

ANALYSE MUTATIONNELLE DU GÈNE CSF3R (RÉCEPTEUR DU G-CSF)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Hôpital Maisonneuve-Rosemont
- 1.2 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 23 décembre 2015
- 1.3 **Date de publication de l'avis** : 22 février 2016

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

Conflit d'intérêts

Le D^r Lambert Busque et la D^{re} Annie-Claude Labbé n'ont pas participé aux délibérations et ils se sont retirés au moment de formuler la recommandation.

Lecture externe et accompagnement scientifique

La lecture externe et l'accompagnement scientifique sont des mécanismes utilisés par l'INESSS pour assurer la qualité de ses travaux. Les lecteurs externes et les experts accompagnateurs valident les aspects méthodologiques de l'évaluation, de même que l'exactitude du contenu, en fonction de leur domaine d'expertise propre.

Pour le présent avis, l'expert consulté est le D^r Olivier Larochelle, hémato-oncologue au CHU de Québec.

2 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

2.1 Nom de l'analyse

Analyse mutationnelle du gène codant pour le récepteur du G-CSF (*G-CSFR*, *granulocyte colony-stimulating factor receptor*⁴⁶) par séquençage direct de type Sanger.

46. Le gène codant pour le récepteur du G-CSF est aussi appelé *CSF3R* (*colony-stimulating factor 3 receptor*).

2.2 Description brève de l'analyse et précisions techniques et cliniques

La recherche de mutations du gène codant pour le récepteur du G-CSF (*CSF3R*) permettra de confirmer le diagnostic de leucémie neutrophilique chronique (LNC) et de leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa). Elle permettra également d'orienter le traitement en fonction des mutations détectées. Dans le cas de la neutropénie congénitale sévère (NCS), la détection de mutations du gène *CSF3R* permettra de reconnaître les patients à risque de transformation leucémique.

La recherche de mutations sera réalisée à l'aide de la méthode de séquençage Sanger [Sanger *et al.*, 1977]. Le principe de cette méthode de séquençage dite par terminaison de chaîne consiste à engager la polymérisation de l'ADN à l'aide d'une amorce complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer préalablement amplifié par PCR. L'élongation de l'amorce est réalisée par un ADN polymérase en présence des quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ainsi que d'une faible concentration de didésoxyribonucléotides marqués d'un fluorochrome unique (ddNTP*) : ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP. L'incorporation aléatoire d'un ddNTP* en cours d'élongation provoque l'arrêt de la polymérisation du nouveau brin. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN de tailles variables qui se terminent tous par un nucléotide marqué. Les fragments sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire, puis détectés au moyen d'un laser qui excite le fluorochrome du ddNTP terminal. La séquence des fluorochromes, analysée par ordinateur, correspond à celle des bases de l'ADN original.

Plus précisément, le centre demandeur utilisera la trousse Qiaquick de Qiagen pour la purification des produits PCR, la trousse Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies) pour la réaction de séquençage et la trousse DyeEx de Qiagen pour la purification des produits de séquençage. La séquence sera résolue sur le séquenceur ABI 3130XL puis analysée avec le logiciel Sequencher v.4.9. Les amorces utilisées pour les réactions de PCR et de séquençage ont été conçues par le demandeur.

Les réactions de séquençage seront effectuées dans les directions sens et antisens puis comparées entre elles. Si les séquences diffèrent, l'analyse sera reprise. Par ailleurs, les séquences obtenues seront comparées à la séquence de référence. Les mutations détectées seront confirmées en reprenant le séquençage à partir de nouveaux produits de PCR.

Le séquençage du gène *CSF3R* permettra de détecter deux types de mutations : les mutations juxtamembranaires (extracellulaires) et les mutations de la région C-terminale (intracellulaires) [Tefferi *et al.*, 2015; Maxson *et al.*, 2014]. Ces mutations, respectivement trouvées dans les exons 14 et 17 du gène *CSF3R*, touchent différentes voies de signalisation pouvant être ciblées par divers inhibiteurs de la tyrosine kinase.

Les mutations juxtamembranaires (surtout faux sens) ont la capacité d'induire la signalisation intracellulaire en l'absence du ligand G-CSF [Maxson *et al.*, 2014]. La plus prévalente est la mutation T618I [Maxson *et al.*, 2013]. Les mutations intracellulaires (surtout non-sens ou de décalage du cadre de lecture) résultent en la troncation de la portion cytoplasmique du récepteur, induisant sa surexpression et une hypersensibilité au ligand [Maxson *et al.*, 2014].

2.3 Modalités d'administration du test

Cette analyse utilise l'ADN génomique extrait d'échantillons de sang ou de moelle osseuse comme matériel de départ.

Pour les neutropénies congénitales, le test sera fait à la demande d'un hématologue, avec les renseignements cliniques indiquant le diagnostic de neutropénie congénitale idiopathique.

Pour la LNC et la LMC atypique, l'investigation sera faite pour des patients avec leucocytose et dont le bilan est négatif pour le BCR-ABL1 et JAK2V617F.

Le temps de réponse (phase analytique) de cette analyse est de 15 jours ouvrables.
La validation finale du séquençage est effectuée par le directeur médical du laboratoire de diagnostic moléculaire dans un délai maximal de 30 jours postprélèvement.

2.4 Société ou développeur

Protocole maison

2.5 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Cette analyse et les technologies utilisées n'ont fait l'objet d'aucune homologation par Santé Canada ou la FDA.

2.6 Valeur pondérée : 170,00

3 CONTEXTE

3.1 Patients ciblés

Les indications cliniques ciblées sont la leucémie neutrophilique chronique (LNC), la leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa) et la neutropénie congénitale sévère (NCS).

3.2 Description des maladies visées

Le récepteur du G-CSF joue un rôle prépondérant dans la croissance et la différenciation des granulocytes [Beekman et Touw, 2010]. Des mutations du gène *CSF3R* ont été décrites chez les patients atteints de neutropénie congénitale sévère [Germeshausen *et al.*, 2007], de leucémie neutrophilique chronique et de leucémie myéloïde chronique atypique [Meggendorfer *et al.*, 2014; Maxson *et al.*, 2013]. Les principales caractéristiques de ces trois maladies sont décrites au tableau 1. Dans le cas de la leucémie neutrophilique chronique et de la leucémie myéloïde chronique atypique, l'information présentée est basée sur les critères diagnostiques de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) version 2008 [Tefferi *et al.*, 2014].

Leucémie neutrophilique chronique et leucémie myéloïde chronique atypique

La leucémie neutrophilique chronique et la leucémie myéloïde chronique atypique sont des cancers hématologiques rares caractérisés par l'hypercellularité de la moelle osseuse et une leucocytose constituée en majorité de granulocytes [Maxson *et al.*, 2013]. L'absence du chromosome de Philadelphie avec translocation t(9;22) (BCR-ABL1) est également caractéristique et elle permet d'exclure un diagnostic de leucémie myéloïde chronique [Elliott et Tefferi, 2014a].

La LNC est caractérisée par une prolifération des granulocytes neutrophiles (segmentés et immatures) dans le sang et la moelle osseuse, pouvant atteindre plus de 80 % des leucocytes totaux [Maxson *et al.*, 2013]. Le diagnostic différentiel de la LNC inclut la granulocytose réactive ou secondaire et d'autres cancers myéloïdes tels que la LMCa et la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) [Tefferi *et al.*, 2015]. On distingue la LMCa

par une dysplasie des granulocytes⁴⁷ et une augmentation (supérieure ou égale à 10 %) des granulocytes neutrophiles immatures dans le sang et la moelle osseuse [Maxson *et al.*, 2013].

