

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Blida-1-

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie et de physiologie cellulaire



## MÉMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie

Option : **Génétique et Physiologie**

Thème :

**Intérêt de la recherche de la mutation v617f du gène JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs classiques.**

Présenté par : **HAMDAOUI Salah Eddine.**

Soutenue le : **29 Juin 2016.**

Devant le jury :

<b>Mme ANANEAssia</b>	MCA	USBD-1-	Présidente
<b>Mme CherrallahAmira</b>	MCB	USDB-1-	Examinatrice
<b>Mr DJIDJIK Reda</b>	Professeur	CHU Beni-Messous	Promoteur
<b>Mme Guessaibia Nadia</b>	MCB	USDB-1-	Co-promoteur

2015-2016

# Remerciement

Avant tout, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir accordé la force et la patience, la santé et le courage pour compléter ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance au Professeur DJIDJIK Réda chef du service d'immunologie médicale (CHU Béni Messous) pour avoir mis à ma disposition tous le matériel et produits, à Mme GUESSAIBIA Nadia, ainsi que Dr BERKANI Meriem pour leur disponibilité et conseils et surtout la confiance qu'ils m'ont accordé qui m'a permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme ANANE maitre-assistant à l'Université de Blida-1-d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme CHERRALLAH Amira Docteur à l'université de Blida-1-, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens à exprimer également mes profondes reconnaissances à l'ensemble des enseignants surtout Mr MOHAMED SAID Ramdhane qui ont contribué à ma formation.

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste mémoire à mes chers parents : HAMDAOUL Mohamed et ZORRANOU Djamilia, qui ont veillé sur moi et surtout, soutenu depuis toujours, à mes grands-parents que Dieu les fasse rejoindre à son vaste paradis, ma grand-mère BELAHOUD Aicha; que Dieu la protège; mes tantes, mes cousins et cousines, ainsi que mes sœurs, mon frère et à tous les membres des familles HAMDAOUL, ZORRANOU.*

*Je dédie ce mémoire aussi aux personnes qui m'ont beaucoup aidé et encouragé durant mes études, surtout mes chers amis KESSOULOU Imad, TAHERAOUL Aymen, Guillaud Abdelkader et à toute la promotion de Génétique et physiologie 2015/2016 de l'université SAAO DAHLBO Slida-1.*

*Salah-Edine*

## **RESUME**

La Janus kinase 2 (JAK2) est une protéine de type tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire.

La mutation JAK2 V617F associée aux syndromes myéloprolifératifs a été décrite comme un événement génétique fréquent chez la majorité des patients atteints de la polyglobulie de Vaquez (90%), de la thrombocythémie essentielle (50%) et de la myélofibrose idiopathique (50%). Cette mutation est caractérisée par un changement d'un nucléotide (un G pour un T) sur l'exon 14 du gène JAK2 situé sur le chromosome 9, locus 9p24.1, conduisant à une substitution de la valine en phénylalanine en position d'acide aminé 617 de la protéine JAK2.

Dans ce travail nous avons recherché la mutation JAK2 V617F, chez 100 patients chez lesquels un syndrome myéloprolifératif classique a été suspecté, et ce par la technique de PCR en temps réel (technologie Taqman). L'objectif principal est d'établir la prévalence de cette mutation dans les différents syndromes myéloprolifératifs classiques et recherché une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques.

La mutation JAK2 V617F a été retrouvée chez 42% des PV, 45% des TE, et 43% des MFP. Ces résultats en plus de ceux de la littérature confirment l'importance de cette mutation dans la pathogénèse des syndromes myéloprolifératifs.

La découverte de ce marqueur a rapidement été prise en compte par l'OMS qui a considéré la positivité de la mutation JAK2 comme un critère majeur du diagnostic dans les syndromes myéloprolifératifs.

**Mots Clés : Protéine jak2-JAK2 V617F - Syndromes myéloprolifératifs.**

## **Abstract**

The Janus kinase 2 (JAK2) is a tyrosine kinase protein involved in several signaling pathways responsible mainly for the survival and cell proliferation.

The JAK2 V617F mutation associated with myeloproliferative disorders has been described as a common genetic event in the majority of patients with polycythemia Vera (90%) and essential thrombocythemia (50%) and idiopathic myelofibrosis (50%). This mutation is characterized by a change of a nucleotide (a T for a G) on the exon 14 of the gene JAK2 located on chromosome 9, locus 9p24.1, leading to a substitution of valine to phenylalanine in position of amino acid 617 of the protein JAK2.

In this work we looked for JAK2 V617F mutation, at 100 patients to whom a myeloproliferatif syndrome was suspected, we have used a real time PCR (Taqman technology) the main objective is to establish the prevalence of this mutation in different classic myeloprolifératifs disorders and sought an association between the presence of this mutation and certain clinical characteristics.

The JAK2 V617F mutation was founded in 42% of PV, 45% of TE, and 43% of MFP these results in addition to those in the literature confirm the importance of this mutation in the pathogenesis of myeloproliferative disorders.

The discovery of this marker was quickly taken into account by the WHO, which considered the positivity of the JAK2 as a major criterion for diagnosis

**Keywords : jak2Protein - JAK2 V617F –Myeloproliferativedisorders**

## ملخص

(JAK2) هو بروتين من عائلة تروزين كيناز, يشارك في عدة مسارات للإشارات المسؤولة أساسا عن بقاء وتكاثر الخلايا.

وصفت الطفرة JAK2v617F المرتبطة بأمراض التكاثر النقي كحدث وراثي شائع عند غالبية المرضى الذين يعانون من كثرة الحمر فيرا (90%), و كثرة الصفائح الأساسية (50%), و تليف النقي مجهول السبب (50%). و تتميز هذه الطفرة بتغير النوكليوتيدات من T الى G في القطعة الدالة 14 من مورثة JAK2, الواقعة على الصبغي رقم 9p24.19, مما يؤدي الى استبدال الحمض الأميني رقم 617 على مستوى البروتين من فالين الى فنيل الالين.

فمنا من خلال هذه الدراسة بالبحث عن هذه الطفرة عند 100 شخص يعانون من متلازمة التكاثر النقي عن طريق Real Time PCR, و الغاية من البحث هي مقارنة مدى انتشار هذه الطفرة عند مجموعتنا الدراسية مقارنة مع مجموعات أخرى, والتيتسعى الى ايجاد علاقة بين هذه الطفرة وبعض الخصائص السريرية.

تم العثور على طفرة JAK2v617F في 42% من حالات كثرة الحمر, 45% من حالات كثرة الصفائح الأساسية, و 43% من حالات تليف النقي مجهول السبب. هذه النتائج بالإضافة الى النتائج السابقة تؤكد على أهمية هذه الطفرة في التسبب في متلازمات التكاثر النقي.

تمأخذ اكتشاف هذه الطفرة بعين الاعتبار بسرعة من قبل منظمة الصحة العالمية, التي يتعتبر إيجابية الطفرة JAK2 كمعيار رئيسي في تشخيص متلازمات التكاثر النقي.

**الكلمات المفتاحية : البروتين jak2 - متلازمات التكاثر النقي- الطفرة JAK2 V617F**

## Liste des abréviations

- ARMS** :Système de Mutation Réfractaire par Amplification.
- AVC** : accident vasculaire cérébrale.
- BCL**: B-cell CLL/lymphoma 2.
- Bcl-XL**: BCL2-like 1.
- BCR–ABL**: Break Cluster Region-Abelson.
- BFU-E**: Burst Forming Unit – Erythroid.
- BOM** : biopsie ostéo-médullaire.
- CBL** : Casitas B lymphoma.
- CHU** : Centre hospitalo-universitaire.
- EHP** : établissement hospitalier publique.
- EHS** : établissement hospitalier spécialisé.
- DO** : densité optique.
- EGF**: epidermal growth factor.
- EPO**: érythropoïétine.
- EPO-R** : le récepteur à l'érythropoïétine.
- ERK**: Extracellular signal Regulated Signal.
- FERM**: Four-point one, Ezrin, Radixine, Moesin.
- Gab**: Grb2-associated binder.
- G-CSF-R** : récepteur du facteur de croissance granulocytaire.
- GM-CSF**: Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor.
- Grb2**: Growth factor receptor-bound protein 2.
- GSK3**: Glycogen synthase kinase 3.
- HP1**: Heterochromatin protein 1.
- HTA** : Hypertension artérielle.
- HTP** : Hypertension portal.
- HB** : Hémoglobine.
- dHPLC** : Chromatographie Liquide dénaturante à Haute Performance.
- HRM**: Hight Resolution Melting.
- IFN**: interféron.
- IGF** : Insuline Like Growth Factor.
- IL-R** : récepteur à l'interleukine.

