Z.J., Verstovsek, S., and Albitar, M. (2009). Mutation Profile of JAK2 Transcripts in Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasias. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11: 49–53.

Ma, W., Zhang, X., Wang, X., Zhang, Z., Yeh, C.-H., Uyeji, J., and Albitar, M. (2011). MPL Mutation Profile in JAK2 Mutation-negative Patients With Myeloproliferative Disorders: *Diagnostic Molecular Pathology*, 20: 34–39.

Madelung, A.B., Bondo, H., Stamp, I., Loevgreen, P., Nielsen, S.L., Falensteen, A., Knudsen, H., Ehinger, M., Dahl-Sørensen, R., Mortensen, N.B., et al. (2013). World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: Morphological reproducibility and clinical correlations-The Danish experience. *American Journal of Hematology*, 88: 1012–1016.

Mahé, K., Delluc, A., Chauveau, A., Castellant, P., Mottier, D., Dalbies, F., Berthou, C., Guillerme, G., Lippert, E., and Ianotto, J.-C. (2018). Incidence and impact of atrial arrhythmias on thrombotic events in MPNs. *Annals of Hematology*, 97: 101–107.

Mansier, O., Migeon, M., Saint-Lézer, A., James, C., Verger, E., Robin, M., Socié, G., Bidet, A., Mahon, F.-X., Cassinat, B., et al. (2016). Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18: 68–74.

Marchioli, R., Finazzi, G., Specchia, G., Cacciola, R., Cavazzina, R., Cilloni, D., De Stefano, V., Elli, E., Iurlo, A., Latagliata, R., et al. (2013). Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*, 368: 22–33.

Marty, C., Lacout, C., Droin, N., Le Couédic, J.-P., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., and Plo, I. (2013). A role for reactive oxygen species in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia*, 27: 2187–2195.

Marty, C., Saint-Martin, C., Pecquet, C., Grosjean, S., Saliba, J., Mouton, C., Leroy, E., Harutyunyan, A.S., Abgrall, J.-F., Favier, R., et al. (2014). Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood*, 123: 1372–1383.

Marty, C., Pecquet, C., Nivarthi, H., El-Khoury, M., Chachoua, I., Tulliez, M., Villeval, J.-L., Raslova, H., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., et al. (2016). Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*, 127: 1317–1324.

Maslah, N., Verger, E., Schlageter, M.-H., Miclea, J.-M., Kiladjan, J.-J., Giraudier, S., Chomienne, C., and Cassinat, B. (2019). Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls. *Annals of Hematology*, 98: 111–118.

McKenney, A.S., Lau, A.N., Somasundara, A.V.H., Spitzer, B., Intlekofer, A.M., Ahn, J., Shank, K., Rapaport, F.T., Patel, M.A., Papalexis, E., et al. (2018). JAK2/IDH-mutant-driven myeloproliferative neoplasm is sensitive to combined targeted inhibition. *Journal of Clinical Investigation*, 128: 789–804.

McKerrell, T., Park, N., Chi, J., Collord, G., Moreno, T., Pongstingl, H., Dias, J., Gerasimou, P., Melanthy, K., Prokopiou, C., et al. (2017). JAK2 V617F hematopoietic clones are present several years prior to MPN diagnosis and follow different expansion kinetics. *Blood Advances*, 1: 968–971.

McLeod, D.L., Shreeve, M.M., and Axelrad, A.A. (1974). Improved Plasma Culture System for Production of Erythrocytic Colonies In Vitro: Quantitative Assay Method for CFU-E. *Blood*, 44: 517–534.

McNamara, C.J., Panzarella, T., Kennedy, J.A., Arruda, A., Claudio, J.O., Daher-Reyes, G., Ho, J., Siddiq, N., Devlin, R., Tsui, H., et al. (2018). The mutational landscape of accelerated- and blast-phase myeloproliferative neoplasms impacts patient outcomes. *Blood Advances*, 2: 2658–2671.

McNeil, J.J., Nelson, M.R., Woods, R.L., Lockery, J.E., Wolfe, R., Reid, C.M., Kirpach, B., Shah, R.C., Ives, D.G., Storey, E., et al. (2018a). Effect of Aspirin on All-Cause Mortality in the Healthy Elderly. *New England Journal of Medicine*, 379: 1519–1528.

McNeil, J.J., Wolfe, R., Woods, R.L., Tonkin, A.M., Donnan, G.A., Nelson, M.R., Reid, C.M., Lockery, J.E., Kirpach, B., Storey, E., et al. (2018b). Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. *New England Journal of Medicine*, 379: 1509–1518.

Mead, A.J., Rugless, M.J., Jacobsen, S.E.W., and Schuh, A. (2012). Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 366: 967–969.

Mesa, R.A., Li, C.-Y., Ketterling, R.P., Schroeder, G.S., Knudson, R.A., and Tefferi, A. (2005). Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood*, 105: 973–977.

Mesa, R.A., Verstovsek, S., Cervantes, F., Barosi, G., Reilly, J.T., Dupriez, B., Levine, R., Le Bousse-Kerdiles, M.-C., Wadleigh, M., Campbell, P.J., et al. (2007). Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leukemia Research*, 31: 737–740.

Mesa, R.A., Kiladjian, J.-J., Verstovsek, S., Al-Ali, H.K., Gotlib, J.R., Gisslinger, H., Levy, R.S., Siulnik, A., Gupta, V., Khan, M., et al. (2013). Comparison of placebo and best available therapy for the treatment of myelofibrosis in the phase 3 COMFORT studies. *Haematologica*, 99: 292–298.

Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochemical Journal*, 417: 651–666.