L'hydroxyurée par voie orale est couramment utilisée en première intention pour le traitement de la LNC et de la LMCa [Elliott et Tefferi, 2014b; Elliott *et al.*, 2005]. La greffe allogénique de cellules souches représente une option de remplacement dans les cas de neutrophilie réfractaire et de transformation blastique [Elliott et Tefferi, 2014b]. Quant aux inhibiteurs de la tyrosine kinase (Ruxolitinib, Dasatinib), ils constituent des options de traitement supplémentaires associées à la détection de mutations du gène *CSF3R* (voir section 4.3).

Neutropénie congénitale sévère

La neutropénie congénitale sévère (NCS) est une maladie dont l'incidence annuelle est de 4,7 cas par million de naissances [Tsangaris *et al.*, 2011]. Il s'agit d'un syndrome hétérogène d'aplasie médullaire caractérisé par un arrêt de maturation en myélopoïèse au stade promyélocyte / myélocyte. Cet arrêt résulte en une neutropénie sévère chronique associée à des infections bactériennes sévères récurrentes [Triot *et al.*, 2014; Zeidler *et al.*, 2009]. Le traitement standard consiste à administrer du G-CSF afin d'augmenter le nombre de neutrophiles et de prévenir les septicémies [Dale *et al.*, 1993]. La greffe de cellules souches demeure le seul traitement pour les patients réfractaires au G-CSF et les patients dont l'état a évolué vers le syndrome myélodysplasique ou la leucémie [Zeidler *et al.*, 2000].

Tableau 1 Principales caractéristiques de la LNC, la LMCa et la NCS (information tirée de Tefferi *et al.*, 2015; Maxson *et al.*, 2013; Donadieu *et al.*, 2011)

MALADIE	BCR-ABL1	DYSPLASIE DES GRANULOCYTES	LEUCOCYTES TOTAUX	GRANULOCYTES NEUTROPHILES	NEUTROPHILES IMMATURES
LNC	négatif	non	$\geq 25 \times 10^9/L$	$> 80 \%$	$< 10 \%$
LMCa	négatif	oui	$\geq 13 \times 10^9/L$	↑	$\geq 10 \%$
NCS	négatif	non	---	Compte absolu $< 0,5 \times 10^9/L$	---

Signes : LMCa : leucémie myéloïde chronique atypique; LNC : leucémie neutrophilique chronique; NCS : neutropénie congénitale sévère; PMN : polymorphonucléaire neutrophile.

3.3 Nombre d'analyses anticipées et de patients visés

Le volume provincial attendu est de 10 à 20 analyses par année.

3.4 Spécialités médicales concernées

Hématologie, génétique, hémato-oncologie

3.5 Données médico-administratives

Analyse non incluse au *Répertoire québécois et système de mesure des procédures de biologie médicale* et aucun envoi hors Québec.

47. La dysplasie des granulocytes ou dysgranulopoïèse est définie comme suit : des granulocytes matures avec un noyau hyposégmenté, un cytoplasme hypogranulaire ou les deux. Information tirée de « Diagnostic significance of detecting dysgranulopoiesis in chronic myeloid leukemia » [site Web de Medscape], disponible à : http://www.medscape.com/viewarticle/463870_2 (consulté le 13 octobre 2015).

3.6 Brève description de la situation actuelle

Bien que la LNC et la LMCA soient définies par l'OMS comme étant deux cancers distincts, le diagnostic de ces deux entités est basé sur l'exclusion à l'aide des critères diagnostiques de l'OMS version 2008 [Tefferi *et al.*, 2014]. Actuellement, la distinction entre ces deux entités repose en partie sur des seuils arbitraires pour le compte total de leucocytes, le pourcentage de neutrophiles immatures et la présence ou l'absence de dysgranulopoïèse (tableau 1) [Maxson *et al.*, 2013]. L'absence de BCR-ABL1 (chromosome de Philadelphie) exclut la leucémie myéloïde chronique (LMC) [Elliott et Tefferi, 2014a]. L'absence de mutations du gène *JAK2* (V617F), non spécifiques d'une néoplasie myéloproliférative en particulier, indique que la prolifération cellulaire est clonale et elle exclut la possibilité d'une cause réactionnelle (réaction inflammatoire ou infectieuse, tumeur solide, néoplasme des plasmocytes) [Elliott et Tefferi, 2014b; Vardiman *et al.*, 2009].

Les critères diagnostiques de l'OMS pour la LNC, la LMCA et la LMMC sont les suivants [Tefferi *et al.*, 2014] :

- l'absence de BCR-ABL1 et de mutations des gènes *PDGFRA* / *PDGFRB* / *FGFR1*;
- l'absence de conditions réactionnelles pouvant être associées à une granulocytose ou une monocytose;
- le diagnostic de LNC requiert l'absence de dysgranulopoïèse (caractéristique de la LMCA);
- le compte de monocytes est supérieur à $1 \times 10^9/L$ (requis pour le diagnostic de la LMMC);
- le compte de leucocytes est d'au moins $25 \times 10^9/L$ (diminue la possibilité de granulocytose réactionnelle);
- plus de 80 % de neutrophiles segmentés ou immatures;
- moins de 10 % de cellules myéloïdes immatures (réduit la possibilité de LMCA ou d'autres cancers myéloïdes telle la myélofibrose).

3.7 Brève description des avantages évoqués de l'analyse proposée

La détection de mutations du gène *CSF3R* permettrait de confirmer le diagnostic de LNC et de LMCA et d'orienter le traitement des patients en fonction du type des mutations détectées.

Selon le demandeur, cette analyse apportera des modifications à l'algorithme de traitement des patients atteints de LNC. Ces patients sont actuellement non traités ou traités avec des traitements palliatifs (HYDREA, hydroxyurée). Selon le demandeur, il sera possible (par l'intermédiaire du programme « patients d'exception » de la RAMQ) d'obtenir soit du Ruxolitinib ou du Dasatinib pour ces patients.

De plus, cette analyse permettrait de reconnaître les individus atteints de NCS afin de leur offrir un suivi plus étroit compte tenu du risque de progression vers une leucémie aiguë.

L'analyse mutationnelle du gène *CSF3R* est une nouvelle analyse; elle ne remplace donc aucune autre analyse incluse au répertoire.

4 DONNÉES PROBANTES

4.1 Valeur diagnostique

Quatre études portant sur l'identification des mutations du gène *CSF3R* et sur leur association avec la LNC et la LMCA ont été retenues. Le tableau 2 présente un résumé des fréquences mutationnelles du gène *CSF3R*.

En 2013, l'étude de Maxson et ses collègues avait pour objectif d'identifier les gènes pouvant contribuer à la progression de la LNC et de la LMCA. Le séquençage de 1862 gènes codant pour des kinases, des phosphatases, des facteurs de croissance et des récepteurs de cytokines a été effectué par NGS. Des mutations du gène *CSF3R* ont été observées chez 16 des 27 patients (59 %) atteints de LNC ou de LMCA. Les mutations juxtamembranaires (T615A et T618I) ainsi que différentes mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture menant à la troncation de la portion cytoplasmique du récepteur du gène *CSF3R* ont été détectées. Cette étude constitue la première observation de l'association de mutations du gène *CSF3R* avec la LNC et la LMCA. Les auteurs concluent que les mutations du gène *CSF3R* sont communes chez les patients atteints de LNC ou de LMCA et qu'elles constituent un critère diagnostique potentiellement utile concernant ces cancers [Maxson *et al.*, 2013].