**IRS:** Insulin Receptor Substrat.

**JAK:** Just an another kinase , JANUS KINASE.

**JH:** JAK Homology.

**JNKs:** c-Jun N-terminal Kinase.

**Jun:** oncogene JUN, alias AP1.

**KIR:** kinase inhibitory region.

**LAM :** Leucémie Aiguë Myéloïde.

**LMC :** Leucémies Myéloïde Chronique.

**LMMC :** Leucémie Myélomonocytaire Chronique.

**MAPK :** Mitogen Activated Protein Kinase.

**MEC :** Matrice Extra-Cellulaire.

**dNTP:** Deoxyribonucleotide triphosphate.

**NFS :** numération formule sanguine.

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé.

**PCR:** Polymerase Chain Reaction.

**PDK:** phosphatidylinositol -dependent kinase.

**PG :** Polyglobulie.

**PH:** Plextrin Homology.

**PIAS:** protein inhibitors of activated STAT.

**PI3K:** Phosphatidyl Inositol 3 Kinase.

**Pim-1:** Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase.

**PMF:** myélofibrose primitive.

**PNN:** Polynucleaire netrophile.

**PNE:** polynucleaire eosinophile.

**PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog.

**PTP:** Protein Tyrosine Phosphatases.

**PV:** polyglobulie de Vaquez.

**PVSG:** Polycythemia Vera Study Group.

**RARS-T:** Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis.

**RSK:** Ribosomal s6 kinase.

**SCF:** stem cell factor.

**SMD :** syndrome myélodysplasique.

**SHP :** SH2-domain containing Phosphatase.

**SMP :** syndromes myéloprolifératifs.

**SOCS:** suppressor of cytokine signaling.

**SPM:** splénomégalie.

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription.

**TC-PTP :** T cell protein tyrosine phosphatase.

**TE :** thrombocytémie essentielle.

**TET2:** Ten Eleven Translocation 2.

**mTORC:** mTOR complex 2.

**TPO:** Thrombopoïétine.

**TYK:** tyrosine Kinase.

**Tyr-P:** tyrosines phosphorylées.

**VEGF :** Vascular Endothelial Growth Factor.

**VGI :** volume globulaire isotopique.

---

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : les lignées hématopoïétiques.....	2
<b>Figure 2</b> : Structure de la protéine JAK2 .....	8
<b>Figure 3</b> :L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs à la cytokine.....	9
<b>Figure 4</b> : l'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK.....	11
<b>Figure 5</b> : Voie de signalisation JAK/STAT non canonique .....	14
<b>Figure 6</b> : Structure de JAK2 V617F .....	15
<b>Figure 7</b> :Variation frequency of JAK2 exon12, JAK 2 V 617F, MPL W515L/K and CALR exon 9 frame-shifting mutations. ....	23
<b>Figure 8</b> : graphique de répartition des patients selon le sexe .....	25
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique de la chimie de marquage TaqMan .....	31
<b>Figure 10</b> : A:Hydrolyse de sondes .....	32
<b>Figure 11</b> : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.....	33
<b>Figure 12</b> : Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle muté et non muté (réfèrent) AK2 par PCR en temps réel (Taqman).....	35

**Figure 13** : Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle muté et non muté (réfèrent) JAK2 par PCR en temps réel(Taqman).....36

**Figure 14** : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la PV de notre série avec les autres séries..... 42

**Figure 15** : Comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la TE de notre série avec les autres séries..... 44

**Figure 16** : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la MFP de notre série avec les autres séries..... 46

## Glossaire

**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 les plaquettes lors de la thrombocytopoïèse et les cellules de la lignée lymphoïde lors de la lymphopoïèse .

**Cellule souche multipotente** : des cellules souches multipotentes (cellules fœtales et adultes) capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires, comme les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse qui sont à l'origine des cellules sanguines (érythrocytes, monocytes, granulocytes...)

**Cyanose** : Coloration mauve ou bleutée de la peau due à la présence d'un taux anormalement élevé (supérieur à 50 grammes par litre de sang) d'hémoglobine non oxygénée dans les vaisseaux capillaires de la peau et qui prédomine sur les ongles et les lèvres.

**Dacryocyte** : est un terme issu du grec *dakuron*: larme et *kutos*: cellule Les dacryocytes sont des globules rouges en forme de larmes. Une prolifération de dacryocytes est appelée une "dacrycytose". Une dacrycytose se voit souvent dans les myélofibroses, les thalassémies et toute hématopoïèse extramédullaire.

**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.

**Glycoprotéine 130** : (également connu sous le gp130, IL6ST, IL6-bêta ou CD130) est une protéine transmembranaire qui est le membre fondateur de la classe de tous les récepteurs de cytokines . Elle forme une sous - unité du type I ,récepteur de cytokine au sein du récepteur de l' IL-6 famille

## Glossaire

**Hématopoïèse** : (du Grec αἷμα, αίματος : "le sang" et ποιεῖν : faire, fabriquer) désigne le processus physiologique de production des cellules sanguines ou bien éléments figurés du sang.

**Hypoxie** : désigne diminution des besoins tissulaires en oxygène et les apports. Elle peut être la conséquence de l'hypoxémie.

**La réticuline** : est une fibre des matrices extra-cellulaires, on la trouve en particulier dans les tissus hématopoïétiques, mais aussi dans le rein, le foie et les glandes endocrines. Elle mesure de 0.1 à 0.2 μm de diamètre et forme un réseau relativement fin autour des vaisseaux sanguins, autour des cellules musculaires, autour des cellules adipeuses ; et constitue la charpente de certains organes sur laquelle repose le parenchyme des organes. C'est le tout premier type de fibre produit au cours de l'histogenèse.

**Précurseurs** : cellules dérivant d'un progéniteur capable de se diviser et mûrissent

**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

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Critères OMS 2008 pour le diagnostic des SMP.....	6
<b>Tableau 2 :</b> principale anomalies chromosomiques communément retrouvées dans PV, MFP, et TE.....	20
<b>Tableau 3:</b> critères cliniques des patients .....	26
<b>Tableau 4 :</b> critères biologiques des tableaux.....	27
<b>Tableau 5:</b> Composition du mélange nécessaire à la détection de la mutation v617f.....	34
<b>Tableau 6 :</b> protocole d'amplification (jak2 v617f) .....	34
<b>Tableau 7 :</b> Comparaison des critères cliniques entre le groupe PV JAK2v617f positif et le groupe PV jak2v617f négatif .....	36
<b>Tableau 8:</b> Comparaison des critères biologiques entre le groupe PV JAK2v617f positif et le groupe PV jak2v617f négatif.....	36
<b>Tableau 9:</b> Comparaison des critères cliniques entre le groupe TE JAK2v617f positif et le groupe TE jak2v617f négatif .....	37
<b>Tableau 10 :</b> Comparaison des critères biologiques entre le groupe TE JAK2v617f positif et le groupe TE jak2v617f négatif .....	38
<b>Tableau 11:</b> Comparaison des critères cliniques entre le groupe MFP JAK2v617f positif et le groupe MFP jak2v617f négatif.....	38
<b>Tableau 12:</b> Comparaison des critères biologiques entre le groupe MFP JAK2v617f positif et le groupe MFPjak2v617 négatif.....	39
<b>Tableau 13:</b> Comparaison entre notre groupe d'étude PV et d'autres groupes.....	41
<b>Tableau 14:</b> Comparaison entre notre groupe d'étude TE et d'autres groupes.....	43
<b>Tableau 15:</b> Comparaison de notre groupe d'étude MFP avec d'autres groupes.....	45
<b>Tableau 16:</b> Comparaison des critères cliniques et biologiques des groupes JAK2 v617f positifs et négatifs.....	47