Milosevic Feenstra, J.D., Nivarthi, H., Gisslinger, H., Leroy, E., Rumi, E., Chachoua, I., Bagienski, K., Kubsova, B., Pietra, D., Gisslinger, B., et al. (2016). Whole exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 127: 325–332.

Moliterno, A.R., Williams, D.M., Gutierrez-Alamillo, L.I., Salvatori, R., Ingersoll, R.G., and Spivak, J.L. (2004). Mpl Baltimore: A thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 11444–11447.

Mollard, L.-M., Chauveau, A., Boyer-Perrard, F., Douet-Guilbert, N., Houot, R., Quintin-Roué, I., Couturier, M.-A., Dagherne, A., Malou, M., Le Calloch, R., et al. (2018). Outcome of Ph negative myeloproliferative neoplasms transforming to accelerated or leukemic phase. *Leukemia & Lymphoma*, 59: 2812–2820.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., et al. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*, 20: 11–24.

Mullally, A., Bruedigam, C., Poveromo, L., Heidel, F.H., Purdon, A., Vu, T., Austin, R., Heckl, D., Breyfogle, L.J., Kuhn, C.P., et al. (2013). Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- $\alpha$  in a murine model of polycythemia vera. *Blood*, 121: 3692–3702.

Nakatake, M., Monte-Mor, B., Debili, N., Casadevall, N., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., and Plo, I. (2012). JAK2V617F negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene*, 31: 1323–1333.

Nam, A.S., Kim, K.-T., Chaligne, R., Izzo, F., Ang, C., Taylor, J., Myers, R.M., Abu-Zeinah, G., Brand, R., Omans, N.D., et al. (2019). Somatic mutations and cell identity linked by Genotyping of Transcriptomes. *Nature*, 571: 355–360.

Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., et al. (2013). Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *New England Journal of Medicine*, 369: 2391–2405.

Nayak, B.K., and Das, G.M. (2002). Stabilization of p53 and transactivation of its target genes in response to replication blockade. *Oncogene*, 21: 7226–7229.

Newberry, K.J., Patel, K., Masarova, L., Luthra, R., Manshouri, T., Jabbour, E., Bose, P., Daver, N., Cortes, J., Kantarjian, H., et al. (2017). Clonal evolution and outcomes in myelofibrosis after ruxolitinib discontinuation. *Blood*, 130: 1125–1131.

Nischal, S., Bhattacharyya, S., Christopeit, M., Yu, Y., Zhou, L., Bhagat, T.D., Sohal, D., Will, B., Mo, Y., Suzuki, M., et al. (2013). Methylome profiling reveals distinct alterations in phenotypic and mutational subgroups of myeloproliferative neoplasms. *Cancer Research*, 73: 1076–1085.

Ortmann, C.A., Kent, D.G., Nangalia, J., Silber, Y., Wedge, D.C., Grinfeld, J., Baxter, E.J., Massie, C.E., Papaemmanuil, E., Menon, S., et al. (2015). Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 372: 601–612.

O'Sullivan, J.M., Hamblin, A., Yap, C., Fox, S., Boucher, R., Panchal, A., Alimam, S., Dreau, H., Howard, K., Ware, P., et al. (2019). The poor outcome in high molecular risk, hydroxycarbamide-resistant/intolerant ET is not ameliorated by ruxolitinib. *Blood*, 134: 2107–2111.

Pacilli, A., Rotunno, G., Mannarelli, C., Fanelli, T., Pancrazzi, A., Contini, E., Mannelli, F., Gesullo, F., Bartalucci, N., Fattori, G.C., et al. (2018). Mutation landscape in patients with myelofibrosis receiving ruxolitinib or hydroxyurea. *Blood Cancer Journal*, 8: 122.

Panagiota, V., Thol, F., Markus, B., Fehse, B., Alchalby, H., Badbaran, A., Lehmann, U., Koenecke, C., Shahswar, R., Chaturvedi, A., et al. (2014). Prognostic effect of calreticulin mutations in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*, 28: 1552–1555.

Pangallo, J., Kiladjan, J.-J., Cassinat, B., Renneville, A., Taylor, J., Polaski, J.T., North, K.D., Abdel-Wahab, O., and Bradley, R.K. (2020). Rare and private spliceosomal gene mutations drive partial, complete, and dual phenocopies of hotspot alterations. *Blood*, ahead of print.

Pardanani, A.D., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., et al. (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*, 108: 3472–3476.

Pardanani, A., Lasho, T., Finke, C., Oh, S.T., Gotlib, J., and Tefferi, A. (2010). LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia*, 24: 1713–1718.

Pardanani, A., Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Pancrazzi, A., Finke, C.M., Vannucchi, A.M., and Tefferi, A. (2011). Primary myelofibrosis with or without mutant MPL: comparison of survival and clinical features involving 603 patients. *Leukemia*, 25: 1834–1839.

Passamonti, F., Malabarba, L., Orlandi, E., Baratè, C., Canevari, A., Brusamolino, E., Bonfichi, M., Arcaini, L., Caberlon, S., Pascutto, C., et al. (2003). Polycythemia vera in young patients: a study on the long-term risk of thrombosis, myelofibrosis and leukemia. *Haematologica*, 88: 13–18.

Passamonti, F., Rumi, E., Arcaini, L., Boveri, E., Elena, C., Pietra, D., Boggi, S., Astori, C., Bernasconi, P., Varettoni, M., et al. (2008). Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*, 93: 1645–1651.

Passamonti, F., Cervantes, F., Vannucchi, A.M., Morra, E., Rumi, E., Pereira, A., Guglielmelli, P., Pungolino, E., Caramella, M., Maffioli, M., et al. (2010a). A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*, 115: 1703–1708.

Passamonti, F., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Boveri, E., Arcaini, L., Roncoroni, E., Astori, C., Merli, M., Boggi, S., et al. (2010b). A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*, 24: 1574–1579.