Une étude réalisée par une équipe de la clinique Mayo aux États-Unis avait pour but de déterminer la fréquence et la spécificité des mutations du gène *CSF3R* chez une cohorte constituée de 54 patients chez qui on suspectait la LNC (35⁴⁸) et la LMCA (19) [Pardanani *et al.*, 2013]. Parmi ceux-ci, 12 cas de LNC et 9 cas de LMCA satisfaisaient aux critères diagnostiques de l'OMS (LNC-OMS et LMCA-OMS respectivement). Tous les cas de LNC-OMS avaient une mutation du gène *CSF3R* (12/12), en majorité la T618I (83,3 %), contrairement aux cas pour qui la LNC était suspectée et qui ne satisfaisaient pas aux critères de l'OMS (1/17). Aucune mutation du gène *CSF3R* n'a par ailleurs été détectée dans les cas de LMCA-OMS (0/9) ni dans les cas possibles de LMCA ne satisfaisant pas aux critères de l'OMS (0/10). Cette étude représente la première confirmation de l'existence d'une association entre les mutations du gène *CSF3R* (dont la T618I) et la LNC-OMS. Les auteurs concluent que la mutation T618I est un marqueur moléculaire hautement sensible (83,3 %) et spécifique pour la LNC définie par les critères de l'OMS (LNC-OMS) et ils suggèrent qu'elle soit incorporée dans les critères diagnostiques de l'OMS [Pardanani *et al.*, 2013]. Selon Tefferi et ses collègues [2015], la discordance entre les résultats de fréquence mutationnelle du gène *CSF3R* pour la LMCA (44,4 % selon Maxson versus 0 % selon Pardanani) vient probablement de différences dans l'attribution morphologique des cas de LNC et de LMCA [Tefferi *et al.*, 2015].

Une étude de cohorte multicentrique rétrospective a produit des résultats similaires à ceux de l'étude de Pardanani et ses collègues en confirmant, entre autres, l'absence de mutations du gène *CSF3R* (T618I) pour les 27 cas de LMCA-OMS analysés [Wang *et al.*, 2014]. Selon les auteurs, la présence d'une mutation juxtamembranaire du gène *CSF3R* chez un patient avec néoplasie myéloproliférative à prédominance neutrophilique devrait être considérée comme une LNC, ce qui exclut essentiellement un diagnostic de LMCA [Wang *et al.*, 2014].

Une étude de prévalence basée sur 218 patients pour qui le diagnostic avait été établi selon les critères de l'OMS avait pour objectif de déterminer la fréquence des mutations dans divers gènes, dont le *CSF3R*, afin de tracer le profil moléculaire de la LNC, de la LMCA et de la LMMC. De façon similaire aux études de Pardanani et de Wang, les mutations du gène *CSF3R* ont été significativement associées à la LNC ($p < 0,001$) [Megendorfer *et al.*, 2014].

48. Les 35 cas de LNC incluent 12 cas de LNC-OMS, 17 cas de LNC non définie par les critères de l'OMS et 6 cas de LNC avec gammopathie monoclonale.

Tableau 2 Fréquence mutationnelle du gène *CSF3R* dans la leucémie neutrophilique chronique (LNC) et la leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa)

ÉTUDE COHORTE MÉTHODE	N : DIAGNOSTIC	FRÉQUENCE MUTATION <i>CSF3R</i> N (%)	FRÉQUENCE T618I+ N (%)	MUTATIONS <i>CSF3R</i> (N)
Maxson <i>et al.</i> , 2013 N = 27 Séquençage NGS	9 : LNC	8 (89 %)	7 (77,7 %)	T618I (5) T618I + D771fs (1) T618I + E808K (1) T715A + S783fs (1)
	18 : LMCa ou LMCa suspecté †	8 (44,4 %)	5 (27,7 %)	T618I (4) D771fs (1) G683R (1) T618I + W791* (1) T615A + Y752* (1)
Pardanani <i>et al.</i> , 2013 N = 54 LNC-LMCa suspectés Séquençage Sanger	12 : LNC-OMS 17 : LNC	LNC-OMS : 12 (100 %) LNC : 1 (6 %)	LNC-OMS: 10 (83,3 %)	<u>LNC-OMS</u> : T618I (9) T618I + 2341_2342insC exon 17 (1) I598I (1) M696T (1) <u>LNC</u> : M696T (1)
	9 : LMCa-OMS 10 : LMCa	LMCa-OMS : 0 (0 %) LMCa : 0 (0 %)	LMCa-OMS : 0 (0 %)	aucune
Wang <i>et al.</i> , 2014 N = 134 (7 centres) Séquençage Sanger	65 : LMCa-OMS ‡	ND	0/27 analysés (0 %)	G683R (1) exon 17 §
Meggendorfer <i>et al.</i> , 2014 N = 218 Séquençage Sanger	14 : LNC-OMS	6 (43 %)	5 (35,7 %)	T618I (2) T618I + Y787*(1) T618I + W791* (2) Q754*(1)
	58 : LMCa-OMS	2 (3 %)	1 (1,7 %)	T618I (1) T615A + W791* (1)

Sigles et acronymes : fs : *frame shift* (décalage du cadre de lecture); LMCa : leucémie myéloïde chronique atypique; LMCa-OMS : LMCa satisfaisant aux critères diagnostiques de l'OMS; LNC : leucémie neutrophilique chronique; LNC-OMS : LNC satisfaisant aux critères diagnostiques de l'OMS; ND : non déterminé; OMS : Organisation mondiale de la santé.

* Mutation non-sens (induisant un codon stop) qui mène à la troncation de l'extrémité carboxy-terminale du récepteur G-CSF.

† LMCa favorisée par rapport à la LNC en raison de la présence de dysplasie granulocytaire et/ou du compte différentiel de leucocytes comprenant plus de 10 % de cellules immatures.

‡ Ces patients satisfont aux trois critères de l'OMS suivants et ils ont donc été classés LMCa : leucocytes totaux supérieurs ou égaux à $13 \times 10^9/L$, supérieurs ou égaux à 10 % de cellules immatures, dysgranulopoïèse (10 % ou plus de granulocytes).

§ La mutation G683R serait possiblement un polymorphisme germlinal selon ce qui est rapporté dans la base de données SNP (*Single nucleotide polymorphism*) (SNP ID : rs3918001). Toutefois, l'ADN génomique n'était pas disponible pour le confirmer [Wang *et al.*, 2014].

4.2 Valeur pronostique

La neutropénie congénitale sévère (NCS) est un syndrome préleucémique avec risque élevé de progression en SMD ou en LMA [Rosenberg *et al.*, 2010]. La détection de mutations dans le gène *CSF3R* serait utile pour déterminer le risque de transformation leucémique et ainsi offrir une autre option thérapeutique aux patients qui ne répondent que peu ou pas au traitement standard (G-CSF) [Zeidler *et al.*, 2009]. Par ailleurs, le temps entre la détection des mutations du gène *CSF3R* et la transformation leucémique peut varier considérablement. Quelques mois, quelques années voire des décennies peuvent s'écouler après la détection des clones initiaux [Skokowa *et al.*, 2014; Beekman et Touw, 2010].

Le risque de transformation leucémique associé à la présence de mutations du gène *CSF3R* a été démontré chez une cohorte de 148 patients avec NCS [Germeshausen *et al.*, 2007]. Des mutations non-sens du gène *CSF3R*, induisant la troncation de la portion C-terminale du récepteur, ont été détectées dans 41 % (61/148) des cas de NCS et 15,5 % (23/148) ont évolué en leucémie⁴⁹, en SMD ou en monosomie 7⁵⁰ (tableau 3).

Parmi ceux qui ne présentaient pas de signes de transformation leucémique (125/148; 84,5 %), l'incidence des mutations du gène *CSF3R* était de 34 % (43/125) comparativement à 78 % (18/23) pour ceux ayant évolué en leucémie. La corrélation entre les mutations du gène *CSF3R* et le développement d'un cancer secondaire s'est avérée hautement significative (chi carré de Pearson, $p = 8,6 \times 10^{-5}$) [Germeshausen *et al.*, 2007].