RESUME.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iiiv
GLOSSAIRE.....	iiiv
INTRODOCTION GENERALE.....	ix
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
I.1 Les syndromes myeloprolifératifs .....	2
I.1.1 L'hématopoïèse .....	2
I.1.2 Description générale.....	3
I.1.3 la Polyglobulie de Vaquez.....	3
I.1.3.1 Présentation clinique de la Polyglobulie de Vaquez.....	4
I.1.4 Thrombocythémie essentielle .....	5
I.1.5 Myélofibrose Primitive .....	5
I.2 JANUS KINASE (JAK2) .....	7
I.2.1 Définition : .....	7
I.2.1 Structure .....	7
I.2.3 Fonctions : .....	8
I.2.3.1 Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines : .....	9
I.2.3.2 La voie JAK/STAT canonique : .....	10
I.2.3.3 La voie PI3K/Akt : .....	11
I.2.3.4 La voie des MAPKs : .....	12
I.2.4 Les régulateurs négatifs.....	12
I.2.4.2 Les SOCS : .....	13
I.2.5 Les fonctions de jak2 dans la régulation épigénétique : .....	13
I.3 La mutation JAK2 V617F : .....	14

I.3.1 Description de la mutation JAK2 V617F.....	14
I.3.2 Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines :.....	15
I.3.3 La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique:.....	16
I.3.4 L'altération du rétrocontrôle négatif :.....	16
I.3.5 La régulation croisée du récepteur à l'IGF : .....	17
I.3.6 L'impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique :.....	17
I.3.7 JAK2 est l'événement initiateur de la PV .....	18
I.3.8 Une mutation — trois pathologies distinctes : .....	19
I.3.9 Pathogenèse JAK2 V617F : .....	19
I.3.10 Autres anomalies génétique présente dans les syndromes myéloprolifératifs classiques.....	21
I.3.10.1 Les mutations de MPL.....	21
I.3.10.2 Les mutations de LNK:.....	21
I.3.10.3 Les mutations de TET2,EZH et CALR.....	22
I.3.11 Détection de JAK2 V617F.....	23
CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES.....	24
II.1 Les Patients :.....	25
II.2 Critères cliniques et biologiques des patients :.....	26
II.2.1 Les Critères Cliniques.....	26
II.2.2 Les Critères Biologiques.....	27
II.3 Méthode : .....	28
II.3.1 Prélèvements.....	28
II.4 Extraction et dosage de l'ADN :.....	28
II.4.1 Extraction.....	28
II.4.2 Dosage de l'ADN .....	29
II.5 Recherche de la mutation par PCR en temps réel (real time PCR) .....	29
II.5.1 Chimies de marquages.....	29

II.5.1.1 Les sondes d'hydrolyses(Taqman) .....	29
II.5.1.2 Protocole opératoire : .....	33
II.5.1.3 Protocole d'amplification : .....	34
II.6 Analyse statistique : .....	34
CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION .....	35
III.1 Résultats .....	36
III.2 La discussion : .....	39
III.2.1 Première partie : .....	39
III.2.2 Deuxième partie .....	47
CONCLUSION .....	48
Références .....	50
Annexes .....	57

## Introduction générale

Les syndromes myéloprolifératifs (ou SMP) sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale des cellules myéloïdes (Chomel et al, 2009)

La première description de ces pathologies hématologiques a été faite par William Dameshek en 1951 (Dameshek 1951). Les principales pathologies regroupées dans les SMP sont la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocythémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP). La Leucémie Myéloïde Chronique se distingue des autres SMP par la présence d'une translocation tr 9-22, appelée chromosome de Philadelphie (Phi), résultant en la protéine de fusion BCR-ABL, ce qui la place à part des autres SMP. La Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocythémie Essentielle et la Myélofibrose idiopathique sont désignées SMPPhi- (négatif pour le chromosome Philadelphie). En 2005, plusieurs groupes ont mis en évidence la présence de la mutation commune V617F de la tyrosine kinase JAK2 dans la plupart de ces pathologies. Cette mutation est retrouvée dans environ 90% des PV, 50% des MFP et 70% des TE (Baxter, Scott et al); (James, Ugo et al. 2005); (Kralovics, Passamonti et al. 2005); (Levine, Wadleigh et al. 2005). Plus récemment d'autres mutations au niveau de l'exon 12 de JAK2 ont été décrites (Scott, Tong et al. 2007). Le pronostic le plus favorable est celui de la TE, le plus mauvais étant celui de la MFP. La TE peut évoluer en PV, ces deux pathologies peuvent également évoluer en myélofibrose. Enfin, chacun de ces trois syndromes myéloprolifératifs peut se transformer en leucémie aigüe myéloïde.

Notre travail a été effectué sur 100 patients suspectés avoir un syndrome myéloprolifératif classique dans le but de chercher des liens entre la présence de mutations jak2 v617f et les différents critères cliniques et biologiques présentés par les patients.

CHAPITRE I :  
SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I : Etudes bibliographique

### I.1 LES SYNDROMES MYELOPROLIFERTIFS

#### I.1.1 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui conduit à la génération continue et régulée des cellules sanguines matures à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) dans un microenvironnement spécifique. C'est un processus complexe qui a lieu dans le thymus. Il y a deux grandes lignées de cellules hématopoïétique : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (lymphocytes). la lignée lymphoïde comprend les lymphocytes (Tet B)et les NK, La lignée myéloïde comprend la lignée granuleuse (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles), et la lignés mégacaryocytaire (plaquettes). au sein du thymus .les csh qui correspondent à une population très minoritaire, sont multipotentes et capables d'auto-renouvellement.

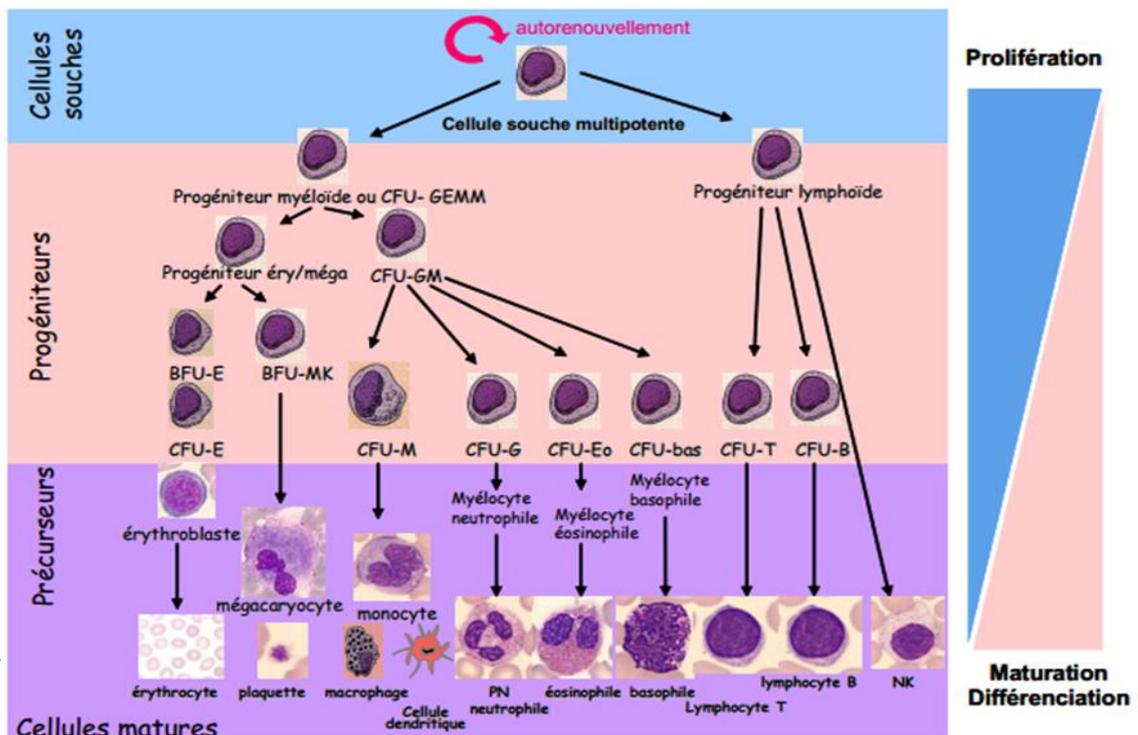


Figure.1-Les lignées hématopoïétiques.(Boissinot, 2008).

### I.1.2 Description générale

En 1951, **William Dameshek** fut le premier à décrire les syndromes myéloprolifératifs (SMP). En se basant sur des similarités phénotypiques de myéloprolifération il regroupa: la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP) (**Dameshek, 1951**).