Passamonti, F., Cervantes, F., Vannucchi, A.M., Morra, E., Rumi, E., Cazzola, M., and Tefferi, A. (2010c). Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood*, 116: 2857–2858.

Passamonti, F., Elena, C., Schnittger, S., Skoda, R.C., Green, A.R., Girodon, F., Kiladjian, J.-J., McMullin, M.F., Ruggeri, M., Besses, C., et al. (2011). Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*, 117: 2813–2816.

Passamonti, F., Thiele, J., Girodon, F., Rumi, E., Carobbio, A., Gisslinger, H., Kvasnicka, H.M., Ruggeri, M., Randi, M.L., Gangat, N., et al. (2012). A prognostic model to predict survival in 867 World Health Organization-defined essential thrombocythemia at diagnosis: a study by the International Working Group on Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*, 120: 1197–1201.

Passamonti, F., Giorgino, T., Mora, B., Guglielmelli, P., Rumi, E., Maffioli, M., Rambaldi, A., Caramella, M., Komrokji, R., Gotlib, J., et al. (2017). A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia*, 31: 2726–2731.

Pecquet, C., Chachoua, I., Roy, A., Balligand, T., Vertenoel, G., Leroy, E., Albu, R.-I., Defour, J.-P., Nivarthi, H., Hug, E., et al. (2019). Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *Blood*, 133: 2669–2681.

Pellagatti, A., Armstrong, R.N., Steeples, V., Sharma, E., Repapi, E., Singh, S., Sanchi, A., Radujkovic, A., Horn, P., Dolatshad, H., et al. (2018). Impact of spliceosome mutations on RNA splicing in myelodysplasia: dysregulated genes/pathways and clinical associations. *Blood*, 132: 1225–1240.

Pietra, D., Rumi, E., Ferretti, V.V., Di Buduo, C.A., Milanese, C., Cavalloni, C., Sant'Antonio, E., Abbonante, V., Moccia, F., Casetti, I.C., et al. (2016). Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 30: 431–438.

Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., et al. (2006). MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *PLoS Medicine*, 3: 1140–1151.

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

Prchal, J., and Axelrad, A.A. (1974). Bone-Marrow Responses in Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*, 290: 1382–1382.

Quintás-Cardama, A., Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Kilpivaara, O., Cortes, J., Roupie, A.-L., Zhang, S.-J., Harris, D., Estrov, Z., Kantarjian, H., et al. (2013). Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon  $\alpha$ -2a. *Blood*, 122: 893–901.

Rampal, R., Al-Shahrour, F., Abdel-Wahab, O., Patel, J.P., Brunel, J.-P., Mermel, C.H., Bass, A.J., Pretz, J., Ahn, J., Hricik, T., et al. (2014a). Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*, 123: e123–e133.

Rampal, R., Ahn, J., Abdel-Wahab, O., Nahas, M., Wang, K., Lipson, D., Otto, G.A., Yelensky, R., Hricik, T., McKenney, A.S., et al. (2014b). Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: E5401–E5410.

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17: 405–423.

Robin, M., de Wreede, L.C., Wolschke, C., Schetelig, J., Eikema, D.-J., Van Lint, M.T., Knelange, N.S., Beelen, D., Brecht, A., Niederwieser, D., et al. (2019). Long-term outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis. *Haematologica*, 104: 1782–1788.

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29: 24–26.

Rodriguez-Meira, A., Buck, G., Clark, S.-A., Povinelli, B.J., Alcolea, V., Louka, E., McGowan, S., Hamblin, A., Sousos, N., Barkas, N., et al. (2019). Unravelling Intratumoral Heterogeneity through High-Sensitivity Single-Cell Mutational Analysis and Parallel RNA Sequencing. *Molecular Cell*, 73: 1292–1305.

Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., and Lê Cao, K.-A. (2017). mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology*, 13: e1005752.

Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Brusca, A., Fama, R., Rasi, S., Monti, S., Deambrogi, C., Paoli, L.D., et al. (2014). Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 123: 2139–2147.

Rotunno, G., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., Pacilli, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Fanelli, T., Bosi, A., and Vannucchi, A. (2014). Impact of Calreticulin Mutations on Clinical and Hematological Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia. *Blood*, 123: 1552–1555.

Rotunno, G., Pacilli, A., Artusi, V., Rumi, E., Maffioli, M., Delaini, F., Brogi, G., Fanelli, T., Pancrazzi, A., Pietra, D., et al. (2016). Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group. *American Journal of Hematology*, 91: 681–686.

Ruggiu, M., Cassinat, B., Kiladjian, J.-J., Raffoux, E., Giraudier, S., Robin, M., Itzykson, R., Clappier, E., Michonneau, D., de Fontbrune, F.S., et al. (2020). Should transplantation still be considered for Ph1-negative myeloproliferative neoplasms in transformation? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, ahead of print.

Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Elena, C., Casetti, I.C., et al. (2014a). JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*, 123: 1544–1551.

Rumi, E., Harutyunyan, A.S., Casetti, I., Pietra, D., Nivarthi, H., Moriggl, R., Cleary, C., Bagienski, K., Astori, C., Bellini, M., et al. (2014b). A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology*, 89: 117–118.

Rumi, E., Pietra, D., Pascutto, C., Guglielmelli, P., Martínez-Trillos, A., Casetti, I., Colomer, D., Pieri, L., Pratorcorona, M., Rotunno, G., et al. (2014c). Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*, 124: 1062–1069.

Rumi, E., and Cazzola, M. (2016). How I treat essential thrombocythemia. *Blood*, 128: 2403–2414.

