



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb de Blida - 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de **MASTER**

Option : **GENETIQUE**

Thème

La Recherche de la Mutation *JAK2 V617F* dans les Néoplasmes Myéloprolifératifs

Présentée par : **DJEKOUN RADIA** et **SIAMALUBE BEENZU**

Soutenue le : **19/09/2020**

Devant le jury :-

Présidente	: Dr. Zerouti Khadidja	MAA	Université Saad Dahleb de Blida - 1
Examinatrice	: Dr. Guessaibia Nadia	MCA	Université Saad Dahleb de Blida - 1
Promotrice	: Dr. Berkani Lilya Meriem	MAA	CHU Issaad Hassani de Béni Messous
Co-promotrice	: Dr. Aissani El-Fertas Radia	MCB	Université Saad Dahleb de Blida - 1

Année Universitaire : 2019 - 2020

Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué au laboratoire Immunologie Médicale « unité d'Immunogénétique » dirigé par Dr. Berkani Lilya Meriem, Maître assistante au CHU Issaad Hassani de Béni Messous, Alger. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et de reconnaissance pour toute l'aide qu'elle nous a accordé pendant ce travail. Nous la remercions également d'avoir accepté d'être la promotrice. Aussi à tout le personnel du service, surtout Mademoiselle Linda.

Nous tenons à remercier notre co-promotrice, Madame Aïssani El-Fertas Radia, Maître de Conférences à l'Université Saad Dahleb de Blida – 1, pour sa disponibilité et les conseils qu'elle nous a donné qui nous ont beaucoup aidés à réaliser ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage sincère de notre gratitude.

Nous sommes très sensibles à la présence dans ce jury de Madame Zerrouiti Khadidja, Maître Assistante à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'USDB – 1. Nous vous remercions pour avoir accepté de présider ce travail.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Madame Guessaibia Nadia, une Maître de Conférences à l'USDB – 1, pour l'attention que vous avez porté à examiner la lecture de notre manuscrit.

Nous adressons nos sincères et profondes reconnaissances à l'ensemble des enseignants surtout Dr. MOHAMED SAID RAMDANE qui a contribué à notre formation.

Enfin, nous remercions tous ceux et celles, de près ou de loin, qui nous ont aidés et soutenus pendant les moments les plus difficiles, particulièrement : Winniet, Anita, Samuel.

Je dédie ce modeste mémoire à mes chers parents : KATELE JANE et SYAMALUBE THOMAS, qui ont veillé sur moi et surtout, soutenu depuis toujours, à mon frère Tom et ma sœur Chimuka et à tous les membres des familles SIAMALUBE et KATELE, ainsi que mes chers amis : KATEBE AKEMATA et MAKANZA VICTOR.

Je dédie aussi aux personnes qui m'ont beaucoup aidé et encouragé durant mes études, surtout mes chers collègues : IKRAM ASSIA et SAMBOKO EDITH, à toute la promotion 2014 des étudiants Zambiens en Algérie, ainsi qu'à toute la promo 2020 génétique et physiologie et aux Professeurs.

Que le bon Dieu vous bénisse tous

SIAMALUBE BEENZU

Tous d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et ma inspiré les bons pas, sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

A mes chers parents, mes sœurs et mon frère

Qui n'ont cessé de de me soutenir et m'encouragé durant tous mon parcours, vous êtes toujours présents a mes coté pour me consoler quand il fallait.

A mes amis imene, leila, fouzia, naima et linda

Merci pour les bons moments que J'ai partagé et que je partagerai avec vous. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma reconnaissance et de ma gratitude.

A tous mes enseignants de Génétique et Physiologie de l'Université Saad Dahleb de Blida – 1, a tous mes collègues de laboratoire mère et enfant du chu beni messous, a tous l'équipe médicale et paramédicale du laboratoire d'immunologie chu benimessous.

Que dieu vous bénisse tous

DJEKOUN RADIA

Résumé

Les syndromes myéloprolifératifs ou néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) comportent plusieurs entités cliniques et font référence, le plus souvent, aux syndromes myéloprolifératifs classiques négatifs pour le gène *BCR-ABL*.

Nous avons réalisé une étude rétrospective concernant 380 cas suspects de NMP classiques. La mutation *JAK2 V617F* du gène *JAK2* a été recherchée par PCR en temps réel (technologie Taqman) dans un but diagnostique. De plus, cette étude nous a permis de déterminer la prévalence de cette mutation dans les différents néoplasmes myéloprolifératifs classiques, tout en recherchant une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques et biologiques.

La mutation *JAK2 V617F* a été détectée chez 274 patients, soit 72% des cas. 28% étaient négatifs. Elle était plus fréquente chez les femmes (54% ; n=148) comparé aux hommes (46% ; n=126). Et aussi plus fréquente dans la tranche d'âge 60-69 ans avec un taux de 34% (n=57).

La distribution de la mutation *JAK2 V617F* variait dans les 4 groupes. En effet, elle a été retrouvée chez 81% (n = 87) des patients du groupe PV, 79% de patients du groupe TE (n= 132), 37% de patients du groupe MFP (n=17) et 63% de patients de groupe NMP non classées (n=38).

Ces résultats en plus de ceux de la littérature confirment l'importance de cette mutation dans la pathogénèse des syndromes myéloprolifératifs.

Pour cela l'OMS considère la positivité de la mutation *JAK2* comme un critère majeur du diagnostic. Aussi, cette découverte offre une perspective de recherche et de développement de nouvelles thérapeutiques plus ciblées de ces syndromes comme les inhibiteurs de JAKs.

Mots Clés : Mutation *JAK2 V617F* - Syndromes myéloprolifératifs - PCR en temps réel.

Abstract

Myeloproliferative syndromes or myeloproliferative neoplasms (MPNs) comprise several clinical entities and most often refer to classic myeloproliferative syndromes negative for the BCR-ABL gene.

We performed a retrospective study of 380 suspected cases of classical MPN. The JAK2 V617F mutation of the JAK2 gene was sought by real-time PCR (Taqman technology) for diagnostic purposes. Moreover, this study allowed us to determine the prevalence of this mutation in the various classical myeloproliferative neoplasms and while looking for an association between the presence of this mutation and certain clinical and biological characteristics.

The JAK2 V617F mutation was detected in 274 patients, or 72% of cases. 28% were negative. It was more common in women (54%; n = 148) compared to men (46%; n = 126). And also more common in the 60-69 age group with a rate of 34% (n = 57).

The distribution of the JAK2 V617F mutation varied among the 4 groups. Indeed, it was found in 81% (n = 87) of patients in the PV group, 79% of patients in the ET group (n = 132), 37% of patients in the PMF group (n = 17) and 63% of unclassified MPN group patients (n = 38).

These results, in addition to those in the literature, confirm the importance of this mutation in the pathogenesis of myeloproliferative syndromes.

For this, the WHO (world health organization) considers the positivity of the JAK2 mutation as a major diagnostic criterion. Also, this discovery offers a prospect of research and development of new more targeted therapies for these syndromes such as inhibitors of JAKs.

Keywords : JAK2 V617F mutation –Myeloproliferative disorders- real-time PCR

نبذة مختصرة

تشمل متلازمات التكاثر النقوي أو الأورام التكاثرية النقوية (NMPs) العديد من الكيانات السريرية وغالبًا ما تشير إلى متلازمات التكاثر النقوي الكلاسيكي السلبية لجين BCR-ABL. أجرينا دراسة بأثر رجعي لـ 380 حالة مشتبه بها من NMP الكلاسيكي. تم البحث عن طفرة JAK2 V617F لجين JAK2 بواسطة PCR في الوقت الحقيقي (تقنية Taqman) لأغراض التشخيص. بالإضافة إلى ذلك ، سمحت لنا هذه الدراسة بتحديد مدى انتشار هذه الطفرة في الأورام التكاثرية النقوية الكلاسيكية المختلفة ، مع البحث عن ارتباط بين وجود هذه الطفرة وبعض الخصائص السريرية والبيولوجية. تم اكتشاف طفرة JAK2 V617F في 274 مريضًا ، أو 72٪ من الحالات. 28٪ كانت سلبية. كان أكثر شيوعًا عند النساء (54 ٪ ؛ ن = 148) مقارنة بالرجال (46 ٪ ؛ ن = 126). وأيضًا أكثر شيوعًا في الفئة العمرية 60-69 بنسبة 34٪ (ن = 57). اختلف توزيع طفرة JAK2 V617F بين المجموعات الأربع. في الواقع ، تم العثور عليه في 81 ٪ (ن = 87) من المرضى في المجموعة الكهروضوئية ، و 79 ٪ من المرضى في مجموعة TE (ن = 132) ، و 37 ٪ من المرضى في مجموعة MFP (ن = 17) و 63 ٪ من المرضى مرضى مجموعة NMP غير المصنفة (ن = 38). تؤكد هذه النتائج ، بالإضافة إلى تلك الموجودة في الأدبيات ، أهمية هذه الطفرة في التسبب في متلازمات التكاثر النقوي. لهذا ، تعتبر منظمة الصحة العالمية إيجابية طفرة JAK2 كمعيار تشخيصي رئيسي. أيضًا ، يوفر هذا الاكتشاف إمكانية البحث وتطوير علاجات جديدة أكثر استهدافًا لهذه المتلازمات مثل مثبطات JAKs.

الكلمات الرئيسية: طفرة JAK2 V617F - متلازمات التكاثر النقوي

- PCR في الوقت الحقيقي .

Bcl-2 : est le prototype d'une famille de gènes qui peuvent être soit pro-apoptotiques – entre autres Bax, Bak, Bok, Bad, Bid et Bim – ou anti-apoptotiques – parmi lesquels Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Nr13. À l'heure actuelle, il y a en tout 30 membres identifiés chez les eucaryotes supérieurs.

Cellule souche hématopoïétique (CSH) : est un type de cellule à l'origine de toutes les lignées de cellules sanguines, qui intervient lors de l'hématopoïèse. En se divisant, une CSH donne une nouvelle cellule souche hématopoïétique grâce à sa capacité d'autorenouvellement et une cellule déjà engagée dans une voie de différenciation qui pourra, à terme, donner une cellule sanguine mature : globules rouges lors de l'érythropoïèse, globules blancs lors de la leucopoïèse et plaquettes lors de la thrombocytopoïèse.

Cytosquelette : l'ensemble organisé des polymères biologiques constituant le squelette de la cellule, composé des trois filaments: l'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires; tous constamment renouvelés par polymérisation. Dont le rôle est de contrôler la forme des cellules.

Erythropoïétine (EPO) : est une hormone qui stimule la formation et la croissance des globules rouges. Elle est produite en majorité par le rein. Elle est sécrétée en cas de baisse de la concentration du sang artériel en oxygène, de diminution des globules rouges ou par une augmentation des besoins en oxygène.

La ferritine : est une protéine permettant le stockage du fer. Elle joue un rôle clé dans le métabolisme du fer, permettant de réguler son absorption intestinale en fonction des besoins de l'organisme. Elle a ainsi une fonction de réserve et de détoxification du fer.

Le gène de fusion BCR-ABL : code pour une protéine de fusion possédant une activité tyrosine kinase dérégulée. Cela est dû à l'absence de domaines responsables de l'auto-inhibition de la kinase, combinée à la présence de domaines responsables de l'auto-activation.

Les kits Invitrogen : sont une famille de produits de purification conçus pour relever les défis posés par des types d'acide nucléique spécifiques, des sources et des volumes d'échantillons, des

niveaux de débit et des applications en aval. Ces kits sont basés sur une membrane de silice, une résine échangeuse d'anions, ou technologies avancées de purification par membrane de silice.

Splénomégalie : Augmentation du volume de la rate, organe situé en haut et à gauche de l'abdomen (ventre), dont le rôle est de produire des lymphocytes (globules blancs jouant un rôle important dans la défense immunitaire de l'organisme) et de détruire les globules rouges anormaux ou trop vieux. Plusieurs causes peuvent être responsables de cette anomalie : une hypertension portale (haute pression de la veine porte), une maladie infectieuse (mononucléose, hépatite virale ou alcoolique, syphilis, paludisme), une maladie du sang (hémopathie), un cancer ou une affection inflammatoire (polyarthrite rhumatoïde).

Thrombopoïétine (TPO) : est une hormone qui stimule la formation de plaquettes sanguines et la prolifération de leurs précurseurs (les mégacaryocytes). Elle est synthétisée par le foie et les reins .

Thrombose : correspond à un caillot (thrombus) se formant dans un vaisseau sanguin, interrompant la circulation sanguine. Lorsque le caillot se forme dans une veine, on parle de thrombose veineuse ou de phlébite. Lorsqu'il se forme dans une artère, on appelle ça une thrombose artérielle.

Un spectrophotomètre : est un instrument permettant de réaliser une mesure spectrophotométrique. Un spectromètre, ou spectroscopie, est un appareil qui permet d'effectuer une mesure spectrométrique de l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée ou sur une région donnée du spectre.

Figure 1 : Schéma du système hématopoïétique	4
Figure 2 : La translocation t (9;22) (q34;q11).....	5
Figure 3 : Structure des Janus Kinases	8
Figure 4 : Implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines.....	9
Figure 5 : Activation de la voie de signalisation JAK-STAT	10
Figure 6 : Voie de signalisation PI3K/mTOR et ses fonctions cellulaires.....	11
Figure 7 : MAPKs et leur signalisation	12
Figure 8 : Localisation du gène <i>JAK2</i> sur le chromosome 9p, locus 9p24.1	14
Figure 9 : Séquences nucléotidiques et protéiques caractérisant la mutation V617F	15
Figure 10 : Structure de la protéine <i>JAK2</i> sauvage (A) et muté (B).....	15
Figure 11 : Activation constitutive des voies de signalisation	16
Figure 12 : Représentation du gène <i>MPL</i> et de ces mutations	17
Figure 13 : représentation des domaines de la calréticuline <i>CALR</i>	18
Figure 14 : Mutation type 1 et type 2 du gène <i>CALR</i> trouve dans les néoplasmes myéloproliférative	18
Figure 15 : Mode opératoire de l'extraction de l'ADN sur colonnes chromatographiques Invitrogen®.....	21
Figure 17 : Hydrolyse des sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)	24
Figure 18 : Modèle graphique de la PCR en temps réel	24
Figure 21 : Exemple d'un échantillon d'ADN positif pour la mutation <i>JAK2V617F</i>	26
Figure 22 : Exemple d'un échantillon d'ADN négatif pour la mutation <i>JAK2V617</i>	26

Figure 23 : Répartition des patients selon le sexe dans la population générale et les groupes.....	28
Figure 24 : Moyenne d'âge (Année \pm SD) pour chaque groupe NMP.....	29
Figure 25 : Répartition de la population générale selon les tranches d'âge	29
Figure 26 : Répartition des patients selon les tranches d'âges pour chaque type de pathologie	30
Figure 27 : Répartition des patients selon leur origine géographique	31
Figure 28 : Répartition des patients selon le type de NMP par origine géographique	31
Figure 29 : Répartition des patients selon les signes biologiques	35
Figure 30 : Répartition des patients selon le résultat de la BOM.....	36
Figure 31 : Répartition des patients MFP selon le grade de la fibrose à la BOM	36
Figure 32 : Répartition des patients selon le statut mutationnel du gène <i>jak2</i>	37
Figure 33 : Répartition de la mutation <i>JAK2 V617F</i> selon les tranches d'âge.....	38
Figure 34 : Répartition des patients appartenant aux différents groupes NMP selon le statut mutationnel du gène <i>jak2</i>	38
Figure 35 : Répartition des patients <i>JAK2V617F+</i> selon leur origine géographique	39
Figure 36 : Résultats de biopsie ostéoméduleaire pour les patients <i>JAK2V617F</i> négatifs.....	47
Figure 37 : Répartition des patients de phénotype MFP <i>JAK2V617F</i> négatifs selon le grade de la fibrose	47
Figure 38 : Résultats de biopsie ostéomedulaire pour les patients <i>JAK2V617F</i> positifs.....	48
Figure 39 : Répartition des patients de phénotype MFP <i>JAK2V617F</i> positifs selon le grade de la fibrose	48

Tableau I	: Protocole d'amplification pour la recherche de la mutation JAK2 V617F	25
Tableau II	: Répartition des patients appartenant aux différents groupes NMP selon les signes cliniques.....	34
Tableau III	: Répartition des patients appartenant aux différents groupes NMP selon les autres paramètres biologiques	35
Tableau IV	: Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques entre les patients positifs et négatifs à la mutation dans le groupe PV.....	43
Tableau V	: Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques entre les patients positifs et négatifs à la mutation dans le groupe TE.....	43
Tableau VI	: Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques entre les patients positifs et négatifs à la mutation dans le groupe MFP.....	44
Tableau VII	: Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques entre les patients positifs et négatifs à la mutation dans le groupe NMP non classés	44
Tableau VIII	: Comparaison des paramètres biologiques entre les patients positifs et négatifs à la mutation dans les différents groupes	45

4E-BP1: Eucaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

A: Alanine

ADN: Acide Désoxyribonucléique

Akt: cellular homolog of the V-akt oncogene ou protein kinase B

ARN: Acide Ribonucléique

ASXL1: Additional Sex Combs like 1

AU : Acide Urique

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAD: Bcl-2 associated Agonist of Cell Death/Biotin Acceptor Domain

BAF3: immortalized murine bone marrow-derived pro-B-cell line

Bcl-2: B cell leukemia protein 2

BCR-ABL1: Breakpoint Cluster Region – Abelson tyrosine kinase homolog 1

BOM: Biopsie Ostéomédullaire

BPO : Bilan Pré-Opératoire

CALR : Calréticuline

Cbl : Casitas B-lineage Lymphoma

c-Myc: Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog

CSH : Cellule Souche Hématopoiétique

DNMT3A : DNA (cytosine 5) methyl-transférase 3A

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EPO : Erythropoïétine

EPO-R : Récepteur à l'Erythropoïétine

ERK: Extracellular Regulated Signal

ETV6: ETS translocation variant 6

EZH: Enhancer of Zeste Homolog 2

FAM: Fluorescence Amplification

FER: Ferritine

FERM: 4-1 Ezrin, Radixin, Moesin

FOXO3A: Forkhead box protein

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

Gab1: GRB2 associated binding protein 1

G-CSF: Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3

HB: Hémoglobine

HTA : Hypertension Artérielle

HTE : Hématocrite

IDH : Isocitrate déshydrogénase

IFN : Interferon

IGF: Insulin-like Growth Factor

IL: Interleukine

IRS-2 : Insulin Receptor Substrate 2

JAK2 : Janus kinase de la protéine 2

JH: Jak Homology domain

JNK: C-Jun N-terminal kinase

K: Lysine

kD: Kilodalton

L: Leucine

LA : Leucémie Aigue

LDH : Lactate déshydrogénase

LMA : Leucémie Myéloide Aigue

LMC : Leucémie Myéloide Chronique

LNK : Lymphocyte Adapter protein ou « linker »

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MEKK: MAPK Kinase

MFP : Myéloblastose Primitive

MPL : Myeloproliferative Leukemia protein

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin

NFS: Numération Formule Sanguine

NMP : Néoplasmes myéloprolifératifs

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

p21WAF: Cyclin-dependent kinase inhibitor on viral replication and tumor growth

p27Kip1: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B

p53: Tumor protein 53

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDK1: Phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1

PH: Pleckstrin Homology

Phi: Philadelphie

PI3K: Phosphatidylinositol-3 kinase

PIAS: Protein Inhibitor of Activated STAT

Pim-1: Proviral integration site for Moloney murine leukemia virus 1

PTP: Protein Tyrosine Phosphatases

PV : Polyglobulie de Vaquez

R : Asparagine

RUNX1: Runt-related transcription factor 1

S6K: Ribosomal protein S6 kinase beta-1

SAPL: Syndromes des Anti-phospholipides

SF3B1: Splicing Factor 3b subunit 1

SH2: Src Homology-2

SMD : Syndrome Myélodysplasique

SMP : Syndromes myéloprolifératifs

SOCS: Suppressor Of Cytokine Signaling

Src: Sarcoma

SRSF2: Serine/Arginine-Rich Splicing factor 2

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

t(9;22): translocation entre le chromosome 9 et 22

TE : Thrombocytémie Essentielle

TET2: Ten Eleven Translocation member 2

TPO: Thrombopoiétine

Tyk2: Tyrosine kinase 2

U2AF1: U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

V617F : substitution de la Valine à la Phénylalanine dans la position 617

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

W : Tryptophane

RESUME.....	
LISTE DES TABLEAUX.....	
LISTE DES FIGURES.....	
LISTE DES ABREVIATIONS.....	
GLOSSAIRE.....	
INTRODUCTION.....	1
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Généralités sur les Néoplasmes Myéloprolifératifs	3
I. 1. Leucémie Myéloïde Chronique	4
I. 2. Polyglobulie de Vaquez	5
I. 3. Thrombocytémie Essentielle.....	6
I. 4. Myélofibrose Primitive	6
I. 5. Anomalies moléculaires des néoplasies myéloprolifératives	6
II. Janus kinase et néoplasme myéloprolifératif	7
II. 1 Structure et fonction des janus kinase	7
II. 2. Voie de signalisation JAK/STAT.....	9
II. 2. 1. Voie JAK/STAT canonique.....	9
II. 2. 2. Voies JAK/STAT non canoniques	10
II. 3. Régulation de la voie JAK/STAT	12
II. 4. Mutation JAK2 V617F et néoplasmes myéloprolifératifs	13
III. Autres altérations génétiques dans les néoplasies myéloprolifératives	16
III. 1. Mutations du gène MPL.....	17
III. 2. Mutation du gène CALR.....	17

MATERIELS ET METHODES.....	
I. MATÉRIEL.....	19
I.1 Recrutement des Patients.....	19
I.2 Recueil des données	19
I.3 Prélèvement des Patients	20
I.4 Paramètres biologiques demandés non réalisés par le laboratoire	20
II. METHODES	20
II.1 Extraction de l'ADN	20
II.1.1 Principe.....	20
II.1.2 Mode opératoire	20
II.2 Dosage de l'ADN	22
II.2.1 Principe.....	22
II.2.2 Mode opératoire	22
II.3 PCR en temps réel – TAQMAN	23
II.3.1 Principe.....	23
II.3.2 Mode opératoire	25
II.3.2.1 Préparation du mélange réactionnel.....	25
II.3.2.2 Amplification	25
II.3.2.3 Interprétation des résultats.....	25
RESULTATS ET DISCUSSION	
I.RESULTATS.....	27
I. 1.Caractéristiques de la cohorte	27
I. 1.1 Répartition des patients selon le sexe et l'âge	27

I.1.2. Répartition des patients selon leur origine géographique	30
I. 1.3. Répartition selon les signes cliniques, biologiques et anatomopathologiques	32
I.2 . Etude de la mutation JAK2 V617F	37
I.2.1 Répartition de la population JAK2V617F positive par origine géographique.....	39
I.2.2. Etudes comparative des caractéristiques épidémiologiques et cliniques entre patients JAK2 V617F positifs et négatifs	39
I.2.3. Etudes comparative des caractéristiques biologiques et anatomopathologique entre patients JAK2 V617F positifs et négatifs	40
II. DISCUSSION.....	49
II.1 Analyse des caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée	49
II.1.1 Répartition selon leur origine géographique	49
II.1.2 Répartition selon le sexe	50
II.1.3 Répartition selon les tranches d'âge	50
II.2 Analyse des caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée	51
II.2.1 Répartition des patients selon les signes cliniques.....	51
II.2.2 Répartition des patients selon les signes biologiques.....	52
II.3 Analyse de la fréquence de la mutation JAK2 V617F dans la population étudiée et par type de NMP	53
II.4 Analyse de la population positive pour la mutation JAK2V617F	54
II.4.1 Répartition de la population JAK2 V617F positive par origine géographique.....	54
II.4.2 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon le sexe.....	55
II.4.3 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon la tranche d'âge.....	55
II.4.4 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon les signes cliniques.....	55

Table des Matières

II.4.5 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon les signes biologiques.....	56
II.5 Répartition de la population négative pour la mutation selon les signes biologiques.....	57
CONCLUSION	60
Références bibliographiques	62
Annexes.....	

Introduction

Les syndromes myéloprolifératifs ou, comme il convient désormais de les appeler selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des hémopathies acquises, clonales, caractérisées par une prolifération cellulaire excessive des lignées hématopoïétiques myéloïdes (**Mosca et al., 2016**).

La classification des NMP revue en 2016 par l'OMS (**tableau I annexe1**) distingue quatre «Grands» syndromes incluant : la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), et la myélofibrose primaire (MFP), auxquels s'ajoutent la myélofibrose préfibrotique (pré-MF), et des entités plus rares (**Mosca et al., 2016**).

La LMC est constamment associée à une anomalie chromosomique, le « chromosome Philadelphie », générant la fusion *BCR-ABL1*. La polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle, la myélofibrose primitive et la myélofibrose préfibrotique forment un groupe distinct des LMC. Ils sont appelés NMP classiques pour « BCR-ABL1 négatif » ou « Philadelphie négatif » (**Mosca et al., 2016**).

Les NMP sont la conséquence d'une mutation acquise dans une cellule souche hématopoïétique responsable d'un avantage prolifératif, entraînant une hyperplasie clonale d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Les mutations causales conduisent à une activation constitutive des voies de signalisation de certains récepteurs aux cytokines (principalement l'érythropoïétine, la thrombopoïétine et le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)), et donc à une hypersensibilité voire une indépendance à ces dernières (**Mosca et al., 2016**).

La mutation *JAK2V617F* est l'anomalie moléculaire la plus fréquemment retrouvée dans les NMP : elle est retrouvée dans 95 % des PV et 50 à 60 % des TE et MFP. Les autres mutations mises en évidence touchent le gène *CALR* (25 à 35 % des TE et MFP), *MPL* (5 à 10 % des TE et MFP) ou l'exon 12 de *JAK2* (2 % des PV). Les mutations de *JAK2*, *MPL* et *CALR* sont généralement mutuellement exclusives (**Mosca et al., 2016**).

Dans le cadre du projet de fin d'études, il nous a été proposé de réaliser une étude rétrospective et prospective sur la mutation *JAK2 V617F* et le syndrome myéloprolifératifs, au service d'Immunologie du CHU Beni Messous. Nous avons pour objectifs de :

- Établir la prévalence de cette mutation dans les différentes NMP classiques, décrite comme étant mise en cause dans la plupart des NMP classiques
- Rechercher une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques et biologiques.

La survenue de la pandémie au SARS-Cov2 et l'expansion de la COVID-19, avec le confinement qui s'en est suivi, a contraint les structures sanitaires, dont le CHU Beni Messous, à annuler les stages des étudiants en biologie. Nous nous sommes, donc, limités à faire une étude rétrospective en analysant les données épidémiologiques, cliniques et moléculaires de patients ayant le néoplasme myéloprolifératif durant la période 2016-2019.

Rappels
Bibliographiques

I. Généralités sur les Néoplasmes Myéloprolifératifs

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines du sang périphérique: les globules rouges ou hématies, les différentes familles de globules blancs ou leucocytes et les plaquettes. Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée: la Cellule Souche Hématopoïétique (CSH). Cette cellule a deux propriétés essentielles: l'auto-renouvellement et le pouvoir de différenciation (**Figure 1**) (**Hanahan et Weinberg, 2000**).

L'hématopoïèse doit être contrôlée très finement afin de maintenir, en dépit des variations de consommation importantes liées à des circonstances pathologiques, comme une hémorragie. Cette régulation repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux (facteurs de croissance) qui peuvent être stimulateurs ou inhibiteurs de l'hématopoïèse. La dérégulation de l'homéostasie hématopoïétique peut être à l'origine des hémopathies malignes. Ce dysfonctionnement peut être consécutif à une expression inadaptée ou à des altérations structurales de certains gènes suite à des mutations ponctuelles ou à des anomalies de structures telles que les translocations chromosomique (**Najmi, 2015**).

Les néoplasmes myéloprolifératifs ou « NMP » sont des maladies chroniques caractérisées par une prolifération clonale des cellules myéloïdes avec une conservation de leur capacité de différenciation. L'anomalie moléculaire somatique à l'origine des NMP touche une cellule souche myéloïde avec des conséquences plus ou moins spécifiques sur les lignées érythroïdes (Polyglobulie de Vaquez) et mégacaryocytaires (Thrombocytémie Essentielle). Les NMP peuvent, au cours de leur évolution naturelle, se transformer en Leucémie Aigue avec arrêt de la différenciation cellulaire (**Chomel et al., 2009**).

