

Hervé AVET-LOISEAU¹

Place de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique des hémopathies malignes

RÉSUMÉ

La prise en charge des patients présentant une hémopathie maligne nécessite aujourd'hui une évaluation pronostique précise permettant une stratégie thérapeutique adaptée. Outre le caryotype médullaire, cette évaluation repose sur de nombreuses techniques moléculaires nécessaires à la mise en évidence de translocations, délétions, duplications ou mutations. Certaines de ces techniques n'étant pas de réalisation courante, un réseau biologique maillant l'ensemble du territoire national doit être mis en place afin d'offrir ces expertises à l'ensemble des patients.

MOTS-CLÉS

Hématologie, biologie moléculaire, pronostic, diagnostic.

The role of molecular biology techniques in the diagnostic assessment of hematopoietic malignancies

SUMMARY

The management of patients presenting a hematopoietic malignancy requires today a detailed prognostic assessment. Besides the karyotype, this assessment is based on many molecular techniques able to detect translocations, deletions, duplications, or mutations. Some of these techniques are not currently performed in all laboratories, requiring the establishment of a network throughout the national territory in order to propose this whole panel to all the patients diagnosed in France. Most of the current therapeutic progresses, and probably even more tomorrow, are based on a detailed prognostic assessment as soon as the diagnosis.

KEYWORDS

Hematology, molecular biology, prognosis, diagnosis.

I - Introduction

Les techniques moléculaires prennent une place de plus en plus importante dans la stratégie diagnostique et surtout pronostique des hémopathies malignes. Si certains examens relèvent clairement de la recherche clinique, d'autres sont d'ores et déjà pris en compte dans la stratégie thérapeutique des cliniciens. Ces données, certes en perpétuelle évolution, doivent être prises en compte dès le stade

du prélèvement afin d'optimiser la gestion de celui-ci. Il n'est bien entendu pas question de réaliser un listing des différents examens réalisables dans le cadre du bilan diagnostique des hémopathies malignes. Le but de cet article est d'essayer de stratifier, pathologie par pathologie, les examens permettant d'asseoir un diagnostic de certitude et de donner aux cliniciens les événements pronostiques indispensables à une décision thérapeutique argumentée.

¹Laboratoire d'Hématologie — Institut de Biologie — CHU, 9 quai Moncoussu — 44093 Nantes. — Tél. : 02 40 08 40 34 — Fax : 02 40 08 40 50
E-Mail : havetloiseau@chu-nantes.fr

Place de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique des hémopathies malignes

II - Différentes techniques disponibles

La découverte quasi continue de nouveaux paramètres pronostiques conduit à utiliser un panel de techniques moléculaires de plus en plus étendu et sophistiqué (*tableau I*). La technique moléculaire la plus simple est sans doute l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Celle-ci repose sur l'hybridation de sondes spécifiques marquées par un fluorochrome sur des prélèvements cellulaires de nature variable (cultifs de cytogénétique, frottis sanguins ou médullaires, cellules congelées, voire même prélèvements d'anatomie pathologique). La mise à disposition de sondes commerciales de plus en plus nombreuses étend progressivement le champ d'utilisation de cette technique.

Les techniques d'amplification des acides nucléiques par réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) deviennent maintenant de pratique courante. Elles peuvent être réalisées sur ADN (technique de PCR « classique ») ou sur ARN. On parle dans ce dernier cas de Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR), une technique qui constitue en fait une PCR « classique » réalisée sur un ADN complémentaire (ADNc) obtenu après transcription inverse de l'ARN.

Ces deux techniques, et plus particulièrement la RT-PCR, permettent d'amplifier des séquences de gènes chimériques, produits des différentes translocations fréquemment observées dans les hémopathies malignes.

La possibilité de mesurer en continue la quantité d'ADN total produite lors de l'amplification (grâce à un marqueur fluorescent) a permis le développement au cours des années 1990 de la PCR quantitative ou (RQ-PCR pour Real-time Quantitative-PCR). L'obtention d'un résultat réellement quantitatif permet ainsi une utilisation pour la quantification de la maladie résiduelle minimale (minimal residual disease ou

MRD) après traitement. La mise en œuvre des techniques de RQ-PCR sont d'une complexité variable selon que l'on analyse une cible universelle (par exemple, BCR-ABL dans la Leucémie myéloïde chronique), ou une cible spécifique du patient (par exemple, réarrangements IGH ou TCR dans les Leucémies aiguës lymphoblastiques).