Par la suite, une anomalie cytogénétique due à une translocation [t(9;22)(q34;q11)] ,dont résulte la protéine de fusion BCR-ABL (une tyrosine kinase constitutivement active et présente chez 100% des patients ), a permis de séparer les SMP en deux catégories :

- Les SMP Phi+, ou positifs pour le chromosome de Philadelphie : il s'agit de la LMC.
- Les SMP Phi-, ou négatifs pour le chromosome de Philadelphie : y sont classés la PV, la TE et la MFP.

Les SMP Phi- sont caractérisés par une prolifération clonale et une accumulation de cellules myéloïdes matures de la lignée érythrocytaire, granulocytaire, thrombocytaire ainsi que par le développement d'une fibrose ostéo-médullaire. En 2005, une mutation sur le gène codant pour la tyrosine kinase JAK2 a été mise en évidence. Cette mutation entraîne un changement d'acide aminé, d'une valine pour une phénylalanine, en position 617 (V617F) dans la protéine JAK2. Cette mutation est retrouvée dans environ 95% des cas de PV, 60% des TE et 50% des MFP .D'autres marqueurs génétiques ont récemment été identifiés et feront l'objet du paragraphe "Génétique des SMP". Parmi les SMP Phi-, la TE présente le meilleur pronostic, le plus mauvais étant celui de la MFP. De plus la TE peut évoluer en PV, qui peuvent toutes deux évoluer en MFP. Il est également à noter que ces trois syndromes peuvent se transformer en Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM).(**Cleytay,2010**).

### I.1.3 La Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez (PV) est le premier des SMP à avoir été reconnu comme une entité clinique. Hyprocrate avait déjà décrit quelques cas, mais c'est Luis Henri Vaquez, en 1892 qui publia le premier une description détaillée d'un patient dont il nomma la pathologie « cyanose avec hyperglobulie persistante »(**Vaquez, 1892; Skoda, 2007**). Plus

tard, **William Osler** rapporta quatre autres cas de patients souffrant de « vraie polyglobulie», en opposition avec les polyglobulies dues à l'hémoconstriction (**Osler, 1903; Osler,1908**). Depuis, les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis de mieux caractériser la PV. La PV est une maladie clonale, acquise, caractérisée par une augmentation de la prolifération de la lignée érythrocytaire principalement mais également des lignées granulocytaires et mégacaryocytaire. La PV se différencie des polyglobulies dites secondaires ou réactionnelles par l'absence d'hypoxie ou d'hyperproduction d'érythropoïétine (cardiaque ou respiratoire) Le diagnostic de la PV se fait sur des critères majeurs et mineurs dont le détail est présenté dans le Tableau 1. Globalement, ils comprennent l'élévation de l'hématocrite et de l'hémoglobine, la présence de la mutation JAK2V617F ou d'autres mutations de JAK2 (exon 12), un taux d'érythropoïétine sérique normal ou bas et enfin, une pousse endogène des progéniteurs en culture in vitro en l'absence de cytokines. Les patients atteints de PV sont généralement âgés (>60 ans).

De nombreux progéniteurs hématopoïétiques CD34+ sont présents dans le sang des patients, ce qui indique un changement de compartiment des cellules souches de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Ce phénomène conduit à une installation des progéniteurs dans la rate et ainsi à une splénomégalie.(**Boissinot, 2008**).

### **I.1.3.1 Présentation clinique de la Polyglobulie de Vaquez**

Les critères diagnostics des SMP sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Tableau 1**), la présence de la mutation V617F de JAK2 découverte en 2005 (**Baxter, Scott et al; James, Ugo et al, 2005; Kralovics, Passamonti et al, 2005; Levine, Wadleigh et al, 2005**) et les mutations de l'exon 12 de JAK2 font maintenant partie des critères majeurs de diagnostic de la PV (**Scott, Tong et al, 2007**). Dans certains cas, les patients développent une splénomégalie résultant d'une hématopoïèse extramédullaire, l'apparition d'un prurit est également courante. Les complications les plus fréquentes sont des thromboses, des hémorragies et dans moins de 10% des cas, on observe une transformation en leucémie aigüe myéloïde .(**Boissinot, 2008**).

### **I.1.4 Thrombocythémie Essentielle**

Les patients atteints de thrombocythémie essentielle (TE) présentent un taux de plaquettes très élevé souvent accompagné d'une élévation du taux de granulocytes. Les mégacaryocytes sont géants et ont des lobulations de noyaux atypiques. Le diagnostic de la TE est basé essentiellement sur des critères d'exclusion. Exclusion, tout d'abord, des critères des autres SMP (PV et MFP), et exclusion des causes de thrombocytose réactionnelle (**Tableau 1**). Les critères d'inclusion sont donc l'élévation du taux de plaquettes, la présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur clonal, prolifération de mégacaryocytes matures (**Tableau 1**). Les patients atteints de TE sont généralement des adultes mais on trouve aussi des cas de TE chez les enfants. Les complications courantes sont des accidents thrombotiques. (**Boissinot, 2008**).

### **I.1.5 Myélofibrose Primitive**

La myélofibrose primitive (MFP) appelée aussi myélofibrose idiopathique est caractérisée par une prolifération excessive de la lignée myéloïde associée à un envahissement progressif de la moelle osseuse par du tissu fibreux avec apparition d'une hématopoïèse extramédullaire, d'une splénomégalie et d'une anémie. Son incidence est de 0,5 à 1,3/100 000 habitants par an. L'âge moyen au moment du diagnostic se situe entre 60 et 65 ans. La MFP peut être la conséquence de l'évolution d'une MV ou d'une TE. Les risques majeurs de la maladie sont l'évolution en LAM et l'insuffisance médullaire. Dans la MFP, les progéniteurs érythroïdes sont également capables de former des CEE. La pousse spontanée des CFU-MK a également été mise en évidence dans cette pathologie (**Adams et al, 1988**).

**Tableau.1-Critères OMS 2008 pour le diagnostic des SMP, d'après (Tefferi, 2009).**

<b>Critères diagnostiques OMS 2008</b>			
	<b>Polyglobulie de Vaquez</b>	<b>Thrombocytémie Essentielle</b>	<b>MyéloFibrose Primitive</b>
<b>Critères Majeurs</b>	<b>1-</b> Hb >18,5 g/dL (♂) > 16,5 g/dL (♀) <i>Ou</i> Hb >17 g/dL (♂) > 15 g/dL (♀) si associé à une augmentation ≥2g/L de la valeur basale qui ne peut être attribuée à une correction d'une déficience en fer ou Augmentation ≥ 25% de la masse globulaire p/r à la moyenne <i>Ou</i> Taux d'Hb ou Hct > 99% à la gamme de référence	<b>1-</b> Taux de plaquettes ≥450.109/L	<b>1-</b> Prolifération mégacaryocytaire atypique associée à une fibrose réticulinique et/ou collagénique <i>Ou</i> En absence de fibrose réticulinique, la prolifération mégacaryocytaire atypique doit être associée à une augmentation de la cellularité médullaire, d'une prolifération granulocytaire et fréquemment d'une baisse de l'érythropoïèse (i.e. MFP pré-fibrotique)
	<b>2-</b> Présence de JAK2V617F (ou mutations similaires)	<b>2-</b> Prolifération de mégacaryocytes de grande taille morphologiquement matures. Peu, ou pas, de prolifération érythroïde ou granulocytaire	<b>2-</b> Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, les SMD et les autres SMP
<b>Critères Mineurs</b>	<b>1-</b> Prolifération des 3 lignées myéloïdes dans la moelle osseuse <b>2-</b> Taux d'Epo sérique inférieur à la normale <b>3-</b> Pousse de CEE	<b>3-</b> Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, la MFP, les SMD et les autres SMP	<b>3-</b> Présence de JAK2V617F <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve de fibrose ostéo-médullaire réactionnelle
		<b>4-</b> Présence de JAK2V617F <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve d'une thrombocytose réactionnelle	<b>1-</b> Leuco-érythroblastose <b>2-</b> Augmentation du taux de LDH sérique <b>3-</b> Anémie <b>4-</b> Splénomégalie palpable

## I.2 JANUS KINASE (JAK2)

### I.2.1 Définition

La protéine JAK2 est une (protéine à fonction tyrosine kinase ) dont le gène est localisé en 9p24 (**Streak et al ,2007**) . fait partie de la sous-famille des protéines JAK (pour Janus Kinase)qui sont des molécules de signalisation intracellulaire non réceptrices. Cette sous-famille est impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables notamment de la survie et de la prolifération cellulaire (**Schindler et al,2002**). JAK2 peut se fixer à des récepteurs de facteur de croissance homodimériques comme le récepteur à l'érythropoïétine (EPO-R), le récepteur à la thrombopoïétine (TPO-R ou MPL), le récepteur du facteur de croissance granulocytaire (G-CSF-R) ou hétérodimériques comme le récepteur à l'interleukine 3 (IL3-R) ( **Parganas et al , 1998**).