Saliba, J., Saint-Martin, C., Di Stefano, A., Lenglet, G., Marty, C., Keren, B., Pasquier, F., Valle, V.D., Secardin, L., Leroy, G., et al. (2015). Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nature Genetics*, 47: 1131–1140.

Sashida, G., Wang, C., Tomioka, T., Oshima, M., Aoyama, K., Kanai, A., Mochizuki-Kashio, M., Harada, H., Shimoda, K., and Iwama, A. (2016). The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *The Journal of Experimental Medicine*, 213: 1459–1477.

Schaub, F.X., Looser, R., Li, S., Hao-Shen, H., Lehmann, T., Tichelli, A., and Skoda, R.C. (2010). Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 115: 2003–2007.

Schieber, M., Crispino, J.D., and Stein, B. (2019). Myelofibrosis in 2019: moving beyond JAK2 inhibition. *Blood Cancer Journal*, 9: 74.

- Schnittger, S., Bacher, U., Kern, W., Schröder, M., Haferlach, T., and Schoch, C. (2006). Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. *Leukemia*, 20: 2195–2197.
- Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Beelen, D., Bojko, P., Bürkle, D., Dengler, R., Distelrath, A., Eckart, M., Eckert, R., et al. (2009). Characterization of 35 new cases with four different MPLW515 mutations and essential thrombocytosis or primary myelofibrosis. *Haematologica*, 94: 141–144.
- Schnittger, S., Eder, C., Jeromin, S., Alpermann, T., Fasan, A., Grossmann, V., Kohlmann, A., Illig, T., Klopp, N., Wichmann, H.-E., et al. (2013). ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*, 27: 82–91.
- Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., et al. (2007). JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *New England Journal of Medicine*, 356: 459–468.
- Senín, A., Fernández-Rodríguez, C., Bellosillo, B., Camacho, L., Longarón, R., Angona, A., Besses, C., and Álvarez-Larrán, A. (2018). Non-driver mutations in patients with JAK2V617F-mutated polycythemia vera or essential thrombocythemia with long-term molecular follow-up. *Annals of Hematology*, 97: 443–451.
- Sever, M., Kantarjian, H., Pierce, S., Jain, N., Estrov, Z., Cortes, J., and Verstovsek, S. (2009). Cytogenetic abnormalities in essential thrombocythemia at presentation and transformation. *International Journal of Hematology*, 90: 522–525.
- Shide, K., Kameda, T., Yamaji, T., Sekine, M., Inada, N., Kamiunten, A., Akizuki, K., Nakamura, K., Hidaka, T., Kubuki, Y., et al. (2017). Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia*, 31: 1136–1144.
- Shimizu, T., Kubovcakova, L., Nienhold, R., Zmajkovic, J., Meyer, S.C., Hao-Shen, H., Geier, F., Dirnhofer, S., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., et al. (2016). Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 213: 1479–1496.
- Shiozawa, Y., Malcovati, L., Galli, A., Sato-Otsubo, A., Kataoka, K., Sato, Y., Watatani, Y., Suzuki, H., Yoshizato, T., Yoshida, K., et al. (2018). Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nature Communications*, 9: 3649.
- Shlush, L.I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W.C., Brandwein, J.M., Gupta, V., Kennedy, J.A., Schimmer, A.D., Schuh, A.C., Yee, K.W., et al. (2014). Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*, 506: 328–333.
- Spiegel, J.Y., McNamara, C., Kennedy, J.A., Panzarella, T., Arruda, A., Stockley, T., Sukhai, M., Thomas, M., Bartoszko, J., Ho, J., et al. (2017). Impact of genomic alterations on outcomes in myelofibrosis patients undergoing JAK1/2 inhibitor therapy. *Blood Advances*, 1: 1729–1738.
- Spivak, J.L. (2019). How I treat polycythemia vera. *Blood*, 134: 341–352.
- Stengel, A., Jeromin, S., Haferlach, T., Meggendorfer, M., Kern, W., and Haferlach, C. (2019). Detection and characterization of homozygosity of mutated CALR by copy neutral loss of heterozygosity in myeloproliferative neoplasms among cases with high CALR mutation loads or with progressive disease. *Haematologica*, 104: e187–e190.
- Szuber, N., Hanson, C.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Pardanani, A., Gangat, N., and Tefferi, A. (2018). MPL-mutated essential thrombocythemia: a morphologic reappraisal. *Blood Cancer Journal*, 8: 121.
- Tam, C.S., Nussenzweig, R.M., Popat, U., Bueso-Ramos, C.E., Thomas, D.A., Cortes, J.A., Champlin, R.E., Ciurea, S.E., Manshour, T., Pierce, S.M., et al. (2008). The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL- myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 112: 1628–1637.

Tam, C.S., Kantarjian, H., Cortes, J., Lynn, A., Pierce, S., Zhou, L., Keating, M.J., Thomas, D.A., and Verstovsek, S. (2009). Dynamic Model for Predicting Death Within 12 Months in Patients With Primary or Post-Polycythemia Vera/Essential Thrombocythemia Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 27: 5587–5593.

Tapper, W., Jones, A.V., Kralovics, R., Harutyunyan, A.S., Zoi, K., Leung, W., Godfrey, A.L., Guglielmelli, P., Callaway, A., Ward, D., et al. (2015). Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nature Communications*, 6: 6691.

Tashi, T., Swierczek, S., Kim, S.J., Salama, M.E., Song, J., Heikal, N., King, K.Y., Hickman, K., Litton, S., and Prchal, J.T. (2018). Pegylated interferon Alfa-2a and hydroxyurea in polycythemia vera and essential thrombocythemia: differential cellular and molecular responses. *Leukemia*, 32: 1830–1833.