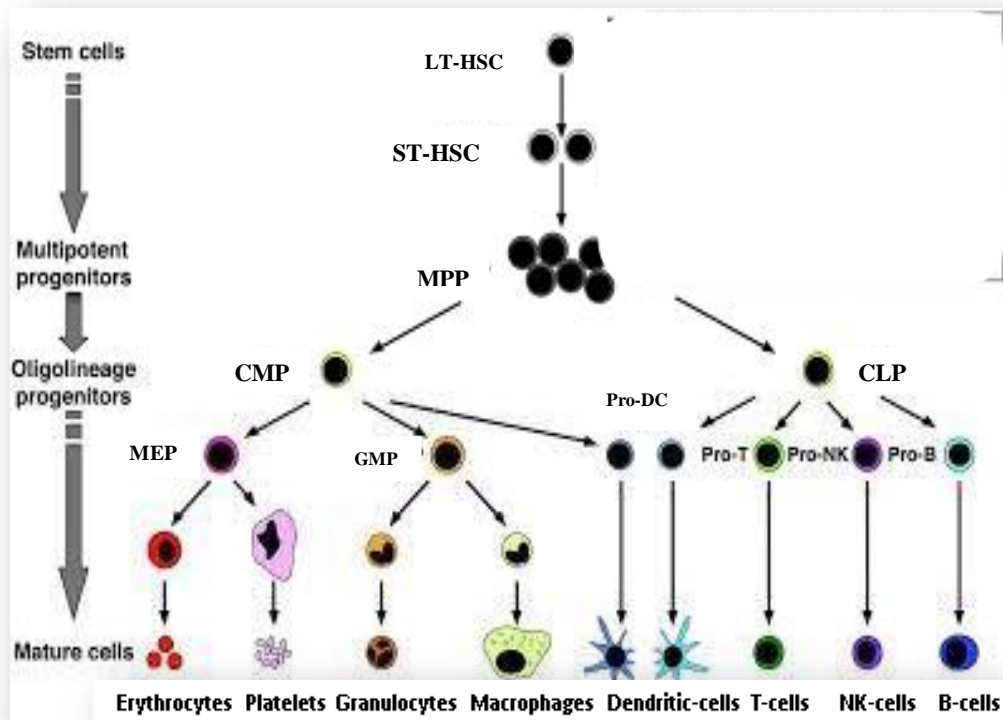


Figure 1 : Schéma du système hématopoïétique d'après (Passegue, Jamieson et al. 2003).

(LT-HSC : CSH long-terme ; ST-HSC : CSH court-terme ; MPP : progéniteur multipotent ; CLP : progéniteur lymphoïde commun ; CMP : progéniteur myéloïde commun ; MEP ; progéniteurs des mégacaryocytes et érythrocytes ; GMP : progéniteurs des granulocytes et monocytes,

I. 1. Leucémie Myéloïde Chronique

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est une prolifération myéloïde monoclonale sans blocage de la maturation prédominant sur la lignée granuleuse au niveau médullaire et splénique. Elle évolue, en l'absence de traitement, en trois phases: une phase chronique d'une durée de trois à quatre ans, une phase d'accélération d'une dizaine de mois et enfin une phase de transformation en Leucémie Aïgue (ou phase blastique) de survenue inéluctable et fatale. La LMC possède une anomalie chromosomique acquise très caractéristique: la translocation $t(9;22)(q34;q11)$ (Mahon, 2001).

Les remaniements entre les gènes *BCR* (Breakpoint Cluster Region), sur chromosome 22 et *ABL1* (Abelson tyrosine kinase), sur le chromosome 9, ont pour conséquence la formation du gène chimérique *BCR-ABL* sur le chromosome 22q- (chromosome Philadelphie ou Ph) et du gène réciproque *ABL-BCR* sur le chromosome 9 q+ (Figure 2). Il est admis que ces événements

moléculaires ont lieu au sein de la cellule souche hématopoïétique pluripotente (Lukasova et al., 1997).

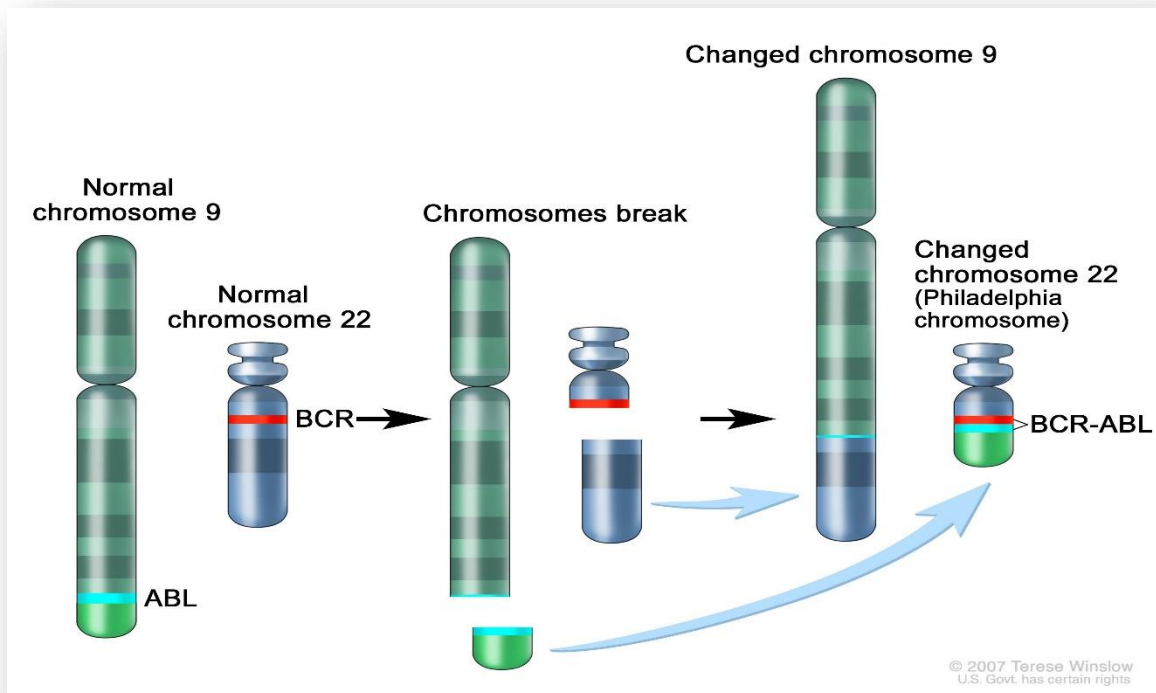


Figure 2 : La translocation t (9;22) (q34;q11) (Poopak et al., 2015).

I. 2. Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez « PV » (ou Polyglobulie Primitive ou Maladie de Vaquez), est une affection rare décrite par Louis Vaquez en 1892. Il s'agit d'une hémopathie maligne clonale qui appartient à la catégorie des NMP chroniques, conséquence de l'atteinte de la cellule souche hématopoïétique multipotente devenue hypersensible à l'érythropoïétine secondairement à la mutation du gène d'une protéine de la transduction du signal: Janus Kinase 2. Il en résulte une hyperplasie des trois lignées myéloïdes prédominant sur la lignée érythroblastique avec une augmentation du nombre absolu des hématies ou polycythémie, de l'hématocrite et du volume sanguin total (Godon et al., 2002).

Des travaux ont permis de proposer que la mutation JAK2 V617F soit l'évènement moléculaire primaire et suffisant pour entraîner le développement d'une Polyglobulie Primitive surtout après l'âge de 50 ans avec une prédominance masculine-(Belakehal et al., 2014).

I. 3. Thrombocytémie Essentielle

La Thrombocytémie Essentielle ou « TE » a été décrite pour la première fois en 1934 et a été intégrée en 1951 dans le groupe des Syndromes Myéloprolifératifs. C'est une anomalie clonale de la souche hématopoïétique dont le phénotype est marqué par une hyperplaquetose parfois associée à une hyperleucocytose en règle modérée, voire à une discrète anémie (**Cortelazzo et al., 1990**).

Un pic de fréquence est observé vers 30 ans avec une prépondérance féminine. Elle est asymptomatique dans environ la moitié des cas; chez l'autre moitié, elle peut se révéler par différents symptômes, plus ou moins sévères, comme une thrombose (obstruction partielle ou totale du flux sanguin par un caillot) entraînant une phlébite au niveau d'une jambe, un accident cardiaque ou une neurologique. L'érythmélalgie (des rougeurs et des sensations de brûlures au niveau des extrémités) est l'un des symptômes les plus révélateurs de la maladie (**Cahn et al., 2009**). En Algérie, une étude rétrospective, coopérative et multicentrique sur une période de dix ans (Janvier 1996 à Décembre 2005), a montré qu'il y a une incidence moyenne de 15 cas / an (**Djouadi, 2009**).

I. 4. Myélofibrose Primitive

La Myélofibrose Primitive ou « MFP » a été décrite pour la fois en 1879 par le médecin Allemand, Gustav Heuck comme un mode évolutif des leucémies avec un tableau associant hépto-splénomégalie, image de sang leucémique et ostéosclérose médullaire. L'étiologie de cette affection reste inconnue et sa physiopathologie mal comprise, probablement en partie du fait de sa complexité. Sa faible incidence, l'absence de traitement curatif ou entraînant une rémission complète expliquent le relatif désintérêt des hématologues pour cette pathologie chronique (**Dupriez et al., 2001**).

Elle est très rare avec l'âge médian au diagnostic entre 60 et 65 ans, une prédominance masculine. Elle est asymptomatique au début mais son évolution est accompagnée de différents symptômes, tels que la fièvre, l'amaigrissement, les sueurs nocturnes, la fatigue et les douleurs osseuses. De plus, des troubles liés à la splénomégalie peuvent aussi apparaître, en particulier les troubles digestifs (**Lachhab, 2012**).

I. 5. Anomalies moléculaires des néoplasies myéloprolifératives

La myéloprolifération est contrôlée par les voies de signalisation mettant en jeu certaines cytokines et leurs récepteurs. Ainsi, il y a une prolifération érythroïde, mégacaryocytaire et

granuleuse, *via* l'activation des voies de signalisation dont la voie JAK2/STAT, et ce, respectivement, après activation des récepteurs homodimériques de type 1 de l'érythropoïétine (EPOR), la thrombopoïétine (MPL) et le G-CSF (G-CSFR). Les NMP sont dus à des mutations affectant cette voie et touchant trois gènes majeurs : *JAK2*, *MPL* et *CALR* (**Vainchenker et Kralovics, 2017**).

Ce sont des mutations acquises de type gain de fonction permettant une prolifération accrue *via* une indépendance aux cytokines et une activation constitutive des voies de signalisation. JAK2V617F est la mutation la plus récurrente retrouvée dans plus de 95% des PV et environ 50% des TE et MFP. Dans la PV, d'autres mutations de JAK2 appelés exon 12 ont été identifiées (**Plo, 2008**).

II. Janus kinase et néoplasme myéloprolifératif

La compréhension des mécanismes physiopathologiques des NMP classiques « non-Phi » (c'est-à-dire non porteurs du chromosome Philadelphie) a connu une grande avancée en 2005, lorsque la mutation V617F de la tyrosine kinase JAK2 a été découverte par quatre équipes indépendantes menées par Gary Gilliland, William Vainchenker, Radek Skoda et Anthony Green (**Guillemette, 2018**).

II. 1 Structure et fonction des janus kinase

Les protéines JAK (pour Janus Kinase) sont des molécules de signalisation intracellulaire non réceptrices, impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables notamment de la survie et de la prolifération cellulaire (**Schindler et al, 2002**). Elles font environ 1150 acides aminés, avec des masses moléculaires de 120 à 130 kD (**Leonard et O'Shea, 1998**). La famille des Janus kinases contient 4 membres distincts, soit JAK1, JAK2 et Tyk2, exprimés de façon ubiquitaire, ainsi que JAK3, exprimé principalement au niveau des cellules du système immunitaire (**O'Shea et al., 2002**).

Les JAKs possèdent 7 domaines d'homologie appelés JH pour (JAK Homology domain). La partie N-terminale des JAKs est composée des domaines JH7 à JH3, contient le domaine FERM (band 4.1 erzin, radixin and moesin) ainsi qu'un domaine SH2 (Src-homology-2 domain)-like, permettant l'association de la kinase à la région sub-membranaire des récepteurs aux cytokines. La partie Carboxy-terminale des JAKs contient les domaines kinase et pseudokinase nommés respectivement JH1 et JH2 (**Figure 3**) (**Sanz et al., 2011**).

La fonction la plus connue des JAKs est la transduction du signal des récepteurs aux

cytokines de type I et II. On note une différence d'activation des JAKs en fonction des cytokines concernées (Nadjmi, 2015). Ainsi, JAK2 va être activée par l'Erythropoïétine (EPO), la thrombopoïétine (TPO), le GM-CSF ou encore l'IL-3 alors que, JAK1 va être activée par l'IL-2 ou l'IL-15, bien qu'ils transduisent tous deux la signalisation d'autres cytokines comme l'IFN α ou l'IFN β (Nadjmi, 2015).

Les récepteurs aux cytokines ont des préférences propres pour les kinases JAK. Les récepteurs homodimériques utilisent presque exclusivement JAK2. Il en est même des récepteurs possédant la sous-unité βc . JAK3 est activé uniquement par les récepteurs possédant la sous-unité γc . Les récepteurs possédant la sous-unité gp130, et les récepteurs aux cytokines de type II utilisent JAK1, JAK2 et Tyk2 dans des combinaisons variées (Figure 4) (Vainchenker et al., 2008).

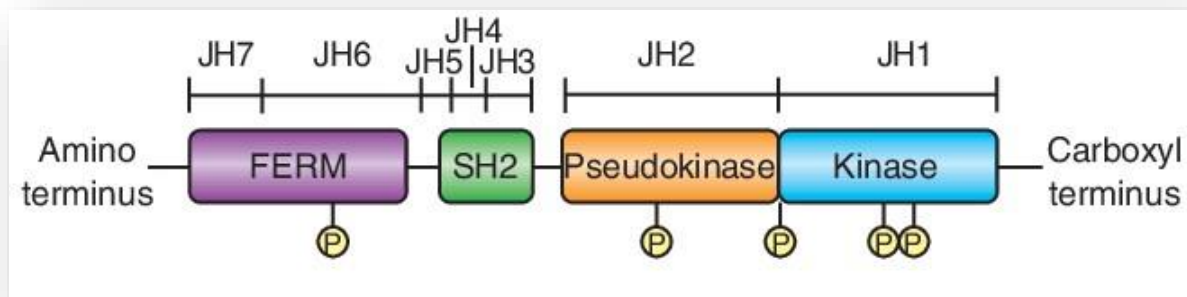


Figure 3 : Structure des Janus Kinases (Emilie-Fleur et al ;2011).

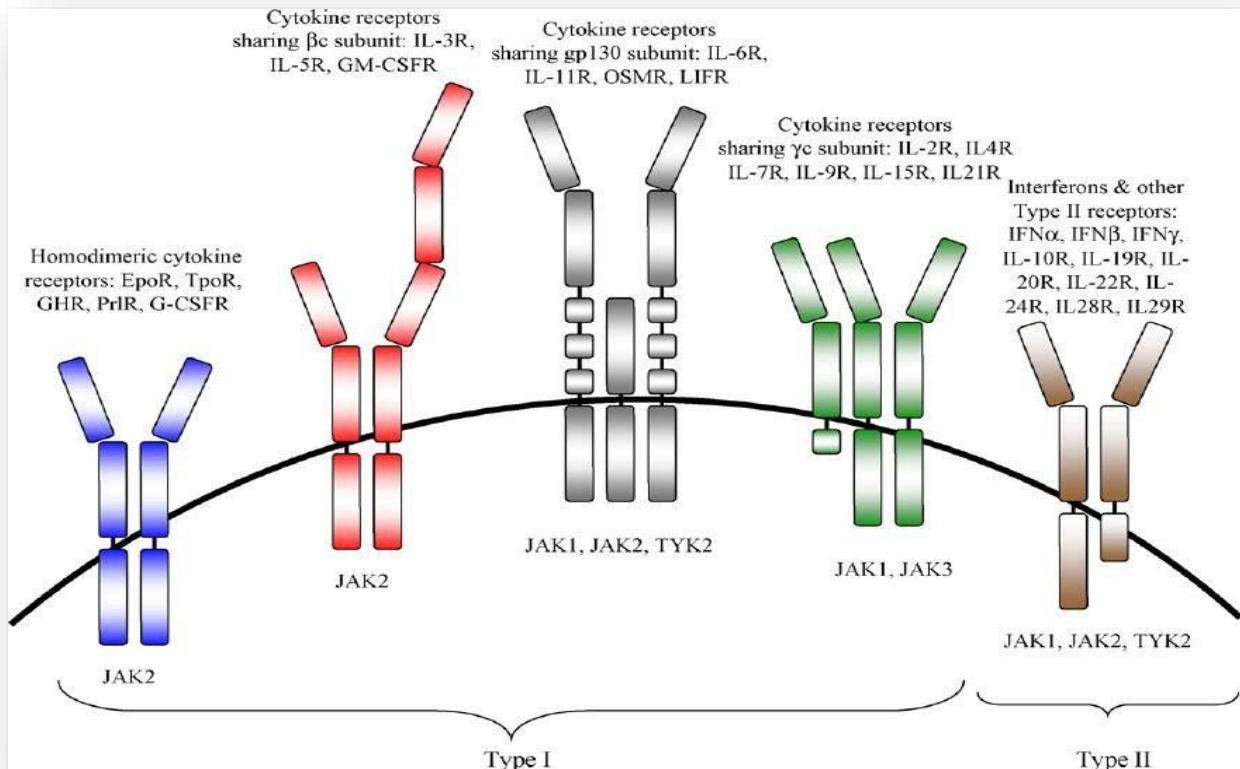


Figure 4 : Implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines (Vainchenker *et al.*, 2008).

II. 2. Voie de signalisation JAK/STAT

La voie de signalisation JAK / STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) est importante pour plusieurs réponses de l'hôte incluant la réponse aux agents pathogènes, la différenciation, la prolifération et l'oncogénèse (Boyer *et al.*, 2004). Les protéines STATs sont des facteurs de transcription. Chez les mammifères il existe sept gènes différents qui sont à l'origine des sept membres de la famille STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 ET possèdent tous un résidu tyrosine conservé. Pour un type cellulaire donné, les cytokines induisent des réponses spécifiques *via* la voie JAK/STAT. Cette précision est essentiellement assurée par la spécificité des récepteurs membranaires et la combinatoire des protéines JAKs et des protéines STATs activées. Il existe la voie canonique et la voie non canonique.

II. 2. 1. Voie JAK/STAT canonique

Les kinases JAKs associées au récepteur se trans-phosphorylent et phosphorylent ensuite des résidus tyrosine spécifiques du domaine intracytoplasmique des chaînes du récepteur. Des sites

d'ancrage (docking domains) qui permettent le recrutement d'autres protéines de signalisation contenant des domaines SH2 sont ainsi créés. Les facteurs de transcription de la famille STATs sont recrutés au niveau du récepteur activé. Ils sont à leur tour phosphorylés par les JAKs. Ils quittent ensuite le récepteur pour former des dimères (homo- ou hétérodimères) dans le cytoplasme et transloquer dans le noyau où ils vont réguler l'expression de gènes cible et favoriser leur transcription (Ihle et al.,1997 ; Rawlings et al.,2004 ; Li, 2008) (Figures 5) .

On compte, parmi les cibles de STATs, des gènes dont les produits sont impliqués dans la prolifération cellulaire (comme la cycline D1, c-Myc ou encore Pim-1), la survie (comme Bcl-2 ou Bcl-xL), ou encore l'angiogenèse ou les métastases (comme le VEGF). Cependant, bien que STAT5 et STAT3 aient un effet pro-prolifératif et anti-apoptotique, STAT1 aurait un rôle plutôt antagoniste, antiprolifératif et proapoptotique. (Stephanou, et Latchman, 2005).

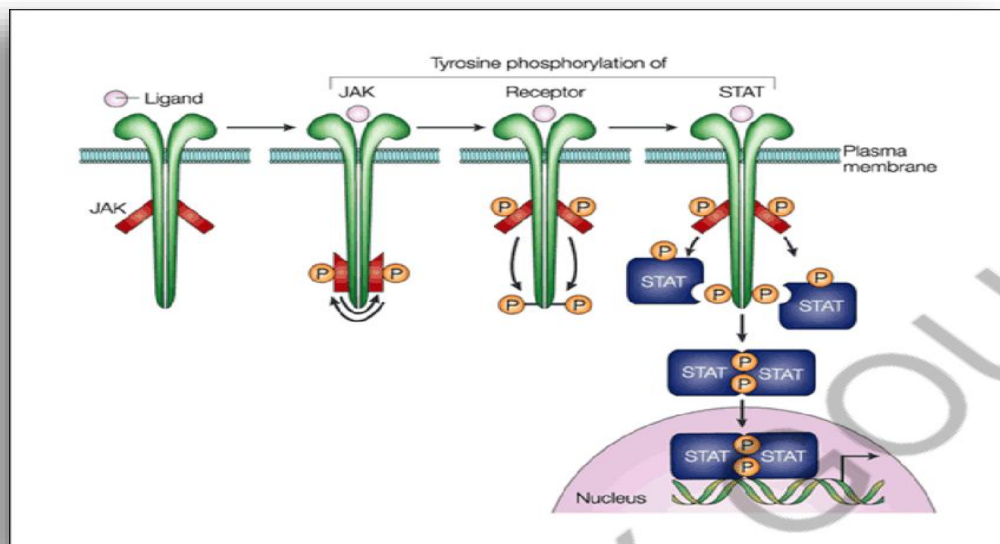


Figure 5 : Activation de la voie de signalisation JAK-STAT (Levy et Darnell, 2002).

II. 2. 2. Voies JAK/STAT non canoniques

➤ Voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est activée par la fixation sur des tyrosines du récepteur phosphorylées par JAK2, soit de la sous-unité p85 de la PI3K elle-même, ou de protéines adaptatrices telle Gab1, Gab2, Cbl, Vav ou IRS-2 (Richmond et al., 2005).

La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PI3,4,5P3). Ce composé permet le recrutement de protéines possédant un domaine PH (Plextrin Homology) au niveau de la membrane plasmique, dont Akt. Akt est ensuite phosphorylée et activée par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dépendent kinase 1) et par le complexe mTORC2 (mTOR complexe 2). AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles impliquées dans la traduction protéique (comme mTOR qui cible 4E-BP1 et S6K), dans la survie cellulaire (comme BAD ou FOXO3A), dans la prolifération (comme p27kip1 ou p21WAF) ou encore le métabolisme (GSK3) (Figure 6) (Gautier, 2011)

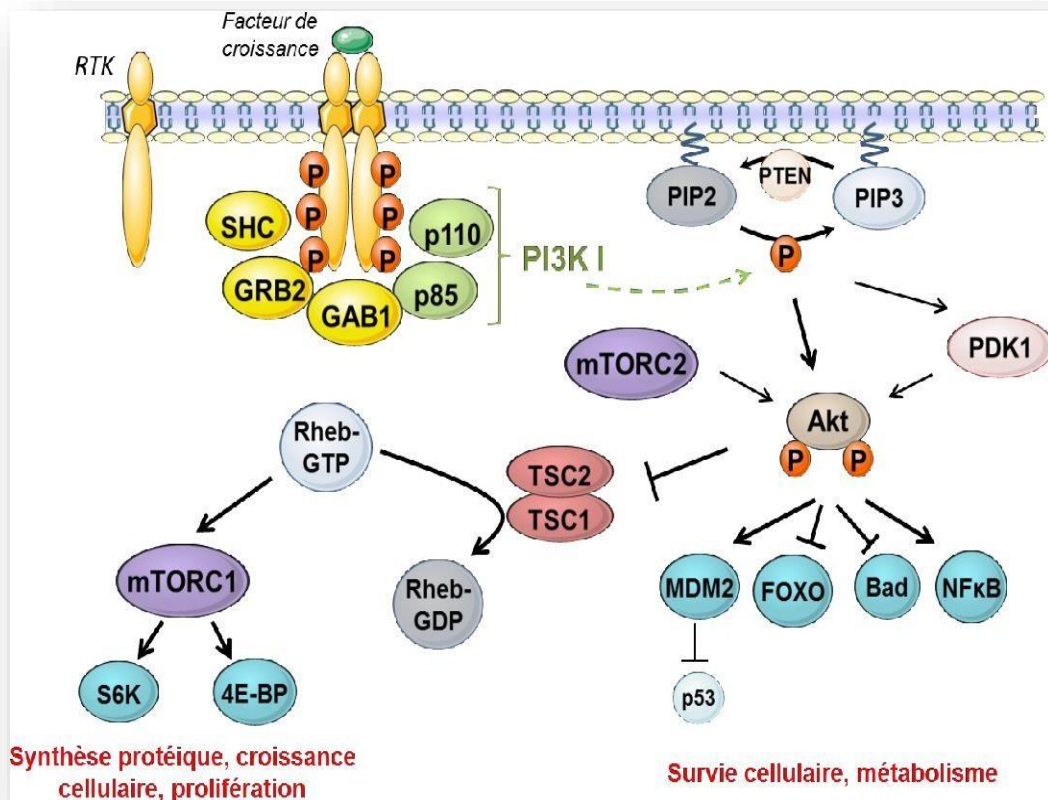


Figure 6 : Voie de signalisation PI3K/mTOR et ses fonctions cellulaires (Benjamin, 2017).

➤ Voie des MAPKs

Trois groupes majeurs de MAPKs activées en aval de JAK2 ont été caractérisés chez les mammifères : ERK1/2, JNKs et p38MAPK. Chaque groupe de MAPK est activé par des cascades de kinases distinctes dans lesquelles une MAP3K (ou MEKK) phosphoryle et

active une MAP2K (ou MEK) qui, à son tour, stimule l'activité de la MAPK. Une fois activée, la MAPK phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie (**Figure 7**) (**Gautier , 2011**).

Les MAPKs possèdent de nombreuses cibles telles que des facteurs de transcription, des régulateurs de la traduction, des protéines du cytosquelette et favorisent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (**Najmi, 2015**).

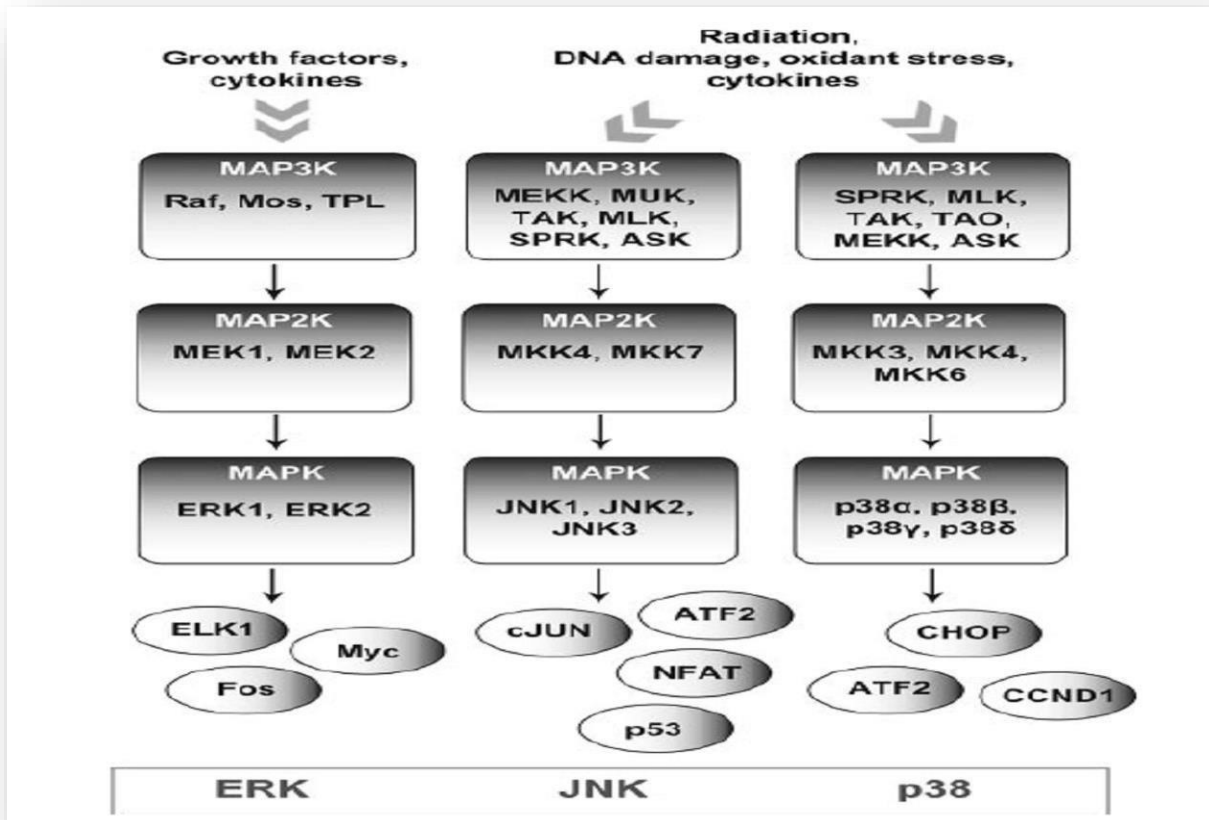


Figure 7 : MAPKs et leur signalisation (Geest and Coffey, 2009).