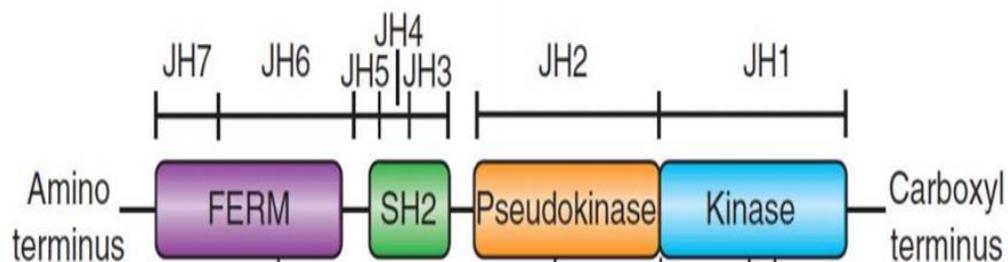
### I.2.2 structure

La tyrosine kinase (JAK2) appartient à la famille des Janus des tyrosines kinases appelées janus kinases, qui comprend également TYK2, JAK1 et JAK3.C'est une protéine cytosolique d'environ 130 kDa. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et est fortement conservée entre les espèces. Semblable aux autres JAKs, La protéine JAK2 comporte plusieurs domaines fonctionnels essentiels à son activité appelés JAK homologie (JH) de JH1 à JH7 .(**Lucet et al , 2006**) (**figure 1**) :

- **Le domaine JH1:** c'est le domaine catalytique. Il contient les résidus aminés tyrosine conservés et impliqués dans l'auto-régulation de l'activité kinase. La phosphorylation de ces tyrosines est nécessaire à l'activation de JAK1, JAK2 et TYK2.

-**Le domaine JH2 :** c'est le domaine pseudo-kinase. Il ne possède pas d'activité catalytique propre mais il est néanmoins nécessaire à la fonction catalytique des JAKs (Arora et al ;2003). En absence du domaine JH2, l'activité kinase des JAKs est fortement augmentée (Cargnello et al ;2011). Ces observations supposent donc un rôle inhibiteur du domaine JH2. D'autre part, le domaine JH2 de JAK1, JAK2 et JAK3 s'associe avec les facteurs de transcription de la famille STATs (**Hilkens et al ; 2001**).

- **Les domaines JH3 à JH7** : forment le domaine N-terminal et sont impliqués dans l'association des JAKs aux récepteurs des cytokines. Ils permettent aussi le recrutement d'autres substrats. Les domaines JH4 à JH7 forment un motif FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin). Ces motifs sont impliqués dans des interactions protéine/protéine et notamment dans les interactions avec les récepteurs (**Machida, and Mayer, 2005**). Ce motif semble ainsi être impliqué dans l'interaction entre JAK1 et la chaîne gp130 de certains récepteurs de cytokines tels que le récepteur à l'interleukine 6(IL6-R) (**Hebenstreit et al ; 2006**).



**Figure.2-Structure de la protéine JAK2 (Emilie-Fleur et al ;2011).**

La moitié carboxy-terminale de la protéine est composée de JH1 et JH2, régions qui codent respectivement pour les domaines kinase et pseudo-kinase. La moitié amino-terminale de JAK2 contient les domaines de JH3 à JH7. Le domaine N-terminal et surtout les résidus 32-58 du domaine JH7 sont indispensables à la fixation de JAK2 à l'EpoR.

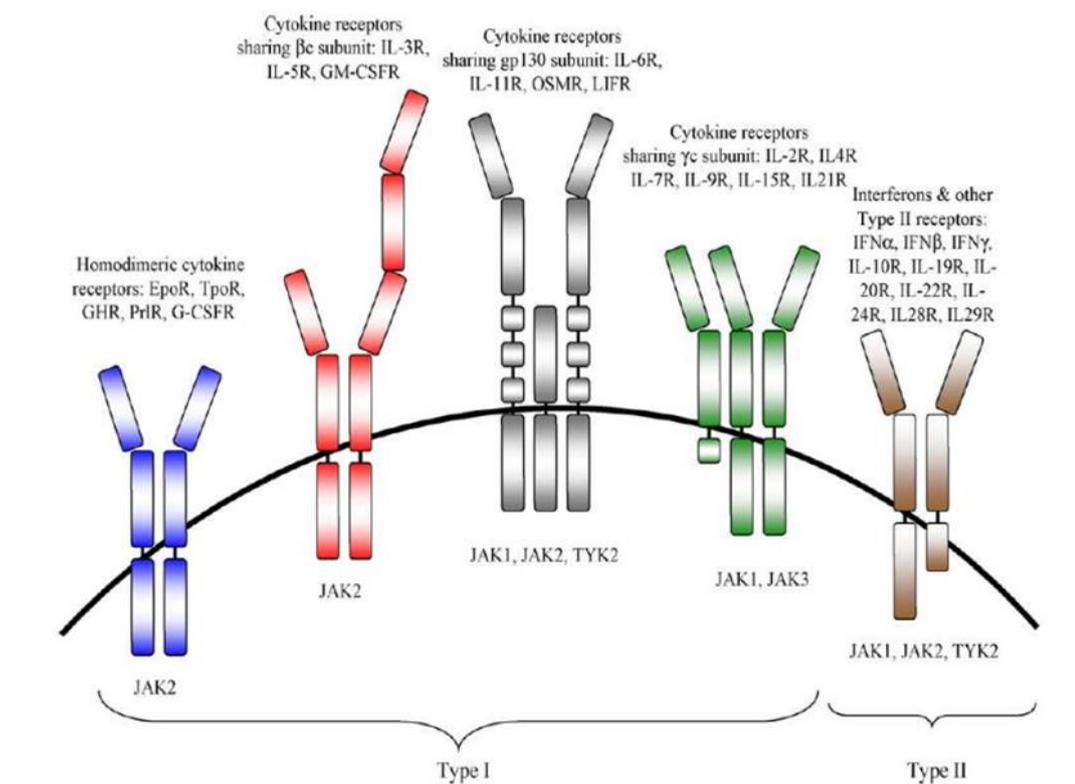
### **I.2.3FONCTIONS**

La voie JAK2/STAT est une étape clé dans la voie de signalisation de nombreuses cytokines, telles que l'EPO, les facteurs de croissance, la prolactine, la thrombopoïétine, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), l'IL -3 et l'IL -5.(**Nelson, ME., Steensma, DP ; 2006**).

### I.2.3.1 Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines

La prolifération, la survie et la différenciation cellulaire des lignées hématopoïétiques sont finement régulées par les cytokines. La première étape de transduction du signal des cytokines est la fixation de celles-ci sur leur récepteur.

Ainsi, JAK2 va être activée par l'EPO, la 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 $\alpha$  ou l'IFN $\beta$ .



**Figure.3-**L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines.(Vainchenker et al, 2008).

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  $\beta c$ . JAK3 est activé uniquement par les récepteurs possédant la sous-unité  $\gamma c$ . Les récepteurs possédant la sous-unité gp130, et les récepteurs