Les techniques de séquençage prennent quant à elles une place de plus en plus importante. Permettant de déterminer l'enchaînement des nucléotides d'une séquence d'ADN, elles sont devenues indispensables pour mettre en évidence des mutations ponctuelles ou pour caractériser une anomalie révélée par une technique de PCR par exemple.

Enfin, les techniques d'hybridation sur supports miniaturisés (puces à ADN (DNA Chips), micro-réseaux (microarrays)), qu'elles soient réalisées à partir d'ARN ou d'ADN, ont ouvert de nouveaux champs d'exploration particulièrement intéressants. Toutefois, elles ne sont clairement pas aujourd'hui encore du domaine de la routine diagnostique et ne seront donc pas abordées dans cet article.

III - Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les progrès thérapeutiques ont été extrêmement modestes au cours des 20 dernières années dans cette pathologie, principalement du fait de l'absence de développement de nouvelles molécules actives. Les quelques progrès réalisés, et ceux que l'on peut espérer pour le futur, découlent en fait d'une meilleure caractérisation du pronostic individuel de chaque patient. En pratique, il est aujourd'hui indispensable d'identifier dès le diagnostic les anomalies moléculaires associées à un pronostic favorable, permettant de ne plus

NOTE

Cet article constitue une adaptation de la présentation « Place de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique des hémopathies » donnée le 8 juin 2006 dans le cadre de la réunion « Hématologie et Hémostase de demain » Organisé à Paris par le Collège d'Hématologie des Hôpitaux.

Tableau I

Indications des principales techniques moléculaires.

Technique	Matériel utilisable	Anomalies détectables	Faisabilité
FISH	Frottis sanguins Frottis médullaires Cellules congelées (DMSO) Cellules fixées	Translocations Délétions Trisomies/Monosomies	Technique répandue
RT-PCR (ARN)	Cellules fraîches Cellules congelées	Transcrits de fusion (translocations) Gènes hyperexprimés	Technique répandue
PCR (ADN)	Cellules fraîches Cellules congelées	Duplications	Technique répandue
PCR allèle-spécifique	Cellules fraîches Cellules congelées	Caractérisation réarrangements géniques	Centres spécialisés
PCR + Séquençage	Cellules fraîches Cellules congelées	Duplications Mutations	Centres + spécialisés
RQ-PCR	Cellules fraîches Cellules congelées	Quantification transcrits Mutations	Centres + spécialisés

Tableau II

Principales anomalies moléculaires dans les leucémies aiguës

Anomalies	Techniques d'analyse	Pathologies	Impact pronostique
t(15;17)	Cytogénétique FISH RT-PCR	LAM3	Favorable
t(8;21)	Cytogénétique FISH RT-PCR	LAM	Favorable
inv(16)	Cytogénétique FISH RT-PCR	LAM	Favorable
MLL	Cytogénétique FISH	LAM LAL	Défavorable
Duplications FLT3	PCR	LAM caryotype normal	Défavorable
Mutations NPM1	PCR + analyse fragment	LAM caryotype normal	Favorable
Mutations CEBPA	PCR + séquençage	LAM caryotype normal	Favorable
t(12;21)	FISH RT-PCR	LAL B	Favorable
t(9;22)	Cytogénétique FISH RT-PCR	LAL B	Défavorable

proposer l'allogreffe de moelle osseuse en première rémission complète (*tableau II*).

Outre la translocation t(15;17), qui constitue une réelle urgence thérapeutique, il est maintenant essentiel de mettre en évidence la translocation t(8;21) et l'inversion inv(16), ou les transcrits chimeriques dérivés (ETO-AML1 et CBFβ-MYH11). En dehors du caryotype classique, ces anomalies peuvent être mises en évidence par FISH ou par RT-PCR. À côté de ces anomalies chromosomiques classiques, plusieurs anomalies géniques ont été récemment identifiées. La première est une duplication en tandem du gène FLT3 (1). Celle-ci implique généralement la portion juxta-membranaire de ce récepteur cellulaire, conduisant à une activation constitutive de son activité tyrosine kinase. Associée à un pronostic péjoratif, cette anomalie est principalement observée dans les caryotypes normaux. Sa détection repose sur une analyse par PCR, puis analyse de fragments. La seconde anomalie plus récemment identifiée est une mutation du gène codant pour la nucléophosmine (NPM1) (2, 3). Cette anomalie est également fréquemment mise en évidence chez des patients présentant un caryotype normal, et nécessite là encore le recours à des analyses de fragments. Des données cliniques récentes suggèrent que la mise en évidence de ces mutations soit associée à un pronostic ne justifiant plus le recours systématique à l'allogreffe en première rémission complète. Enfin, des données plus récentes relatives à des mutations concernant le gène CEBPA (CCAAT-enhancer binding protein alpha) ont été mises en évidence chez environ 10 % des LAM et seraient associées à un pronostic favorable (4).