II. 3. Régulation de la voie JAK/STAT

Plusieurs moyens sont utilisés afin d'obtenir une régulation fine de la voie JAK/STAT. D'une part, les JAKs peuvent être déphosphorylées et d'autre part, elles peuvent être directement dégradées (**O'Shea et al., 2005**). Les trois classes de régulateurs négatifs les plus connues sont :

- les SOCS (suppressor of cytokine signaling),
- les PIAS (« Protein Inhibitor of Activated STAT »)

- les PTP (« Protein Tyrosine Phosphatases») (Najmi, 2015).

Le mode de régulation négative utilisant ces trois systèmes est illustré dans les **figures 1, 2 et 3 en annexe 1**.

II. 4. Mutation *JAK2 V617F* et néoplasmes myéloprolifératifs

Le gène codant la protéine tyrosine kinase JAK2 humaine a été cloné en 1998. Il code pour 1132 acides aminés, avec un poids moléculaire de 131 KDa. Il est situé sur le bras court du chromosome 9 à la position 24 (chromosome 9, région 2, bande 4, sous bande 1). Il est composé de 26 exons (**Figure 8**) (Najmi, 2015).

L'absence de *JAK2* est létale au 10^{ème} jour de développement embryonnaire. La non-viabilité des embryons est due à l'absence d'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal. La réponse à l'IL-3, l'IL-5 et au GM-CSF est également abolie, ce qui démontre le rôle crucial de JAK2 pour la réponse à ces cytokines (Najmi, 2015).

La mutation *JAK2 V617F* est une substitution de la guanosine en position 1849 par la thymidine au niveau de l'exon 14 du gène de JAK2 (**figure 9**). Cette mutation ponctuelle entraîne, au niveau protéique, la substitution de la valine en position 617 par la phénylalanine à l'intérieur du domaine pseudokinase JH2 de JAK2. Cette substitution empêche le domaine pseudokinase de JAK2 d'inhiber son domaine kinase, donc pas de régulation négative de son activité kinase (**figure 10**) (Saharinene et al., 2000 ; Laabyech, 2013).

Au niveau fonctionnel, cette mutation confère à JAK2 une activation constitutive (Najmi, 2015) (**Figures 11**). La mutation V617F est donc une mutation « gain de fonction ». La mutation JAK2 V617F est unique et clonale, elle a été mise en évidence au niveau des différents types cellulaires myéloïdes et notamment au niveau des érythroblastes, des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes (Najmi, 2015).

Des études sur des drosophiles présentant la mutation JAK, située dans le domaine JH2-pseudokinase, ont montré que ces insectes développaient une hyperactivité kinase de la protéine associée à un risque accru de syndromes myéloprolifératifs et de leucémies (Luo et al., 1997 ; Staerk et al., 2005). D'autres travaux fondamentaux ayant pour objectif d'évaluer les conséquences fonctionnel de la mutation JAK2 V617F, ont été réalisés sur des lignées cellulaires (comme BAF3). Ces travaux ont montré que cette mutation conduit à (Laabyech, 2013) :

- l'activation constitutive des voies de signalisation canoniques.
- la dérégulation de la transcription et de la traduction protéique.
- l'altération du rétro-contrôle négatif.
- la régulation croisée du récepteur à l'IGF (Insulin-like Growth Factor).

La présence de la mutation JAK2V617F entraîne une amplification de la myélopoïèse terminale (**Dupont et al., 2007 ; Bruchova et al., 2009 ; Anand et al., 2011**). Par contre, elle ne semble pas influencer sur la proportion de cellules souches ou progénitrices (**Anand et al., 2011**). Ce phénomène d'amplification est la résultante d'une augmentation de survie et de prolifération cellulaire.

La mutation JAK2 V617F a été détectée chez plus de 90 % des patients atteints de PV, mais aussi chez plus de 50 % des patients atteints de TE et chez environ la moitié des patients atteints de MP (**Levine et al., 2011**). Cette mutation a également été mise en évidence dans quelques cas de syndrome myeloprolifératif atypiques, de myélodysplasies, de LMC, de thromboses.

La mutation V617F est une mutation somatique acquise dans le compartiment hématopoïétique. Elle est retrouvée dans les cellules myéloïdes, rarement dans les cellules lymphoïdes et elle est absente des cellules non hématopoïétiques (tumeurs solides) (**Scott et al., 2005**). L'étude de prélèvements issus de patients a montré que cette mutation était présente dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs plus matures (**Jamieson et al., 2006**).

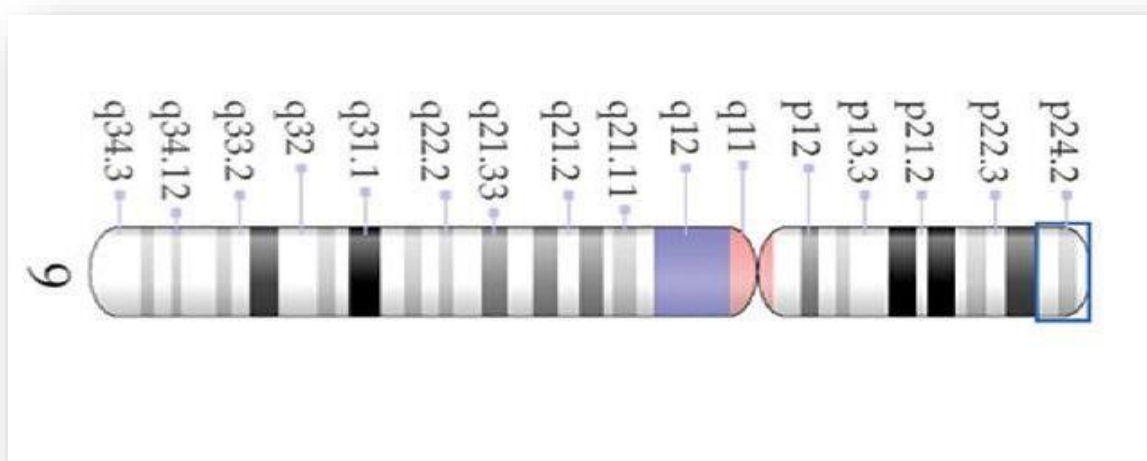


Figure 8 : Localisation du gène *JAK2* sur le chromosome 9p, locus 9p24.1

(**Iakshan et al., 2016**).

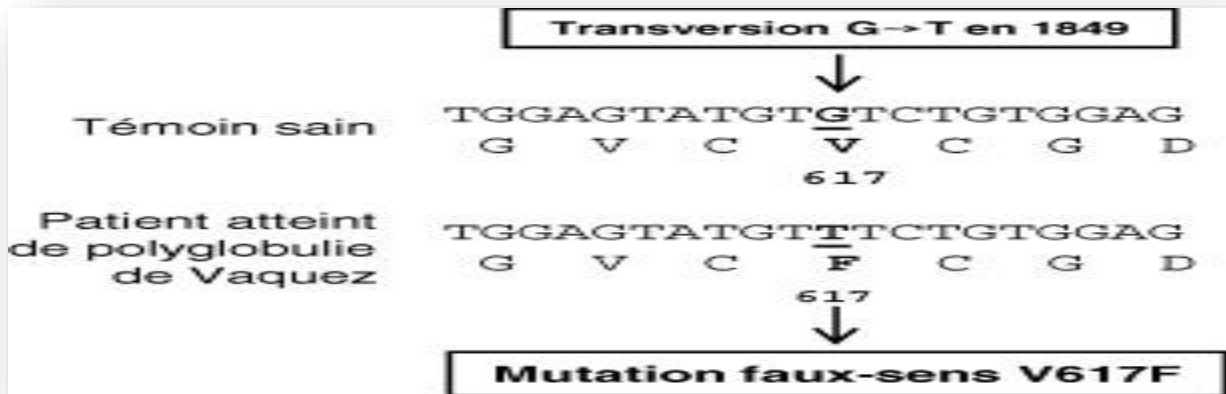


Figure 9 : Séquences nucléotidiques et protéiques caractérisant la mutation V617F (Chomel et al., 2009).

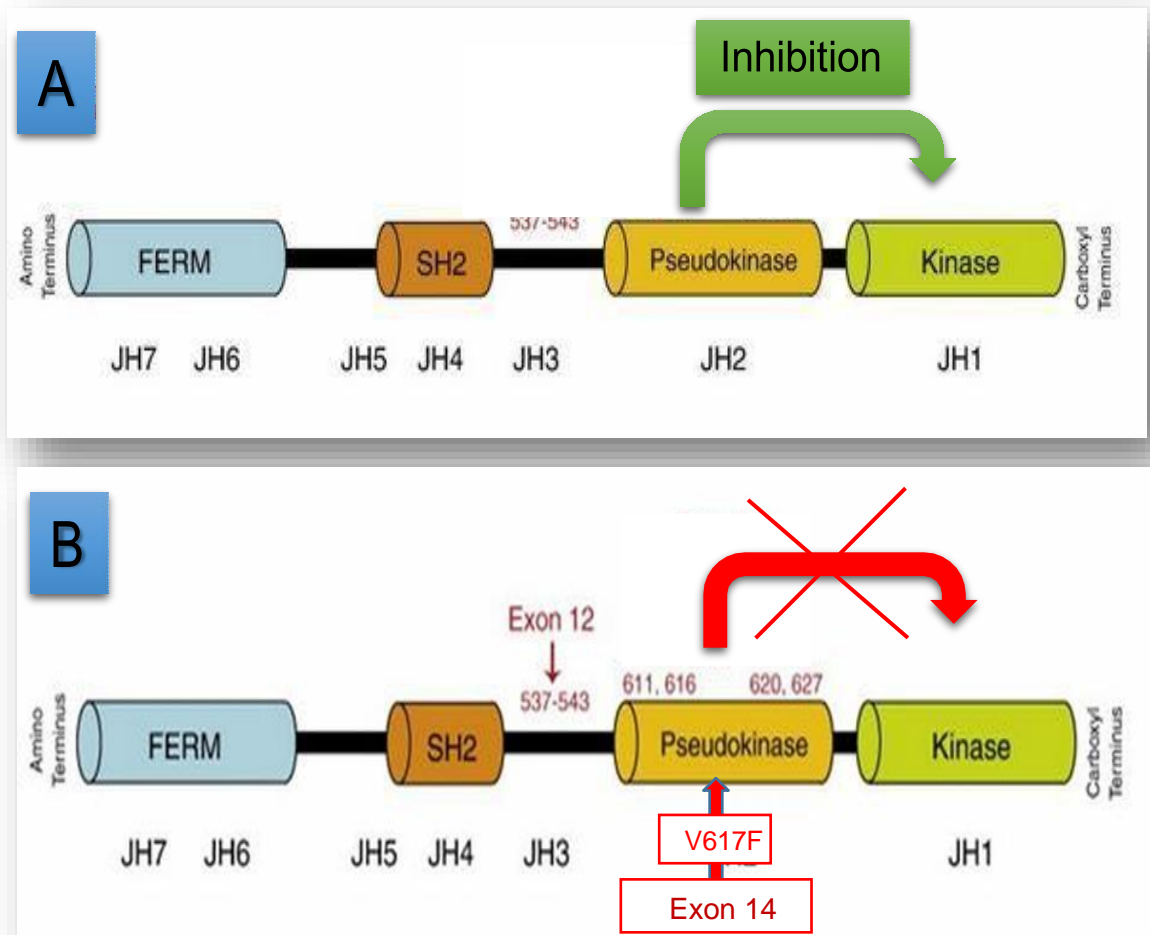


Figure 10 : Structure de la protéine JAK2 sauvage (A) et muté (B) (Najmi,2015 modifié).

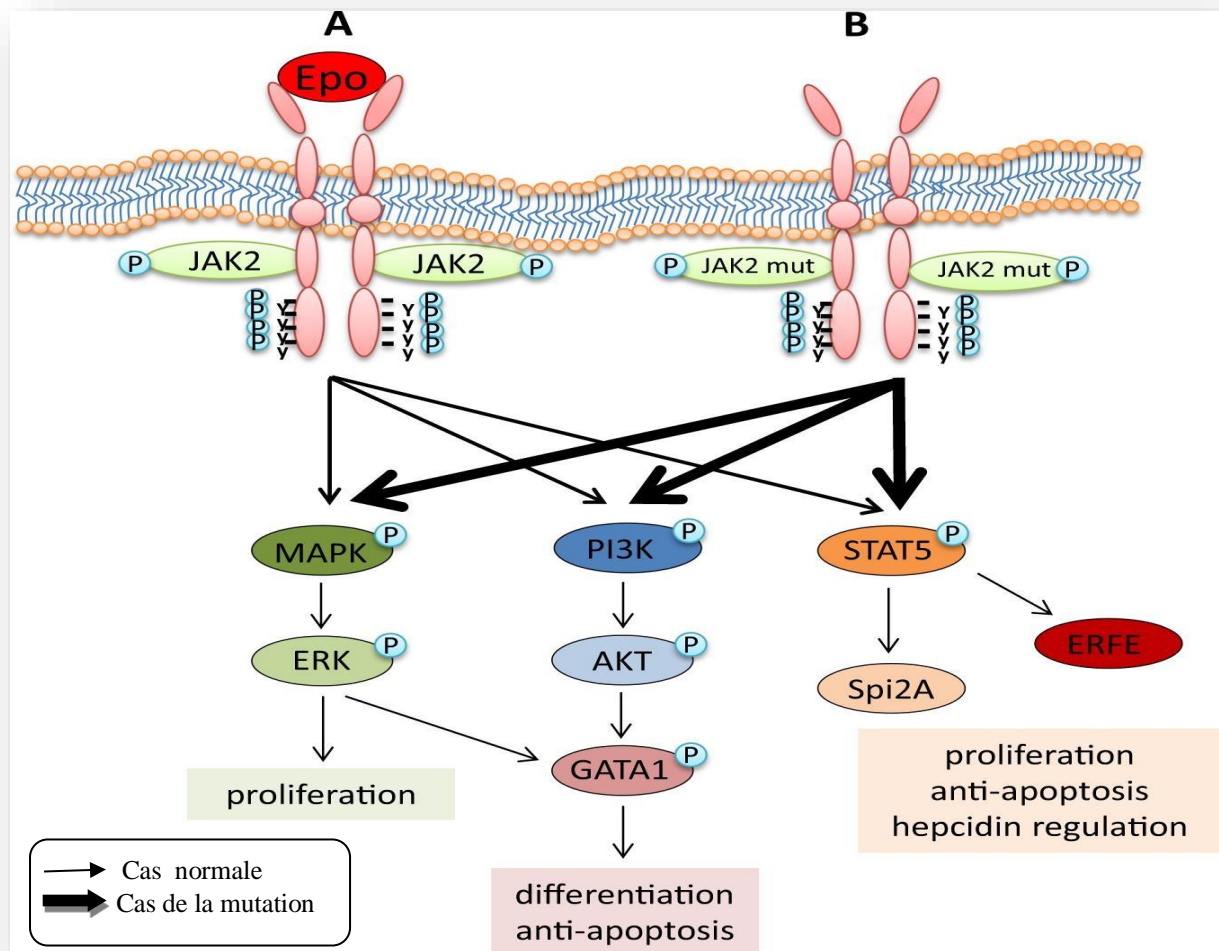


Figure 11 : Activation constitutive des voies de signalisation (Ginzburg et al., 2018).

III. Autres altérations génétiques dans les néoplasies myéloprolifératives

Comme nous l'avons précisé plus haut, les NMP sont dus à des mutations affectant 3 gènes majeurs : JAK2, MPL et la calréticuline (CALR). De plus, l'hétérogénéité de ces maladies est en partie due à d'autres anomalies génétiques acquises surtout dans les MFP. Ce sont des mutations beaucoup moins spécifiques des NMP classiques puisque retrouvées dans d'autres hémopathies malignes. Elles concernent des régulateurs épigénétiques (*TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*), d'épissage (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) ou des facteurs transcriptionnels (*P53*, *RUNX1*, *ETV6*). Elles ne sont pas responsables de la myéloprolifération mais sont des modificateurs de la maladie en coopérant avec les mutations de signalisation (Nadjmi, 2015).

III. 1. Mutations du gène *MPL*

Le produit du gène *MPL* (MyeloProliferative Leukemia) correspond au récepteur de la thrombopoïétine (TPO) et induit une activation constitutive de la voie JAK/STAT. Les mutations de *MPL* touchent approximativement 10% des MFP et 3% des TE, la plupart du temps sans association avec JAK2 V617F. Les TE *MPL*⁺ touchent préférentiellement les femmes âgées, avec un taux plaquettaire élevé et un taux d'hémoglobine bas (Teofili et al., 2010).

Parmi les mutations acquises de l'exon 10, on retrouve majoritairement une substitution du tryptophane (W) en position 515 par la leucine (L) ou la lysine (K) ou l'asparagine (R) ou l'alanine (A). La conformation cytosolique de *MPL* est modifiée et entraîne une activation spontanée du récepteur.

La mutation *MPLS505N* est également décrite dans les thrombocytoses familiales et conduit également à une activation de la voie de signalisation de la tyrosine kinase JAK2 (figure 12).

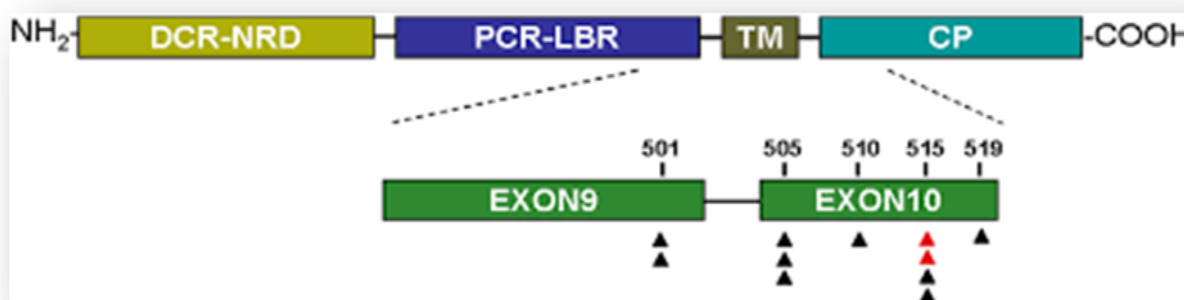


Figure 12 : Représentation du gène *MPL* et de ces mutations (Gong et al.,2013).

III. 2. Mutation du gène *CALR*

Le gène *CALR* code pour la protéine de liaison au réticulum endoplasmique, la calréticuline. C'est une protéine chaperon hautement conservée et participe à divers processus cellulaires. Un total de 36 types d'insertions et des suppressions entraînant un décalage du cadre de lecture ont été détectées dans ce gène (Lamar, 2014).

Les mutations touchant le gène *CALR* sont localisées dans l'exon 9. Ces mutations ont été trouvées dans plus de 50% des TE et des MFP, sans mutation de *JAK2* ou de *MPL*, et au total dans environ 25 à 30 % des patients présentant une TE ou une MFP (Lamar, 2014).

Une délétion de 52 pb (*CARLdel52*) et une insertion de 5 pb (*CARLins5*), sont les plus fréquentes après la mutation *JAK2 V617F*, et sont exclusivement associées aux MFP (figure13 et 14) (Maude et al., 2019).

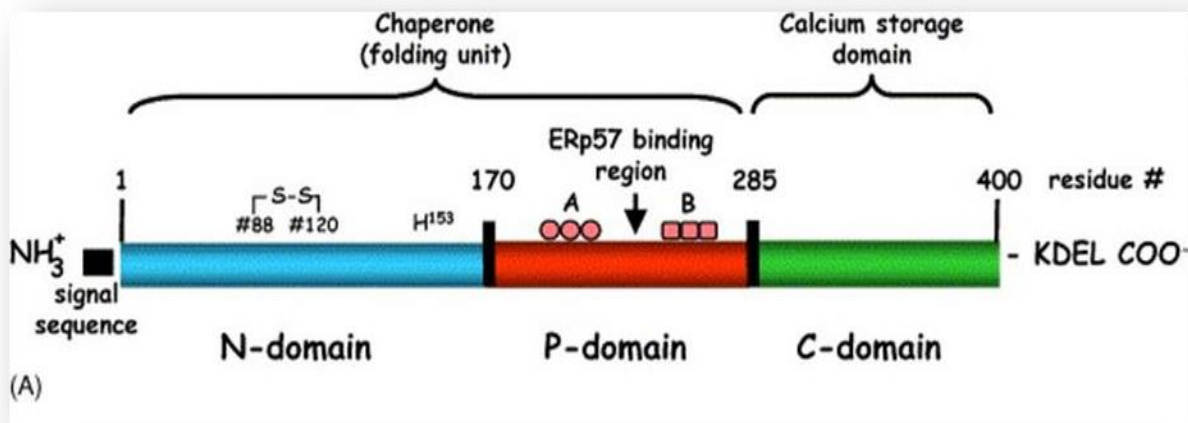


Figure 13 : représentation des domaines de la calréticuline *CALR* (Gelebart et al., 2005).

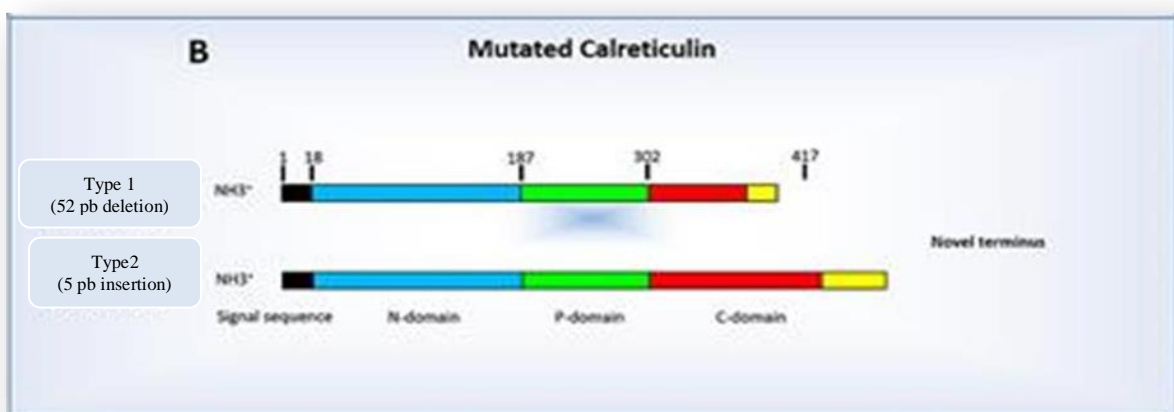


Figure 14 : Mutation type 1 et type 2 du gène *CALR* trouve dans les néoplasmes myéloproliférative (varricchio et al., 2017).

Matériel & Méthodes

Dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master en Génétique, nous avons effectué un stage de courte durée au Service d'Immunologie Médicale du Centre Hospitalo-Universitaire de Béni Messous à Alger, dans l'unité d'Immunogénétique pendant une période s'étalant de Février à Mars 2020.

Nous devons réaliser un travail de recherche sur les néoplasmes myéloprolifératif, incluant une étude rétrospective et prospective. Nous avons pour objectifs de rechercher la mutation JAK2 V617F.

L'étude rétrospective concernait 380 patients (reçus de 2016 à 2019) chez lesquels un NMP classique a été suspecté. La recherche de la mutation JAK2 V617F a été effectuée par PCR en temps réel utilisant la technologie Taqman.

L'objectif principal était d'établir la prévalence de cette mutation dans les différentes NMP classiques et rechercher une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques.

La survenue de la pandémie au SARS-Cov2 et l'expansion de la COVID-19 a profondément touché plusieurs secteurs, notamment l'enseignement supérieur et la recherche scientifiques, dans le monde et en Algérie. Les universités ont dû fermer leurs portes et les stages de fin d'études, dernière étape avant l'entrée sur le marché du travail pour beaucoup d'étudiants, ont été annulés devant la menace, que représente le Sars-cov2 pour la santé publique.

Dans ces circonstances, exacerbées par le confinement, notre travail a pris fin le 15 mars 2020, un mois seulement après le début de notre stage. Nous nous sommes donc limités à une étude rétrospective.

I. MATÉRIEL

I. 1. Recrutement des Patients

Le recrutement des patients a été fait en majorité au niveau de CHU Béni Messous parmi eux, 226 (70%) étaient suivis dans le service d'Hématologie, 47 (12%) dans le service de Médecine Interne, 29 (8%) au service de Gastrologie et les autres 38 (10%) dans différents autres services.

I. 2. Recueil des données

Une fiche de renseignement dument remplie est exigée pour chaque patient (**voir Annexe 2**). Une étude de ces fiches a été réalisée pour tous les patients.

I. 3. Prélèvement des Patients

On prélève deux tubes EDTA (Ethylène Diamine Tétra-Acétique) de sang, pour l'extraction d'ADN par kit ou par sel. Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour une utilisation ultérieure. On mentionne sur les tubes le nom et prénom de chaque patient, le numéro attribué par le laboratoire ainsi que la date du prélèvement. Le sang total est décongelé à température ambiante avant l'extraction d'ADN.

L'anonymat et la confidentialité des informations ont été rigoureusement respectés. Les prélèvements sanguins ont été traités sans que nom ou adresse ne soient transmis. Après analyse, les résultats ont été rendus aux patients concernés.

I. 4. Paramètres biologiques demandés non réalisés par le laboratoire

Un certain nombre de paramètres biologiques sont demandés à l'inclusion comme : la numération formule sanguine (NFS), le myélogramme, le dosage de la LDH, bilan de coagulation (**voir fiche de renseignements en annexe 2**).

II. METHODES

II. 1 Extraction de l'ADN

II. 1. 1. Principe

Nous avons utilisé le kit « Invitrogen » qui permet l'extraction de l'ADN génomique à partir d'un échantillon de sang Total. Les colonnes utilisées sont munies d'une membrane à base de silice avec des propriétés d'adsorption sélective des acides nucléiques lui permettant l'extraction de l'ADN génomique tout en assurant de hauts rendements et une grande pureté.

II. 1. 2. Mode opératoire

Un mélange contenant 200 µl de sang, 20 µl de protéinase K et 20 µl de RNases est déposé dans un tube Eppendorf puis vortexé pendant 15 sec et laissé à température ambiante pendant 2 min.

Pour réaliser une lyse optimale, 200 µl du tampon de lyse (pure link genomic lysis/binding buffer) est ajouté au mélange et l'ensemble est incubé au bain marie pendant 10 min à 55°C. Après incubation, 200 µl d'éthanol (96-100%) sont ajoutés et le tout est vortexé pendant 15 sec.

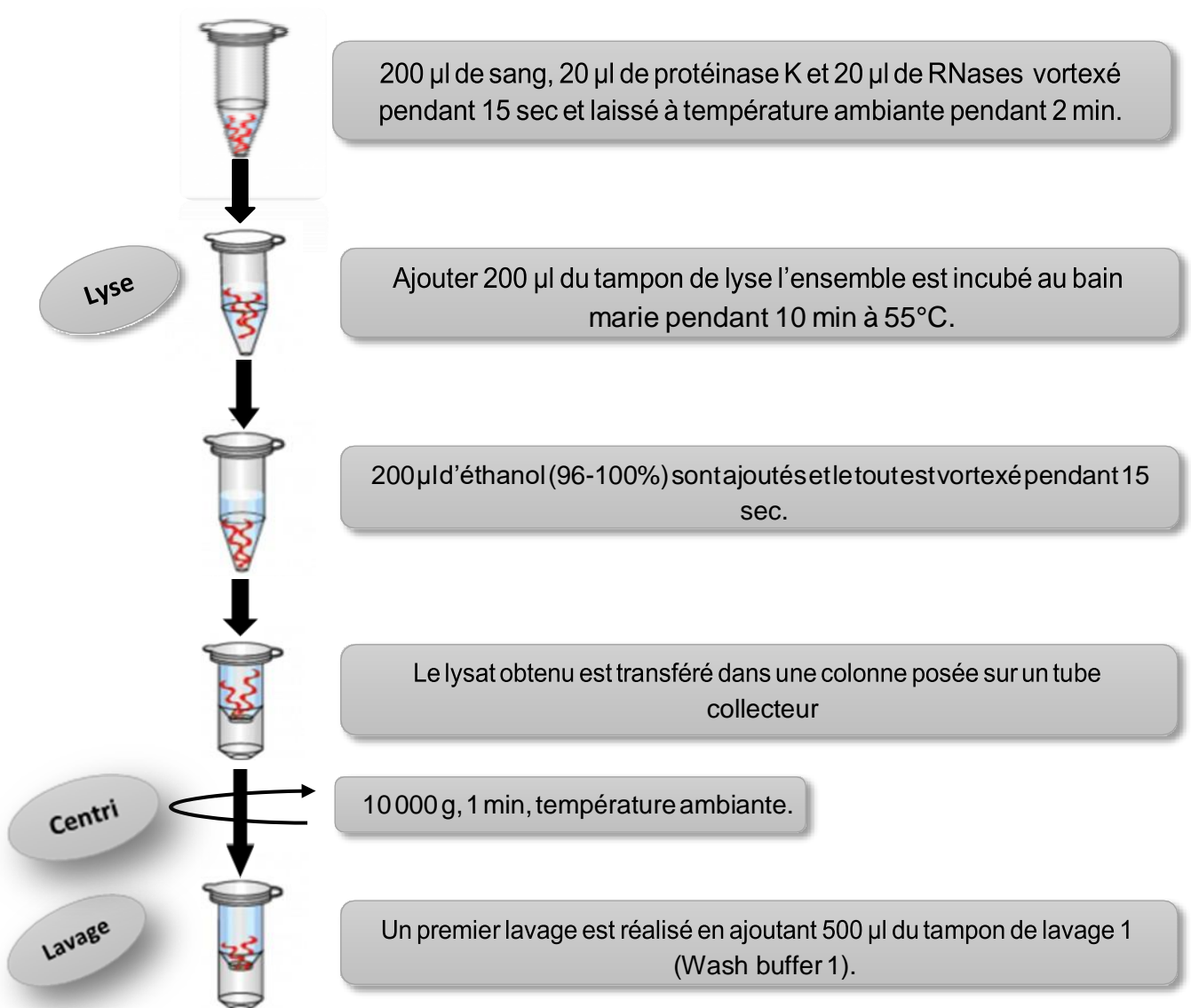
Le lysat obtenu est transféré dans une colonne posée sur un tube collecteur puis centrifugé à 10 000 g pendant 1 min à température ambiante.