Parmi les cas ayant évolué en leucémie, aucune mutation du gène *CSF3R* n'a été détectée dans 22 % (5/23) des cas de NCS.

Tableau 3 Fréquence des mutations du gène *CSF3R* et développement d'un cancer secondaire chez les patients atteints de NCS

GROUPE	SANS MUTATION <i>CSF3R</i> , N (%)	AVEC MUTATION <i>CSF3R</i> , N (%)	TOTAL
NCS sans Mo7/SMD/leucémie	82 (66)	43 (34)	125
NCS avec Mo7/SMD/leucémie	5 (22)	18 (78)	23
NCS/Mo7	0	2	2
NCS/SMD	1	4	5
NCS/LMA	4	9	13
NCS/LLA	0	2	2
NCS/LMMC	0	1	1
Total	87 (59)	61 (41)	148

Source : Germeshausen *et al.*, 2007.

Sigles : LLA : leucémie lymphoïde aiguë; LMA : leucémie myéloïde aiguë; LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique; NCS : neutropénie congénitale sévère; Mo7 : monosomie 7; SMD : syndrome myélodysplasique.

Ainsi, selon les auteurs de cette étude, l'occurrence des mutations du gène *CSF3R* contribuerait significativement à la leucémogénèse, mais elle ne serait pas un prérequis. Par ailleurs, le risque de développer un cancer secondaire à la NCS est 7 fois plus élevé chez les

49. Les types de leucémies observées à la suite de la NCS étaient la LMA, la LLA ou la LMMC.

50. La monosomie 7 renvoie à la présence d'un seul chromosome 7.

patients avec mutations du gène *CSF3R* comparativement à ceux qui en sont dépourvus (OR 6,9; IC95 % : 2,4 - 19,8) [Germeshausen *et al.*, 2007].

Plus récemment, une étude de cohorte constituée de 31 patients atteints de NCS avait pour objectif d'identifier le profil d'acquisition des mutations associées à la leucémie par séquençage NGS [Skokowa *et al.*, 2014]. Parmi ces 31 patients, 21 ont développé une leucémie et l'état de 10 d'entre eux a évolué vers un SMD. Des mutations du gène *RUNX1* ont été détectées chez 64,5 % (20/31) des patients et, de ceux-ci, 85 % (17/20) avaient aussi des mutations tronquantes du gène *CSF3R* (*RUNX1+ CSF3R+*). Parmi les cas *RUNX1+ CSF3R+*, 11 (64,7 %) ont développé une leucémie et 6 (35,3 %) un SMD. Afin de déterminer la séquence d'acquisition des mutations des gènes *RUNX1* et *CSF3R*, l'analyse mutationnelle des cellules de la moelle osseuse de 10 patients consécutifs atteints de NCS à différents moments avant le début de la leucémie a été effectuée. Chez 6 de ces 10 patients, une mutation du gène *CSF3R* était présente avant l'apparition des mutations du gène *RUNX1*. Les résultats indiquent qu'une mutation du gène *CSF3R* constitue un événement précoce dans la leucémogénèse à la suite de la NCS [Skokowa *et al.*, 2014]. Les auteurs concluent que les patients chez qui on a observé *RUNX1+ CSF3R+* seraient à haut risque d'une évolution rapide vers la leucémie et qu'ils devraient être considérés comme candidats à une greffe de cellules souches.

4.3 Valeur thérapeutique

Le Ruxolitinib (Jakavi^{MC}, Novartis) est présentement indiqué pour le traitement de la splénomégalie associée à la myélofibrose primitive, à la myélofibrose consécutive à une polycythémie vraie ou à une thrombocythémie essentielle⁵¹. Le Dasatinib (Sprycel^{MC}, B.M.S.) est actuellement indiqué pour le traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique ou en phase accélérée chez les adultes ou pour le traitement en première intention de la LMC en phase chronique chez les adultes présentant une contre-indication sérieuse à l'imatinib et au nilotinib⁵¹. Relativement au traitement de la LNC ou de la LMCa, le Ruxolitinib et le Dasatinib ne sont pas reconnus par la RAMQ, ni par Santé Canada⁵², ni par la FDA⁵³.

Aucune étude de cohorte prospective ou rétrospective n'a démontré l'efficacité du Ruxolitinib et du Dasatinib relativement au statut mutationnel du gène *CSF3R*. Toutefois, il a été démontré *in vitro* que la présence de mutations juxtamembranaires (domaine extracellulaire) du récepteur du G-CSF conférait une sensibilité aux inhibiteurs de kinase JAK (p. ex. Ruxolitinib), et les mutations tronquantes (domaine intracellulaire) une sensibilité accrue aux inhibiteurs de kinases SRC (p. ex. Dasatinib) [Maxson *et al.*, 2013].

51. Information tirée de la Liste des médicaments (mise à jour du 1^{er} octobre 2015), disponible à : https://www.prod.ramq.gouv.qc.ca/DPI/PO/Commun/PDF/Liste_Med/Liste_Med/liste_med_cor1_2015_10_01_fr.pdf (consulté le 21 octobre 2015).

52. La monographie de Jakavi^{MC} est disponible en accédant à la Base de données sur les produits pharmaceutiques de Santé Canada (<http://webprod5.hc-sc.gc.ca/dpd-bdpp/info.do?code=87357&lang=fra>) (consulté le 21 octobre 2015). La monographie de Sprycel^{MC} est disponible en accédant à la Base de données sur les produits pharmaceutiques de Santé Canada (<http://webprod5.hc-sc.gc.ca/dpd-bdpp/info.do?code=77850&lang=fra>) (consulté le 21 octobre 2015).

53. La monographie de Jakavi^{MC} est disponible en accédant à la base de données des médicaments approuvés par la FDA Drugs@FDA (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=JAKAFI>) (consulté le 21 octobre 2015). La monographie de Sprycel^{MC} est disponible en accédant à la base de données des médicaments approuvés par la FDA Drugs@FDA (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=SPRYCEL>) (consulté le 21 octobre 2015).

Par ailleurs, une étude clinique portant sur le Ruxolitinib (NCT02092324)⁵⁴ est en période de recrutement. Cette étude a pour objectif principal de déterminer la proportion de patients atteints de LNC ou de LMCa ayant une réponse hématologique partielle ou complète. Parmi les objectifs secondaires, on cherchera à déterminer si les réponses hématologiques peuvent être corrélées avec certains types de mutations du gène *CSF3R* et la réduction du nombre de cellules avec mutations dans le sang périphérique.

Le tableau 4 présente les quelques études de cas repérées portant sur la réponse au Ruxolitinib chez des patients atteints de LNC ou de LMCa avec mutations du gène *CSF3R*.

Tableau 4 Valeur thérapeutique de la détection de mutations dans le gène *CSF3R*

ÉTUDE	CAS (SEXE, ÂGE)	DIAGNOSTIC	GÈNE (MUTATION)	TRAITEMENT	RÉPONSE
Maxson <i>et al.</i> , 2013	♂ 53 ans	LNC	<i>CSF3R</i> (T618I)	Ruxolitinib 10 mg bid	↓ leucocytes totaux * ↓ compte absolu de neutrophiles*
Dao <i>et al.</i> , 2014	♂ 75 ans	LMCa	<i>CSF3R</i> (T618I)	Hydroxyurée	Échec
				Ruxolitinib 20 mg bid	↓ graduelle sur 3 mois leucocytes totaux *
Lasho <i>et al.</i> , 2014	♀ 66 ans	LNC	<i>CSF3R</i> (T618I) <i>SETBP1</i> (D868N)	Hydroxyurée	Échec
				Ruxolitinib 10, 15 et 20 mg bid	Échec
Ammatuna <i>et al.</i> , 2015	♂ 57 ans	LMCa-OMS	<i>CSF3R</i> (T618I) <i>SETBP1</i> (G870S)	Hydroxyurée et Ruxolitinib 15 mg bid	Échec

Sigles et acronymes : bid : deux fois par jour; LMCa : leucémie myéloïde chronique atypique; LMCa-OMS : leucémie myéloïde chronique atypique satisfaisant aux critères diagnostiques de l'OMS; LNC : leucémie neutrophilique chronique; mg : milligramme; ♂ : homme; ♀ : femme.