Au final, le diagnostic de LAM impose aujourd'hui

la recherche de facteurs pronostiques indispensables à une décision thérapeutique argumentée. Outre le caryotype qui reste un examen pronostique de base, le recours à des techniques moléculaires doit être systématique, en tout cas pour les patients les plus jeunes, accessibles à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (en pratique chez les patients de moins de 65 ans).

IV - Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

À l'inverse des LAM, les LAL ont fait l'objet de progrès thérapeutiques extrêmement spectaculaires au cours des 30 dernières années, tout particulièrement chez l'enfant. Ces progrès sont essentiellement liés à 2 facteurs : d'une part la mise au point de protocoles de chimiothérapie combinant les différentes drogues actives dans une séquence particulière, et d'autre part la mise en évidence de groupes pronostiques très différents sur la base d'anomalies chromosomiques spécifiques. On peut ainsi estimer qu'aujourd'hui le pronostic global d'un enfant présentant une LAL est de l'ordre de 80 % de survie à 5 ans. Les résultats sont en revanche beaucoup plus décevants chez l'adulte. Chez l'enfant, quatre anomalies chromosomiques spécifiques résument à elles seules le pronostic : l'hyperdiploïdie, la translocation t(12;21), la translocation t(9;22), et les réarrangements du gène MLL (*tableau II*). Alors que les deux premières sont associées à un pronostic excellent (de l'ordre de 90 % de survie à long terme), les deux dernières sont associées à un pronostic nettement plus péjo-

Place de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique des hémopathies malignes

ratif. L'hyperdiploïdie est classiquement détectée par le caryotype, et se trouve mise en évidence chez environ 30 % des enfants présentant une LAL (essentiellement des types B). En cas d'échec de la cytogénétique, on peut avoir recours soit à l'index d'ADN, soit à la FISH en sélectionnant les chromosomes les plus souvent en excès. À l'inverse, la translocation t(12;21) n'est pas détectable par le caryotype. Cette anomalie est présente chez 25 à 30 % des enfants, là encore essentiellement dans les LAL de phénotype B. Chez l'enfant, il faut donc avoir recours systématiquement à des techniques de type FISH ou RT-PCR (5). Cette translocation donne en effet naissance à un gène chimérique fonctionnel ETV6-AML1, dont le transcrite peut être détecté par RT-PCR. Cette translocation (tout comme l'hyperdiploïdie) étant virtuellement absente chez l'adulte, il n'est donc pas nécessaire d'aller la rechercher chez les patients au-delà de 20 ou 25 ans.

À l'opposé de ces anomalies, la t(9;22) ainsi que les réarrangements du gène MLL sont associés à un pronostic très défavorable. La t(9;22) est rare chez l'enfant, observée chez environ 5 % des patients (5, 6). À l'inverse, elle est observée de manière plus fréquente chez l'adulte, l'incidence augmentant avec l'âge (près de 30 % chez les patients âgés). Au plan chromosomique, cette translocation est similaire à celle observée dans la LMC, le classique chromosome Philadelphie. Au plan moléculaire, certaines différences sont cependant notées. Même si le transcrite chimérique de type M-BCR-ABL est observé chez près de 50 % des LAL (plus volontiers chez l'adulte, et sans que ces formes correspondent à des transformations d'emblée de LMC), un transcrite chimérique plus court est également retrouvé, dénommé mBCR-ABL. Ces formes mBCR-ABL s'observent plus volontiers chez l'enfant. Ne pouvant être distinguées au plan cytogénétique, ces formes doivent néanmoins être identifiées dès le diagnostic afin de sélectionner les amorces spécifiques destinées à permettre le suivi de la maladie résiduelle en cours de traitement ou après celui-ci. Cette caractérisation peut se faire par RT-PCR ou par FISH. Ces formes pouvant bénéficier de traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase (Glivec®, Sprycel®), il est impératif de les identifier formellement dès le diagnostic.