Après élimination du tube collecteur, un premier lavage est réalisé en ajoutant 500 μ l du tampon de lavage 1 (Wash buffer 1). Le tube collecteur est à nouveau éliminé après centrifugation à 10 000 g pendant 1 min à température ambiante.

Un deuxième lavage est ensuite effectué en ajoutant 500 μ l du tampon de lavage 2 (Wash buffer 2) suivi d'une centrifugation à 14 000 g pendant 3 min à température ambiante.

Enfin, le tube collecteur est remplacé par un tube Eppendorf et 60 μ l du tampon d'éluion (pure link genomic elution buffer) sont ajoutés.

Après incubation pendant 1 min à température ambiante, l'ADN est élué par centrifugation à 10 000 g pendant 1 min. L'eppendorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne) (**Figure 15**).



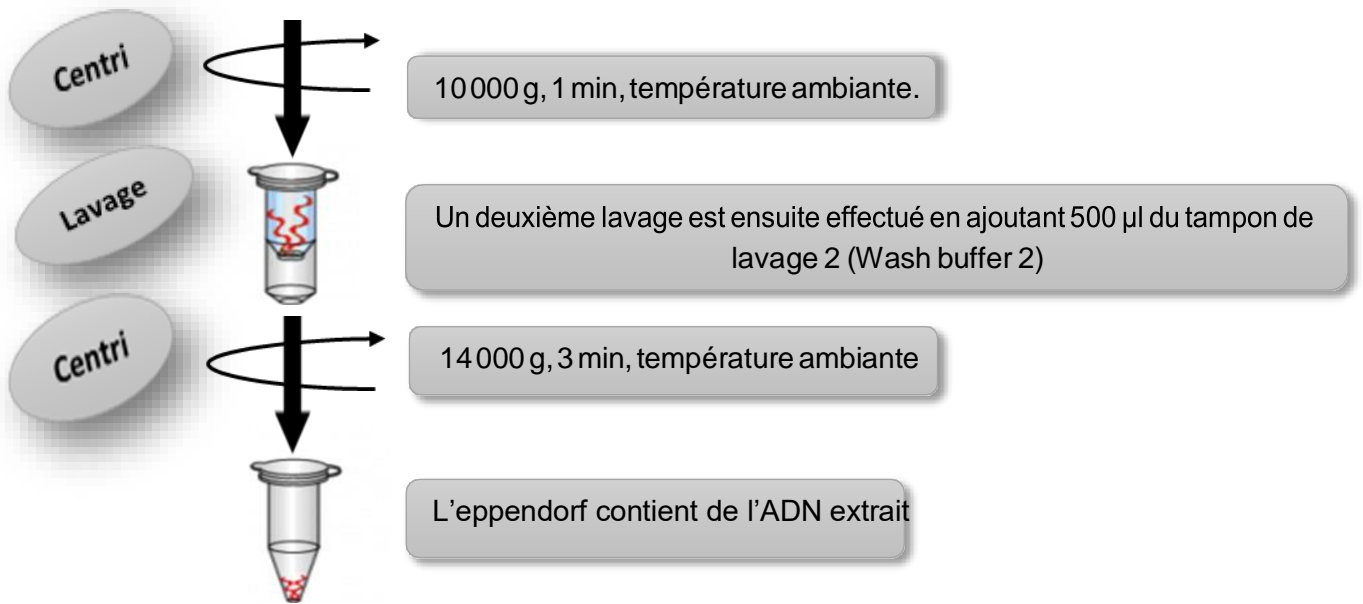


Figure 15 : Mode opératoire de l'extraction de l'ADN sur colonnes chromatographiques Invitrogen® (centri = centrifugation).

II. 2. Dosage de l'ADN

II. 2. 1. Principe

Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement dans l'ultraviolet à 260 nm. L'ADN peut donc être mesuré directement dans des solutions aqueuses en mesurant l'absorption (A) en lumière ultraviolette. Ainsi, la concentration de l'ADN est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon témoin appelé ; blanc. L'interférence par des contaminants se reconnaît par le calcul d'un ratio.

Les protéines absorbent à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio entre 1,8 et 2.

II. 2. 2. Mode opératoire

L'ADN a été dosé par spectrophotométrie « spectrophotomètre Maestro-Nano » (**figure 16 voir annexe 2**). L'estimation de la concentration d'ADN se fait en premier par la lecture de la densité optique (DO) à 260 nm et 280 nm, puis, la DO 260/280 est calculé. L'ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 à 2. Si ce rapport est supérieur ou égale à 2, il y a une contamination par de l'ARN, et si il est inférieur à 1,5, il ya un excès de protéines. Par la suite la concentration de l'ADN est calculée par la formule ci-dessous :

$[ADN] = 50 \times DO\ 260 \times \text{Facteur de dilution}$ (Une unité d'absorbance d'une solution d'ADN à 260nm correspond à une concentration de 50 ng/µl)

Le spectrophotomètre Maestro-Nano mesure des concentrations d'ADN allant de 2 à 2000 ng/μl. Enfin, l'ADN doit avoir une concentration comprise entre 0,5 et 50 ng/μl, et sera conservé à +4°C, ou à -20°C si l'utilisation est différée.

II. 3. PCR en temps réel - TAQMAN

II. 3. 1. Principe

La technologie Taqman ou utilisant les sondes d'hydrolyse, est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase qui hydrolyse une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR.

Un fluorochrome émetteur (reporter) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3'. Lors de la stimulation, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence.

Etant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise **(Poitras et Houde, 2002)**.

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives.

A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée, elle l'hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique.

Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde **(Poitras et Houde, 2002)**.

Cette technique permet la discrimination allélique grâce à l'utilisation de deux amorces sens, dites de diagnostic, correspondant respectivement, aux allèles sauvâge et muté V617F ainsi qu'une amorce commune. L'amplification PCR se produit uniquement lorsque les amorces et la cible sont complémentaires à 100% ; dans le cas contraire, l'amplification ne peut se réaliser. Par ailleurs, la surveillance en temps réel de l'accumulation du produit de PCR au cours de

l'amplification peut être utile en tant que méthode semi-quantitative de la détection de la mutation JAK2V617F (Marras *et al.*, 2002; Sherrill *et al.*, 2004) (Figures 17 et 18).

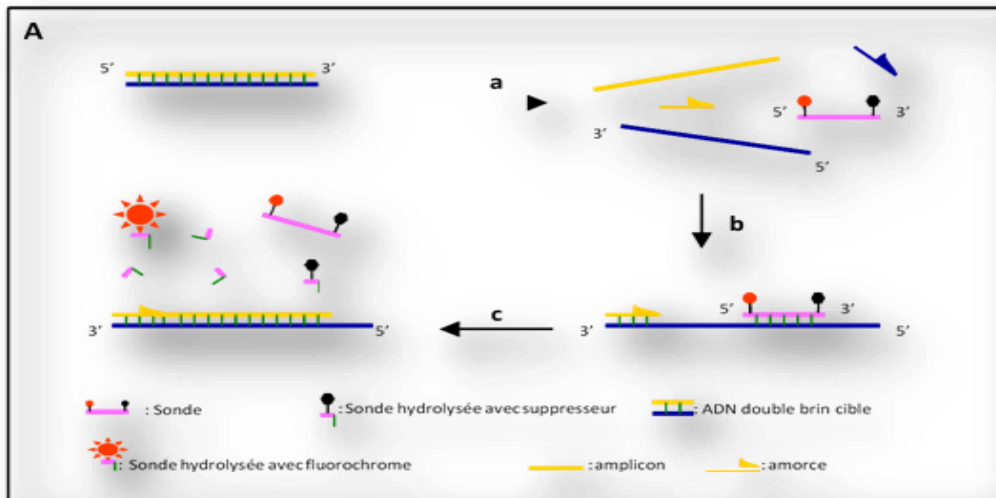


Figure 17 : Hydrolyse des sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'hybridation, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase se déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur ou quencher permettant ainsi l'émission de la fluorescence (Poitras et Houde, 2002).

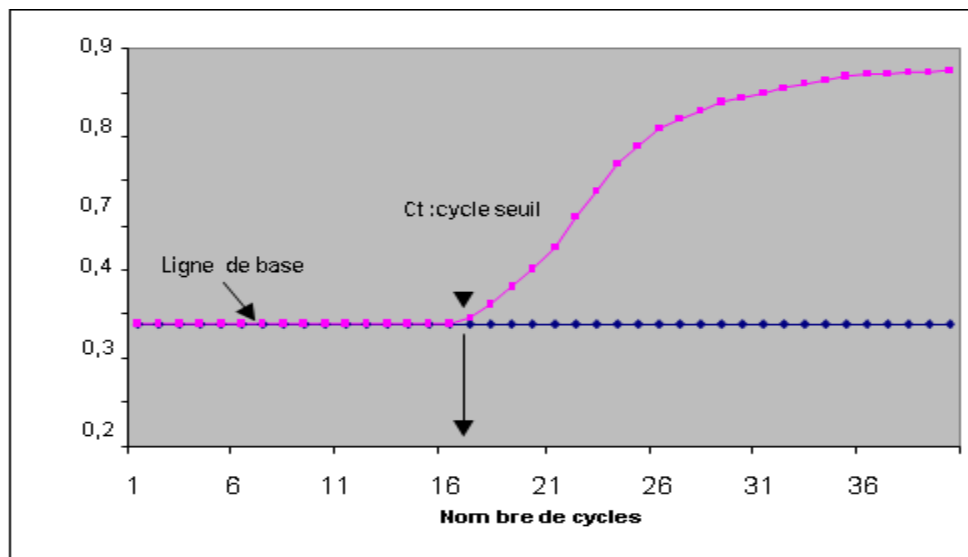


Figure 18 : - Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (Poitras et Houde, 2002).

II. 3. 2. Mode opératoire

II. 3. 2. 1. Préparation du mélange réactionnel

Pour chaque échantillon, deux mélanges réactionnelles doivent être préparés, qui diffèrent par la nature de la sonde (de référence ou mutée). Chaque mélange doit contenir (pour un échantillon) : 10 µl du mélange de master mix (contient : ADN polymerase, dNTPs et MgCl₂), 7 µl d'eau distillée stérile et 2 µl de sondes. Nous déposons ensuite 19 µl du mélange dans chaque puits (pour chaque échantillon : un puits pour la détection du gène sauvage et un puits pour la détection de la mutation). Nous déposons ensuite 2 µl de l'échantillon d'ADN dans les deux puits correspondants, tout en veillant à bien mélanger en pipetant 2 à 3 fois. Enfin, la plaque d'amplification doit être recouverte par un film adhésif pour éviter tout risque d'évaporation pendant l'amplification (**Figure 19 voire annexe 2**).

II. 3. 2. 2. Amplification

La plaque d'amplification est placée dans un thermocycleur (Applied Biosystems 7500) (**Figure 20 voire annexe 2**) pour suivre un programme spécifique qui dure 95 min (**Tableau I**).

Tableau I : Protocole d'amplification pour la recherche de la mutation JAK2 V617F.

	ETAPES	TEMPERATURES	TEMPS
	Dénaturation	95°C	10min
5 cycles	Dénaturation	92°C	15s
	Hybridation/élongation	58°C	1min
40cycles	Dénaturation	92°C	15s
	Hybridation/élongation	60 °C	1min
	Conservation	4 °C	∞

II. 3. 2. 3. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats de la PCR en temps réel Taqman nécessite l'utilisation de logiciel spécifique (7500 software v2.0.6). En effet, un ordinateur est directement connecté au détecteur du thermocycleur (Applied Biosystems 7500) pour récolter les données en temps réel.

L'interprétation est facilitée par la présentation des résultats sous forme de courbes d'amplification, correspondant à l'émission de la fluorescence (FAM) à chaque cycle.

On trouve si joint exemple d'un échantillon d'ADN positif (**figure 21**) et un autre négatif (**figure 22**) pour la mutation JAK2V617F.

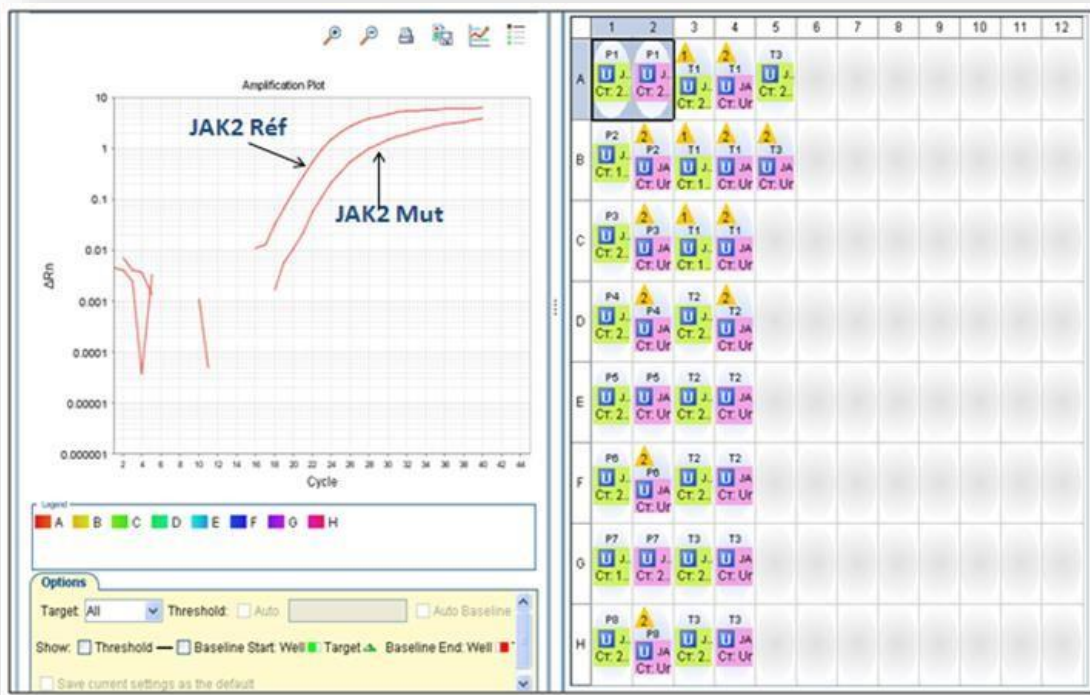


Figure 21: Exemple d'un échantillon d'ADN positif pour la mutation JAK2V617F.

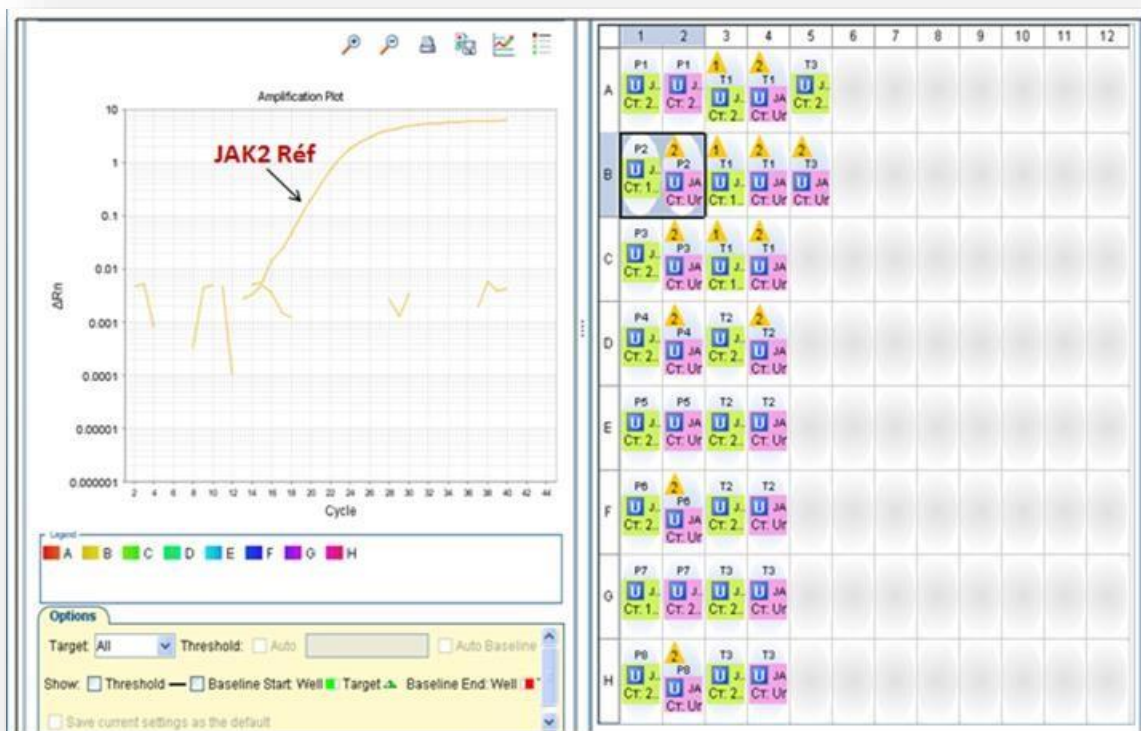


Figure 22: Exemple d'un échantillon d'ADN négatif pour la mutation

Résultats & Discussion

Résultats

I. RESULTATS

Dans cette partie du mémoire, nous allons présenter, interpréter puis discuter les résultats obtenus concernant les aspects :

- Epidémiologiques (sexe, âge et le type de pathologie).
- Moléculaires (mutation *JAK2 V617F* chez la population globale)

L'impact du statut mutationnel sur les indices épidémiologiques et les paramètres hématologiques de ces patients a aussi été analysé.

1.1. Caractéristiques de la cohorte

Notre étude a inclus 380 patients classés en quatre catégories selon la suspicion diagnostique : la première catégorie comporte 167 patients chez lesquels on suspecte une TE (Thrombocytémie Essentielle) avec un pourcentage de 44%. La deuxième comporte 107 patients chez lesquels une PV (Polyglobulie de Vaquez) a été suspectée, avec un pourcentage de 28%. La troisième catégorie comporte 46 patients chez lesquels on suspecte une MFP (Myélofibrose Primitive), ce qui représente un pourcentage de 12% et enfin une catégorie qu'on a nommé NMP non classés, représentée par 60 patients (16%) qui n'ont pas pu être classés dans l'une des trois catégories PV, TE ou MFP.

Nous allons présenter nos résultats en deux parties. La première partie, épidémiologique décrit la population étudiée selon l'origine géographique, le sexe, l'âge et le type de pathologie. La deuxième partie détermine la fréquence de la mutation *JAK2 V617F* dans la population globale, ainsi que l'impact du statut mutationnel sur les indices épidémiologiques et les paramètres hématologiques de ces patients.

I. 1.1. Répartition des patients selon le sexe et l'âge

Nous avons constaté une prédominance féminine avec 202 femmes (53.16%), contre 178 hommes (46.84%). Le sexe ratio H/F est de 0.87 (**Figure 23A**). Par ailleurs, la **figure23B** montre que les femmes prédominaient dans le groupe TE (n=110 ; 66%), et les hommes dans le groupe PV (n=73 ; 69%), avec un sexe ratio respectivement de 0.52 et 2.21.

En revanche, une égalité (23 patients pour chaque sexe), dans le groupe MFP a été constatée c'est-à-dire 50% de femmes et 50% d'hommes, donc un sexe ratio de 1. Dans les NMP non classés nous constatons qu'il y a 36 patients du sexe féminin et 24 du sexe masculin correspondant respectivement à 60% et 40%, avec un sexe ratio de 0,67.

Concernant l'âge, la moyenne de la population générale était de 56.28 ans avec un écart type de 22.34 ans (56.28 ± 22.34 ans). Les moyennes d'âge de chaque groupe sont illustrées dans la **figure 24**. L'âge minimal est de 4 ans et maximal de 87ans. La stratification de la population selon les tranches d'âge est illustrée dans la **figure 25** et révèle que la tranche d'âge la plus représentée est celle de 60-69 ans avec 82 cas soit (21,58%). Dans cette tranche d'âge, le phénotype TE prédominait (**Figure 26**).

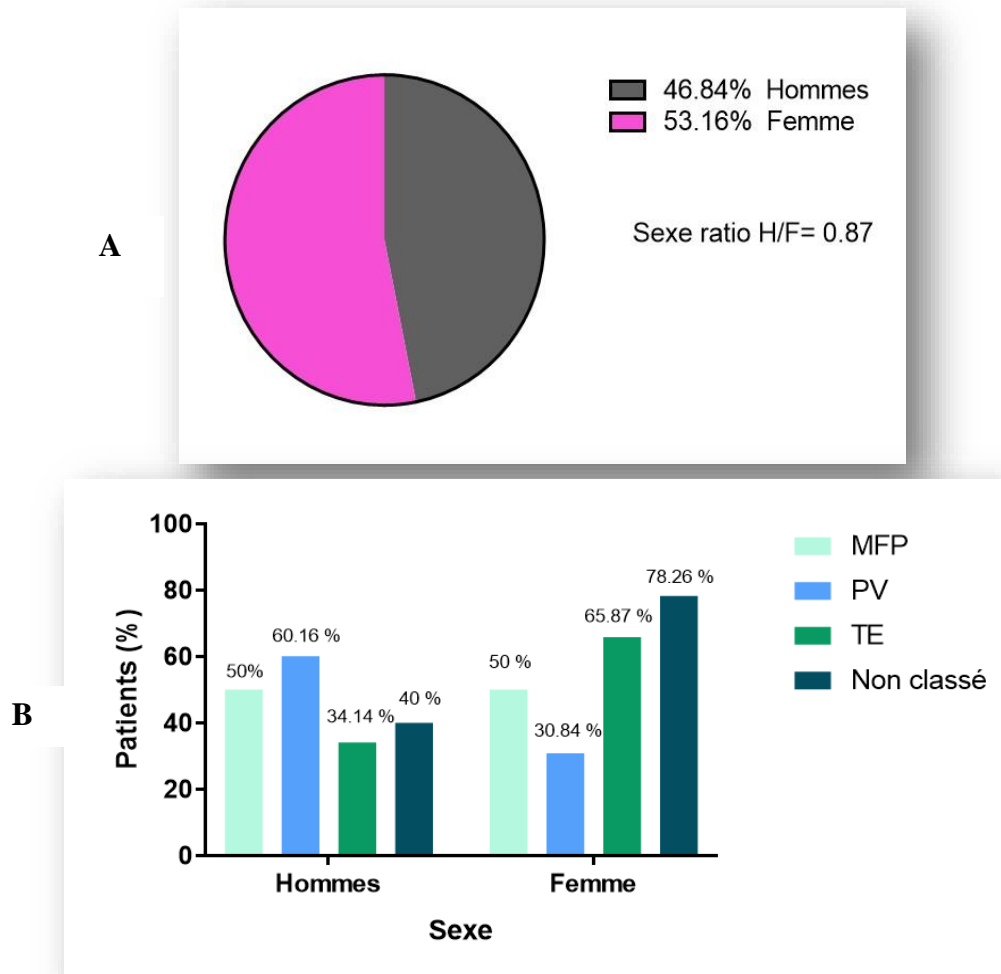


Figure 23 : Répartition des patients selon le sexe dans la population générale (**A**) et les groupes (**B**).

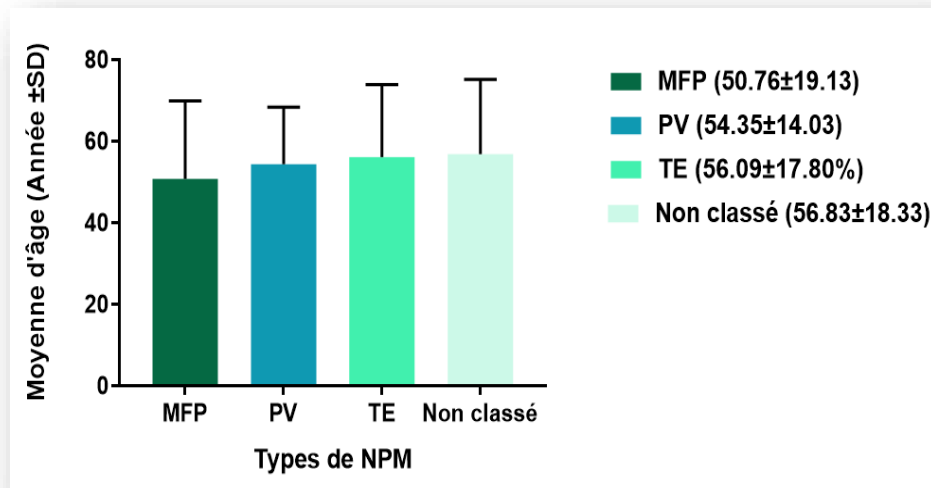


Figure 24 : Moyenne d'âge (Année ± SD) pour chaque groupe NPM.

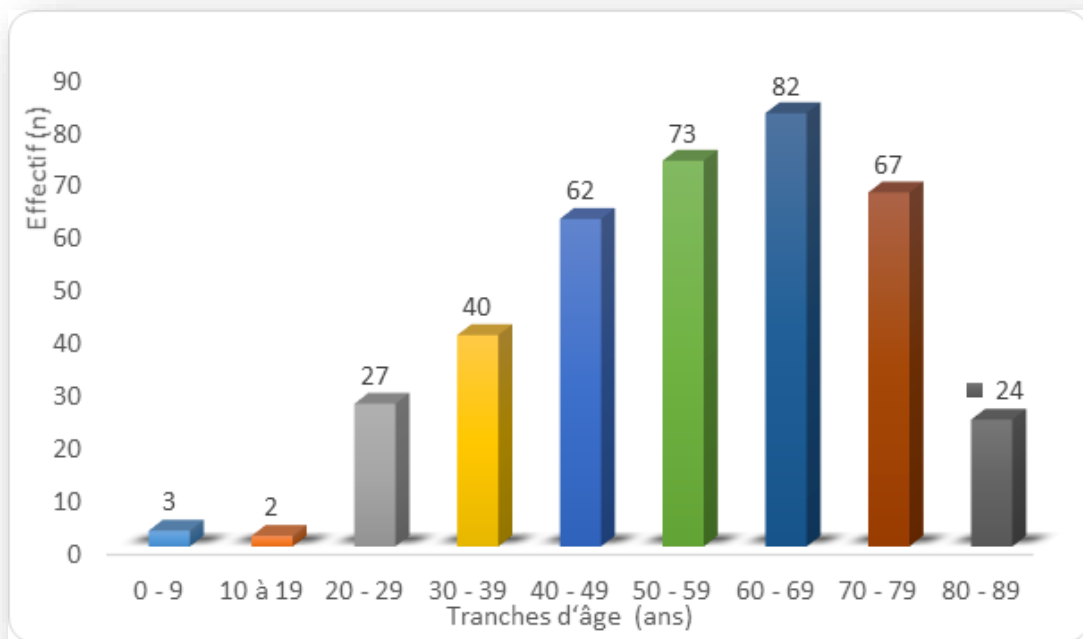


Figure 25 : Répartition de la population générale selon les tranches d'âge.