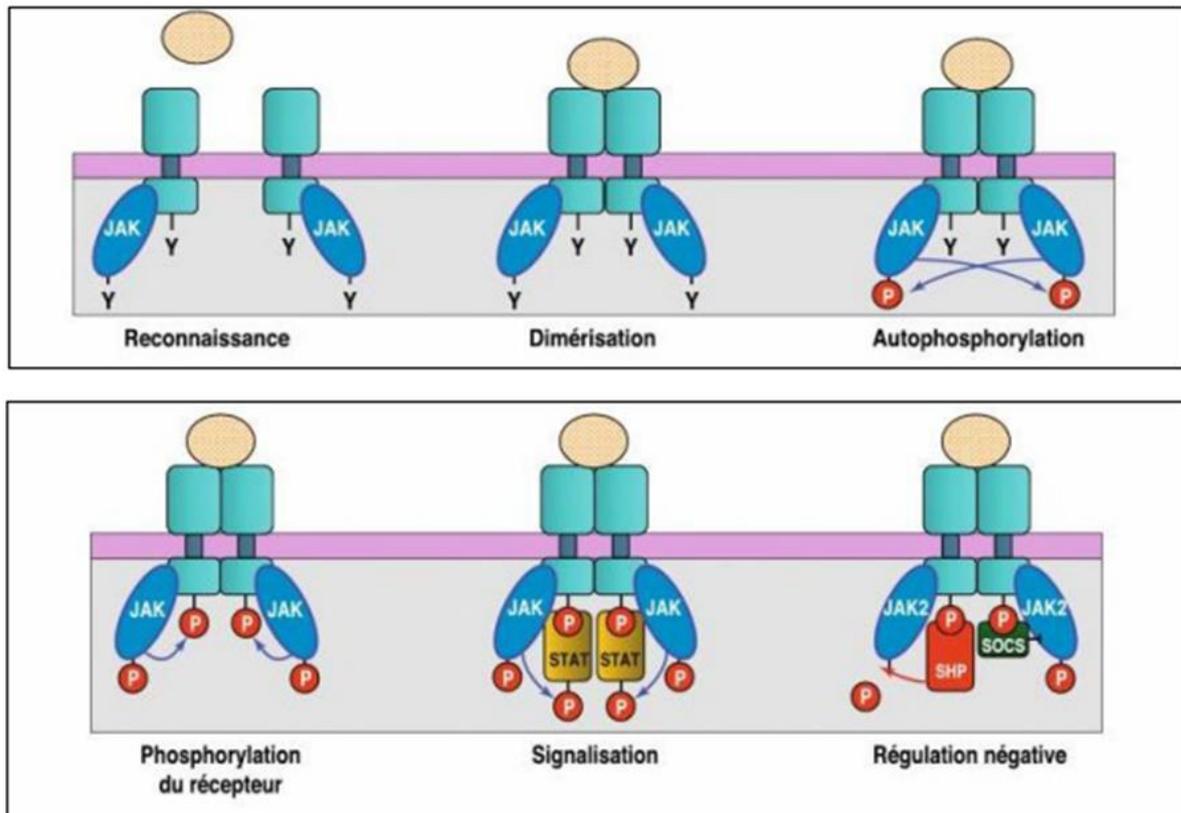
aux cytokines de type II utilisent JAK1, JAK2 et Tyk2 dans des combinaisons variées. D'après (Vainchenker et al, 2008).

### **I.2.3.2 La voie JAK/STAT canonique**

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. En aval de JAK2 sont activées les STAT 1, 3 et 5. Les STATs possèdent tous un résidu tyrosine conservé. Les kinases JAKs associées au récepteur se trans-phosphorylent et phosphorylent ensuite des résidus tyrosine spécifiques du domaine intra-cytoplasmique 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 dans le cytoplasme et transloquer dans le noyau où ils vont réguler l'expression de gènes cible et favoriser leur transcription (Li, 2008).

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. On compte, dans les cibles de STATs, des protéines impliquées 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, anti-prolifératif et proapoptotique. (Stephanou, and Latchman, 2005)



**Figure.4-**L'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK.(Jacques, 2010).

Les protéines JAK sont associées de façon constitutive aux récepteurs. La reconnaissance d'une cytokine permet la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation croisée des protéines JAK associées. Ces dernières phosphorylent également le récepteur, ce qui permet la reconnaissance de phosphotyrosines par divers protéines, dont les principales sont les protéines STAT, qui sont phosphorylées par les kinases JAK. La régulation négative de la signalisation est réalisée en particulier par les protéines SOCS qui prennent la place des protéines STAT sur les phosphotyrosines du récepteur et inhibent la kinase JAK, et par les phosphatases SHP qui se lient au récepteur et déphosphorylent les kinases JAK.(Jacques, 2010).

### I.2.3.3 La 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-dependent kinase 1) et par le complexe mTORC2 (mTOR complex 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).(Gautier, 2011).

### **I.2.3.4 La voie des MAPKs**

Les MAPKs sont des serine/thréonine kinases ubiquitaires dont la superfamille possède 11 membres : ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3, p38MAPKs (p38 $\alpha/\beta/\gamma$ ), ERK5, ERK3 et ERK7. 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.(GAUTIER, 2011).

### **I.2.4 LES REGULATEURS NEGATIFS**

La signalisation des récepteurs aux cytokines médiée par JAK2 possède également des protéines inhibitrices exerçant un rétrocontrôle négatif. Les trois classes de régulateurs négatifs les plus connues en aval de JAK2 sont : les protéines SOCS, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) et PTP (Protein Tyrosine Phosphatases). (LAABYECH.A ,2013).

#### **I.2.4.1 Les phosphotyrosines phosphatases**

Plusieurs protéines à activité phosphatase interviennent pour limiter la cascade de phosphorylation mise en jeu par la voie JAK/STAT .Elles agissent soit au niveau des

kinases JAK, soit au niveau des protéines phosphorylées par les JAK, en particulier les récepteurs de cytokines ou les facteurs STAT.(LAABYECH ,2013).

#### **I.2.4.2 Les SOCS**

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 [49]. Elles peuvent également être induites par d'autres stimuli qui n'activent pas la voie JAK/STAT, comme les lipopolysaccharides, l'insuline, l'EGF (epidermal growth factor) et le SCF (stem cell factor) .(De Sepulveda et al ,1999).

#### **I.2.4.2 Les PIAS :**

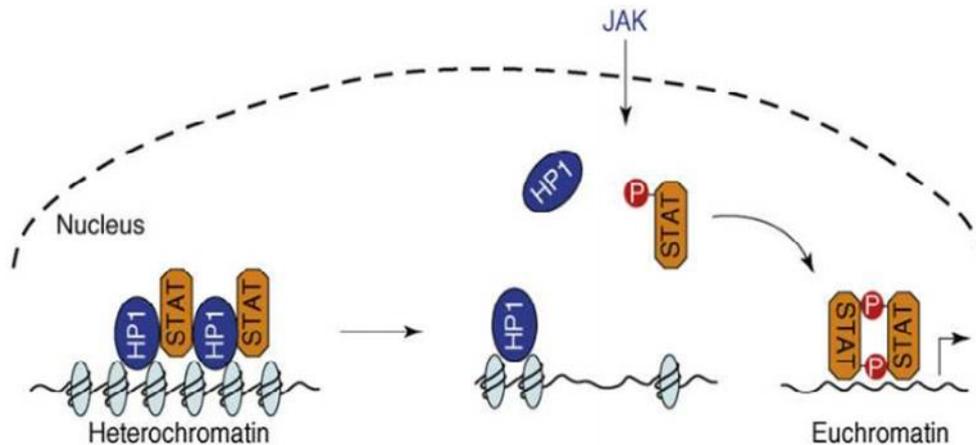
La protéine PIAS1 (proteininhibitors of activated STAT) a été identifiée comme partenaire de STAT1 dans des expériences de double hybride . Les autres membres de sa famille, PIAS3, PIASxa, PIASxb et PIASy, ont été identifiés sur la base d'homologies de séquence avec PIAS1 Ces protéines sont exprimées constitutivement, mais leur interaction avec les STAT est observée seulement après stimulation par des cytokines. En effet, les PIAS ne se lient qu'aux formes activées des STAT. Il existe parmi les PIAS une certaine sélectivité de reconnaissance des membres STAT . Les différentes PIAS utilisent des mécanismes différents pour inhiber la signalisation JAK/STAT.

#### **I.2.5 les fonctions de jak2 dans la regulation epigenetique**

Outre la voie canonique classique décrite ci-dessus, la voie JAK/STAT peut également agir de manière totalement différente, sans faire intervenir l'activité transcriptionnelle des STATs. En effet, des travaux réalisés chez la drosophile ont permis de mettre en évidence un autre mode d'action de la voie JAK/STAT.