* Les valeurs et statistiques associées ne sont pas mentionnées par les auteurs.

Un patient atteint de LNC chez qui on a détecté une mutation du gène *CSF3R* activatrice de la voie de signalisation JAK (T618I) a été traité avec le Ruxolitinib. Une diminution marquée du nombre total de leucocytes et du compte absolu de neutrophiles a été mesurée chez ce patient [Maxson *et al.*, 2013]. Des résultats similaires ont été obtenus chez un patient atteint de LMCa après l'échec d'un traitement à l'hydroxyurée [Dao *et al.*, 2014], traitement le plus couramment utilisé en première ligne [Elliott *et al.*, 2005].

On a par ailleurs constaté que des mutations du gène *SETBP1* étaient présentes chez 33 % des cas de LNC (parmi lesquels 40 % (4/10) étaient *CSF3R*T618I+ *SETBP1*+ [Pardanani *et al.*, 2013]) et chez 24,3 % des cas de LMCa [Piazza *et al.*, 2013]. La présence de mutations du gène *SETBP1* pourrait avoir un effet sur la réponse au Ruxolitinib, comme le démontrent deux études de cas [Ammatuna *et al.*, 2015; Lasho *et al.*, 2014]. Un cas de LNC présentant à la fois une mutation des gènes *CSF3R* et *SETBP1* n'a pas répondu au Ruxolitinib après un échec avec l'hydroxyurée, et ce, même à une dose quotidienne élevée. Selon les auteurs, la contribution de la coexpression de la mutation du gène *SETBP1* à l'inefficacité du traitement au Ruxolitinib n'est toutefois pas connue [Lasho *et al.*, 2014]. De façon similaire au cas de LNC décrit par Lasho et ses collègues, un cas de LMCa répondant aux critères diagnostiques de l'OMS avec mutations concomitantes des gènes *CSF3R* et *SETBP1* s'est montré réfractaire

54. Des renseignements supplémentaires au sujet de cette étude sont disponibles sur le site Web ClinicalTrials.gov à : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02092324> (consulté le 20 octobre 2015).

au Ruxolitinib [Ammatuna *et al.*, 2015] contrairement au cas de LMCA sans mutation du gène *SETBP1* [Dao *et al.*, 2014].

4.4 Validité analytique

Dans les cas de cancer, la détection de mutations somatiques impose des défis techniques uniques comparativement à la détection de mutations germinales [Spencer *et al.*, 2014]. Outre l'hétérogénéité génétique caractéristique des cellules cancéreuses, la présence concomitante de cellules saines et de cellules cancéreuses dans un échantillon clinique fait en sorte que la fréquence des mutations somatiques détectées est variable (effet de dilution) [Spencer *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2012]. Puisque la proportion d'allèles non mutés excède souvent la proportion d'allèles mutés, la détection et le repérage de mutations peu fréquentes peuvent être ardues et dépendre de la sensibilité de la méthode utilisée [Jiang *et al.*, 2012].

Le séquençage direct de type Sanger permet la détection de mutations somatiques avec un niveau de sensibilité (limite de détection) de 15 % à 25 % comparativement à d'autres technologies plus sensibles comme le dHPLC (0,1 % à 10 %) et le PCR allèle-spécifique (AS-PCR) (0,01 %) [Hughes *et al.*, 2006]. Ainsi, les mutations présentes dans certains clones mineurs peuvent ne pas être détectées par séquençage direct [Beekman et Touw, 2010].

Aucune étude évaluant la performance du séquençage direct de type Sanger pour la détection de mutations somatiques à faible fréquence allélique du gène *CSF3R* dans les cas de NCS, LCN et LMCA n'a été repérée.

4.5 Données fournies par le demandeur

L'analyse proposée permet la lecture de chacun des nucléotides de l'exon 14 du gène *CSF3R* de même que celle de l'exon 17, régions où les différentes mutations ayant une incidence sur le diagnostic ou l'évolution de l'état du patient ont été rapportées. Chaque spécimen à analyser est traité en duplicata et chaque produit de PCR est séquencé dans les deux directions. Lors de chaque analyse, l'ADN d'un patient sain est utilisé comme témoin négatif.

Selon le demandeur, la sensibilité de la technique de séquençage Sanger est d'environ 15 %. Comme il s'agit de mutations somatiques, uniquement celles qui auront une fréquence allélique supérieure à 15 % seront rapportées. La spécificité de l'essai est basée sur l'utilisation d'amorces d'ADN spécifiques situées dans l'exon 14 du gène *CSF3R* et l'intron entre les exons 16 et 17 pour le premier amplicon, et de part et d'autre de l'exon 17 pour le second amplicon. Le second amplicon permet le séquençage jusqu'à l'extrémité C-terminale de la protéine codante. La taille des produits d'amplification est de 810 et 950 paires de bases pour les amplicons n° 1 et n° 2, respectivement. Le séquençage de ces régions permet de couvrir toutes les régions susceptibles de contenir des mutations fonctionnelles.

Validation du séquençage du gène *CSF3R*

L'étude de validation du séquençage du récepteur du gène G-CSF (*CSF3R*) a été réalisée en 2014 et 2015 à partir de 35 échantillons issus de 30 patients. Le séquençage a été un succès pour 33 échantillons sur 35.

À la suite des deux réactions d'amplification par PCR réalisées avec les deux paires d'amorces spécifiques, une analyse sur gel d'agarose a été effectuée pour évaluer la qualité et la spécificité (annexe A). Des bandes spécifiques de 810 et 950 paires de bases

étaient présentes pour les puits contenant de l'ADN et aucune bande n'était visible pour le témoin négatif sans ADN. Pour tous les spécimens étudiés (patients et témoin négatif), la spécificité d'amplification a été confirmée par la présence, dans tous les cas, de bandes de 810 et 950 paires de bases. Chaque produit d'amplification (4 par échantillon, 2 amplicons à 2 reprises) était ensuite séquencé à l'aide d'amorces spécifiques. Après la réaction de séquençage, chacune des séquences était alignée avec la séquence obtenue pour le patient sain. Pour chacun des patients, les séquences sens et antisens ont confirmé la présence ou l'absence d'une mutation (annexe B).

Les résultats de séquençage ont révélé la présence d'au moins une mutation chez 10 % (3/30) des patients qui ont subi le test. Chez ces trois patients positifs, deux présentaient la mutation T618I et un la mutation E835K (annexe C). Pour un des patients porteurs de la mutation T618I, une mutation tronquante (W818*) a aussi été détectée. La mutation T618I a été rapportée dans la littérature comme étant un critère diagnostique majeur pour la LNC. La mutation E835K a été répertoriée dans la base de données COSMIC (COSM4172010). Toutes les mutations détectées ont été lues sur deux produits de PCR différents, de même que dans les deux directions.

Contrôle externe de la qualité

Puisqu'aucun contrôle externe de la qualité n'est disponible pour cette analyse précise, les contrôles de la qualité de l'American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) seront utilisés pour le séquençage.

5 IMPACTS BUDGÉTAIRES

Les conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois n'ont pas été analysées.

6 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

La confirmation du diagnostic de LNC à la suite de la détection de mutations du gène *CSF3R* ouvre la possibilité d'un traitement de remplacement par rapport au traitement standard à l'hydroxyurée. Ainsi, il pourrait être possible pour les patients atteints de LNC ou de LMCA d'avoir accès au Ruxolitinib ou au Dasatinib par l'intermédiaire du programme « patients d'exception » de la RAMQ.