Tefferi, A., Pardanani, A., Lim, K.-H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Gangat, N., Finke, C.M., Schwager, S., Mullally, A., et al. (2009). TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*, 23: 905–911.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Abdel-Wahab, O., Guglielmelli, P., Patel, J., Caramazza, D., Pieri, L., Finke, C.M., Kilpivaara, O., Wadleigh, M., et al. (2010). IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*, 24: 1302–1309.

Tefferi, A., Jimma, T., Gangat, N., Vaidya, R., Begna, K.H., Hanson, C.A., Van Dyke, D.L., Caramazza, D., and Pardanani, A. (2011). Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. *Blood*, 118: 4595–4598.

Tefferi, A., Pardanani, A., Gangat, N., Begna, K.H., Hanson, C.A., Van Dyke, D.L., Caramazza, D., Vannucchi, A.M., Morra, E., Cazzola, M., et al. (2012). Leukemia risk models in primary myelofibrosis: an International Working Group study. *Leukemia*, 26: 1439–1441.

Tefferi, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Vannucchi, A.M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Vaidya, R., Cazzola, M., Rambaldi, A., et al. (2013). Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia*, 27: 1874–1881.

Tefferi, A., Guglielmelli, P., Larson, D.R., Finke, C., Wassie, E.A., Pieri, L., Gangat, N., Fjerza, R., Belachew, A.A., Lasho, T.L., et al. (2014a). Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*, 124: 2507–2513.

Tefferi, A., Wassie, E.A., Lasho, T.L., Finke, C., Belachew, A.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., Gangat, N., and Wolanskyj, A.P. (2014b). Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia*, 28: 2300–2303.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Belachew, A.A., Wassie, E.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., and Pardanani, A. (2014c). Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*, 28: 1568–1570.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Tischer, A., Wassie, E.A., Finke, C.M., Belachew, A.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., and Pardanani, A.D. (2014d). The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood*, 124: 2465–2466.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., Ketterling, R., Hanson, C.H., Maffioli, M., Caramazza, D., Passamonti, F., and Pardanani, A. (2014e). CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*, 28: 1472–1477.

Tefferi, A., Wassie, E.A., Guglielmelli, P., Gangat, N., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., et al. (2014f). Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. *American Journal of Hematology*, 89: E121–E124.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Elala, Y., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Gangat, N., and Pardanani, A. (2016a). Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Advances*, 1: 105–111.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Finke, C.M., Rotunno, G., Elala, Y., Pacilli, A., Hanson, C.A., Pancrazzi, A., and Ketterling, R.P. (2016b). Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Advances*, 1: 21–30.

Tefferi, A., Mudireddy, M., Mannelli, F., Begna, K.H., Patnaik, M.M., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., Gangat, N., Yogarajah, M., De Stefano, V., et al. (2018a). Blast phase myeloproliferative neoplasm: Mayo-AGIMM study of 410 patients from two separate cohorts. *Leukemia*, 32: 1200–1210.

Tefferi, A., Lavu, S., Mudireddy, M., Lasho, T.L., Finke, C.M., Gangat, N., Pardanani, A., Hanson, C.A., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., et al. (2018b). JAK2 exon 12 mutated polycythemia vera: Mayo-Careggi MPN Alliance study of 33 consecutive cases and comparison with JAK2 V617F mutated disease. *American Journal of Hematology*, 93: E93–E96.

Tefferi, A., Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Gangat, N., Ketterling, R.P., Pardanani, A., and Vannucchi, A.M. (2018c). MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 36: 1769–1770.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Gangat, N., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., and Pardanani, A. (2018d). Prognostic significance of ASXL1 mutation types and allele burden in myelofibrosis. *Leukemia*, 32: 837–839.

Tefferi, A., Guglielmelli, P., Lasho, T.L., Coltro, G., Finke, C.M., Loscocco, G.G., Sordi, B., Szuber, N., Rotunno, G., Pacilli, A., et al. (2020). Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *British Journal of Haematology*, ahead of print.

Tenedini, E., Bernardis, I., Artusi, V., Artuso, L., Roncaglia, E., Guglielmelli, P., Pieri, L., Bogani, C., Biamonte, F., Rotunno, G., et al. (2014). Targeted cancer exome sequencing reveals recurrent mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*, 28: 1052–1059.

Tenenhaus, M. (1998). La régression PLS, théorie et pratique. In *La Régression PLS, Théorie et Pratique*, (Paris: Editions Technic).

Teofili, L., Giona, F., Torti, L., Cenci, T., Ricerca, B.M., Rumi, C., Nunes, V., Foa, R., Leone, G., Martini, M., et al. (2010). Hereditary thrombocytosis caused by MPLSer505Asn is associated with a high thrombotic risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis. *Haematologica*, 95: 65–70.

The ASCEND Study Collaborative Group (2018). Effects of Aspirin for Primary Prevention in Persons with Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*, 379: 1529–1539.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 368: 2059–2074.

Theocharides, A., Boissinot, M., Girodon, F., Garand, R., Teo, S.-S., Lippert, E., Talmant, P., Tichelli, A., Hermouet, S., and Skoda, R.C. (2007). Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood*, 110: 375–379.

Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Boeltken, B., Zankovich, R., Diehl, V., and Fischer, R. (1999). Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) - a clinicopathological study. *Leukemia*, 13: 1741–1748.

Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Schmitt-Graeff, A., Zankovich, R., and Diehl, V. (2002). Follow-up examinations including sequential bone marrow biopsies in essential thrombocythemia (ET): a retrospective clinicopathological study of 120 patients. *American Journal of Hematology*, 70: 283–291.

Thiele, J., Kvasnicka, H.M., Müllauer, L., Buxhofer-Ausch, V., Gisslinger, B., and Gisslinger, H. (2011). Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*, 117: 5710–5718.

Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., and Skoda, R.C. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*, 111: 3931–3940.

Titmarsh, G.J., Duncombe, A.S., McMullin, M.F., O'Rorke, M., Mesa, R., De Vocht, F., Horan, S., Fritschi, L., Clarke, M., and Anderson, L.A. (2014). How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hematology*, 89: 581–587.

Toppaldoddi, K.R., da Costa Cacemiro, M., Bluteau, O., Panneau-Schmaltz, B., Pioch, A., Muller, D., Villeval, J.-L., Raslova, H., Constantinescu, S.N., Plo, I., et al. (2019). Rare type 1-like and type 2-like calreticulin mutants induce similar myeloproliferative neoplasms as prevalent type 1 and 2 mutants in mice. *Oncogene*, 38: 1651–1660.

Vaidya, R., Caramazza, D., Begna, K.H., Gangat, N., Van Dyke, D.L., Hanson, C.A., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2011). Monosomal karyotype in primary myelofibrosis is detrimental to both overall and leukemia-free survival. *Blood*, 117: 5612–5615.

Vannucchi, A.M., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Pardanani, A., Pereira, A., Finke, C., Score, J., Gangat, N., Mannarelli, C., et al. (2013). Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*, 27: 1861–1869.

Vannucchi, A.M., Kiladjian, J.J., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Mesa, R., et al. (2015). Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*, 372: 426–435.

Venton, G., Courtier, F., Charbonnier, A., D'incan, E., Saillard, C., Mohty, B., Mozziconacci, M.-J., Birnbaum, D., Murati, A., Vey, N., et al. (2018). Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *American Journal of Hematology*, 93: 330–338.

Verger, E., Cassinat, B., Chauveau, A., Dosquet, C., Giraudier, S., Schlageter, M.-H., Ianotto, J.-C., Yassin, M.A., Al-Dewik, N., Carillo, S., et al. (2015). Clinical and molecular response to interferon- $\alpha$  therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood*, 126: 2585–2591.

Verstovsek, S., Mesa, R.A., Gotlib, J., Levy, R.S., Gupta, V., DiPersio, J.F., Catalano, J.V., Deininger, M., Miller, C., Silver, R.T., et al. (2012). A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine*, 366: 799–807.

Warshawsky, I., Mularo, F., Hren, C., and Jakubowski, M. (2010). Failure of the Ipsogen MutaScreen kit to detect the JAK2 617V>F mutation in samples with additional rare exon 14 mutations: implications for clinical testing and report of a novel 618C>F mutation in addition to 617V>F. *Blood*, 115: 3175–3176.

Wassie, E., Finke, C., Gangat, N., Lasho, T.L., Pardanani, A., Hanson, C.A., Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2015). A compendium of cytogenetic abnormalities in myelofibrosis: molecular and phenotypic correlates in 826 patients. *British Journal of Haematology*, 169: 71–76.

Weinstein, J.N., Myers, T.G., O'Connor, P.M., Friend, S.H., Fornace, A.J., Kohn, K.W., Fojo, T., Bates, S.E., Rubinstein, L.V., Anderson, N.L., et al. (1997). An Information-Intensive Approach to the Molecular Pharmacology of Cancer. *Science*, 275: 343–349.

Wilkins, B.S., Erber, W.N., Bareford, D., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Paul, B., Harrison, C.N., Green, A.R., and Campbell, P.J. (2008). Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*, 111: 60–70.

Williams, D.M., Kim, A.H., Rogers, O., Spivak, J.L., and Moliterno, A.R. (2007). Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis. *Experimental Hematology*, 35: 1641–1646.

Wilmes, S., Hafer, M., Vuorio, J., Tucker, J.A., Winkelmann, H., Löchte, S., Stanly, T.A., Pulgar Prieto, K.D., Poojari, C., Sharma, V., et al. (2020). Mechanism of homodimeric cytokine receptor activation and dysregulation by oncogenic mutations. *Science*, 367: 643–652.

Wong, T.N., Ramsingh, G., Young, A.L., Miller, C.A., Touma, W., Welch, J.S., Lamprecht, T.L., Shen, D., Hundal, J., Fulton, R.S., et al. (2014). Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. *Nature*, 518: 552–555.

- Wong, T.N., Miller, C.A., Jotte, M.R.M., Bagegni, N., Baty, J.D., Schmidt, A.P., Cashen, A.F., Duncavage, E.J., Helton, N.M., Fiala, M., et al. (2018). Cellular stressors contribute to the expansion of hematopoietic clones of varying leukemic potential. *Nature Communications*, 9: 455–471.
- Wu, Z., Zhang, X., Xu, X., Chen, Y., Hu, T., Kang, Z., Li, S., Wang, H., Liu, W., Ma, X., et al. (2014). The mutation profile of JAK2 and CALR in Chinese Han patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Journal of Hematology & Oncology*, 7: 48.
- Xie, M., Lu, C., Wang, J., McLellan, M.D., Johnson, K.J., Wendl, M.C., McMichael, J.F., Schmidt, H.K., Yellapantula, V., Miller, C.A., et al. (2014). Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature Medicine*, 20: 1472–1478.
- Yang, H., and Wang, K. (2015). Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and WANNOVAR. *Nature Protocols*, 10: 1556–1566.
- Yang, Y., Akada, H., Nath, D., Hutchison, R.E., and Mohi, G. (2016). Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood*, 127: 3410–3423.
- Yang, H., Kurtenbach, S., Guo, Y., Lohse, I., Durante, M.A., Li, J., Li, Z., Al-Ali, H., Li, L., Chen, Z., et al. (2018). Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood*, 131: 328–341.
- Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., et al. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478: 64–69.
- Yoshimi, A., Lin, K.-T., Wiseman, D.H., Rahman, M.A., Pastore, A., Wang, B., Lee, S.C.-W., Micol, J.-B., Zhang, X.J., de Botton, S., et al. (2019). Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature*, 574: 273–277.
- Zhang, S.-J., Rampal, R., Manshouri, T., Patel, J., Mensah, N., Kayserian, A., Hricik, T., Heguy, A., Hedvat, C., Gonen, M., et al. (2012). Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood*, 119: 4480–4485.
- Zoi, K., and Cross, N.C.P. (2017). Genomics of Myeloproliferative Neoplasms. *Journal of Clinical Oncology*, 35: 947–954.