Les réarrangements de MLL sont retrouvés chez environ 5 % des patients également, que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant, et touchent la bande chromosomique 11q23 (5-7). Il faut toutefois mettre à part les petits nourrissons (< 12 mois), chez lesquels un réarrangement de ce gène est retrouvé dans 80 % des cas. La caractéristique essentielle de ce type de réarrangement est la multiplicité des partenaires chromosomiques décrits, rendant les approches moléculaires classiques peu adaptées à leur détection. La méthode de choix est dans ce cas la FISH, permettant la détection rapide et simple de tous les cas, indépendamment de la nature du partenaire chromosomique. Au plan pronostique, ces réarrangements sont associés à un pronostic

globalement péjoratif, tout particulièrement chez le nourrisson.

Plus récemment, les techniques de biologie moléculaire ont pris une place prépondérante pour le suivi de la MRD. En effet, les LAL se caractérisent par des réarrangements monoclonaux des gènes IGH et TCR. La caractérisation moléculaire de ces réarrangements permet la sélection de sondes spécifiques pour chaque patient, permettant un suivi quantitatif de la MRD par PCR. Chez l'enfant, la quantification de cette MRD est devenue le principal paramètre pronostique, permettant une adaptation thérapeutique en temps réel (8, 9). Il faut noter que ce suivi peut également être réalisé par cytométrie en flux, technique qui sort du champ de cette revue.

V - Leucémie myéloïde chronique (LMC) et syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMP)

Si la LMC est rare (500 à 600 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en France), le suivi de ces patients est devenu une des principales activités moléculaires des Laboratoires d'Hématologie. La raison de cette flambée d'examen est liée à l'extraordinaire efficacité de l'imatinib (Glivec®) dans le traitement de cette pathologie. Cet inhibiteur de l'activité tyrosine kinase d'ABL est devenu le traitement de référence des patients atteints de LMC, transformant cette pathologie en réelle maladie chronique (au sens non oncologique du terme), entraînant des rémissions de très longue durée (sans qu'il soit encore possible de parler de guérisons). Les patients étant suivis 3 à 4 fois par an, l'allongement de la file active de patients entraîne une augmentation continue du nombre d'examen à réaliser. Le suivi repose typiquement sur la quantification par RQ-PCR des transcrits M-BCR-ABL (10).

Plus récemment, une mutation spécifique touchant le gène JAK2 a été rapportée dans un nombre significatif de cas de syndromes myéloprolifératifs, essentiellement dans les polyglobulies de Vaquez (PV), dans les thrombocythémies essentielles (TE), et à un moindre degré dans les splénomégalies myéloïdes (SM) (11-14). Ces mutations affectent toujours le même codon V617E, et peuvent donc être recherchées aisément par une RQ-PCR spécifique. Compte tenu de la fréquence extrême de cette mutation dans les cas de PV (de l'ordre de 95 à 98 %), cette analyse par RQ-PCR est devenue un test diagnostique majeur en cas d'érythrocytose, de même que dans les cas de thrombocytose isolée.

VI - Lymphomes malins

Le diagnostic des lymphomes malins repose avant tout sur l'examen anatomo-pathologique de biopsies tumorales. Néanmoins, la description de nombreuses anomalies chromosomiques, plus

ou moins spécifiques de sous-types lymphomateux, a suscité des demandes d'analyses moléculaires, essentiellement dans les cas de diagnostics difficiles. Le principal problème rencontré vis-à-vis de ces demandes est constitué par la nature du matériel tumoral proposé. Ainsi, dans la plupart des cas, le matériel disponible consiste en des biopsies tumorales fixées dans le formol et incluses en paraffine. Ce matériel est loin d'être optimal pour les analyses moléculaires, que ce soit par FISH ou par techniques de PCR. Néanmoins, les prélèvements congelés représentent un matériel utilisable pour les 2 techniques. Une autre bonne solution est la réalisation d'empreintes permettant l'application de techniques de FISH. Les demandes les plus fréquentes concernent les suspicions de lymphome du manteau, caractérisés par la présence quasi constante (mais non absolue) de la translocation t(11;14), ou de son corollaire moléculaire, l'hyperexpression de cycline D1. Les autres indications sont principalement la recherche d'une translocation impliquant le gène MYC (8q24) dans les cas de lymphomes de Burkitt. Cette recherche repose sur la cytogénétique ou sur la FISH interphasique. Enfin, les demandes de recherche de t(14;18) dans les lymphomes folliculaires sont rares, cette translocation n'étant nullement spécifique de ce type de lymphome. Elle peut se faire par FISH ou par PCR multiplexe (une technique fondée sur l'amplification simultanée de plusieurs amplicons). L'absence de démonstration formelle d'utilité de la recherche de cette translocation moléculaire dans le suivi des patients ne justifie pas sa recherche en pratique clinique, en dehors d'essais thérapeutiques.