Une partie des protéines STATs non phosphorylées est localisée dans le noyau, sur l'hétérochromatine, associée à la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1), une protéine majeure de l'hétérochromatine (Shi et al ;2008). La présence des STATs au niveau de l'hétérochromatine est essentielle pour le maintien de la localisation de HP1

et la stabilité de l'hétérochromatine. L'activation des STATs par phosphorylation induit un décrochage des STATs, ce qui entraîne un déplacement de HP1 et une déstabilisation de l'hétérochromatine (Shi et al, 2008). (Figure 05)



**Figure.5-** Voie de signalisation JAK/STAT non canonique. (Li, 2008).

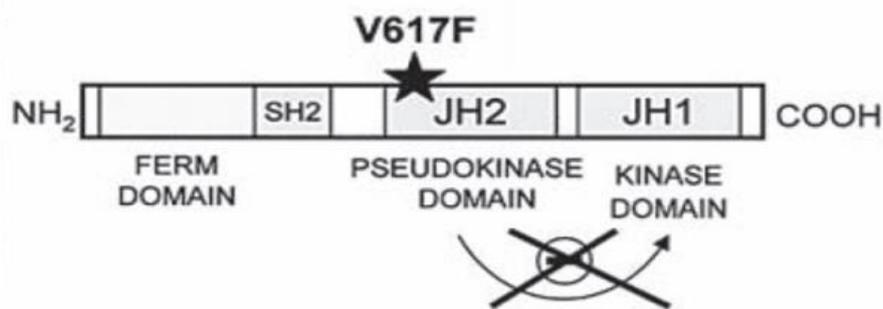
Dans le mode non-canonique de la voie JAK/STAT, les STATs non phosphorylés sont localisés dans le noyau, associés à HP1 au niveau de l'hétérochromatine. La phosphorylation de STATs par JAK entraîne une diminution de la quantité de STATs localisés sur l'hétérochromatine. Ceci mène au déplacement de HP1 et à une instabilité de l'hétérochromatine. Les STATs phosphorylés se fixent ensuite sur l'euchromatine afin d'activer la transcription de gènes cibles. Les STATs et autres facteurs de transcription ne peuvent pas accéder aux gènes localisés au niveau de l'hétérochromatine. (Li, 2008).

## I.3 LA MUTATION JAK2 V617F

### I.3.1 Description de la mutation JAK2 V617F

La mutation JAK2 V617F est une substitution de la guanine en position 1849 par la thymidine au niveau de l'exon 14 du gène de JAK2. Cette mutation ponctuelle entraîne, au niveau protéique, la substitution de la valine en position 617 par la phénylalanine à l'intérieur du domaine pseudo-kinase de JAK2. Cette substitution

empêche le domaine pseudo-kinase de JAK2 d'inhiber son domaine kinase. Au niveau fonctionnel, cette mutation confère à JAK2 une activation constitutive. La mutation JAK2 V617F, unique et clonale, est acquise. 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 (**Baxter et al, 2005**). La mutation JAK2 V617F est située dans le domaine JH2-pseudo-kinase qui régule négativement l'activité kinase de la protéine (**Zhao et al ,2005**).



**Figure.6-**Structure de JAK2 V617F.(LAABYECH.A ;2013)

### **I.3.2 Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines**

Dans les lignées cellulaires, l'introduction de la mutation entraîne une activation constitutive des voies de signalisation normalement activées en présence de cytokines en aval de JAK2 sauvage, notamment des voies JAK2/ STAT1, 3 et 5, MAPK et PI3K/Akt (**Garcon et al ,2006**). Il y a une phosphorylation anormalement élevée de STAT5, STAT3, mais également des molécules telles que : extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK 1/2), protéine kinase B (Akt), en l'absence d'érythropoïétine (**James et al , 2005**). La voie JAK2/STAT étant la voie la plus directe et la plus connue en aval de JAK2, c'est celle qui a été la plus étudiée.(**Laabyech, 2013**).

### **I.3.3 La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique:**

L'ensemble des voies activées en aval de la mutation JAK2 V617F entraîne la dérégulation transcriptionnelle de nombreux gènes. En effet, les protéines STATs étant des facteurs de transcription, leur activation en aval de l'oncogène entraîne une augmentation de la transcription de leurs gènes cibles. De plus, les voies des MAPKs et de la PI3K/Akt agissent sur des facteurs de transcription.

On peut donc supposer que la dérégulation de ces deux voies de signalisation en aval de JAK2 V617F entraîne une augmentation de la transcription de gènes. En plus d'une dérégulation transcriptionnelle, l'oncogène favorise la traduction d'ARNm en protéines. On constate une expression altérée de divers microARN, or le microARN joue sur la traduction des ARNm en se fixant sur leur 3' ou 5'UTR et en augmentant ou en diminuant leur stabilité ou directement leur traduction en protéine.

Une analyse de l'expression des microARN du sang dans la maladie de Vaquez (MV) révèle une expression aberrante de huit microARN (let-7a, miR-182, miR-143, miR-145, miR-223, miR26b, miR-30b, miR-30c and miR-150) à la fois dans les granulocytes, les cellules mononuclées, les plaquettes et les réticulocytes. (**Delhommeau, et al, 2006**).

### **I.3.4 L'altération du rétrocontrôle négatif**

Les voies classiques de signalisation étant activées constitutivement en aval de JAK2V617F, on aurait pu imaginer que les mécanismes de rétrocontrôle négatif seraient également amplifiés. Cependant, on note, en aval de JAK2 V617F, une altération du rétro-contrôle négatif de la transduction du signal des récepteurs aux cytokines impliquant JAK2. En effet, la présence de la mutation entraîne une hyper-phosphorylation de SOCS3.

Cette hyper-phosphorylation l'empêche d'agir comme régulateur négatif de la signalisation en aval de JAK2 muté, et même, au contraire, il favorise la croissance cellulaire (**Hookham et al , 2005**). Aussi, la présence de la mutation JAK2 V617F entraîne une surexpression de Lnk, une protéine adaptatrice régulant négativement la

transduction du signal de récepteurs aux cytokines. Cependant, JAK2 V617F interagit de manière plus forte avec la région N-terminale de Lnk que JAK2WT, ce qui pourrait créer un déséquilibre d'inhibition entre les deux formes de JAK2. Ces résultats sont néanmoins controversés. En effet, certains travaux suggèrent que Lnk est capable d'inhiber JAK2 V617F. Ces études ne sont cependant pas forcément contradictoires, l'action de Lnk pourrait dépendre du ratio JAK2 V617F/Lnk.

Cette altération du rétrocontrôle négatif amplifie d'autant plus la cascade de signalisation des récepteurs aux cytokines déclenchée par la présence de la mutation. Ces résultats suggèrent que le mécanisme oncogénique de JAK2V617F est plus complexe qu'il n'aurait pu le paraître, la mutation ne faisant qu'amplifier la signalisation activée en aval de la forme sauvage de JAK2; elle possède également des modes de régulation qui lui sont propres. (Laabye, 2013).

### **I.3.5 La régulation croisée du récepteur à l'IGF**

En plus de mimer une activation de récepteurs aux cytokines de type I et II en l'absence de ligand, JAK2V617F peut aussi activer le récepteur à l'IGF1 (Insuline Like Growth Factor 1) (Staerk et al, 2005). Notons que ce récepteur ne fait pas intervenir JAK2 lorsqu'il est sauvage. Des travaux antérieurs à cette découverte montraient une hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1. Or la présence de la mutation entraîne une prolifération cellulaire dépendante de l'IGF1 dans la lignée BA/F3 transduite afin d'exprimer l'oncogène. L'hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1 pourrait par conséquent être liée à cette activation croisée du récepteur de l'IGF1 par JAK2V617F et pourrait participer au phénotype des SMP. Par contre, l'activation du récepteur à l'IGF par JAK2 V617F ne paraît pas être directe mais pourrait faire intervenir l'expression d'adaptateurs induits par la signalisation de l'oncogène précédemment décrite.

### **I.3.6 L'impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique**

Dawson et al. ont montré que, tout comme JAK2 sauvage, JAK2 V617F est également capable de phosphoryler HP1 $\alpha$  et de lever ainsi sa répression sur

l'expression des gènes cible. Cependant, dans les SMP où l'on retrouve une activation constitutive de JAK2, la dérégulation de l'interaction de HP1 $\alpha$  à la chromatine pourrait lever son effet suppresseur de tumeur par une augmentation de l'expression de certains gènes, constituant ainsi un autre mécanisme de dérégulation transcriptionnelle. De plus, cette dérégulation, qui touche la chromatine, pourrait favoriser les recombinaisons mitotiques et l'instabilité génomique (**Dawson et al, 2009**). Cette régulation est cependant sujette à certaines controverses en raison du doute émis par les observations de Girodon et al. Sur la localisation nucléaire et cytoplasmique de JAK2 et JAK2 V617F (**Girodon et al, 2011**).