## Table des illustrations

---

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'HEMATOPOÏESE .....	1
FIGURE 2 : DEFINITION ANATOMO-PATHOLOGIQUE DE LA THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE ET DE LA PREMYELOFIBROSE.....	7
FIGURE 3 : EVOLUTIONS HEMATOLOGIQUES DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS ET INCIDENCES CUMULEES.....	11
FIGURE 4 : REPARTITION DES MUTATIONS PROMOTRICES DANS LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS.....	16
FIGURE 5 : SIGNALISATION CELLULAIRE PAR LES RECEPTEURS AUX FACTEURS DE CROISSANCE COUPLES A LA PROTEINE JAK2 .....	18
FIGURE 6 : MECANISME DE RECOMBINAISON HOMOLOGUE A L'ORIGINE DE CLONES HOMOZYGOTES POUR LA MUTATION JAK2V617F ....	19
FIGURE 7 : MUTATIONS NON CANONIQUES DE JAK2 ET MPL DECRITES DANS LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS .....	21
FIGURE 8 : MECANISME DE L'INTERACTION ENTRE MPL ET LA CALRETICULINE MUTEE (D'APRES ARAKI ET AL. 2016) .....	24
FIGURE 9 : PHYSIOPATHOLOGIE DES MUTATIONS DE CALR .....	25
FIGURE 10 : COMPLEXIFICATION DES GENES MUTES DANS LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS.....	26
FIGURE 11 : MUTATIONS DE GENES IMPLIQUES DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE DANS LES SMP.....	27
FIGURE 12 : MUTATIONS DES GENES IMPLIQUES DANS L'EPIGENETIQUE DANS LES SMP .....	27
FIGURE 13 : MUTATIONS DES GENES IMPLIQUES DANS L'EPISSAGE DES ARNM DANS LES SMP .....	29
FIGURE 14 : LA MUTATION PROMOTRICE JAK2V617F PEUT ETRE ACQUISE SECONDAIREMENT (D'APRES KRALOVICS ET AL. 2006) .....	32
FIGURE 15 : ILLUSTRATION DE L'HETEROGENEITE CLONALE ET DE L'ACQUISITION DE MUTATIONS DANS LES SMP.....	33
FIGURE 16 : MODELE TUMORAL SIMPLIFIE DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS .....	37
FIGURE 17 : EXEMPLES DE PREDICTIONS PRONOSTIQUES SELON GRINFELD ET AL. ....	42
FIGURE 18 : CENTRES D'ORIGINE DES PATIENTS INCLUS.....	131
FIGURE 19 : PIPELINE DEDIE AU PROJET DE NGS DES MYELOFIBROSES .....	133
FIGURE 20 : FLOW-CHART RESUMANT LES ECHANTILLONS RETENUS DANS L'ANALYSE.....	136
FIGURE 21 : DISTRIBUTION DE LA COUVERTURE MEDIANE POUR L'ENSEMBLE DE LA COHORTE .....	137
FIGURE 22 : DISTRIBUTION DE LA PROPORTION DE BASES > 200X POUR L'ENSEMBLE DE LA COHORTE .....	137
FIGURE 23 : CLASSIFICATION DES VARIANTES DETECTES PAR NGS.....	138
FIGURE 24 : EVENEMENTS (DECES ET TRANSFORMATION EN LEUCEMIE AIGUË) DANS LA COHORTE.....	140
FIGURE 25 : CHARGES ALLELIQUES DES MUTATIONS PROMOTRICES SELON LE TYPE DE MYELOFIBROSE.....	141
FIGURE 26 : NOMBRE DE MUTATION ADDITIONNELLES PAR GENE .....	141
FIGURE 27 : DISTRIBUTION DE LA CHARGE ALLELIQUE DES MUTATIONS ADDITIONNELLES SELON LE GENE MUTE.....	142
FIGURE 28 : RESEAU BAYESIEN DU PROFIL MUTATIONNEL DE L'ENSEMBLE DE LA COHORTE .....	143
FIGURE 29 : NOMBRE DE MUTATION ADDITIONNELLES SELON L'AGE DANS L'ENSEMBLE DE LA COHORTE.....	143
FIGURE 30 : DISTRIBUTION DE LA CHARGE ALLELIQUE DES MUTATIONS ADDITIONNELLES SELON LA SURVENUE OU NON D'UN EVENEMENT (DECES OU TRANSFORMATION LEUCEMIQUE) .....	144
FIGURE 31 : TRANSITIONS DU MODELE MULTI-ETAT AVEC LA TRANSFORMATION LEUCEMIQUE ET LE DECES .....	145
FIGURE 32 : TRANSITIONS DU MODELE MULTI-ETAT AVEC LA TRANSFORMATION LEUCEMIQUE, L'ALLOGREFFE ET LE DECES.....	146