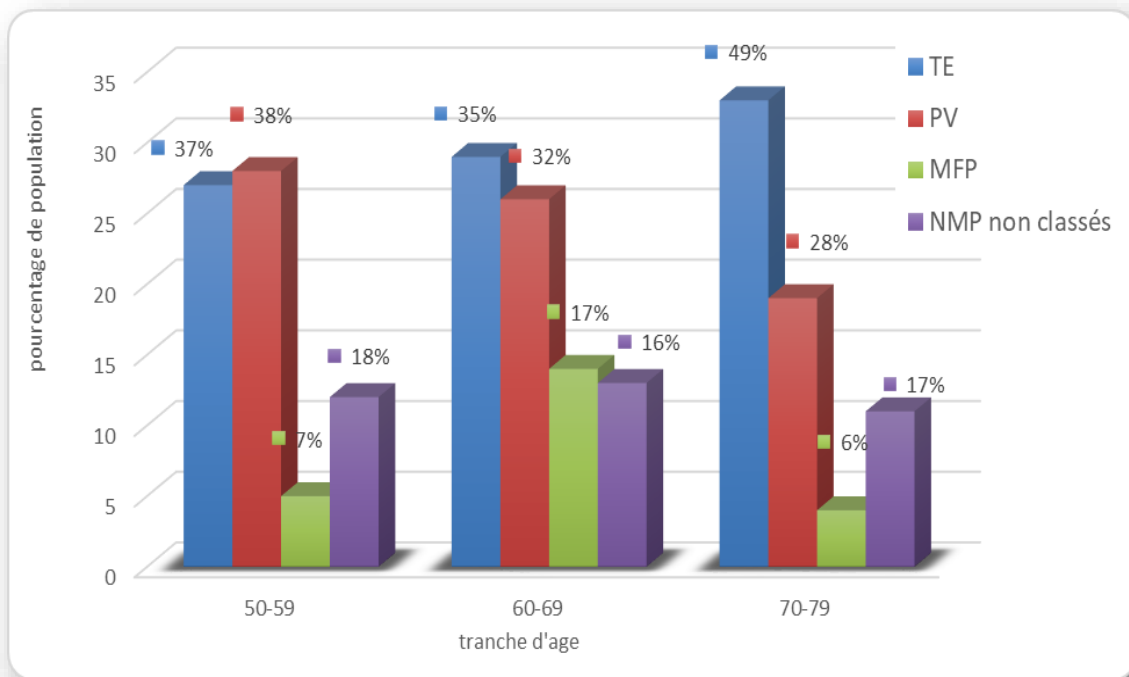


Figure 26 : Répartition des patients selon les tranches d'âges pour chaque type de pathologie.

I.1.2. Répartition des patients selon leur origine géographique

Sur l'ensemble des sujets présentant un Néoplasme Myéloprolifératif (NMP), 188(49%) proviennent de la wilaya d'Alger, 92(24%) de la wilaya de Blida, 24(6%) de la wilaya de Béjaïa, 21(6%) de la wilaya de Sétif, 10(3%) de la wilaya Tizi Ouzou et les 45 autres patients (12%) proviennent d'autres wilayas (figure 27). La figure 28 représente la répartition des patients selon le type de NMP par origine.

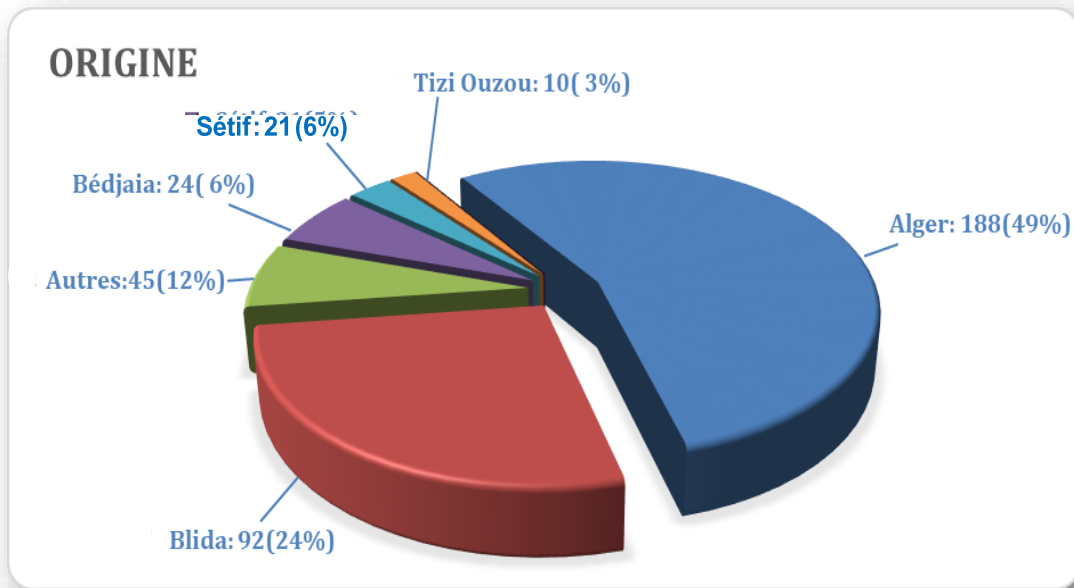


Figure 27 : Répartition des patients selon leur origine géographique.

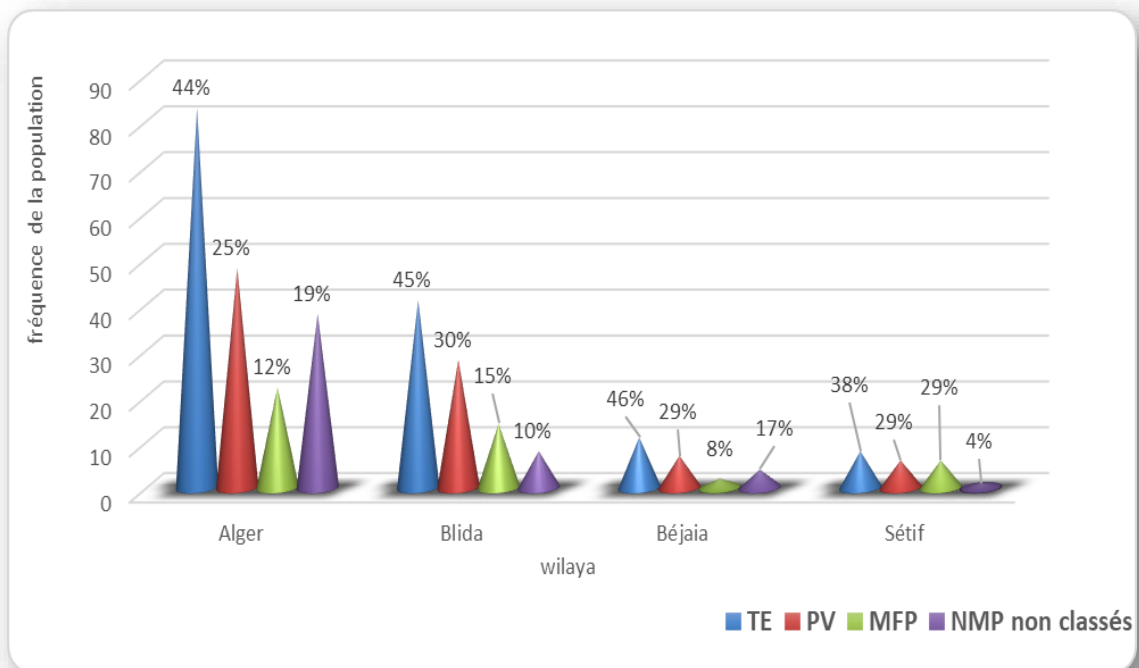


Figure 28 : Répartition des patients selon le type de NMP par origine géographique.

I.1.3. Répartition des patients selon les signes cliniques, biologiques et anatomopathologiques

Cette analyse a pour but d'établir la fréquence des signes cliniques et biologiques dans les quatre catégories. Les résultats sont compilés dans les **tableaux II et III** ainsi que les **figures 29, 30 et 31**. L'analyse de ces résultats montre que :

Dans le groupe TE, une splénomégalie et des céphalées ont été observés respectivement chez 34,70% et 33.5% des patients. La sensation de fatigue a concerné la moitié du groupe (49.7%). Par ailleurs, nous avons noté des thromboses, qu'elles soient veineuses (foie, rein, cerveau, rate) ou artérielles dans 19,80% des cas. Un diabète et une hépatomégalie ont été rapportés respectivement chez 6,60% et 7,80% des cas. D'autres signes cliniques ont également été notés à des fréquences moins élevées comme : le syndrome de Budd-Chiari (4,20%) et l'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) ischémique (3,60%).

Concernant la biologie des patients du groupe TE, la majorité présentaient une thrombocytose (84.2%), suivie d'une hyperleucocytose (56.0%) ainsi qu'un taux d'hématocrite bas (44.3%), un taux d'hémoglobine bas (42.3%) et une anémie (38.8%). Par ailleurs, 3 patients ne présentaient aucune anomalie biologique à l'inclusion.

Le frottis sanguin a été réalisé chez 113 patients chez lesquels une TE a été suspectée. On a noté que 16 patients (14%) ne présentaient aucune anomalie et 84 patients (74%) présentaient une anomalie des plaquettes.

Le frottis médullaire n'a été réalisé que chez 10 patients. On note que 2(20%) présentaient une moelle de richesse normale, 5(50%) présentaient beaucoup de mégacaryocytes et 3(30%) ne présentaient aucune anomalie.

Enfin, les résultats de la BOM (**figure 30**) réalisée chez 253 patients (67%) ont révélé que 53 (20.9%) étaient en faveur d'une TE.

Dans le groupe PV, 50% des patients présentaient une érythrose (surtout faciale ou conjonctivale), 42.4% des vertiges, 41.5% une HTA, 39,60% une splénomégalie, 26.4% un prurit et enfin 24,50% avaient des troubles visuels. D'autres signes cliniques étaient présents chez 3,80% des patients, tels que les problèmes cardiaques et la dyspnée.

Sur le plan biologique les patients atteints de PV avaient des taux anormalement élevés d'hémoglobine, de l'hématocrite et une polyglobulie avec des taux respectifs de 93.8%, 89.9% et 81.9%. De plus, une hyperleucocytose (28.9%) et une thrombocytose (13.2%) ont été observées.

Les résultats du frottis sanguin réalisés chez 63 patients étaient comme suit : 33(52%) ne présentaient aucune anomalie et 11(14%) présentaient une anomalie des plaquettes.

Le frottis médullaire n'a été réalisé que chez 7 patients. On note que 5(71%) ont révélé une moelle de richesse normale, 1(14%) beaucoup de mégacaryocytes et 1(14%) aucune anomalie.

Enfin, les résultats de la BOM (**figure 30**) réalisée chez 253 (67%) patients a révélé que 39 (15.4%) étaient en faveur d'une PV.

Dans le groupe MFP, la suspicion de cette pathologie a été faite après objectivation d'une myélofibrose suite à l'étude de la moelle osseuse (Biopsie ostéomédullaire ou PBO). Une fréquence élevée de ces patients présentaient une splénomégalie (82,60%) et des hémorragies (digestive, rétinienne, cervicale ou méningée) pour 15,20% d'entre eux. Des signes non spécifiques comme la fièvre et l'amaigrissement ont également été notés, à l'inclusion.

Sur le plan biologique, on note que la majorité des patients présentaient une leucopénie (72.7%) suivie d'une thrombopénie (62.9%), un taux d'hémoglobine bas (24.0%), un taux d'hématocrite bas (23.5%) et une anémie (22.5%). On note aussi qu'un seul patient MFP ne présentait aucune anomalie biologique.

Concernant le frottis sanguin, réalisé chez 27 patients on note que: 7(26%) patients ne présentaient aucune anomalie, alors que 5(19%) présentaient une anomalie des plaquettes.

On note aussi que le frottis médullaire réalisé chez 10 patients, a révélé une moelle de richesse normale chez 6 (60%), 2 (20%) présentaient beaucoup de mégacaryocytes et enfin 2(20%) n'avaient aucune anomalie à signaler.

Cependant la BOM (**figure 30**) a révélé que 44 (17.4%) étaient en faveur d'une MFP, 38(86%) ont révélé une fibrose dont 9 (24%) de grade 1, 15 (39%) de grade 2, 11 (29%) de grade 3 et 3 (8%) de grade 4 (**figure 31**).

Dans le groupe des NMP non classés, nous avons observé une splénomégalie dans 63% des cas, et de la fatigue chez 55% des patients. La thrombose était présente à une fréquence de 45% tandis que l'érythrose ne concernait que 8,3% des cas et seulement 6 patients présentaient des hémorragies.

Sur le plan biologique, les patients présentaient une thrombopénie (25.7%), un taux d'hémoglobine bas (24.0%), un taux d'hématocrite bas (23.5%), une leucopénie (22.7%) et une anémie (22.5%). On note aussi que 13 patients, correspondant à 21% des cas, ne présentaient aucune anomalie biologique, à l'inclusion.

Le frottis sanguin réalisé chez 24 patients, n'a révélé aucune anomalie chez 13 patients (54%) et une anomalie des plaquettes chez 4 patients (17%).

On note aussi que le frottis médullaire réalisé chez 9 patients seulement, a révélé une moelle de richesse normale chez 4 patients (44%), beaucoup de mégacaryocytes chez 1 patient (11%) et aucune anomalie chez 3 patients (33%). Enfin, la BOM (**figure 30**) a révélé 111 biopsies (43.9%) en faveur d'un NMP non classé parmi les 253 biopsies réalisées.

Tableau II : Répartition des patients selon les signes cliniques.

Signes cliniques	PV (n=107) (n ; %)	TE (n=167) (n ; %)	MFP (n=46) (n ; %)	NMP non classés (n=60) (n ; %)
Erythrose	53 (50%)	25 (15%)	-	5 (8,3%)
Thrombose	26 (24,5%)	33 (19,8%)	4 (8,7%)	27 (45%)
Céphalées	55 (51,9%)	56 (33,5%)	8 (17,4%)	13 (21,7%)
Troubles Visuels	26 (24,5%)	24 (14,4%)	3 (6,5%)	3 (5%)
Splénomégalie	42 (39,6%)	58 (34,7%)	38 (82,6%)	38 (63%)
Erythromélgie	10 (9,4%)	3 (1,8%)	-	4 (6,7%)
Acouphènes	-	1 (0,006%)	-	1 (1,7%)
Hémorragies	8 (7,5%)	5 (3%)	7 (15,2%)	6 (10%)
HTA	44 (41,5%)	63 (37,7%)	9 (19,6%)	10 (16,7%)
Budd-Chiari	6 (5,7%)	7 (4,2%)	1 (2,2%)	5 (8,3%)
Prurit	28 (26,4%)	15 (9%)	3 (6,5%)	7 (11,7%)
Crise de goutte	1 (0,9%)	4 (2,4%)	-	-
Néphropathie	-	3 (1,8%)	1 (2,2%)	-
Fièvre	13 (12,3%)	14 (8,4%)	11 (24%)	7 (11,7%)
Amaigrissement	22 (20,8%)	37 (22,2%)	17 (37%)	18 (30%)
Sueurs	11 (10,4%)	16 (9,6%)	10 (21,7%)	5 (8,3%)
Fatigue	51 (48,1%)	83 (49,7%)	28 (60,9%)	33 (55%)
Hépatomégalie	9 (8,5%)	13 (7,8%)	11 (24%)	18 (30%)
Vertiges	45 (42,4%)	55 (33%)	7 (15,2%)	16 (26,7%)
Diabète	8 (7,5%)	11 (6,6%)	3 (6,5%)	4 (6,7%)
Problème Cardiaque	4 (3,8%)	8 (4,8%)	2 (4,3%)	7 (11,7%)
Dyspnée	4 (3,8%)	9 (5,4%)	1 (2,2%)	5 (8,3%)
Problème Thyroïdien	2 (1,9%)	9 (5,4%)	3 (6,5%)	1 (1,7%)
AVC	5 (4,7%)	6 (3,6%)	-	3 (5%)

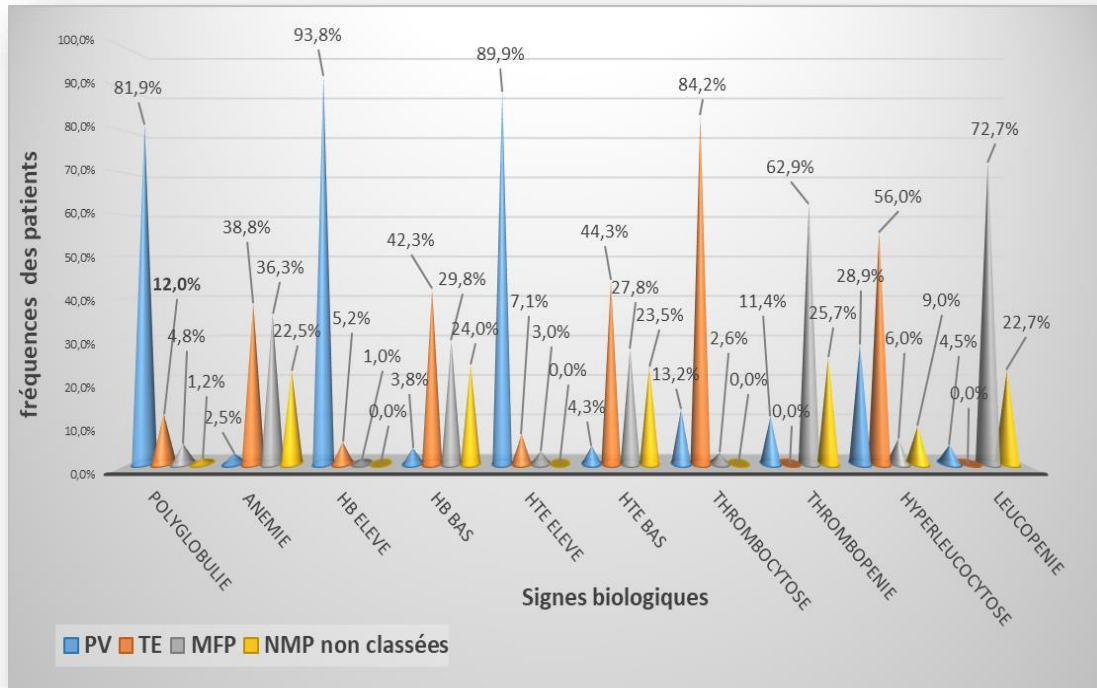


Figure 29 : Répartition des patients selon les signes biologiques.

Tableau III : Répartition des patients selon les autres signes biologiques.

Paramètres Biologiques	PV (n=107) (n ; %)	TE (n=167) (n ; %)	MFP (n=46) (n ; %)	NMP non classés (n=60) (n ; %)
LDH élevée	8 (7,7%)	11 (10,6%)	7 (6,7%)	3 (2,9%)
AU élevé	7 (8,8%)	9 (11,3%)	6 (7,5%)	2 (2,5%)
Anomalie de la coagulation	6 (10,5%)	5 (8,8%)	2 (3,5%)	3 (5,3%)
SAPL +	0	1 (5,0%)	0	0
SAPL -	3 (15,0%)	6 (30,0%)	4 (20,0%)	6 (30,0%)
B12 élevée	1 (4,8%)	2 (9,5%)	0	1 (4,8%)
B12 bas	2 (9,5%)	1 (4,8%)	0	0
B12 normale	1 (4,8%)	6 (28,6%)	4 (19,0%)	5 (23,8%)
FER élevé	0	1 (4,3%)	0	0
FER bas	1 (4,3%)	3 (13,0%)	2 (8,7%)	2 (8,7%)

FER normal	3 (13.0%)	8 (34.8%)	1 (4.3%)	4 (17.4%)
Ferritine élevée	1 (6.3%)	0	0	0
Ferritine basse	1 (6.3%)	3 (18.8%)	0	0
Ferritine normale	4 (25.0%)	5 (31.3%)	2 (12.5%)	0
EPO basse	1 (33.3%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	0
D Dimères élevés	0	1 (100%)	0	0

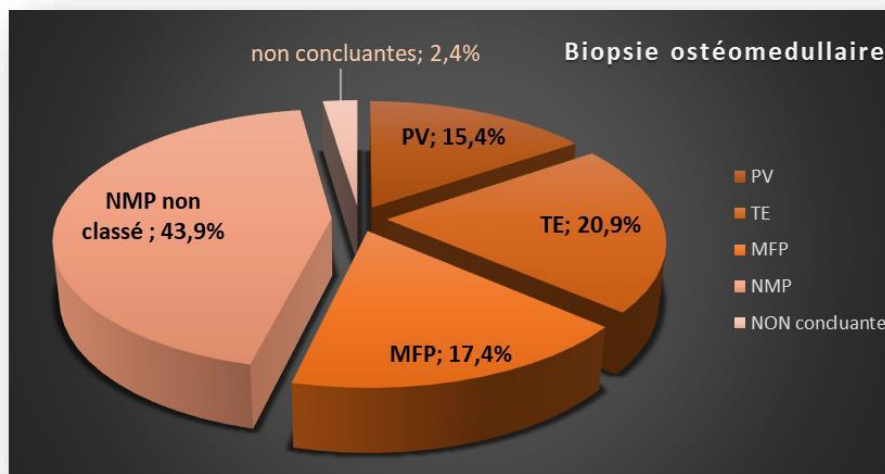


Figure 30 : Répartition des patients selon le résultat de la PBO.

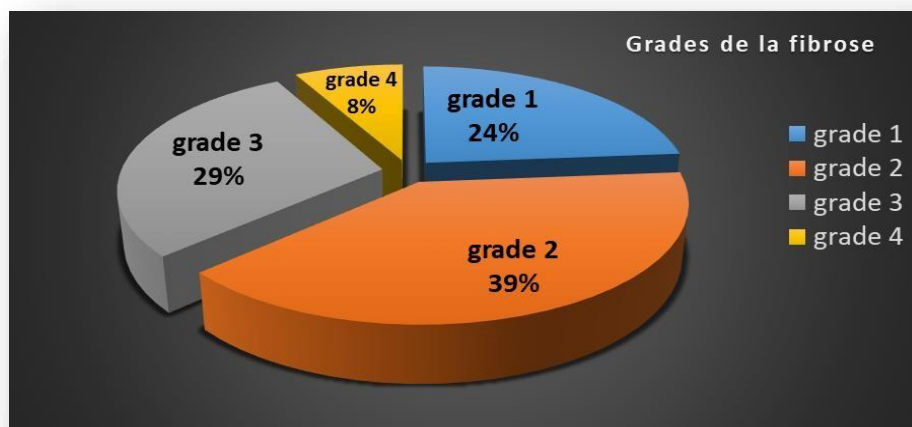


Figure 31 : Répartition des patients MFP selon le grade de la fibrose à la PBO.

I. 2. Etude de la mutation *JAK2 V617F*

Dans notre étude, la mutation *JAK2 V617F* a été détectée chez 274 patients, soit 72% des cas et 28% ne portaient pas la mutation. Cette différence est hautement significative avec une valeur $P < 0.0001$ (**Figure 32**). Dans la population générale, nous avons remarqué que la mutation *JAK2 V617F* était plus fréquente chez les femmes (54% ; n=148) comparée aux hommes (46% ; n=126). Elle était plus fréquente dans la tranche d'âge 60-69 ans avec un taux de 34% (n=57) suivi de celle des 50-59 ans et 70-79 ans avec 54 cas dans chacune (32%). Par contre, aucun cas n'a été observé dans la tranche d'âge 10-19 ans (**Figure 33**).

La distribution de la mutation *JAK2 V617F* variait dans les 4 groupes. En effet, elle a été retrouvée chez 81% des patients (n = 87) du groupe PV, 79% des patients du groupe TE (n= 132), 37% des patients du groupe MFP (n=17) et 63% des patients de groupe NMP non classées (n=38) (**Figure 34**).

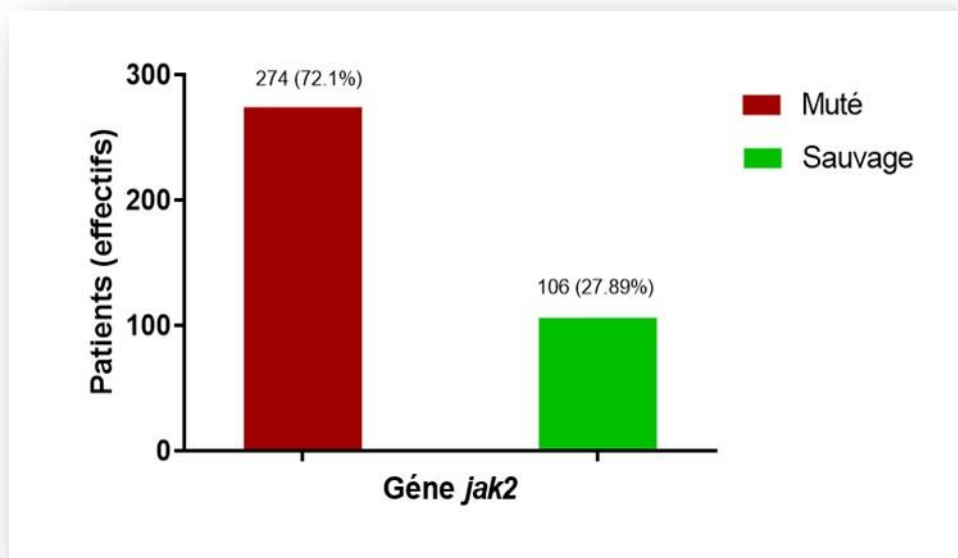


Figure 32 : Répartition des patients selon le statut mutationnel V617F du gène *JAK2*.

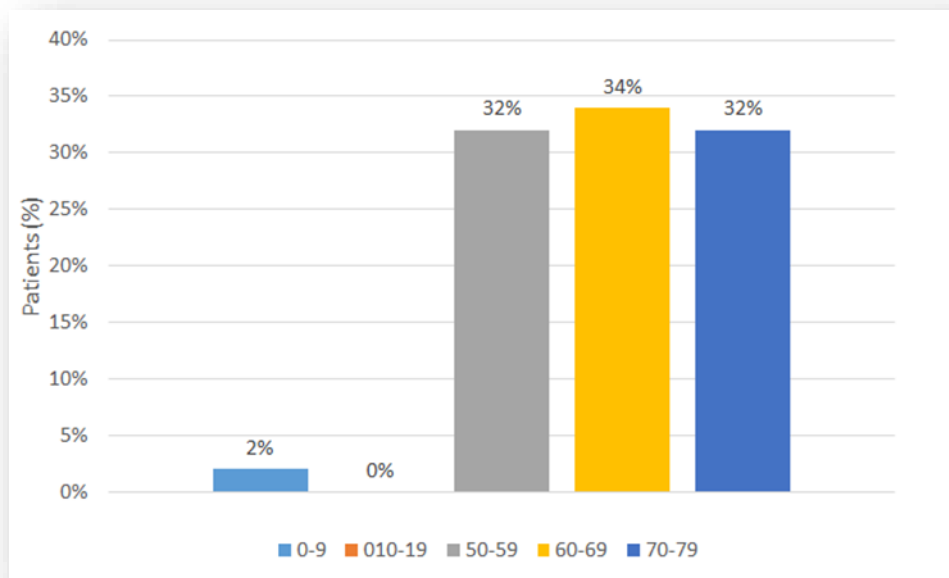


Figure 33: Répartition de la population *JAK2 V617F* positive selon les tranches d'âge.

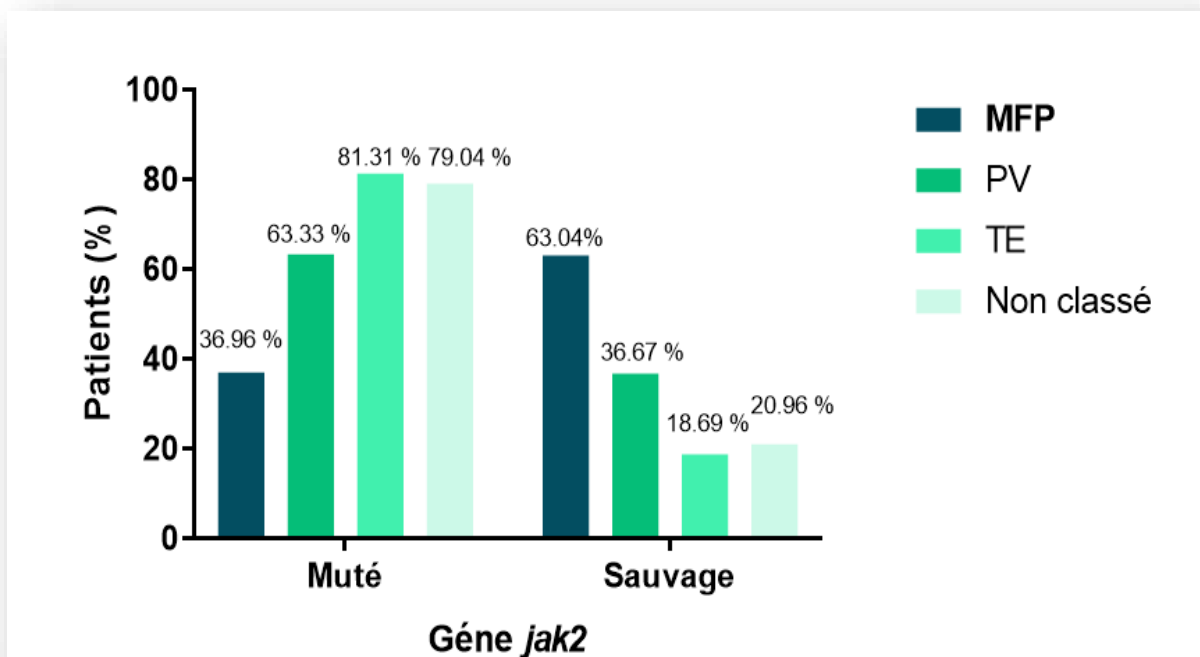


Figure 34 : Répartition des patients appartenant aux différents groupes NMP selon le statut mutationnel V617F du gène *JAK2*.