Dans les cas de NCS, la détection de telles mutations permettra d'évaluer le pronostic des patients en termes de risque d'évolution vers une leucémie aiguë. Ainsi, une greffe de cellules souches pourrait être envisagée lorsque les chances de réussite seraient encore bonnes.

7 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'AUTRES ORGANISATIONS

Aucune position ou orientation concernant l'analyse mutationnelle du gène *CSF3R* n'a été repérée.

8 SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION

L'analyse mutationnelle du gène *CSF3R* (récepteur du G-CSF) permettrait de confirmer le diagnostic de LNC et de LMCa, d'orienter le traitement en fonction des mutations détectées et de reconnaître les patients atteints de NCS à risque de transformation leucémique. Actuellement, après l'exclusion des causes réactionnelles, le diagnostic de la LNC et de la LMCa repose sur les critères de l'OMS basés principalement sur le compte des leucocytes totaux, le pourcentage de granulocytes neutrophiles immatures, l'absence de BCR-ABL1 et la présence de dysgranulopoïèse (pour la LMCa).

Valeur diagnostique

En 2013, une étude a révélé l'existence de mutations du gène *CSF3R* (principalement la T618I) dans 89 % cas de LNC et 44,4 % des cas de LMCa. Cette étude représente la première observation de l'association de mutations du gène *CSF3R* avec la LNC et la LMCa. Par la suite, trois études ont confirmé l'association quasi exclusive de ces mêmes mutations avec la LNC et leur absence dans la LMCa chez des patients dont le diagnostic était basé sur les critères de l'OMS. Des mutations du gène *CSF3R* n'ont été détectées que dans 0 % à 3 % des cas de LMCa-OMS.

Valeur pronostique

Une seule étude évaluant le risque de transformation leucémique associée à la présence de mutations du gène *CSF3R* a été repérée. L'état des patients atteints de NCS et qui ont des mutations du gène *CSF3R* a 7 fois plus de risques d'évoluer vers une leucémie. Des mutations non-sens du gène *CSF3R* ont été détectées chez 41 % des patients atteints de NCS, et l'état de 15,5 % d'entre eux a évolué en leucémie, en SMD ou en monosomie 7. Une autre étude a révélé que les mutations du gène *CSF3R* seraient un signe précoce de la leucémogénèse, mais ne seraient pas un prérequis. Chez 60 % des patients atteints de NCS, une mutation du gène *CSF3R* était présente avant l'apparition de mutations du gène *RUNX1*. L'état des patients chez qui on a observé la présence du gène *CSF3R*+ avec mutations de *RUNX1* présenterait un risque élevé d'évolution rapide vers la leucémie, et ces patients devraient être considérés comme candidats à une greffe de cellules souches.

Valeur thérapeutique

Seulement deux cas de LNC et deux cas de LMCa avec mutations du gène *CSF3R* traités avec le Ruxolitinib ont été répertoriés. Ces données montrent que le Ruxolitinib permet de réduire le compte de leucocytes totaux et de neutrophiles. Toutefois, pour deux de ces cas, un effet délétère en réponse à ce médicament a été observé en présence de mutations du gène *SETBP1*. Par ailleurs, le Ruxolitinib et le Dasatinib ne sont pas reconnus par la RAMQ, Santé Canada et la FDA pour le traitement de la LNC et de la LMCa.

Validité analytique

Aucune donnée analytique repérée.

9 RECOMMANDATION DE L'INESSS

Analyse mutationnelle du gène *CSF3R* (récepteur du G-CSF)

La recommandation de l'INESSS

- ☐ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☒ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Maintien de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Retrait de l'analyse du *Répertoire*

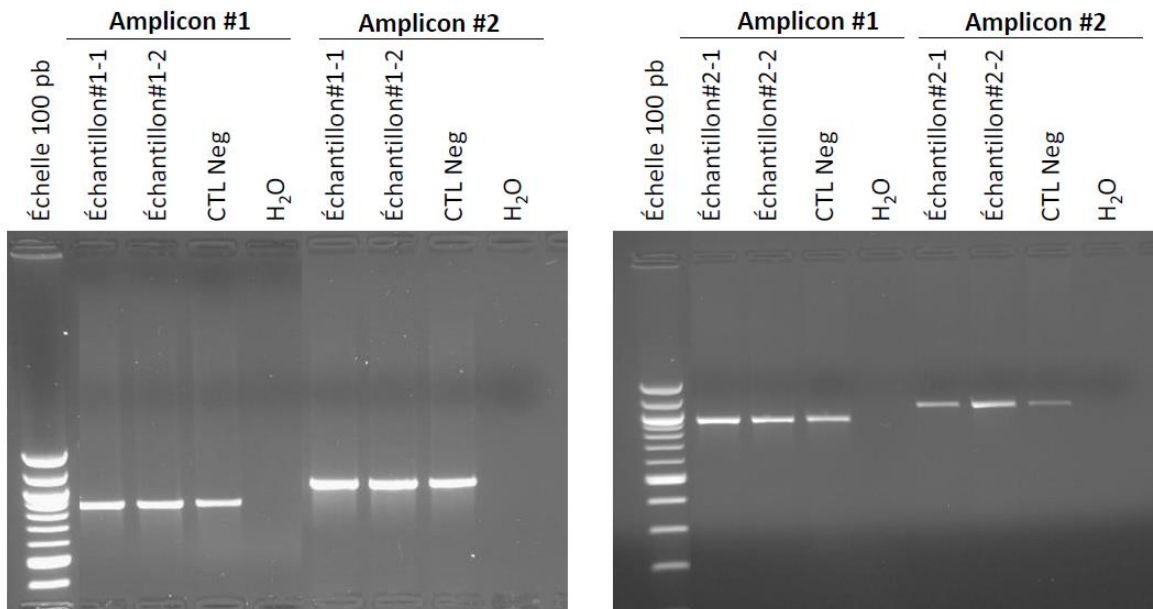
Précisions additionnelles :

- ✓ L'utilité clinique n'est pas clairement démontrée.
- ✓ Les données probantes ont été jugées insuffisantes pour recommander une introduction.
 - données de validation clinique limitées
 - aucune position ou orientation concernant l'analyse mutationnelle du gène *CSF3R* provenant d'autres organisations n'a été repérée.
- ✓ Par ailleurs, le Ruxolitinib et le Dasatinib ne sont pas reconnus par la RAMQ, Santé Canada et la FDA pour le traitement de la LNC et de la LMCa.

ANNEXE A

Résultats de validation locale – exemples de gels d'agarose des produits d'amplification du gène *CSF3R*

Visualisation sur gel d'agarose des produits d'amplification (*CSF3R*) effectués par PCR

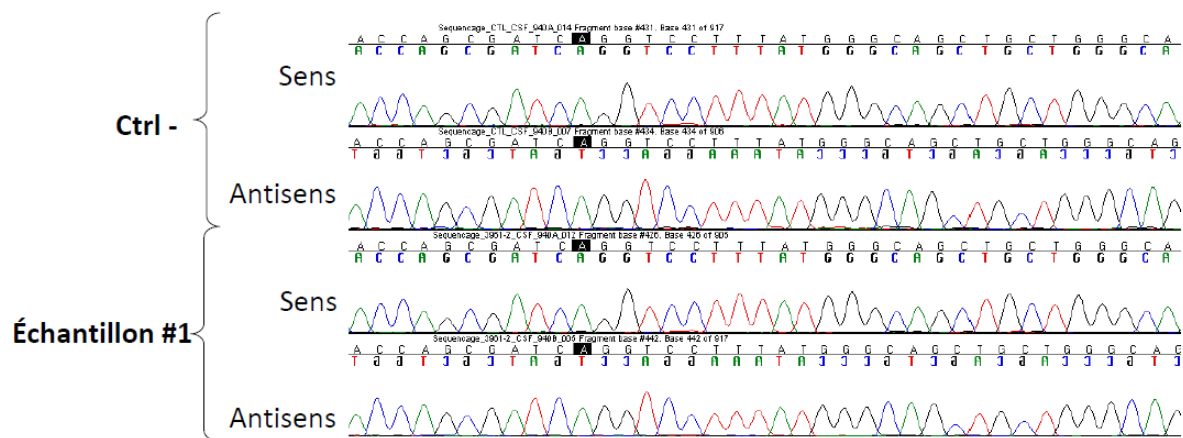


Le contrôle négatif (CTL Neg) représente un individu sain.