## Table des tableaux

---

TABLEAU I : CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ.....	3
TABLEAU II : CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA THROMBOCYTEMIE ESSENTIELLE .....	5
TABLEAU III : CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA MYELOFIBROSE PRIMITIVE .....	6
TABLEAU IV : CRITERES DIAGNOSTIQUES DE LA MYELOFIBROSE PREFIBROTIQUE.....	8
TABLEAU V : SCORES PRONOSTIQUES DANS LA MYELOFIBROSE (HORS SCORES AVEC MUTATIONS ADDITIONNELLES) .....	9
TABLEAU VI : PARAMETRES AU DIAGNOSTIC ASSOCIES AUX EVOLUTIONS HEMATOLOGIQUES DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS (HORS MUTATIONS ADDITIONNELLES) .....	12
TABLEAU VII : DESCRIPTION DES GENES MUTES DANS LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS A UNE FREQUENCE SUPERIEURE A 1% .....	30
TABLEAU VIII : MODELES MURIN AVEC MUTATION JAK2V617F ET MUTATIONS ADDITIONNELLES.....	36
TABLEAU IX : CLASSIFICATIONS PRONOSTIQUES DANS LA MYELOFIBROSE INCLUANT LES MUTATIONS ADDITIONNELLES .....	39
TABLEAU X : CLASSIFICATION MOLECULAIRE DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS SELON GRINFELD ET AL. ....	41
TABLEAU XI : GENES DU DESIGN NGS.....	132
TABLEAU XII : CLASSIFICATION DES VARIANTS SELON LEUR PATHOGENICITE SUSPECTEE.....	135
TABLEAU XIII : DESCRIPTION DE LA COHORTE DE MYELOFIBROSES .....	139

# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je soussigné **Damien LUQUE PAZ**

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.



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes – BP 73532  
49035 Angers cedex  
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



## RÉSUMÉ

Les syndromes myéloprolifératifs non leucémie myéloïde chronique sont des hémopathies myéloïdes et regroupent principalement la polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive. Ces pathologies sont associées à des mutations somatiques dites promotrices des gènes *JAK2*, *CALR* et *MPL* qui sont retrouvées chez plus de 90% des patients et qui entraînent une activation constitutive de la voie de signalisation JAK2-STAT5 à l'origine de la prolifération cellulaire observée. Avec le développement du séquençage de nouvelle génération, d'autres mutations somatiques dites additionnelles peuvent être détectées et participent à l'initiation et à la progression de ces pathologies. Certaines mutations additionnelles ont également un intérêt dans l'évaluation pronostique des patients. Ce travail avait pour objectif d'étudier l'impact pronostique des mutations additionnelles dans les syndromes myéloprolifératifs et de caractériser l'évolution mutationnelle dans ces pathologies à l'aide d'une évaluation séquentielle du profil mutationnel. Nous avons étudié 5 cohortes de patients soit un total de 813 patients avec un syndrome myéloprolifératif et 948 séquençages nouvelle génération analysés. Nous avons confirmé l'impact pronostique des mutations additionnelles dans la thrombocytémie essentielle. Toutefois, aucun impact pronostique n'était retrouvé lorsque nous avons spécifiquement étudié une série de patients avec mutations de *CALR*, ce qui suggère un impact pronostique des mutations additionnelles différent selon la mutation promotrice. L'étude séquentielle du profil moléculaire a montré que peu de mutations étaient nouvellement acquises lors du suivi en phase chronique. En effet les mutations nouvellement détectées étaient pour la plupart déjà présentes dès le diagnostic à une faible charge allélique. Par l'étude moléculaire séquentielle, nous avons montré l'intérêt pronostique du suivi de la charge allélique des mutations de *CALR*. Enfin, en étudiant les transformations leucémiques des syndromes myéloprolifératifs, nous avons identifié trois profils moléculaires associés à des délais de transformation différents. Ce travail de thèse contribue à la caractérisation du profil moléculaire des syndromes myéloprolifératifs. Le pronostic des mutations additionnelles pourrait différer selon la mutation promotrice, le type de mutation ou la charge allélique, ce qui devra être précisé dans de futures études pour faciliter leur utilisation en pratique clinique.

Mots-clés : **Syndromes Myéloprolifératifs, Mutations Additionnelles, Pronostic, Génomique**

## ABSTRACT

Myeloproliferative neoplasms are clonal disorders that include polycythemia vera, essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. They harbored somatic driver mutations in *JAK2*, *CALR* and *MPL* genes which are found in more than 90% of patients. Driver mutations lead to a constitutive activation of the JAK2-STAT5 pathway causing a cell proliferation. With the rise of next generation sequencing, additional mutations could be detected. Additional mutations are involved in the initiation and in the progression of myeloproliferative neoplasms. Furthermore, several additional mutations have a prognostic role. The aim of this work was to investigate the prognostic impact of additional mutations in myeloproliferative neoplasms and to characterize the mutational evolution in these pathologies using a sequential evaluation of the mutational landscape. We studied five cohorts of patients for a total of 813 patients with myeloproliferative neoplasms and 948 next generation sequencing analyzed. We found a prognostic impact of additional mutations in essential thrombocythemia. However, no prognostic impact was found when we specifically studied a cohort of patients with *CALR* mutations, suggesting a different role of additional mutations according to the type of driver mutation. The sequential molecular analysis showed few newly acquired mutations during chronic phase. Indeed, most of the newly detected mutations at the follow-up were already present at at diagnosis with a low allele burden. We identified *CALR* allele burden monitoring as a prognostic marker in essential thrombocythemia. Finally, we studied leukemic transformations of myeloproliferative neoplasms and we identified three molecular profiles associated with distinct time to transformation.

This work contributes to the characterization of the molecular landscape of myeloproliferative neoplasms. The prognosis of additional mutations could differ according to the driver mutation, the type of mutation or the allele burden. Further studies may precise these points to facilitate their use in clinical practice.

Keywords : **Myeloproliferative Neoplasms, Additional Mutations, Prognosis, Genomics**