I. 2. 1. Répartition de la population JAK2 V617F positive par origine géographique

La **figure 35** représente la répartition de la population positive pour la mutation JAK2 V617F par origine géographique. Nous remarquons que sur les 274 individus porteurs de la mutation, 140 sont de la wilaya d'Alger, 67 de la wilaya de Blida, 18 de la wilaya de Béjaïa et 16 de la wilaya de Sétif, soit respectivement 58%, 28%, 7% et 7%.

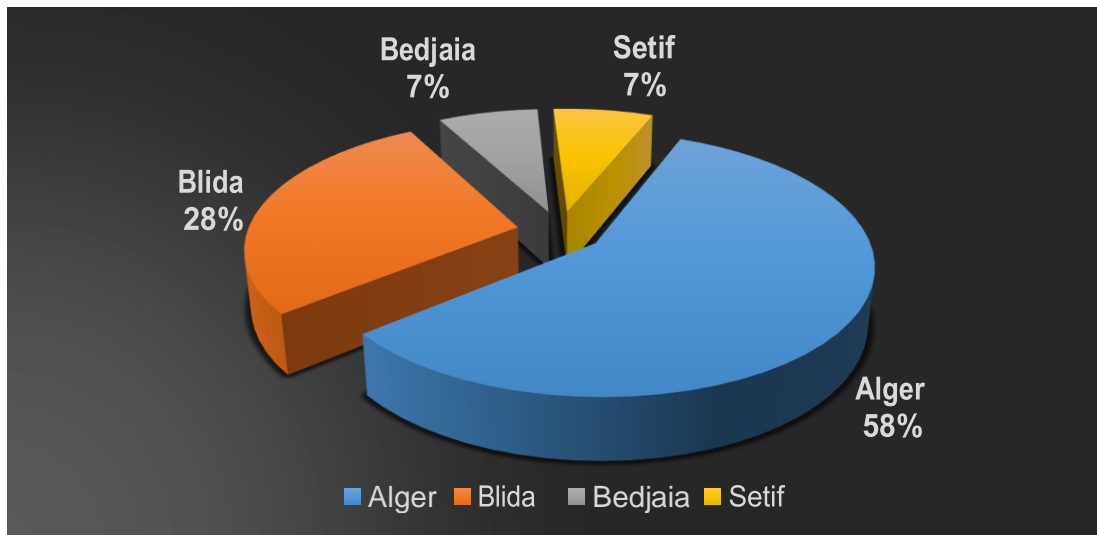


Figure 35 : Répartition des patients JAK2V617F+ selon leur origine géographique.

I.2.2. Etudes comparative des caractéristiques épidémiologiques et cliniques entre patients JAK2 V617F positifs et négatifs

✓ Groupe PV

Les patients atteints de PV positifs à la mutation *JAK2 V617F*, étaient au nombre de 87 cas, avec un âge moyen de 57,35 ans, un écart-type de 14.24 ans et un sexe ratio de 1,72 (55/32). Une érythrose était observée chez 33 % des cas, alors que 15% des cas présentaient des troubles visuels. La majorité des cas de PV étaient de sexe masculin (**Tableau IV**).

La moyenne d'âge des 20 patients PV *JAK2 V617F* négatifs était de 50,6 ans, un écart-type de 11,88 ans et un sexe ratio de 9 (18/2) avec 10% de sexe féminin et 90% masculin. Les patients ont particulièrement présentés des vertiges (30%), des érythroses (27%) et une HTA (24%) (**Tableau IV**).

✓ **Groupe TE**

Le **tableau V** regroupe les caractéristiques épidémiologiques et cliniques de 132 patients, répartis en 45 hommes et 87 femmes, avec un sexe ratio de 0,52 et un âge moyen de 58,51 ans et un écart-type de 17,26 ans. Ces patients ont présenté de la fatigue (33%), une splénomégalie (26%), des céphalées (24%) et des thromboses (17%).

35 patients de phénotype TE étaient négatifs pour la mutation *JAK2 V617F*. La moyenne d'âge était de 50,49 ans, un écart-type de 18,61 ans et un sexe ratio de 0.46 (11 /24) avec 68,57% de sexe féminin et 31,43% de sexe masculin. Ces patients ont présenté, principalement, une asthénie (48%), des céphalées (25%) et une splénomégalie (22%) (**Tableau V**).

✓ **Groupe MFP**

17 patients de phénotype MFP étaient positifs à la mutation *JAK2 V617F*. L'âge moyen était de 59 ans, un écart-type de 18,57 ans et le sexe ratio H/F était de 1,13. La quasi-totalité des patients présentaient une splénomégalie (n=16) et des hémorragies dans 4% des cas (**Tableau VI**).

La moyenne d'âge des 29 patients MFP *JAK2 V617F* négatifs était de 45.93 ans avec 55% de sexe féminin et 45% masculin. Les patients ont particulièrement présentés une splénomégalie (47%) et des hémorragies dans 13% des cas.

✓ **Groupe NMP non classés**

38 patients du groupe des NMP non classés étaient positifs pour à la mutation *JAK2 V617F*. L'âge moyen de ces patients était de 54,8 ans, un écart-type de 19,97 ans et un sexe ratio H/F de 0,73 (16/22). Le profil épidémiologique de ce groupe est caractérisé par une fréquence de splénomégalie de 23% et des thromboses dans 14% des cas (**Tableau VII**).

Les 22 autres cas étaient négatifs pour la mutation *JAK2 V617F*. La moyenne d'âge est de 53,55 ans et un écart-type de 15,5 ans avec 64% des femmes et 36% des hommes, donc un sexe ratio de 0,57. Ces patients ont aussi présentés des thromboses et une splénomégalie (**Tableau VII**).

I.2.3. Etudes comparative des caractéristiques biologiques et anatomopathologiques entre patients *JAK2 V617F* positifs et négatifs

L'analyse des **tableaux VIII** compilant l'essentiel des résultats de l'étude comparative des paramètres biologiques entre patients *JAK2 V617F* positifs et négatifs, montre que :

•Dans le groupe PV *JAK2 V617F* positifs, 77.1% des patients présentaient une polyglobulie, 26.5% une hyperleucocytose et 10.5% une thrombocytose. Le groupe de phénotype PV *JAK2 V617F* négatif était marqué par des taux d'hémoglobine et d'hématocrite élevés (respectivement 21% et 16%) et une polyglobulie (5%).

Le frottis sanguin des patients PV *JAK2V617F* positifs a donné les résultats suivants : 10 patients (6%) présentaient une anomalie des plaquettes alors que 27(17%) n'avaient aucune anomalie. Pour le groupe PV *JAK2V617F* négatifs, seulement 1 patient (2%) présentait une anomalie des plaquettes et 6 (9%) ne présentaient aucune anomalie.

Le frottis médullaire des patients PV *JAK2V617F* positifs a donné les résultats suivants: 4(24%) patients présentaient une moelle de richesse normale et 1 seul (6%) présentait beaucoup de mégacaryocytes. Alors que pour le groupe PV *JAK2V617F* négatifs, on note que 1 seul patient (5%) présentait une moelle de richesse normale et 1 seul (5%) n'avait aucune anomalie à signaler.

Pour le groupe PV *JAK2V617F* positif, la BOM (**Figure 38**) montre que 30 (20.4%) étaient en faveur d'une PV alors que pour les patients *JAK2V617F* négatifs (**Figure 36**) 9 (8%) étaient en faveur d'une PV.

•Dans le groupe de phénotype TE *JAK2V617F* positif, 67.4% présentaient une thrombocytose, 48.2% une hyperleucocytose et 38.8% une anémie.

Le groupe de phénotype TE *JAK2 V617F* négatif était marqué par une thrombocytose et une hyperleucocytose (8%).

Pour le frottis sanguin des patients TE *JAK2V617F* positifs : 71(44%) patients présentaient une anomalie des plaquettes et 14(9%) n'avaient aucune anomalie à signaler. Alors pour le groupe TE *JAK2V617F* négatif, on note que 2 patients (3%) n'avaient aucune anomalie et 13(20%) présentaient une anomalie des plaquettes.

Concernant le frottis médullaire du groupe TE *JAK2V617F* positif: 1 patient (6%) ne présentait aucune anomalie et 2(12%) présentaient beaucoup de mégacaryocytes. Pour Le groupe TE *JAK2V617F* négatif, on note que 2 patients (11%) pressentaient une moelle de richesse normale, 3(15%) présentant beaucoup de mégacaryocytes et 2(11%) n'avaient aucune anomalie à signaler.

La BOM (**Figure 38**) pour le groupe *JAK2V617F* positif a donné les résultats suivants: 32 biopsies (21.8%) en faveur d'une TE, alors que pour le groupe *JAK2V617F* négatif (**Figure 36**) : 21 étaient (20%) en faveur d'une TE.

• Dans le groupe de phénotype MFP JAK2V617F positifs, on note la présence d'une anémie (15%), une thrombopénie (11.4%) et une leucopénie (9.1%).

Le groupe de phénotype MFP *JAK2 V617F* négatif était marqué par une anémie (21%), une thrombopénie (51%) et une leucopénie (64%).

Concernant le frottis sanguin du groupe MFP JAK2V617F positif, on note que 4 patients (2%) présentaient une anomalie des plaquettes et 5(3%) ne présentaient aucune anomalie. Alors que dans le groupe MFP JAK2V617F négatif, on a observé que 1 seul patient (2%) présentait une anomalie des plaquettes et 2(3%) ne présentaient aucune anomalie.

Le frottis médullaire pour le groupe MFP JAK2V617F positif a révélé que 3 patients (18%) présentaient une moelle de richesse normale, 2 (12%) présentaient beaucoup de mégacaryocytes et 1 seul (6%) aucune anomalie. Pour le groupe MFP JAK2V617F négatif, les résultats montrent que 3 patients (15%) présentaient une moelle de richesse normale et 1 seul (5%) n'avait aucune anomalie.

Enfin la BOM (**Figure 38**) pour le groupe JAK2V617F positif a révélé que 17 biopsies (11.6%) étaient en faveur d'une MFP, dont 15 (88.2%) présentaient une fibrose: 1 (6.7%) de grade 1, 8 (53.3%) de grade 2, 4 (26.7%) de grade 3 et 2 (13.3%) de grade 4 (**Figure 39**).

Alors que pour le groupe JAK2V617F négatif on note que 27 biopsies (25%) étaient en faveur d'une MFP (**Figure 36**), dont 23 présentaient une fibrose : 8 (35%) de grade 1, 7 (30%) de grade 2, 7 (30%) de grade 3 et 1 (4.3%) de grade 4 (**Figure 37**).

Le groupe de phénotype NMP non classés JAK2V617F positif était composé de 11.4% de patients présentant une thrombopénie, 9.1% une leucopénie et 12.5% une anémie. Le groupe de phénotype NMP non classés *JAK2 V617F* négatif était marqué par une thrombopénie et une leucopénie (14%) ainsi que par une anémie (10%).

Les résultats du frottis sanguin pour le groupe NMP non classés JAK2V617F positif, montrent que 4(2%) présentaient une anomalie des plaquettes et 7(4%) ne présentaient aucune anomalie. Alors que les résultats du groupe NMP non classés JAK2V617F négatif montrent qu'aucun patient n'avait une anomalie des plaquettes.

Pour le frottis médullaire du groupe NMP non classés JAK2V617F, 1 seul patient (6%) présentait une moelle de richesse normale. Alors que dans le groupe NMP non classés JAK2V617F négatif, on note que 3 patients (15%) présentaient une moelle de richesse normale et 3(15%) n'avaient aucune anomalie à signaler.

La BOM du groupe JAK2V617F positif a révélé que 62 (42.2%) étaient en faveur d'un NMP non classé (**Figure 38**) ; alors que pour le groupe JAK2V617F négatif (**Figure 36**) on note que 49 biopsies (46%) étaient en faveur d'un NMP non classés.

Tableau IV : Comparaison des caractéristiques épidémiologiques dans le groupe PV selon le statut mutationnel *JAK2 V617F*.

PV	<i>JAK2 V617F</i> Positif	<i>JAK2 V617F</i> négatif	Valeur <i>P</i>
Nombre	87	20	/
Age Moyen	57,34	50,6	/
Femmes	32 (37%)	2 (10%)	/
Hommes	55 (63%)	18 (90%)	/
Erythrose	43 (33%)	10 (27%)	0,004*
Troubles Visuels	19 (15%)	7 (19%)	0,2
Vertiges	32 (24%)	11 (30%)	0,2
HTA	37 (28%)	9 (24%)	1

* : $P < 0.05$

Tableau V : Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques dans le groupe TE selon le statut mutationnel *JAK2 V617F*.

TE	<i>JAK2 V617F</i> positif	<i>JAK2 V617F</i> négatif	Valeur <i>P</i>
Nombre	132	35	/
Age Moyen	55,46	50,49	/
Hommes	87 (66%)	24 (69%)	/
Femmes	45 (34%)	11 (31%)	/
Thrombose	31 (17%)	2 (5%)	0,01*
Splénomégalie	49 (26%)	9 (22%)	0,23
Céphalées	46 (24%)	10 (25%)	0,5
Fatigue	63 (33%)	19 (48%)	0,5

* : $P < 0.05$

Tableau VI : Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques du groupe MFP selon le statut mutationnel JAK2V617F.

MFP	JAK2 V617F positif	JAK2 V617F négatif	Valeur P
Nombre	17	29	/
Age Moyen	59	45,93	/
Femmes	8 (47%)	16 (55%)	/
Hommes	9 (53%)	13 (45%)	/
Hémorragies	1 (4%)	6 (13%)	0,2
Splénomégalie	16 (73%)	22 (47%)	0,2
Fièvre	1 (5%)	9 (19%)	0,06
Amaigrissement	4 (18%)	10 (21%)	0,5

NMP non classés	JAK2 V617F positif	JAK2 V617F négatif	Valeur P
Nombre	38	22	/
Age Moyen	54,8	53,5	/
Femmes	22 (58%)	14 (64%)	/
Hommes	16 (42%)	8 (36%)	/
Erythrose	5 (5%)	0	0,14
Thrombose	15 (14%)	12 (17%)	0,17
Splénomégalie	25 (23%)	12 (17%)	0,7
Céphalées	8 (7%)	5 (7%)	1
Hémorragies	5 (5%)	1 (1%)	0,39
HTA	7 (6%)	3 (4%)	0,73
Amaigrissement	7 (6%)	10 (14%)	0,73
Fatigue	16 (15%)	16 (22%)	0,03*
Hépatomégalie	10 (9%)	8 (19%)	0,55
Vertiges	11 (10%)	5 (7%)	0,76

* : $P < 0.05$

Tableau VII: Comparaison des caractéristiques épidémiologiques et cliniques du groupe NMP non classés selon le statu mutationnel JAK2V617

Résultats et Discussion

Tableau VIII: Comparaison des paramètres biologiques entre patients positifs et négatifs pour la mutation dans les différents groupes

Paramètres biologiques												
Mutation Jak2/groupe	LDH		Anomalie de la coagulation		B12				Fer			
	Élevé	Non	Présence	Absence	Élevé	Non	Basse	Non	Élevé	non	Bas	Non
PV (+)	6	81	5	82	0	87	1	86	0	87	0	87
PV (-)	2	18	1	19	1	19	1	19	0	20	1	19
Valeur P	0,64		1		0,18		0,34		1		0,18	
TE (+)	9	123	3	129	0	132	2	130	1	131	1	131
TE (-)	2	33	2	33	2	33	0	35	0	35	0	35
Valeur P	1		0,28		0,04*		1		1		1	
MFP (+)	5	12	2	15	0	17	0	17	0	17	3	14
MFP (-)	2	27	0	29	0	29	0	29	0	29	1	28
Valeur P	0,08*		0,13		1		1		1		0,13	
Non classé (+)	1	37	3	35	0	38	0	38	0	38	4	34
Non classé (-)	2	20	0	22	1	21	0	22	0	22	1	21
Valeur P	0,54		0,29		0,36		1		1		0,64	

* : $P < 0.05$

Résultats et Discussion

Tableau VIII: Comparaison des paramètres biologiques entre patients positifs et négatifs pour la mutation dans les différents groupes (Suite)

Paramètres biologiques								
Mutation Jak2/groupe	Ferritine				EPO		D dimères	
	Élevée	Non	Basse	Non	Basse	Non	Présence	Absence
PV (+)	0	87	0	87	1	86	0	87
PV (-)	1	19	1	19	3	17	1	19
Valeur P	0,18		0,18		0,02*		0,18	
TE (+)	9	123	3	129	1	131	1	131
TE (-)	2	33	2	33	0	35	0	35
Valeur P	1		0,28		1		1	
MFP (+)	0	17	0	17	1	16	0	17
MFP (-)	0	29	0	29	0	29	0	29
Valeur P	1		1		0,36		1	
Non classé (+)	0	38	0	38	0	38	0	38
Non classé (-)	0	22	0	22	0	22	0	22
Valeur P	1		1		1		1	

* : $P < 0.05$

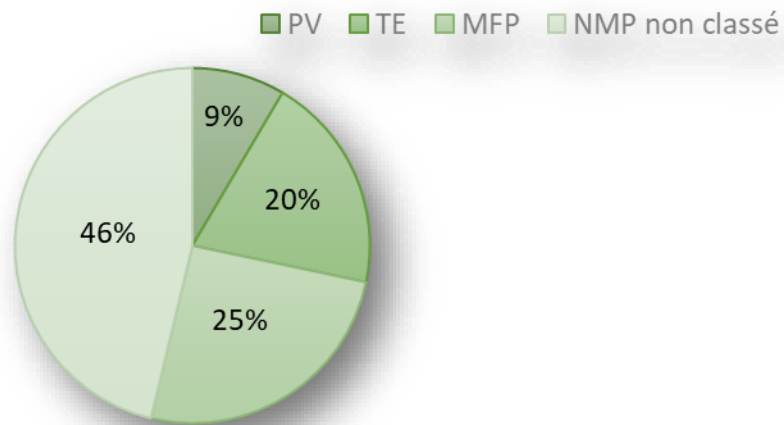


Figure 36: Résultats de la biopsie ostéomédullaire pour les patients *JAK2V617F* négatifs.

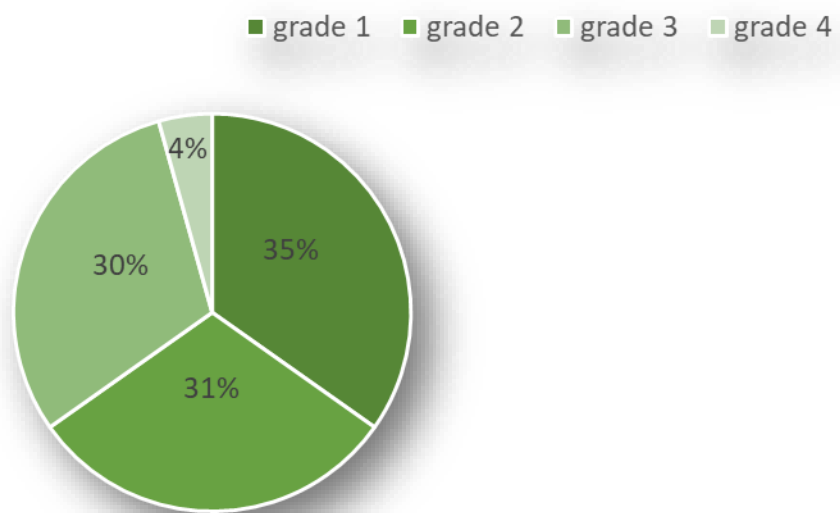


Figure 37 : Répartition des patients de phénotype MFP *JAK2V617F* négatifs selon le grade de la fibrose.

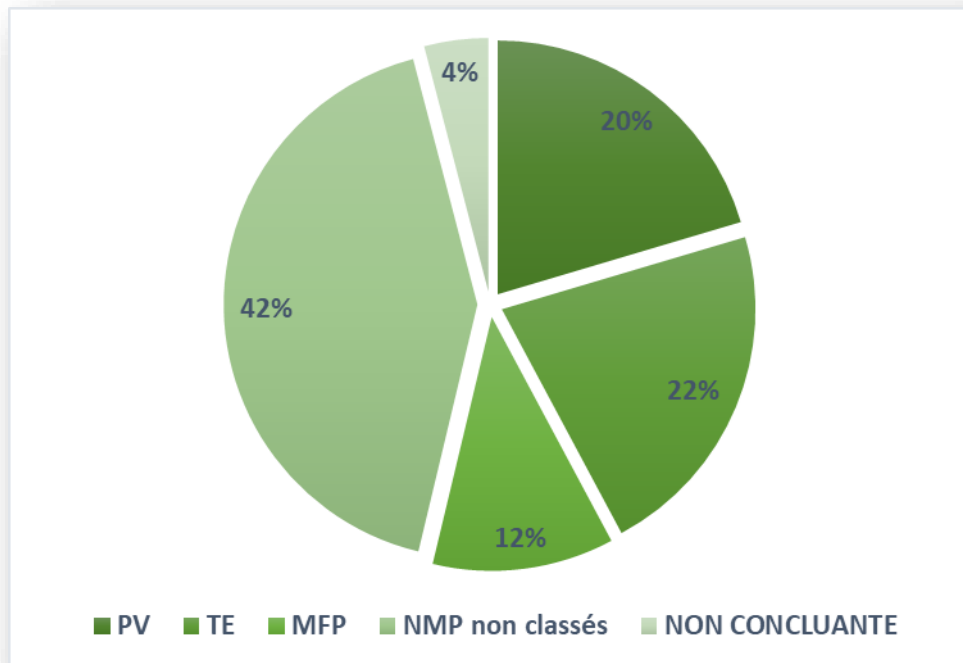


Figure 38 : Résultats de la biopsie ostéoméduleaire pour les patients *JAK2V617F* positifs.

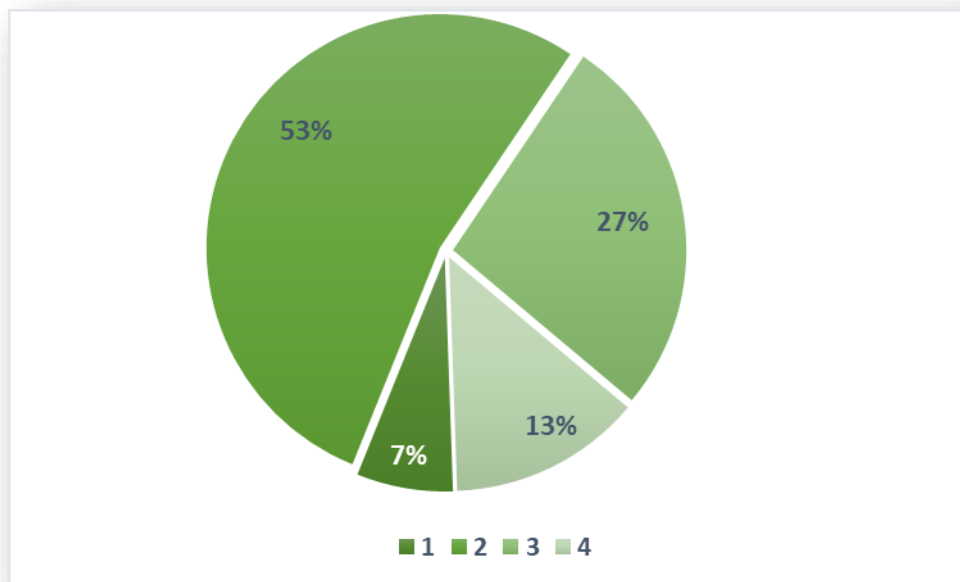


Figure 39 : Répartition des patients de phénotype MFP *JAK2V617F* positifs selon le grade de la fibrose.

Discussions

II. DISCUSSION :

La discussion s'articulera en 5 parties :

- 1) Analyse des caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée
- 2) Analyse des caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée
- 3) Analyse de la fréquence de la mutation JAK2 V617F dans la population étudiée et par type de NMP
- 4) Analyse de la population JAK2 V617F positive
- 5) Analyse de la population JAK2 V617F négative

II.1 Analyse des caractéristiques épidémiologiques de la population étudiée :

II.1.1 Répartition selon leur origine géographique:

La différence d'échantillonnage entre les wilayas peut être expliquée par le fait que la wilaya d'Alger est considérée comme un centre de référence pour la prise en charge de ces pathologies. Il est à noter aussi qu'il pourrait y avoir des cas qui ne sont pas pris en charge par d'autres établissements de santé à travers le pays.

Selon le type de pathologie, les taux les plus élevés des cas incidents des NMP sont dans la wilaya d'Alger avec 83 cas pour la TE et 48 cas pour la PV. Nous notons aussi 22 cas de MFP. Dans la wilaya de Blida, la TE et la PV restent les pathologies où nous observons le taux le plus élevé (41 cas pour TE et 28 cas pour PV), suivi des NMP suspectés (14 cas) de la MFP. Pour la wilaya de Bejaïa, la PV est majoritaire suivie par la TE. Placée en 4ème position la wilaya de Sétif compte 8 cas de TE et 6 cas pour la PV et la MFP, alors qu'un cas était classé dans le groupe NMP non classés.

Nous constatons que la PV et la TE restent les deux Néoplasmes Myéloprolifératifs les plus fréquents dans les différentes wilayas étudiées de l'Algérie comme cela a été observé précédemment pour l'ensemble de la population, ce qui laisse penser qu'il n'y a pas d'influence de la situation géographique sur l'incidence de ces deux pathologies. Ces observations sont en accord avec les travaux de **Titmarsh et al., (2014)** qui ont montré que la différence est non significative pour l'incidence annuelle de la PV et la TE entre l'Amérique du Nord et l'Europe (0,94 et 1,05 et de 0,96 et 1,60). Pour la MFP, seulement 44 cas sont partagés entre les quatre

wilayas d'Alger, de Blida, de Béjaia et de Sétif, ce qui peut être expliqué par le fait que ce soit le plus rare NMP, ce qui est en accord avec l'analyse de **Titmarsh et al., (2014)**. En effet ces derniers ont rapporté que l'incidence annuelle de la MFP était de 0,46 en Europe, 0,46 en Amérique du Nord et 0,63 en Australie.

II.1.2 Répartition selon le sexe

Les résultats obtenus sont en corrélation avec les données bibliographiques. En effet, plusieurs études ont rapporté une prédominance masculine dans la PV, avec une variation du sexe ratio selon les pays et l'affection. Dans le groupe PV, le sexe ratio est de 1,3 en Algérie tandis qu'il est de 3 en France. Ces observations sont en accord avec les résultats des enquêtes épidémiologiques nationales sur la PV et la TE, qui rapportent une prédominance masculine pour la PV (sexe ratio égal à 1,3) et une prédominance féminine dans la TE (sexe ratio de 0,61) incluant 187 patients, ce qui concorde avec les résultats de notre série (sexe ratio de 0,52 de 167 patients). [(**Djouadi., 2009**) ; (**Belakehal et al., 2014**)]. Par ailleurs, les enquêtes menées en Europe, en Amérique du Nord, en Asie et en Australie, ont révélé que l'incidence des PV diffère de façon non significative entre le sexe masculin et féminin, alors que la population féminine est prédominante dans les cas de TE [(**Johansson, 2004**) ; (**Titmarsh et al., 2014**)]. Cette prédominance féminine est plus nette pour les moins de 40 ans et explique l'importance du diagnostic pour pallier aux problèmes rencontrés au cours des grossesses dans la TE [(**Brière et Belluci, 2002**) ; (**Oscá-Gelis et al., 2013**)].

Pour la MFP, nos résultats concordent avec une étude française de Lefrère et *al.*, en 2008 où aucune prédominance d'un sexe n'a été notée. (**Lefrère et al., 2008**)

II.1.3 Répartition selon les tranches d'âge

Nos observations sont en accord avec les travaux de **Mehta et al., en 2014** aux USA, qui ont rapporté que les NMP concernent surtout les individus de plus de 60 ans (**Mehta et al., 2014**). Ces mêmes observations ont été confirmées par l'étude multicentrique effectuées à partir de 64 registres de cancers en Europe et qui montrent que l'incidence des NMP est plus élevée dans la tranche d'âge 60-69 ans avec une incidence de 11,8 par 100000 habitants par an. Alors qu'un faible taux d'incidence de (0,1 et 0,3) par 100 000 habitants est observé pour les tranches d'âge 0-14 ans et 15-24 ans respectivement (**Visser et al., 2012**).

De plus, selon **Monnereau et al., (2013)** l'incidence des NMP est identique entre l'homme et la femme jusqu'à 40 ans puis elle augmente de 1,3 et 1,1 à 16,6 et 12,2 à l'âge de 85 ans. La moyenne d'âge de survenue de ces pathologies dans notre étude est de (57,01 ans dans la TE),

(55,36 ans dans la PV) et (50,76 ans dans la MFP) comparée à 69 ans chez l'homme et 73 ans chez la femme en France, alors qu'en Italie, l'âge moyen de survenue des cancers rares en général est de 60 ans (**Trama et al., 2012**).