ANNEXE B

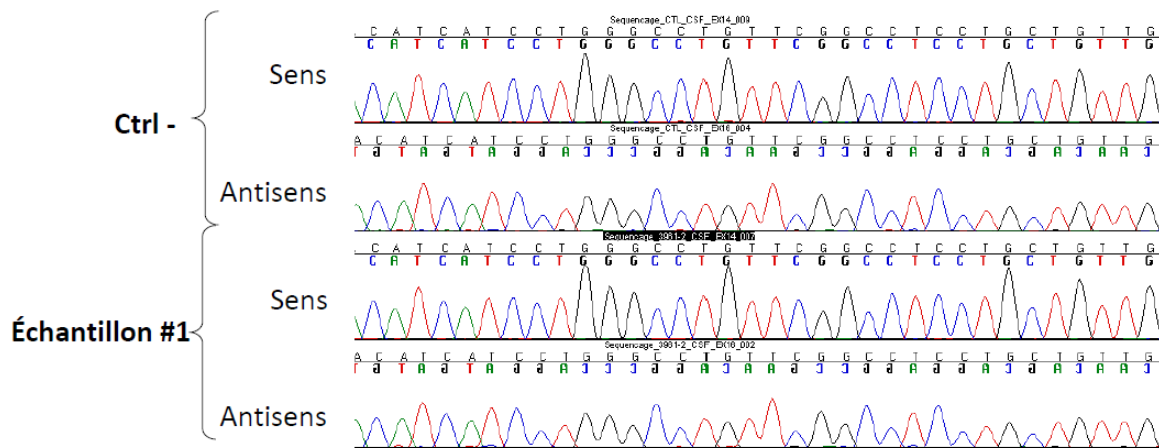
Résultats de validation locale – exemples d'électrophérogrammes

Exemples d'électrophérogrammes obtenus pour l'échantillon #1 et le contrôle négatif afin de séquencer l'amplicon #1.



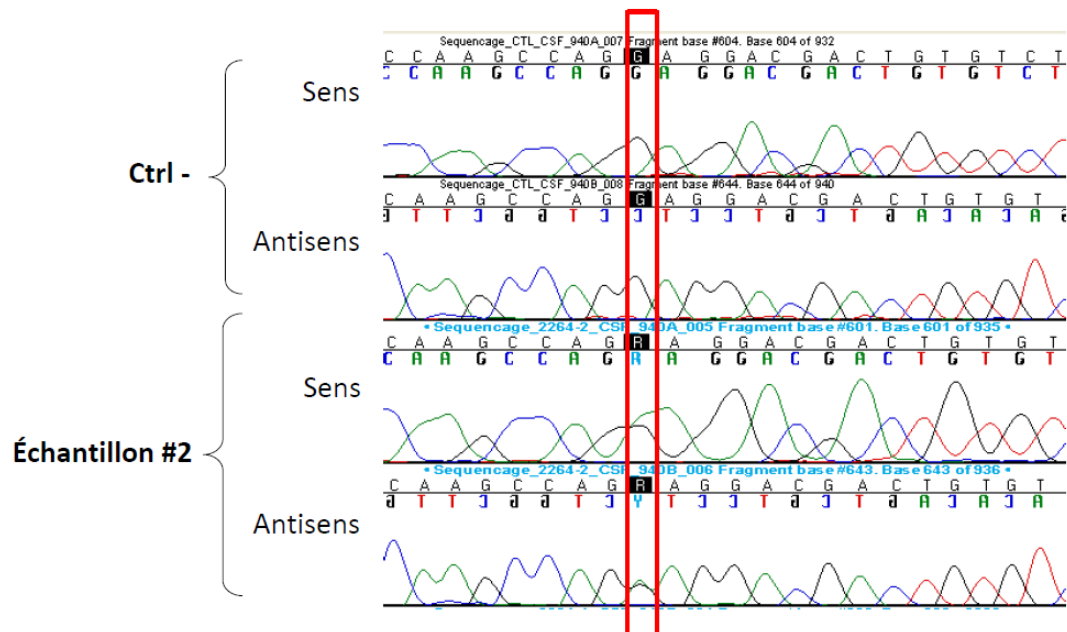
Absence de mutation

Exemples d'électrophérogrammes obtenus pour l'échantillon #1 et le contrôle négatif afin de séquencer l'amplicon #2.



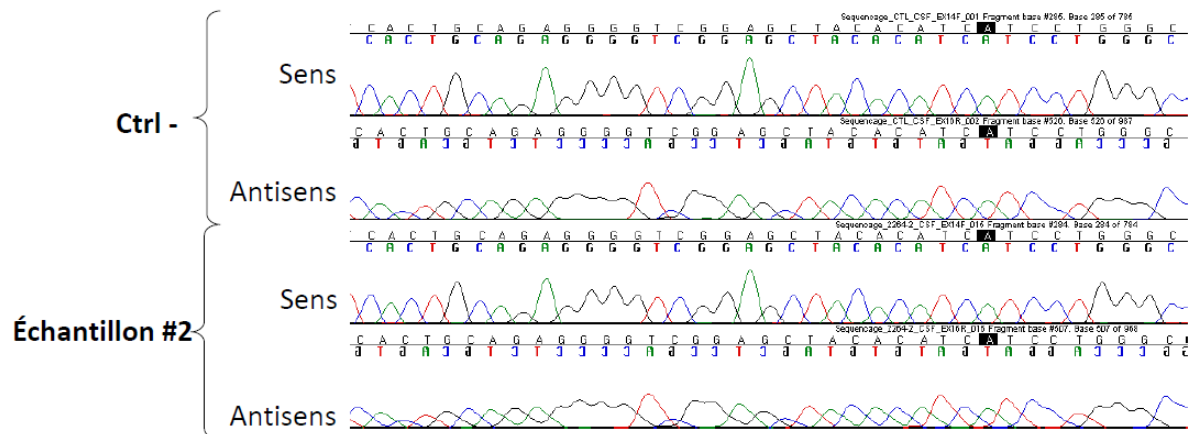
Absence de mutation

Exemples d'électrophérogrammes obtenus pour l'échantillon #2 et le contrôle négatif afin de séquencer l'amplicon #1.



Présence de la mutation E835K (GAG>AAG) dans le gène CSF3R

Exemples d'électrophérogrammes obtenus pour l'échantillon #2 et le contrôle négatif afin de séquencer l'amplicon #2.