L'intérêt majeur de la biologie moléculaire dans le cadre des lymphomes demeure la recherche de clonalité. Ces recherches doivent être réservées au cas de doutes diagnostiques entre une pathologie réactionnelle et une pathologie lymphomateuse. Elles se fondent sur la recherche de réarrangements clonaux des gènes IGH et TCR par PCR. Là encore, la nature du matériel disponible est primordiale. Même si en théorie les prélèvements fixés dans le formol sont utilisables, en pratique, seuls les prélèvements congelés ou placés dans des substances dédiées à la conservation des tissus (de type RNAlater®) sont réellement analysables.

BIBLIOGRAPHIE

(1) MESHINCHI S., ALONZO TA, STIREWALT DL, ZWAAN M., ZIMMERMAN M., REINHARDT D., KASPERS GJ, HEEREMA NA, GERBING R., LANGE BJ, RADICH JP. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML, *Blood*, 2006, 108, 3654-3661.

(2) FALINI B., MECUCCI C., TIACCI E., ALCALAY M., ROSATI R., PASQUALUCCI L., LA STARZA R., DIVERIO D., COLOMBO E., SANTUCCI A., BIGERNA B., PACINI R., PUCCIARINI A., LISO A., VIGNETTI M., FAZI P., MEANI N., PETTIROSSI V., SAGLIO G., MANDELLI F., LO COCO F., PELICCI PG, MARTELLI MF. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, 254-266.

(3) SCHNITTGER S., SCHOCH C., KERN W., MECUCCI C., MARTELLI MF, HAFLERLACH T., HIDDEMAN W., FALINI B., Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype, *Blood*, 2005, 106, 3733-3739.

(4) PREUDHOMME C., SAGOT C., BOISSEL N., CAYUELA JM, TIGAUD I., DE BOTTON S., THOMAS X., RAFFOUX E., LAMANDIN C., CASTAIGNE S., FENAUX P., DOMBRET H., Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*, 2002, 100, 2717-2723.

(5) SCHULTZ KR, PULLEN DJ, SATHER HN, SHUSTER JJ, DEVIDAS M., BROWWITZ MJ, CARROLL AJ, HEEREMA NA, RUBNITZ JE, LOH ML, RAETZ EA, WINICK NJ, HUNGER SP, CARROLL WL, GAYNON PS, CAMITTA BM. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG), *Blood*, 2007, 109, 926-935.

VII - Leucémie lymphoïde chronique (LLC) et myélome

La démonstration récente de l'impact pronostique de certaines caractéristiques chromosomiques et moléculaires justifie l'analyse de certaines d'entre elles. Toute la difficulté aujourd'hui est de définir quelles sont celles qui doivent être recherchées de manière plus ou moins systématique en dehors d'essais thérapeutiques. En l'absence de consensus, le minimum est sans doute de rechercher une del(17p) par FISH au diagnostic des patients présentant une LLC de stade B ou C. La recherche d'autres anomalies chromosomiques comme la del(11q) ou la trisomie 12 sont beaucoup plus discutables. De même, l'évaluation du statut mutationnel du gène IGH, même s'il différencie 2 classes pronostiques, ne se justifie pas en routine compte tenu des aspects techniques.

Dans le myélome, la démonstration de l'impact pronostique fort de certaines anomalies chromosomiques justifie une analyse par FISH au diagnostic (15). Celle-ci devrait se limiter (en l'état actuel des connaissances) à la recherche de la translocation t(4;14) et de la del(17p). Néanmoins, il faut avoir conscience des difficultés techniques de cette analyse, une reconnaissance ou un tri des plasmocytes étant absolument requis avant l'analyse FISH.