Pour les PV, la tranche d'âge des 50-59 ans compte le plus grand nombre de cas (28), suivie de celle de 60-69 ans et 70-79 ans avec 26 cas et 19 cas respectivement. Ces observations diffèrent des résultats de Belakehal et coll. qui rapportent à l'échelle nationale un pic de fréquence de la PV pour la classe d'âge des 60-69 ans (**Belakehal et al., 2014**). Par ailleurs, nos observations vont dans la même sens que la littérature occidentale qui rapporte un âge médian au diagnostic des PV entre 65 et 74 ans (**Johansson et al., 2004 ; Moulard et al., 2014**).

Pour la TE, notre moyenne d'âge est de 57,01 ans, moyenne comprise dans la fourchette d'âge rapportée dans la littérature mondiale, à savoir entre 64,3 et 73 ans (**Phekoo et al., 2006 ; Rohrbacher et al., 2008**). Cependant, cette valeur est légèrement supérieure à la moyenne rapportée par Djouadi en 2009 sur les 187 cas de TE recensés à l'échelle nationale (55 ans). Une prédominance pour la tranche d'âge 70-79 ans (33 cas) est observée suivie par celle de 60-69 ans avec 29 cas. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Djouadi en 2009**, où un pic de fréquence des TE a été observé pour les plus de 70 ans (**Djouadi, 2009**).

L'âge moyen des cas de MFP est de 50,76 ans, ce qui est en désaccord avec la littérature qui rapporte un âge au diagnostic entre 69 et 79 ans [**Phekoo et al., 2006 ; Moulard et al., 2014**]. La classe d'âge la plus importante est celle de 60-69 ans avec 14 cas. 4 et 5 cas sont notés respectivement pour chacune des deux tranches d'âges 70-79 ans et 50-59 ans.

II.2 Analyse des caractéristiques cliniques et biologiques de la population étudiée :

II.2.1 Répartition des patients selon les signes cliniques :

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la PV soit caractérisée par une érythrose qui est parfois associée à une thrombose, une splénomégalie et une HTA. Dans la TE, la thrombose est un signe clinique essentiel pouvant être accompagné d'une splénomégalie et d'une asthénie. Dans certains cas, elle est révélée par des thromboses veineuses splanchniques comme le syndrome de Budd-Chiari. De plus, la MFP est caractérisée par des signes non spécifiques qui peuvent être retrouvés dans les deux autres NMP classiques (**Griesshammer et al., 1999 ; Dupuy et al., 2009**).

Pareillement à notre étude (19,8% thrombose), dans l'étude algérienne de **Djouadi de 2009**, la majorité des patients atteints d'une TE étaient asymptomatiques (68,46%) et seuls 19% présentaient une thrombose (**Djouadi, 2009**).

Ensuite, des fréquences similaires ont été rapportées pour les hémorragies dans le groupe MFP (15,20% dans notre série) et 14,40% dans son étude (**Djouadi, 2009**).

De plus, l'étude de l'équipe de **Belakehal** a retrouvé une faible fréquence des thromboses (7,43%) et de la splénomégalie (2%) dans la PV. Par ailleurs, nos observations de l'érythrose faciale du groupe PV sont en accord avec les travaux multicentriques de **Belakehal et al., 2014** en Algérie, qui ont rapporté que la moitié des patients présentaient cette pathologie et seuls 11% d'entre eux étaient asymptomatiques (**Belakehal et al., 2014**).

II.2.2 Répartition des patients selon les signes biologiques:

Nos résultats peuvent être expliqués par le fait que sur le plan biologique, la PV soit caractérisée essentiellement par la présence d'une polyglobulie et des taux élevés d'hémoglobine et d'hématocrite, alors que la TE est caractérisée essentiellement par la présence d'une hyperplaquettose (**Dupuy et al., 2009**). Les patients MFP dans notre étude présentent une leucopénie et thrombopénie.

Ces résultats nous laissent poser l'hypothèse que la mutation JAK2V617F est la cause principale de ces pathologies, car comme expliqué dans la partie théorique, la protéine JAK2 est activée par l'érythropoïétine (EPO) qui est essentielle pour la lignée rouge, la thrombopoïétine (TPO) pour la lignée plaquettaire et le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) pour la lignée granuleuse. Ces trois cytokines, en se fixant sur leur récepteur spécifique, entraînent l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT, transmettant un signal de survie et de prolifération cellulaire (**Nadjmi, 2015**).

Les NMP classiques non-Phi (PV, TE et MFP) sont des maladies clonales résultant de l'acquisition d'une mutation au sein d'une CSH, entraînant une surproduction anormale de cellules myéloïdes. Les mutations responsables de ces myéloproliférations sont toutes responsables de dérégulations de la voie des récepteurs aux cytokines / JAK2 / STAT, qui confèrent aux cellules tumorales une indépendance ou une hypersensibilité vis-à-vis des cytokines et un avantage de prolifération et de survie (**Chomel et al., 2009 ; James et al., 2005**).

Une étude transversale, réalisée par l'équipe de Padaro et coll., portant sur 15 patients suivis pour : TE (N = 5), PV (N = 9) et MFP (N = 1). Chez les patients atteints de TE, l'hyperplaquettose et l'hyperleucocytose étaient présentes à des fréquences respectives de 60% et 40%. Dans la PV, 22,22% des patients avaient une hyperleucocytose. Les mêmes pourcentages ont été notés dans les deux groupes présentant une hémoglobine élevée et un taux d'hématocrite élevé. Par ailleurs, une

hyperplaquettose a été retrouvée chez 44,44% des patients. Enfin, le patient atteint de MFP ne présentait aucune anomalie biologique, ce qui ne correspond pas à notre étude (Nadjmi, 2015).

II.3 Analyse de la fréquence de la mutation JAK2 V617F dans la population étudiée et par type de NMP

La mutation JAK2V617F a été retrouvée chez 72% des patients donc presque chez les trois quarts de la population étudiée.

Comment donc une mutation unique peut-elle être à l'origine de trois pathologies distinctes ? Plusieurs études ont permis de proposer des réponses et d'établir un modèle de la pathogenèse liée à cette mutation. Chez beaucoup de patients atteints de PV et de MFP, la fréquence des homozygotes V617F dans les polynucléaires neutrophiles est élevée, alors que dans les TE, les cellules malignes sont le plus souvent hétérozygotes (Scott *et al.*, 2006). Le mécanisme conduisant à cette homozygotie ne consiste pas en une perte d'allèle, mais résulte d'une recombinaison mitotique acquise en 9p24 (locus JAK2) (Kralovics *et al.*, 2002). Chez la souris, la surexpression du gène JAK2 muté dans la moelle osseuse est à l'origine d'un phénotype de PV (Wernig *et al.*, 2008). Deux lignées de souris transgéniques ont été créées ; l'une exprimant moins d'allèles V617F que d'allèles sauvages, et l'autre exprimant autant d'allèles mutés que d'allèles sauvages. Dans le premier cas, le phénotype observé se rapproche d'une TE et dans le deuxième, il ressemble à une PV (Tiedt *et al.*, 2006). Toutes ces observations montrent l'importance du ratio allèles JAK2 V617F/ allèles JAK2 sauvages dans la détermination du phénotype de la maladie. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les protéines JAK2 sauvages inhiberaient en partie les effets des protéines JAK2 mutées, sans doute par compétition au niveau du récepteur (Chomel *et al.*, 2009).

Nos résultats concordent avec les résultats de la littérature. En effet, cette mutation a été décrite dans environ deux tiers des patients atteints de NMP quel que soit l'affection, soit dans environ 65% des cas (Baxter *et al.*, 2005 ; James *et al.*, 2005 ; Kralovics *et al.*, 2005).

Ces données confirment que cette mutation est retrouvée chez la majorité des patients atteints d'un NMP classique.

Dans le groupe de PV, la mutation JAK2 V617F est détectée chez 87 patients ce qui correspond à 81,3% des cas. Ce taux est supérieur à celui rapporté par l'expérience de Harieche et coll., au centre Pierre et Marie-Curie (CPMC) à Alger, où la fréquence de la mutation était de 68,75% (11/16) chez les patients PV (Harieche *et al.*, 2014). Cependant, ce même taux est légèrement

inférieur aux données occidentales où la mutation a été observée chez 95 à 97% des patients atteints de PV (**Baxter et al., 2005 ; Kiladjian et al., 2012**).

La même fréquence que la nôtre (81,4%) a été observée sur une population atteinte de PV en Grèce d'après l'étude menée par Speletas et coll., en 2007 (**Speletas et al., 2007**), ainsi qu'au Maroc où Benmoussa et coll., rapportent une fréquence de 89% (**Benmoussa et al., 2009**). En Arabie Saoudite, la fréquence de la mutation est de 91% chez les patients PV (**Mamdooh et al., 2012**), alors qu'elle est de 96% au Brésil (**Monte-Mor et al., 2007**). La variation de la fréquence du clone muté entre les différentes études est liée à la taille de l'échantillon, les critères utilisés pour le diagnostic ainsi que la sensibilité de la technique utilisée pour la détermination de la mutation qui diffère d'une étude à une autre.

Nous avons recensés un total de 132 patients atteints de TE au sein de notre population d'étude, avec une fréquence de la mutation de 79,0%. Ce taux se rapproche des valeurs rapportées par les travaux européens dans les TE (75%) selon les études [(**Cho et al., 2009**) ; (**Suksomyos et al., 2012**)].

Concernant le groupe de MFP, la fréquence de la mutation JAK2 V617F dans notre série est de 37% ce qui est en accord avec la fourchette de fréquences citées dans la littérature [(**Kraloviks et al., 2005**) ; (**Tefferi et al., 2008**)]. Néanmoins, l'expérience de Harieche et coll., rapporte une fréquence de 16,6% de patients positifs pour la mutation sur un total de 6 cas de MFP étudiés (**Harieche et al., 2014**).

La comparaison entre notre étude et l'expérience de Harieche et coll. est difficile car chaque centre en Algérie utilise ses propres moyens et les techniques sont parfois différentes, mais présentent toutefois quelques inconvénients, elles sont qualitatives et non quantitatives. Ce qui peut expliquer la discordance dans les fréquences de la mutation JAK2 V617F recherchée dans les NMP classiques (PV, TE et MFP).

II.4 Analyse de la population positive pour la mutation JAK2V617F :

II.4.1 Répartition de la population JAK2 V617F positive par origine géographique :

La fréquence de la population positive pour la mutation selon les wilayas suit celle de la population générale vue précédemment, c'est-à-dire majoritaire dans les wilayas d'Alger suivie de Blida et de Béjaia. Cette similitude peut être expliquée par la distribution inégale de la population entre ces wilayas. Nous pouvons aussi dire que la mutation n'est pas spécifique d'une région par

rapport à une autre ; et non pas parce que la population étudiée est sous l'influence d'un même environnement ou bien d'un style de vie commun car elle n'appartienne pas à la même ethnie.

Malgré cela, si nous déterminons le statut mutationnel dans chaque wilaya nous constatons que à Sétif, sur un total de 21 cas de NMP, 16 d'entre eux possèdent la mutation soit 76,19%, alors qu'à Béjaia 75% (18/24) de la population est JAK2 V617F positive. A Alger, 74,47% (140/188) des cas de NMP sont porteurs de la mutation, alors qu'à Blida seulement 72,83% (67/92) des cas portent l'allèle muté. D'après ces résultats, nous pouvons dire que sur l'ensemble de la population NMP, plus de la moitié possède le clone muté dans toutes les wilayas mais la mutation est plus fréquente dans la wilaya de Sétif comparée aux autres. Ceci peut être lié à l'exposition des individus de cette wilaya à des facteurs environnementaux ou à des facteurs de risque propres à cette région.

II.4.2 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon le sexe

Ces observations rejoignent celles décrites précédemment pour la population globale où nous notons un sex ratio de 0,89 en faveur d'une prédominance féminine. Ces résultats suggèrent que la présence de la mutation JAK2 V617F n'est pas spécifique d'un genre dans notre population. Pourtant, cette prédominance féminine n'est pas toujours vraie et dépend des types de NMP, de la période d'étude, et de l'enregistrement de la maladie qui est très variable entre les différentes enquêtes épidémiologiques (**Anderson et al., 2012 ; Moulard et al., 2014**).

II.4.3 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon la tranche d'âge

Nos résultats confirment les données de la littérature qui stipulent que ces pathologies touchent beaucoup plus les adultes à partir de 60 ans [(**Visser et al., 2012**) ; (**Mehta et al., 2014**)].

La mutation est absente chez les deux cas âgés 10 ans et 15 ans que nous avons répertoriés dans notre série. Ce résultat est en accord avec les travaux de Reid et coll. (**Reid et al., 1988**). En comparant les deux stratifications, de la population globale à celle de la population JAK2 V617F positive, nous remarquons que la tendance des deux répartitions reste similaire quel que soit le statut mutationnel.

II.4.4 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon les signes cliniques

Les thromboses artérielles et/ou veineuses sont des complications fréquentes de NMP non classés, et peuvent même en être la première manifestation. Dans les cas positifs, elles concernent environ 63% des patients au total et révèlent la maladie chez 14% des patients. Dans les cas négatifs, elles concernent 37% des patients, 17% d'eux ayant déjà eu un événement thrombotique au

diagnostic. Les thromboses veineuses sont plus fréquentes (15 cas ; 7 individus positifs pour la mutation et 8 pour ceux qui sont négatifs).

Les hémorragies concernent 1 à 5% des patients NMP non classés, ce sur-risque hémorragique se corrige sous traitement cytoréducteur efficace. Elles sont digestives, rétinienne, membre inférieures et de localisation variable. Il s'agit principalement de manifestations hémorragiques simples (ménorragies) mais, moins fréquemment, peuvent également survenir des hémorragies potentiellement graves (méningés).

Cliniquement, la survenue de NMP non classés se manifeste par l'apparition d'une volumineuse splénomégalie (25/38 cas pour les patients positifs et 12/22 cas pour les cas négatifs), une hépatomégalie, ainsi que le développement de la fatigue.

II.4.5 Répartition de la population JAK2 V617F positive selon les signes biologiques

Les résultats des patients positifs pour la mutation JAK2V617F nous ont confirmé qu'elle est responsable des affections myéloprolifératives. Cette mutation empêche l'auto-inhibition du domaine kinase par le domaine pseudo-kinase, ce qui entraîne une activation constitutive de la protéine JAK2 indépendamment de la liaison du facteur de croissance au récepteur.

Ainsi, en l'absence de cytokine, la mutation JAK2 V617F induit l'activation des voies de signalisation STAT, MAPK/ERK et PI3K/AKT (**Garcon et al., 2006**). La voie STAT favorise la prolifération, la différenciation et la survie des cellules cibles. La voie MAPK/ERK est également impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La voie PI3K/AKT joue principalement un rôle dans la survie et le contrôle du stress cellulaire.

Ceci explique pourquoi on observe une prolifération spontanée des précurseurs érythroïdes en culture, en l'absence d'EPO. Cette propriété des progéniteurs érythroïdes mutés peut se tester en culture, pour distinguer les polyglobulies de cause primitive (causées par une mutation conférant une indépendance à l'EPO), des polyglobulies de cause secondaire (sans anomalie intrinsèque des cellules hématopoïétiques, sans indépendance à l'EPO).

A noter que parmi les polyglobulies primitives, on distingue la polyglobulie primitive acquise (polyglobulie de Vaquez) et les polyglobulies primitives congénitales. Ces dernières sont très rares, et représentées quasi-exclusivement par des mutations du récepteur à l'EPO (**Guillemette, 2018**).

La même technique est également réalisable pour les progéniteurs mégacaryocytaires, afin d'identifier les thrombocytoses primitives (causées par une mutation conférant une indépendance

à la TPO), des thrombocytoses de cause secondaire (sans anomalie intrinsèque des cellules hématopoiétiques, sans indépendance à la TPO). La prolifération spontanée des progéniteurs mégacaryocytaires semble même plus souvent retrouvée que celle des progéniteurs érythroïdes (**Mondet et al., 2015**).

Dans les PV, les TE ou les MFP, on retrouve une prolifération spontanée des progéniteurs érythroïdes et mégacaryocytaires plus fréquemment en cas de mutation JAK2 V617F ou de mutation de CALR, par rapport aux mutations du MPL ou dans les NMP « triple négatifs » (**Beer et al., 2006**) et (**Pardanani et al., 2006**).

Des études ont d'ailleurs démontrés que la recherche en première intention de la mutation JAK2V617F pourrait permettre d'éviter la réalisation d'analyse supplémentaire sur la moelle osseuse (**James et al., 2006 ; Staerk et al., 2007**).

La présence de la mutation V617F du gène JAK2 chez la majorité des patients atteints de NMP a ouvert la voie du développement de molécules « anti-JAK », la molécule JAK2 devenant une cible thérapeutique (**Quintas-Cardama et Verstovsek., 2013**).

II.5 Répartition de la population négative pour la mutation selon les signes biologiques :

Dans cette partie on va essayer d'expliquer les résultats négative pour la mutation, malgré que ces des patients dont leurs BOM été en faveur d'un des trois types de NMP.

Plusieurs situations peuvent entraîner une augmentation d'un ou plusieurs paramètres érythrocytaires, sans être de vraies polyglobulies :

- Les syndromes thalassémiques hétérozygotes, dans lesquels on observe une augmentation du nombre de globules rouges, sans augmentation de l'hémoglobine ni de l'hématocrite, et associée à une microcytose (**Guillemette, 2018**).

- L'hémoconcentration, dans laquelle on observe une augmentation de l'hématocrite en raison d'une diminution du volume plasmatique, une augmentation modérée de l'hémoglobine, en général sans augmentation notable du nombre de globules rouges (**Guillemette, 2018**).

Ainsi que les fausses thrombocytoses sont en général liées à des erreurs d'automates, la réalisation d'un frottis sanguin est donc suffisante pour pouvoir affirmer une thrombocytose vraie (**Guillemette, 2018**). De plus, d'autres mutations ont été décrites dans les NMPs classiques en dehors de la mutation JAK2V617F.

Tous les exons de JAK2 ont été séquencés dans le but d'identifier les mutations en cause dans les PV, TE et MFP JAK2 V617F négatifs. Ces efforts ont permis de mettre en évidence des mutations de l'exon 12 du gène JAK2, présentes uniquement dans la PV, chez environ 3-4% des patients JAK2 V617F négatifs. Ainsi, la quasi-totalité des patients porteurs d'une PV portent une mutation touchant le gène JAK2 (**Guillemette, 2018**).

Après la découverte de ces mutations, plusieurs équipes ont recherché des mutations dans les récepteurs associés à la protéine JAK2, tels que l'EPO-R, MPL ou le G-CSF-R. C'est ainsi que des mutations gain-de-fonction de MPL ont été identifiées : MPL W515L et W515K, puis de nombreuses autres substitutions dans le même gène. Ces mutations entraînent l'activation du récepteur MPL en l'absence du ligand, elles sont retrouvées dans environ 7-8% des MFP et 4% des TE. Elles n'ont été retrouvées ni dans la PV, ni dans d'autres hémopathies myéloïdes (**Guillemette, 2018**).

De nombreuses mutations de CALR ont été décrites depuis 2013. Il a été démontré que les mutations de CALR activent la voie JAK2/STAT en activant le récepteur MPL, et dans une moindre mesure le G-CSF-R, par interaction entre le domaine d'interaction aux lectines de CALR et les sites de glycosylation de la partie N-terminale de MPL. Chez l'Homme, elles ont été rapportées principalement dans les TE et les MFP, mais également dans de rares cas d'ARSI-T (ou SMD/SMP-RS-T). De rares cas de PV avec mutation de CALR avaient été décrits, mais ces cas ne remplissaient pas tous les critères nécessaires au diagnostic d'une vraie PV. Une large étude n'a retrouvé aucun cas de mutation de la CALR associée à une vraie PV, sur 578 patients avec polyglobulie inexplicée sans mutation du gène JAK2 (**Guillemette, 2018**).

Comme mentionné dans la partie théorique, les protéines LNK et CBL sont des protéines inhibitrices de la voie JAK2/STAT. Des mutations de LNK ont été décrites dans de rares cas de NMP. Dans un certain nombre de cas, elles sont associées à d'autres mutations « drivers » telles que JAK2 V617F. La protéine LNK normale se lie à la protéine JAK2 et entraîne l'inhibition de la voie JAK2/STAT, que cette voie ait été activée par la liaison du ligand à son récepteur ou par des mutations « drivers ». Les mutations de LNK retrouvées dans les NMP altèrent cette fonction inhibitrice. CBL est une protéine à activité ubiquitine ligase, qui ubiquitine et dégrade les protéines à activité tyrosine kinase et leurs récepteurs, mais également une protéine adaptatrice multifonctionnelle, impliquée dans la régulation de la transmission du signal. Des mutations de CBL sont retrouvées dans de rares cas de PV, TE ou MFP, mais également dans certaines formes frontières SMD/SMP et certains SMD. Dans les NMP, elles sont associées à un phénotype

particulier, avec monocytose et fibrose médullaire, et à un mauvais pronostic (**Guillemette, 2018**).

En dehors de ces mutations « drivers », responsables de la myéloprolifération, de nombreuses mutations associées ont été décrites dans les NMP, et pourraient être responsables de l'hétérogénéité de ces pathologies. Il s'agit principalement de mutations impliquées dans l'épigénétique (méthylation de l'ADN et modification des histones) ou l'épissage de l'ARN (**Tefferi et al., 2009**) et (**Mahfoudhi et al., 2015**).

Parmi les mutations impliquées dans l'épigénétique, les mutations de TET2 (tet méthylcytosine dioxygénase 2) sont les plus fréquentes : elles sont retrouvées dans 4 à 11% des TE, 15% des PV, 20% des MFP et jusqu'à 26% dans les LAM secondaires aux NMP. Ce sont des mutations perte-de-fonction, qui favorisent l'amplification des progéniteurs et des cellules souches hématopoïétiques (CSH), et pourraient donc favoriser la prolifération des clones de CSH mutées dans les NMP (**Guillemette, 2018**).

Conclusion

Réunis sous le terme de Néoplasmes Myéloprolifératifs classiques ou Philadelphie négatif, la Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocytémie Essentielle et la Myélofibrose Primitive ; sont des hémopathies malignes qui touchent la lignée myéloïde. Il paraît qu'ils résultent des dérégulations profondes impliquant les acteurs des grandes voies de signalisation cellulaire et de la réponse à l'environnement cytokinique.

Dans ce travail de thèse nous avons abordé les NMP sous différents angles, dans le but d'en comprendre au mieux les mécanismes moléculaires et de mettre en relief l'implication des mutations de JAK2 V617F. La mutation JAK2 V617F peut coexister avec d'autres événements génétiques dans les NMP, comme elle peut être un événement secondaire de ces événements.

La recherche de cette mutation constitue un nouvel outil diagnostique important dans les NMP hors LMC, elle a conduit l'OMS à revoir et à adopter des nouveaux critères. Elle est actuellement faite en cas de suspicion d'un NMP et lorsqu'elle est positive, le diagnostic est certain et donc il reste à classer l'hémopathie.

Dans notre étude la recherche de la mutation par PCR en temps réel Taqman a permis la révélation de la mutation chez 44% TE, 28% PV, 12% MFP et 16% NMP non classés (ceci est peut due au manque de détermination de la BOM dans notre centre). En effet, les résultats indiquent d'une part une prédominance masculine dans la PV, d'une autre part, une prédominance féminine dans la TE et les NMP non classés et une quasi-égalité dans la MFP. Des plus, les groupes PV, TE et NMP non classés surviennent chez les patients de plus de 50 ans alors que la MFP a été suspectée chez les sujets plus jeunes dans notre série. Sur le plan clinique et biologique, les épisodes thrombotiques et l'hyperplaquettose ont été les plus fréquemment retrouvés dans la TE, alors que pour la PV, nous avons noté un taux élevé de l'érythrocytose et de la polyglobulie. La MFP et les NMP non classés présentaient une prédominance de la splénomégalie et pour les signes biologiques ; l'anémie et la thrombopénie respectivement. La plupart des patients étaient d'origine géographique du nord de l'Algérie.

A partir de l'ensemble de nos résultats, nous suggérons qu'à l'avenir, pour lutter efficacement contre les NMP, qui présentent lourdement sur l'économie du pays, il serait souhaitable de mettre en œuvre une stratégie diagnostique par des tests JAK2 en routine dans les services hospitaliers et établir des registres de NMP pour mieux connaître ces pathologies considérées comme rares jusqu'à ce jour.

Il faudrait aussi continuer à identifier et caractériser de nouvelles mutations de JAK2, notamment des doubles mutations (CALR, MPL, EZH), en utilisant des techniques d'imagerie et les molécules thérapeutiques dans les protocoles cliniques, qui nous permettrait de mieux appréhender le rôle complexe de JAK2, et plus précisément de ses mutants, dans la signalisation cellulaire, lors de son association avec les récepteurs aux cytokines.

Enfin, pour améliorer la prise en charge de ces patients, il serait intéressant d'élargir cette étude à la recherche de facteurs de risques pour les NMP par l'augmentation de la population d'étude. Tous ces axes de recherches seraient éventuellement complétés par la création d'un lien avec une prédisposition génétique, ou un événement, qui serait capable d'induire des désordres suffisamment importants dans les progéniteurs hématopoïétiques pour provoquer les dérégulations que nous observons.

Références Bibliographiques

A

- Alter DA, et al. Blood 2016; 127(20) :2391-2405.
- Alston1 Christine I.,and Richard D. Dix . (2019)SOCS and Herpesviruses, With Emphasis on Cytomegalovirus Retinitis
- Anand, S., Stedham, F., Beer, P., Gudgin, E., Ortmann, C.A., Bench, A., Erber, W.,Green, A.R., and Huntly, B.J. (2011). Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. Blood 118, 177-181.
- Anderson, L.A., Duncombe, A.S., Hughes, M., Wilson, J.C., et McMullin, M.F. (2012). Environmental, lifestyle and familial/ethnic factors associates with myeloproliferative neoplasms. American journal of hematology 87 (2), 175-182.

B

- Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., et Green, A.R. (2005). Acquired Mutation of the Tyrosine Kinase JAK2 in Human Myeloproliferative Disorders. The Lancet, 365 (9464), 1054-1061.
- Beer, P.A., F. Delhommeau et al., (2010). "Two routes to Leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive Myeloproliferative Neoplasm." Blood 115 (14): 2891-2900.
- Belakehal, SE., Mrabet, R., Touhami, H., Abdennebi, N., Boukhemia, F., Hamladji, MR., et Lamara, D. (2014). Approche Epidémiologique de la Polyglobulie de Vaquez en Algérie: travail coopératif et multicentrique, à propos de 484 cas. Revue Algérienne d'hématologie, Septembre 2014, 8/9.
- Benjamin Fourneaux. Ciblage de la voie PI3K/mTOR dans les léiomyosarcomes : sensibilité et mécanismes de résistance. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2017. Français. ffnNT : 2017BORD0742ff. fftel-01885499f
- Benmoussa, A., Dehbi, H., Fehri, S., Quessar, A., et Nadifi, S. (2009). JAK2-V617F mutation in Moroccan patients with myeloproliferative disorders : Contributions, diagnosis and therapeutic prospects. Pathologie Biologie, 2780-2784.
- Boyer L, Travaglione S, faizano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A. (2004) Rac GTPase instructs nuclear factor-kappaB activation by conveying the \$CF complex and IlcBalpha to the ruffling membranes. Mol. Biol. Ceil. 3,1124-33.
- Brière J., Bellucci S. (2002). Groupe d'étude sur la thrombocytemie essentielle. Résultats de l'enquete nationale sur les thrombocytemies essentielles. Congrès de la société Française d'Hématologie.

- Bruchova, H., Yoon, D., Agarwal, A.M., Swierczek, S., and Prchal, J.T. (2009). Erythropoiesis in polycythemia vera is hyper-proliferative and has accelerated maturation. *Blood Cells Mol Dis* 43, 81-87.

C

- Cho, Y.U., Chi, H.S., Lee, E.H., Jang, S., Park, C.J., and Seo, E.J. (2009). Comparison of clinicopathologic findings according to JAK2 V617F mutation in patients with essential thrombocythemia. *International journal of hematology*, 89 (1), 39-44.
- Chomel J. -C., N. Sorel, C. Mayeur-Rousse, A.G. Turhan. April, 2009. Les Syndromes Myéloprolifératifs. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 24, 69-85.
- Cortelazzo, S., Viero, P., Finazzi, G., D'Emilio, A., Rodeghiero, F., Barbui, T. Incidence and Risk factors for Thrombotic Complications in a Historical cohort of 100 patients with Essential Thrombocythemia. *J. Clin Oncol* 1990; 8: 556-620.

D

- Djouadi, K. (2009). Approche Epidémiologique de la Thrombocytémie Essentielle en Algérie à propos de 187. Travail coopératif et multicentrique. *Revue Algérienne d'hématologie*. Septembre (1), 16-19.
- Dupont, S., Masse, A., James, C., Teyssandier, I., Lecluse, Y., Larbret, F., Ugo, V., Saulnier, P., Koscielny, S., Le Couedic, J.P., et al. (2007). The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* 110, 1013-1021.
- Dupriez, B., Demory, JL., Martyré, MC., Bilhou-Nabera, C., Le Bousse-Kerdilés, MC., Praloran, V. Métaplasie Myéloïde Primitive avec Myélofibrose. In: *Hématologie*, 13011. *Encycl. Méd. Chir. Paris: Elsevier*, 13-011-B60, 2001, 12p.
- Dupuy, E (1996). Stratégies Thérapeutiques et prophylaxie des complications Thrombotiques dans la Thrombocytémie Essentielle. *John libbey eurotext*, 3 (8), 170-175.