Absence de mutation

ANNEXE C

Résultats de validation locale – séquençage du gène *CSF3R* de 33 patients

	PATIENT	ÉCHANTILLON	TYPE DE SPÉCIMEN	DATE DE PRÉLÈVEMENT	AMPL. PCR	SEQUENÇAGE	MUTATION
1	Patient 1	15-0704	Sang	15/02/06	Oui	Oui	Aucune
2	Patient 2	Seq-845	Moelle	14/04/07	Oui	Oui	Aucune
3	Patient 3	Seq-885	Moelle	14/05/14	Oui	Oui	Aucune
4	Patient 4	Seq-886	Moelle	14/05/14	Oui	Oui	Aucune
5	Patient 5	Seq-809 15-2264	Moelle Sang	14/02/21 15/05/01	Oui Oui	Oui Oui	E835K E835K
6	Patient 6	14-01288	Moelle	14/12/01	Oui	Oui	Aucune
7	Patient 7	8701A	Sang	14/08/21	Oui	Oui	Aucune
8	Patient 8	15-2590	Sang	15/05/29	Oui	Oui	Aucune
9	Patient 9	Seq-842 14- 0468	Moelle Moelle	14/04/04 14/10/10	Oui Oui	Oui Oui	Aucune Aucune
10	Patient 10	15-1993	Moelle	15/04/17	Oui	Oui	Aucune
11	Patient 11	15-0532	Sang	15/01/30	Oui	Oui	Aucune
12	Patient 12	15-2609	Sang	15/05/19	Oui	Oui	Aucune
13	Patient 13	15-0483	Sang	15/01/28	Oui	Oui	Aucune
14	Patient 14	14-1742	Sang	14/12/24	Oui	Oui	Aucune
15	Patient 15	15-0399	Sang	15/01/26	Oui	Oui	Aucune
16	Patient 16	15-2925	Sang	15/06/04	Oui	Oui	Aucune
17	Patient 17	Seq-816	Sang	14/03/03	Oui	Oui	Aucune
18	Patient 18	Seq-906	Sang	14/06/18	Oui	Oui	Aucune
19	Patient 19	Seq-878	Moelle	14/05/22	Oui	Oui	T618I et W818*
20	Patient 20	15-1738	Moelle	15/04/02	Oui	Oui	Aucune
21	Patient 21	Seq-938	Moelle	14/07/22	Oui	Oui	Aucune
22	Patient 22	14-1581	Sang	14/12/17	Oui	Oui	Aucune
23	Patient 23	Seq-825	Moelle	14/03/13	Oui	Oui	Aucune
24	Patient 24	Seq-774	Sang	14/01/13	Oui	Oui	Aucune
25	Patient 25	8054A	Moelle	14/02/21	Oui	Oui	Aucune
26	Patient 26	14-0884	Sang	14/11/07	Oui	Oui	Aucune
27	Patient 27	15-2749	Sang	15/05/27	Oui	Oui	Aucune
28	Patient 28	Seq-936	Sang	14/07/21	Oui	Oui	Aucune
29	Patient 29	Seq-777	Sang	14/01/22	Oui	Oui	Aucune
30	Patient 30	Seq-875 Seq-941	Sang Sang	14/05/22 14/07/27	Oui Oui	Oui Oui	T618I T618I
31	Patient 31	15-1112	Moelle	15/02/27	Oui	Oui	Aucune
32	Patient 32	Seq-852	Sang	14/04/16	Oui	Oui	Aucune
33	Patient 33	15-0698L	Moelle	15/02/05	Oui	Oui	Aucune

RÉFÉRENCES

- Ammatuna E, Eefting M, van Lom K, Kavelaars FG, Valk PJ, Touw IP. Atypical chronic myeloid leukemia with concomitant CSF3R T618I and SETBP1 mutations unresponsive to the JAK inhibitor ruxolitinib. *Ann Hematol* 2015;94(5):879-80.
- Beekman R et Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood* 2010;115(25):5131-6.
- Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, Kurtzberg J, et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood* 1993;81(10):2496-502.
- Dao KH, Solti MB, Maxson JE, Winton EF, Press RD, Druker BJ, Tyner JW. Significant clinical response to JAK1/2 inhibition in a patient with CSF3R-T618I-positive atypical chronic myeloid leukemia. *Leuk Res Rep* 2014;3(2):67-9.
- Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: Diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:26.
- Elliott MA et Tefferi A. The molecular genetics of chronic neutrophilic leukaemia: Defining a new era in diagnosis and therapy. *Curr Opin Hematol* 2014a;21(2):148-54.
- Elliott MA et Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia 2014: Update on diagnosis, molecular genetics, and management. *Am J Hematol* 2014b;89(6):651-8.
- Elliott MA, Hanson CA, Dewald GW, Smoley SA, Lasho TL, Tefferi A. WHO-defined chronic neutrophilic leukemia: A long-term analysis of 12 cases and a critical review of the literature. *Leukemia* 2005;19(2):313-7.
- Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: Results of a long-term survey. *Blood* 2007;109(1):93-9.
- Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: Review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006;108(1):28-37.
- Jiang W, Wang W, Fu F, Teng X, Wang H, Teng L. A more sensitive platform for the detection of low-abundance BRAF(V(6)(0)(0)E) mutations. *Mol Cell Biochem* 2012;366(1-2):49-58.
- Lasho TL, Mims A, Elliott MA, Finke C, Pardanani A, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia with concurrent CSF3R and SETBP1 mutations: Single colony clonality studies, in vitro sensitivity to JAK inhibitors and lack of treatment response to ruxolitinib. *Leukemia* 2014;28(6):1363-5.

- Maxson JE, Luty SB, MacManiman JD, Abel ML, Druker BJ, Tyner JW. Ligand independence of the T618I mutation in the colony-stimulating factor 3 receptor (CSF3R) protein results from loss of O-linked glycosylation and increased receptor dimerization. *J Biol Chem* 2014;289(9):5820-7.
- Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, et al. Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N Engl J Med* 2013;368(19):1781-90.
- Meggendorfer M, Haferlach T, Alpermann T, Jeromin S, Haferlach C, Kern W, Schnittger S. Specific molecular mutation patterns delineate chronic neutrophilic leukemia, atypical chronic myeloid leukemia, and chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 2014;99(12):e244-6.
- Pardanani A, Lasho TL, Laborde RR, Elliott M, Hanson CA, Knudson RA, et al. CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia. *Leukemia* 2013;27(9):1870-3.
- Piazza R, Valletta S, Winkelmann N, Redaelli S, Spinelli R, Pirola A, et al. Recurrent SETBP1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 2013;45(1):18-24.
- Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. *Br J Haematol* 2010;150(2):196-9.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74(12):5463-7.
- Skokowa J, Steinemann D, Katsman-Kuipers JE, Zeidler C, Klimenkova O, Klimiankou M, et al. Cooperativity of RUNX1 and CSF3R mutations in severe congenital neutropenia: A unique pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood* 2014;123(14):2229-37.
- Spencer DH, Tyagi M, Vallania F, Bredemeyer AJ, Pfeifer JD, Mitra RD, Duncavage EJ. Performance of common analysis methods for detecting low-frequency single nucleotide variants in targeted next-generation sequence data. *J Mol Diagn* 2014;16(1):75-88.
- Tefferi A, Elliott M, Pardanani A. Chronic neutrophilic leukemia: Novel mutations and their impact on clinical practice. *Curr Opin Hematol* 2015;22(2):171-6.
- Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014;28(7):1407-13.
- Triot A, Jarvinen PM, Arostegui JI, Murugan D, Kohistani N, Dapena Diaz JL, et al. Inherited biallelic CSF3R mutations in severe congenital neutropenia. *Blood* 2014;123(24):3811-7.
- Tsangaris E, Klaassen R, Fernandez CV, Yanofsky R, Shereck E, Champagne J, et al. Genetic analysis of inherited bone marrow failure syndromes from one prospective, comprehensive and population-based cohort and identification of novel mutations. *J Med Genet* 2011;48(9):618-28.

Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937-51.

Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(17):2645-51.

Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K. Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haematol* 2009;144(4):459-67.

Zeidler C, Welte K, Barak Y, Barriga F, Bolyard AA, Boxer L, et al. Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation. *Blood* 2000;95(4):1195-8.