VIII - Conclusion

En 2007, il n'est plus possible de prendre en charge convenablement des patients présentant une hémopathie maligne sans avoir recours à un minimum d'examen s'appuyant sur les techniques de biologie moléculaire considérées au sens large et incluant donc la FISH, principalement pour l'évaluation du pronostic. Cette nécessité a pour corollaire de connaître ces examens indispensables, afin d'orienter convenablement les prélèvements sanguins, médullaires ou tumoraux lors des prélèvements initiaux. Il n'est en effet pas toujours possible de revenir a posteriori sur ces choix.

Place de la biologie moléculaire dans la stratégie diagnostique des hémopathies malignes

- (6) PUI CH, SANDLUND JT, PEI D, CAMPANA D, RIVERA GK, RIBEIRO RC, RUBNITZ JE, RAZZOUK BI, HOWARD SC, HUDSON MM, CHENG C, KUN LE, RAIMONDI SC, BEHM FG, DOWNING JR, RELLING MV, EVANS WE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*, 2004, 104, 2690-2696.
- (7) JANSEN MW, CORRAL L, VAN DER VELDEN VH, PANZER-GRUMAYER R, SCHRAPPE M, SCHRAUDER A, MARSCHALEK R, MEYER C, DEN BOER ML, HOP WJ, VALSECCHI MG, BASSO G, BIONDI A, PIETERS R, VAN DONGEN JJ. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia*, 2007, 21, 633-641.
- (8) CAVE H, VAN DER WERFF TEN BOSCH J, SUCIU S, GUIDAL C, WATERKEYN C, OTTEN J, BAKKUS M, THIELEMANS K, GRANDCHAMP B, VILMER E. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer-Childhood Leukemia Cooperative Group. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, 591-598.
- (9) ROBILLARD N, CAVE H, MECHINAUD F, GUIDAL C, GARNACHE-OTTOU F, ROHRLICH PS, AVET-LOISEAU H, GARAND R. Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2005, 90, 1516-1523.
- (10) WEIBERG E, MANLEY PW, COWAN-JACOB SW, HOCHHAUS A, GRIFFIN JD. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*, 2007, 7, 345-356.
- (11) JAMES C, UGOV, LE COUEDIC JP, STAERK J, DELHOMMEAU F, LACOUT C, GARCON L, RASLOVA H, BERGER R, BENNACEUR-GRISCELLI A, VILLEVAL JL, CONSTANTINESCU SN, CASADEVALL N, VAINCHENKER W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005, 34, 1144-1148.
- (12) CAMPBELL PJ, SCOTT LM, BUCK G, WHEATLEY K, EAST CL, MARSDEN JT, DUFFY A, BOYD EM, BENCH AJ, SCOTT MA, VASSILIOU GS, MILLIGAN DW, SMITH SR, ERBER WN, BAREFORD D, WILKINS BS, REILLY JT, HARRISON CN, GREEN AR. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 2005, 366, 1945-1953.
- (13) LEVINE RL, WADLEIGH M, COOLS J, EBERT BL, WERNIG G, HUNTLY BJ, BOGGON TJ, WLODARSKA I, CLARK JJ, MOORE S, ADELSPERGER J, KOO S, LEE JC, GABRIEL S, MERCHER T, D'ANDREA A, FROHLING S, DOHNER K, MARYNEN P, VANDENBERGHE P, MESA RA, TEFFERI A, GRIFFIN JD, ECK MJ, SELLERS WR, MEYERSON M, GOLUB TR, LEE SJ, GILLILAND DG. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005, 7, 387-397.
- (14) KRALOVICS R, PASSAMONTI F, BUSER AS, TEO SS, TIEDT R, PASSWEG JR, TICHELLI A, CAZZOLA M, SKODA RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, 1779-1790.
- (15) AVET-LOISEAU H, ATTAL M, MOREAU P, CHARBONNEL C, GARBAN F, HULIN C, LEYVRAZ S, MICHALLET M, YAKOUB-AGHA I, GARDERET L, MARIT G, MICHAUX L, VOILLAT L, RENAUD M, GROSBOIS B, GUILLERM G, BENBOUBKER L, MONCONDUIT M, THIEBLEMONT C, CASASSUS P, CAILLOT D, STOPPA AM, SOTTO JJ, WETTERWALD M, DUMONTET C, FUZIBET JG, AZAÏS I, DORVAUX V, ZANDECKI M, BATAILLE R, MINVIELLE S, HAROUSSEAU JL, FACON T, MATHIOT C. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma : the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, 2007, 109, 3489-3495.