E

- Emilie-Fleur, G. Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives. Thèse de doctorat en ligne. Université Toulouse III Paul Sabatier (2011), 141.

G

- Garcon, L., Rivat, C., James, C., Lacout, C., Camara-Clayette, V., Ugo, V., Lecluse, Y., Bennaceur-Griscelli, A., and Vainchenker, W. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 108, (2006), 1551-1554.
- Gautier.(2011). Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives. Obtention de doctorat de l'université de toulouse III paul sabatier.
- Gelebart .Pascal., Michal Opas ., Marek Michalak .(2005). Molecules in focus Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum
- Geest .R and Paul J. Coffey. (2009). MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis.
- Ginzburg Yelena Z., Maria Feola., Eran Zimran.,Judit Varkonyi., Tomas Ganz.,Ronald Hoffman. (2018). Dysregulated iron metabolism in polycythemia vera: etiology and consequences
- Godon, A, Dib M, Geneviève F, Ifrah N, Zandecki M. Découverte de blastes sanguins au décours de la Polyglobulie de Vaquez. *Ann Biol Clin.* 2002; 60: 701-706
- Gong Jerald Z., James R. Cook., Timothy C. Greiner., Cyrus Hedvat.,Charles E. Hill., Megan S. Lim., Janina A. Longtine., Daniel Sabath and Y. Lynn Wang. (2013). Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms A Report of the Association for Molecular Pathology
- Griesshammer, M., Bangerter, M., Sauer, T et al (1999). Aetiology and Clinical Significance of Thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J. Intern Med*, 245 (3), 295-300
- Guillemette FOUQUET. (2018). Pratiques courantes diagnostiques et thérapeutiques dans la Polyglobulie de Vaquez et la Thrombocytémie Essentielle Enquête auprès de 120 praticiens.université de Lille 2 faculté de médecine HENRI WAREMBOURG.

H

- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70
- Harieche, F., Abdennebi, N., Boukhemia, F., Zerhouni, F., et Hamladji, RM. (2014). Identification de la mutation JAK2 V617F dans les syndromes myéloprolifératifid chroniques. *Revue Algérienne d'hématologie* ; 8-9 : 55-58.

I

- Ihle, J. N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F. W., and Shimoda, K.. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells* 15 Suppl 1, (1997), 105-111; discussion 112.

J

- James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med.* 2005; 11: 546–554.
- James C, Delhommeau F, Marzac C, et al. Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 2006 ; 20 : 350-3 (epub 2005/12/13).
- Johansson, P., Kutti, J., Andreasson, B., Safai-Kutti, S., Vilen, L., Wedel, H., et Ridell, B. (2004). Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *Journal of internal medicine*, 256 (2), 161-165.
- Jonas larson et al (2005). *Molecular medicine and gene therapy.*

K

- Kile, BT., Alexander, WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58, (2001), 1627-35.
- Kiladjian, J.J (2012). The spectrum of JAK2-positive myeloproliferative neoplasms. *ASH Education Program Book*, 2012 (1), 561-566.
- Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2002;30:229—36.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., et Skoda, R.C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*, 352 (17), 1779-1790.
- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:1377—80

L

- Laabyech.A. (2013). La mutation JAK2V617F : techniques de recherche et applications université Mohamed V-souissi – Rabat. These n° 78.

- Lachhab, A. (2012). Néoplasies Myéloprolifératives BCR-ABL négatif: avancées actuelles, Thèse PhD. (Pharmacie), Université Mohammed V-Souissi Faculté de Médecine et Pharmacie Rabat, 62.
- Lamar, E (2014). Recherche des Mutations de MPL dans les Syndromes Myéloprolifératifs: étude rétrospective multicentrique des analyses effectuées au CHU de Brest, Thèse PhD. (Pharmacie), Université de Nantes, 77.
- Lefrère F. (2008). Splénomégalie myéloïde (myéloïfibrose primitive). In Hématologie et transfusion. Estem, Paris, 157-164.
- Leonard WJ, O'Shea JJ. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 293-322.
- Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, et al. X inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107: 4139—41.
- Levy .E and J.E.Darnell Jr. (2002).STATS : transcriptional control and biological impact.
- Li, W.X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18, (2008), 545-551.
- Lukasova, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Kjeronska, J., Ryznar, L., Horakova, J., Krahlucova, E., and Horneck, G. (1997).
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, WP., Lee, S., Roberts, TM., et al. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 17, (1997), 1562–71.

M

- Mahfoudhi E, Secardin L, Scourzic L, Bernard O, Vainchenker W, Plo I. [Properties and biological roles of TET proteins during embryogenesis and in hematopoiesis]. *Medecine sciences : M/S.* 2015;31(3):268-74.
- Mahon F.X., "Chronic Myelogenous Leukemic and Tyrosine Kinase inhibitors." *REV MED IN*, 22(9), 2001.
- Mamdooh, G., Fatin, A.S., Farid, A., Abdul Ali, P., Adel, A., Lubna, S.M., et Ghazi, D. (2012). JAK2 Mutations in Chronic Myeloproliferative Neoplasms; Towards the Application of Personalized Treatment for Saudi Patients. *Open Journal of Blood Diseases*, 2012.

- MARRAS, S. A. E., F. R. KRAMER, and S. TYAGI. 2002. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* 30. myeloproliferative disorders." *Lancet* 365(9464): 1054- 61.
- Maude Tetu, Kenza El Hachami et Caroline Marty. (2019). *Médecine/Sciences* 35 (11), 901-903.
- Mehta, J., Wang, H., Iqbal, S.U., et Mesa, R. (2014). Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leukemia et Lymphoma*, 55 (3), 595-600.
- Mondet J, Park JH, Menard A, Marzac C, Carillo S, Pourcelot E, et al. Endogenous megakaryocytic colonies underline association between megakaryocytes and calreticulin mutations in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2015;100(5):e176-8
- Monnereau, A., Remontet, L., Maynadié, M., Binde-Foucard, F., Belot, A., Troussard, X., et Bossard, N., (2013). Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Etude à partir des registres du réseau Francim. *Partie*.
- Monte-Mor, B.D.C.R., Cunha, A.F.D., Pagnano, K.B.B., Saad, S.T., Lorand-Metze, I., et Costa, F.F. (2007), JAK2 V617F prevalence in Brazilian patients with polycythemia vera, idiopathic myelofibrosis and essential thrombocythemia *Genetics and Molecular Biology*, 30 2), 336-338.
- Mosca M, Vertenoel G, Toppaldoddi KR, Plo I, Vainchenker W. Aspects biologiques de la voie JAK/STAT dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques négatifs pour BCR-ABL. *Bulletin du cancer*. 2016;103(6 Suppl 1):S16-28
- Moulard, O., Mehta, J., Fryzek, J., Olivares, R., Iqbal, U., et Mesa, R.A. (2014). Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia and polycythemia vera in the European Union. *European journal of haematology*, 92 (4), 289-297.

N

- Najmi.I. (2015). Mutation JAK2 dans les hémopathies malignes au chu Hassan II de Fes (à propos 27 cas) université Sidi Mohamed ben Abdellah faculté de médecine et de pharmacie pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie. thèse n° : 055 /15.

O

- Osca-Gelis, G., Puig-Vives, M., Saez, M., Gallardo, D., Lloveres, N., et Marcos-Gragera, R. (2013). Population-based incidence of myeloid malignancies: fifteen years of epidemiological data in the province of Girona, Spain, *haematologica*, 98 (8), e95-e97.
- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Celi*. 109, S121-Si 31.

- O'Shea JJ, Kanno Y, Chen X, Levy DE. (2005) Cell signalling. Stat acetylation —a key facet of cytokine signalling? *Science*. 307, 2 17-8.

P

- Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472—6.
- Passegue, E., C. H. Jamieson, et al. (2003). "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11842-9.
- Phekoo, K.J., Richards, M.A., Moller, H., Schey, S.A., et South Thames Haematology Specialist Committee (2006). The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica*, 91 (10), 1400-1404.
- Pike, Kelly, Michel L. Tremblay.(2016). TC-PTP and PTP1B: Regulating JAK–STAT signaling, controlling lymphoid malignancies
- 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.
- Poitras Elyse et Alain Houde. (2002). *La PCR en temps réel: principes et applications*.
- Poopak. B, G Khosravipoor, F Sheikhsofla, S Rabieipoor, N Safari, S Khalili. (2015). Evaluation of therapy response in Iranian CML patients using quantitative PCR according to ELN guideline 2013. *Payvand Clinical and Specialty Laboratory*.

Q

- Quintas-cardama, A., et Verstovsek, S. (2013). Molecular pathways : JAK /STAT pathway :mutation, inhibitors, and resistance. *clinical cancer research* 19(8), 1933-1940.

R

- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 8):1281-3.
- Reid, M.M., Saunders, P.W., et Kernahan, J. (1988). Myeloproliferative disease in children: a demographic study. *Journal of clinical pathology*, 41 (8), 883-885.
- Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15,(2005) , 146-155.

- Rohrbacher, M., Berger, U., Hochhaus, A., Metzgeroth, G., Adam, K., Lahaye, T., et Hehlmann, R. (2009). Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany, *Leukemia*, 23 (3), 602.

S

- Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 20, (2000), 3387–3395.
- Sanz A, Ungureanu D, Pekkala T, Ruijtenbeek R, Touw IP, et al. (2011) Analysis of Jak2 Catalytic Function by Peptide Microarrays: The Role of the JH2 Domain and V617F Mutation. *PLoS ONE* 6(4): e18522. doi:10.1371/journal.pone.0018522
- Schindler CW. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest* 2002;109:1133—7.
- Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, Todd T, Stephens P, Eddins S, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106:2920—1.
- - Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006;108:2435—7.
- SHERRILL, C. B., D. J. MARSHALL, M. J. MOSER, C. A. LARSEN, L. DAUDE-SNOW, and J. R. PRUDENT. 2004. Nucleic acid analysis using an expanded genetic alphabet to quench fluorescence. *Journal of the American Chemical Society* 126: 4550-4556. signalling causes polycythaemia vera." *Nature* 434(7037): 1144-8.
- Speletas, M., Katodritou, E., Daiou, C., Mandala, E., Papadakis, E., Kioumi, A., et Korantzis, I. (2007). Correlations of JAK2 V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders. *Leukemia research*, 31 (8), 1053-1062.
- Staerk ,J., Kallin, A., Demoulin, JB., Vainchenker, W., Constantinescu SN. JAK1 and TYK2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross talk with IGF1 receptor. *J Biol Chem* 280, (2005) , 41893–9.
- Straek.J., Kallin,A., Royer,Y., Diaconu, C., Dusta,A., Demoulin,J. (2007). JAK2,The JAK2V617F mutant and cytokine receptor. *Pathologie bilogie*,55(2) 88-91.
- Stephanou, A., and Latchman, D.S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, (2005) , 177-182.
- Suksomyos, N., Chanprasert, S., Maunpasitporn, C., et Rojnuckarin, P. (2012). Prevalence of JAK2 V617F mutation and its clinical correlation in thais with myeloproliferative neoplasm

T

- Tefferi, A., et Vardiman, J.W. (2008). Classification and Diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, 22 (1), 14-22.
- Tefferi A, Lim KH, Levine R. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*. 2009;361(11):1117; author reply -8
- Teofili, L., F. Giona et al., (2010). "Hereditary Thrombocytosis caused by MPL Ser 505 Asn is associated with a high risk, splenomegaly and progression to bone marrow fibrosis." *Haematologica* 95 (1): 65-70.
- Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008;111:3931—40.
- Titmarsh, G.J., Duncombe, A.S., McMullin, M.F., O'Rorke, M., Mesa, R., Vocht, F., et Anderson, L.A. (2014). How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hematology*, 89 (6), 581-587.
- Trama, A., Mallon, S., F., Capocaccia, R., et Gatta, G. (2012). The burden of rare cancers in Italy : the surveillance of rare cancers in Italy (RITA) project. *Tumori*, 98 (5) 550-8.

V

- Vainchenker, W., Dusa, A., and Constantinescu, S.N. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 19, (2008), 385-393.
- Valentino, L., and Pierre, J. (2006). JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 71, 713721.
- Varricchio. Lilian., Mario Falchi., Massimiliano Dall'Ora., Caterina De Benedittis., Alessandra Ruggeri., Vladimir N. Uversky and Anna Rita Migliaccio. (2017). Calreticulin: Challenges Posed by the Intrinsically Disordered Nature of Calreticulin to the Study of its Function
- Visser, O., Trama, A., Maynadie, M., Stiller, C., Marcos-Gragera, R., De Angelis, R., et RARECARE Working Group. (2012). Incidence, survival and prevalence of myeloide malignancies in Europe. *European Journal of Cancer*, 48 (17), 3257-3266.

W

- Wernig, G., Gonneville, J.R., Crowley, B.J., Rodrigues, M.S., Reddy, M.M., Hudon, H.E., Walz, C., Reiter, A., Podar, K., Royer, Y., et al. (2008). The Jak2V617F oncogene associated

with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* 111, 3751-3759.

Annexes

Tableau 1 : Critères diagnostiques simplifiés des NMP classiques établis par l'OMS en 2016
(Alter et al., 2016)

TE	PV	MFP
CRITERE MAJEURS	CRITERES MAJEURS	CRITERES MAJEURS
<p>1. Nombre de plaquettes $\geq 450 \times 10^9 /L$</p> <p>2. Biopsie de la moelle osseuse indiquant la prolifération prédominante de la lignée mégacaryocytaire ainsi qu'une augmentation du nombre de gros mégacaryocytes matures hyperlobés. (La BMO est nécessaire, entre autres pour éliminer la MF)</p> <p>3. Ne pas satisfaire aux critères de l'OMS en matière d'anomalie moléculaire BCRABL1, de diagnostic de la LMC, de la PV, de la MF primaire, des SMD et d'autres néoplasies myéloïdes</p> <p>4. Présence d'une mutation JAK2, CALR ou MPL</p>	<p>1. Hb > 165 g/L (hommes), > 160 g/L (femmes) OU Hématocrite > 49 % (hommes), > 48 % (femmes) OU augmentation de la masse érythrocytaire*</p> <p>2. Biopsie de la moelle osseuse (pas faite d'emblée au Québec en PV) indiquant une hypercellularité anormale selon l'âge touchant les 3 lignées (panmyélose), y compris une prolifération érythroïde, granulocytaire et mégalocytaire nette présentant des mégacaryocytes polymorphes matures (différences de taille)</p> <p>3. Présence de la mutation JAK2V617F ou de celle de l'exon 12 de JAK2</p>	<p>1. Présence d'une prolifération mégacaryocytaire et d'atypie, accompagnées d'une fibrose réticulinique et/ou d'une fibrose collagène de grade 2 ou 3 (MO essentielle pour déterminer l'étendue de la fibrose)</p> <p>2. Ne pas satisfaire aux critères de l'OMS en matière de : TE, PV, LMC BCR-ABL1, syndromes myélodysplasiques ou d'autres néoplasies myéloïdes.</p> <p>3. Présence d'une mutation des gènes JAK2, CALR ou MPL, ou présence d'un autre marqueur clonal ou absence de MF réactive en l'absence de ces mutations.</p>
<p>CRITERES MINEURS</p> <p>Présence d'un marqueur clonal ou absence de données probantes indiquant une thrombocytose réactive (tx par certains médicaments, pathologies inflammatoires)</p>	<p>CRITERES MINEURS</p> <p>Taux d'érythropoïétine (une cytokine/hormone pour les précurseurs des érythrocytes dans la moelle osseuse (c'est un facteur de croissance)) sérique sous la normale (compensation rénale en produisant moins d'EPO)</p>	<p>CRITERES MINEURS</p> <p>Présence d'au moins un des symptômes suivants confirmée à deux reprises consécutives :</p> <ul style="list-style-type: none"> a. Anémie non attribuable à une comorbidité b. Leucocytose $\geq 11 \times 10^9 /L$ c. Splénomégalie palpable d. Augmentation du taux de LDH à une valeur supérieure aux limites normales de l'intervalle de référence institutionnel
<p>Exigences relatives au diagnostic : Satisfaire aux 4 critères majeurs OU aux 3 premiers critères majeurs ainsi qu'au critère mineur</p>	<p>Exigences relatives au diagnostic : Les 3 critères majeurs OU les 2 premiers critères majeurs et le critère mineur</p>	<p>Exigences relatives au diagnostic : Les trois critères majeurs et au moins 1 critère mineur</p>
	<p>*Plus de 25 % supérieure à la valeur théorique normale moyenne</p>	

1. Régulation de la voie JAK/STAT

Les trois classes de régulateurs négatifs les plus connues sont : les protéines SOCS (suppressor of cytokine signaling), PIAS (« Protein Inhibitor of Activated STAT ») et PTP (« Protein Tyrosine Phosphatases») (Najmi, 2015).

1.1 PTP (Protein Tyrosine Phosphatases) :

Les PTP peuvent, grâce à leur domaine SH2, se fixer directement sur les JAKs ou sur les récepteurs aux cytokines lorsqu'ils sont phosphorylés. Une fois recrutées, elles déphosphorylent JAK et ses substrats réduisant ainsi leur activité. Certaines PTP sont nucléaires et peuvent directement désactiver les STATs (Valentino et Pierre, 2006).

Les premières phosphatases identifiées comme régulant la voie JAK/STAT ont été les protéines de la famille SHP, SHP1 et SHP2 (SH2-domain containing phosphatases) (Laabyech, 2013). (figure 1)

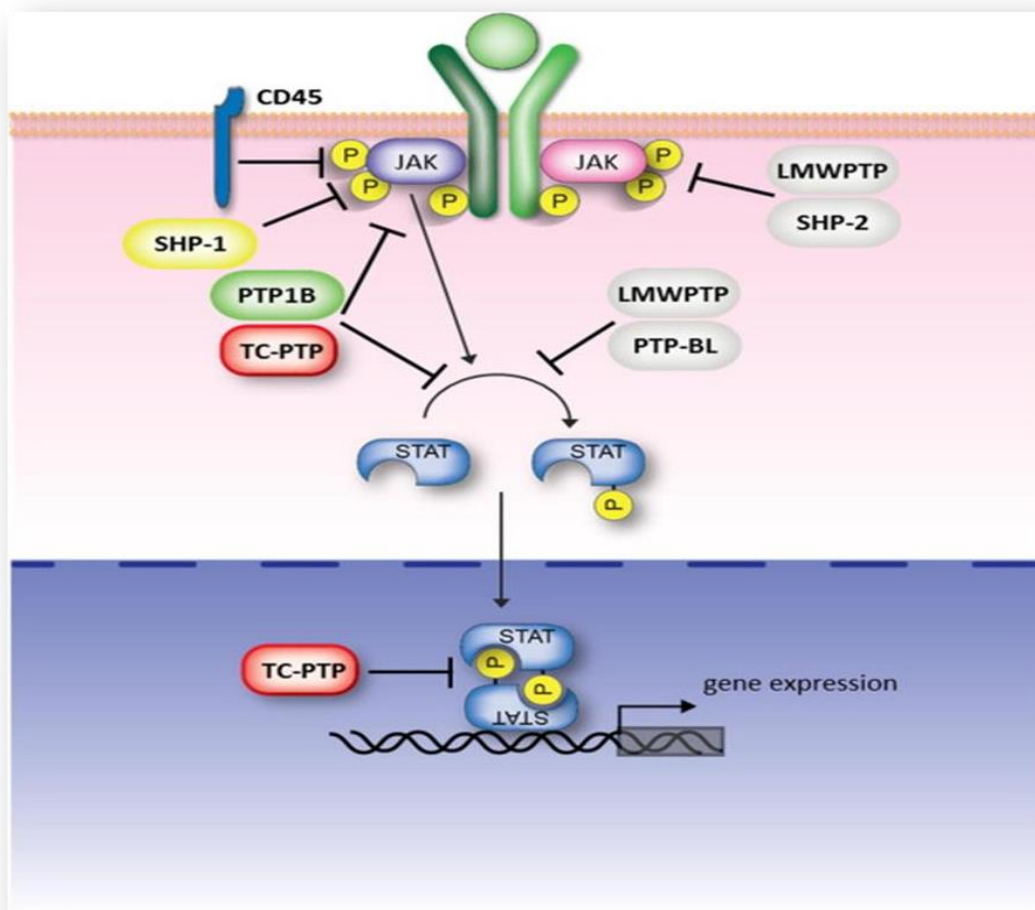


Figure 1: Régulation négative de la voie JAK/STAT par les phosphotyrosine phosphatases (Pike et Tremblay, 2016).

1.2 Les protéines SOCS (suppressor of cytokine signaling) :

Sont induites en réponse aux stimulations par de nombreuses cytokines et hormones dont les récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs de cytokines (**Laabyech, 2013**). La famille des SOCS comprend huit membres : SOCS1 à 7 et CIS issus de différents gènes. Ces protéines contiennent un domaine SH2 central flanqué d'un domaine N-terminal de taille variable et d'un domaine C-terminal conservé, de 40 acides aminés, appelé SOCS-box (**Kile et Alexander, 2001**). Les protéines de cette famille utilisent différents mécanismes pour exercer leur effet inhibiteur. (**figure 2**).

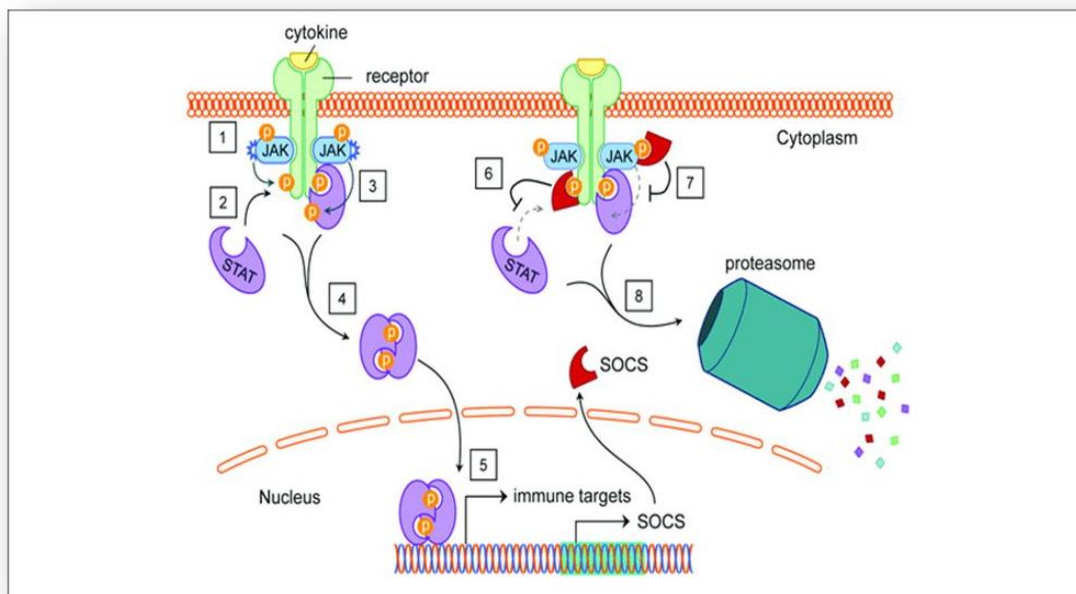


Figure 2: Régulation négative de la voie JAK / STAT par SOCS (**Alston et Dix ,2019**).

- (1) dimérisation des récepteurs transmembranaires apparentés .Cela amène les protéines JAK à proximité pour se phosphoryler entre elles et les résidus de tyrosine sur les récepteurs.
- (2) Protéines STAT amarré aux phosphotyrosines sur des sous-unités du récepteur.
- (3) JAKs activent STAT par phosphorylation.
- (4) STAT activées se détachent de leurs récepteurs se dimérisent et se transloquent vers le noyau.
- (5) STAT agissent comme des facteurs de transcription pour des dizaines de cibles, y compris le SOCS.
- (6) dans le cytoplasme, les protéines SOCS peuvent se lier à diverses phosphotyrosines sur les récepteurs, bloquant les STAT de leurs sites d'accueil.
- (7) Avec leur KIRdomaines, SOCS1 et SOCS3 peuvent inhiber l'activité kinase des protéines JAK, empêchant la phosphorylation des STATs.
- (8) SOCS boxes facilitent ubiquitination des protéines cibles liées au SOCS pour la dégradation par le protéasome.

1.3. Les PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) :

L'activité transcriptionnelle des STATs peut être aussi inhibée par des protéines inhibitrices des STATs activées appelées «PIAS». **Rawling et al.,2004)(figure 3).**

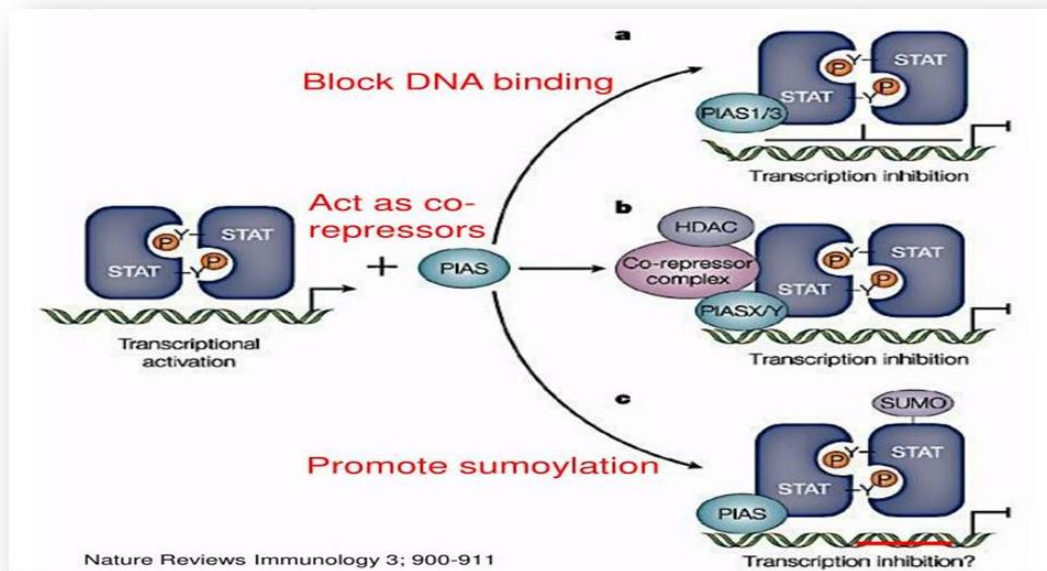


Figure 3: Mécanismes d'inhibition de la voie JAK /STAT par PIAS.(Ke et Bin, 2003)

a | PIAS1 et PIAS3 bloquent l'activité de liaison à l'ADN des dimères STAT.

b | PIASX et PIASY pourraient agir en tant que co-répresseurs transcriptionnels de STAT en recrutant d'autres protéines co-répressives telles que l'histone désacétylase (HDAC).

c | Les protéines PIAS peuvent favoriser la conjugaison de petits modificateurs liés à l'ubiquitine (SUMO) à STAT1

CHU ISSAD HASSANI-BENI MESSOUS

SERVICE D'IMMUNOLOGIE MEDICALE. Chef de service : Pr. DJIDIJIK. R

Unité d'immunogénétique- Dr Berkani.L

FICHE DE RENSEIGNEMENTS :**Detection de la mutation JAK2V617F par technique de PCR en temps réel**

Nom : prénom : Age : ...ans sexe : Service :

N° de téléphone : N° d'échantillon :

○ **Clinique :**

ATCD personnels :

Asthénie	Hépatomégalie	Durée d'évolution des symptômes :
Perte de poids	Splénomégalie	Type :
Fièvre	Thrombose(s)	Localisation :
Sueurs nocturnes		
Céphalées	Hémorragie(s)	Localisation :
Vertige	Sd de Budd Chiari	Localisation :
Troubles visuels	Erythrose	Localisation:
prurit	Erythromégalie	
Dyspnée	Autres :	
HTA		
Crise de goutte		

○ **Biologie :** priere de joindre a la presente demande une FNS récente (< 1 semaine).

Frottis sanguin :	LDH	
	Acide urique	
	Fer sérique	
Frottis médullaire :	Vit B12	
	Anomalie(s) du bilan de la coagulation	
Biopsie ostéomédullaire :	Bilan SAPL	
	Recherche du transcrit BCR-ABL	
	Autres :	

- **Traitement(s) :**
- **Modalités du prélèvement :** prière de prélever le sang total sur **deux tubes avec EDTA** le jour de la demande de l'examen.

Signature et cachet :



Figure 16 : spectrophotomètre Maestro-Nano (dosage d'ADN).



Figure 19 : Préparation de mélange réactionnel.



Figure 20 : Amplification.