### **I.3.7 JAK2 est l'événement initiateur de la PV**

Deux types d'expériences ont démontré le rôle de la mutation JAK2 V617F dans la genèse d'une PV. In vitro, dans des modèles cellulaires, cette mutation induit une hypersensibilité aux cytokines ainsi que la transformation de cellules Ba/F3 (indépendance vis-à-vis de l'IL3 (**Levine et al, 2005**). Chez la souris, la greffe de cellules médullaires exprimant JAK2 mutée (infection rétrovirale) est à l'origine d'une érythrocytose (**James et al, 2005**). Ainsi, ces différents travaux démontrent que la mutation V617F de JAK2 est l'événement initiateur de la PV.

Incidence de la mutation JAK2 V617F 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 SMP 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 la mutation V617F était présente dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs plus matures. (**Jamieson et al, 2006**).

Autres mutations détectées dans les PV, TE et MP L'analyse complète de la partie codante du gène JAK2 a mis en évidence chez des patients atteints de PV ou d'érythrocytose idiopathique des mutations de l'exon 12 . Elles sont localisées en amont du domaine pseudokinase dans une zone extrêmement conservée au cours de l'évolution. Les mutations de

l'exon 12 de JAK2 entraînent les mêmes conséquences que la mutation V617F. L'incidence des mutations de l'exon 12 de JAK2 dans les PV est de l'ordre de 3 %. Des mutations du récepteur à la thrombopoïétine (MPL) ont été identifiées chez une minorité de patients présentant une MP ou une TE (Pardanani et al ;2006). De plus, dans des expériences réalisées chez la souris, il a été montré que les pathologies les plus fréquemment induites par les mutations de MPL étaient des thrombocytoses et des myélofibroses.

### **I.3.8 Une mutation — trois pathologies distinctes**

Comment 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 MP, 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, 2006**). Plus récemment, 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**).

### **I.3.9 Pathogenèse JAK2 V617F**

En dehors des mutations de JAK2 (V617F et exon 12) et de MPL, d'autres événements moléculaires pourraient être nécessaires à l'obtention du phénotype final. Il existe des SMP familiaux avec mutation JAK2 V617F, alors qu'il n'y a pas de transmission germinale de la mutation (**Bellanne-Chantelot et al , 2006**). Il existerait donc un mécanisme génétique de

prédisposition à l'acquisition de la mutation somatique de JAK2. Dans certains SMP, l'hématopoïèse apparaît clonale alors que la mutation V617F n'est retrouvée que dans un nombre faible de cellules (**Levine et al, 2006**). De plus, des anomalies cytogénétiques, telles que la délétion 20q (**Tableau II**), peuvent être observées dans des cas où la proportion de cellules présentant la mutation de JAK2 demeure faible( **Kralovics et al, 2006**). La mutation JAK2 V617F pourrait donc être un événement secondaire, voire un événement insuffisant à l'acquisition du phénotype final, ce qui est contradictoire avec le fait que cette mutation induit chez la souris un phénotype proche d'un SMP humain. Un modèle de pathogenèse des SMP a été proposé (**Levine , Gilliland , 2008**). Il inclut des données démontrées (mutations de JAK2 et de MPL) et des hypothèses (terrain génétique, mutations additionnelles) (**Pardanani et al , 2008**). De plus, des modifications génétiques ou épigénétiques pourraient jouer un rôle dans l'acquisition du phénotype final et dans l'évolution vers une MP (par exemple le type de récepteur homo- ou hétérodimérique sur lequel se fixe JAK2).(CHOMEL et al,2009).

**Tableau.2-** Principales anomalies chromosomiques communément retrouvées dans PV,MFP , et TE(**Bench et al, 2001**).

Chromosomes	Caryotype	Pourcentage		
		PV	MFP	TE
1	Trisomie 1q, translocations...	3-10*	≈3-10	<1
5	Délétion 5q, Monosomie 5...	3	1.5	<1
7	Délétion 7q, Monosomie 7...	≈1-3.6	4	<1
8	Trisomie 8 totale ou partielle...	5-27	5-8	≈1
9	Trisomie 9 totale ou partielle...	≈10	8	1-7
13	Délétion 13 q, duplications...	3-7	6-8	1-4
20	Délétion 20q...	≈10%	7-28	0.2-7
Caryotype anormal (à l'exclusion de -Y)		11-33	33-40	5-7

### **I.3.10 Autres anomalies génétique présente dans les syndromes myéloprolifératifs classiques**

Dans l'étude de Julie Mondet (**Julie Mondet , 2011**), il a rapporté que d'autres mutation que JAK2 v617f peuvent survenir dans les syndromes myéloprolifératifs classiques ces mutations peuvent co exister avec la mutation JAK2 v617f ou entre elle parmi les mutations les plus fréquente :

#### **I.3.10.1 Les mutations de MPL**

Le produit du gène MPL (MyeloProliferative Leukemia) correspond au récepteur de la thrombopoïétine. La protéine JAK2 intervient également comme transducteur du signal de la thrombopoïétine suite à sa fixation sur MPL. La mutation germinale Baltimore K39N au niveau de l'exon 2 retrouvée dans la population afro-américaine a participé à la découverte des mutations acquises de MPL. 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. Les mutations de MPL touchent approximativement 10% des MFP et 3% des TE , la plupart du temps sans association avec JAK2V617F. La mutation a également été rarement rapportée dans des cas de RARS-T.

Les TE MPL+ touchent préférentiellement les femmes âgées, avec un taux plaquettaire élevé et un taux d'hémoglobine bas .

#### **I.3.10.2 Les mutations de LNK**

LNK « lymphocyte spécifique adapter protéine» est une protéine adaptatrice dont la fonction est d'inhiber la phosphorylation de JAK2 (sauvage ou muté) après activation par les récepteurs à l'EPO ou à la TPO (140). Elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation JAK-STAT. Les mutations inhibitrices de LNK conduisent à une perte de fonction et entraînent une activation non régulée de la voie de signalisation JAK-STAT. Une quinzaine de mutations non-sens, faux-sens ou délétions, ont été décrites à ce jour .La

majorité des mutations identifiées touchent soit le domaine d'homologie à la plekstrine soit le domaine SH2 (Src homology 2) dont les rôles respectifs sont la localisation à la membrane cellulaire et la liaison simultanée au récepteur activé et à JAK2. Les mutations LNK sont rares (<10% des NMP) retrouvées dans de rares cas de PV JAK2V617F négatif. Cependant, une étude plus récente a montré que la région C terminale pouvait être mutée chez des patients également JAK2V617F positif. On retrouve également les mutations de LNK dans 3 à 6% des TE ou des myélofibroses, qu'elles soient primitives ou post-PV ou post-TE. Elles sont par contre fréquentes dans les phases blastiques ( $\approx 10\%$ ) des NMP.

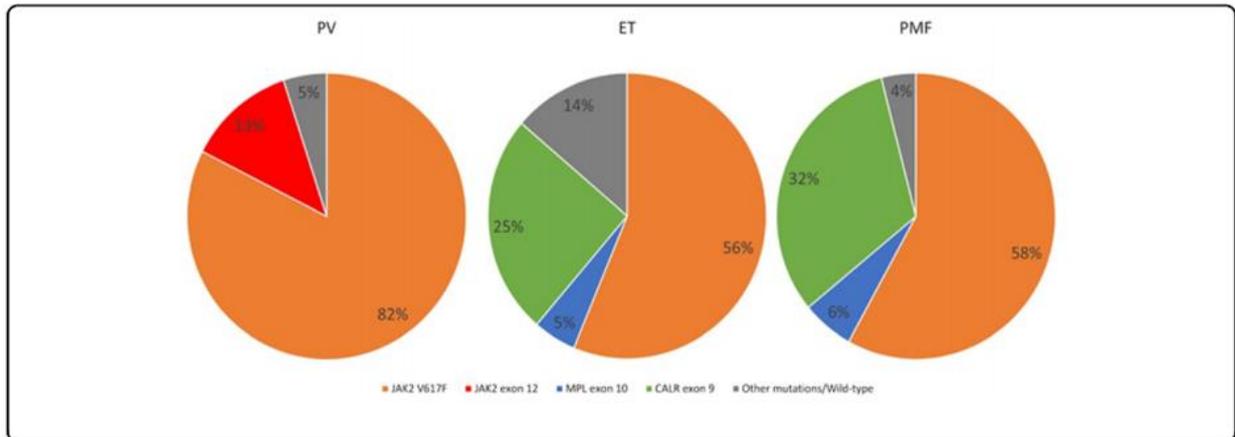
### **I.3.10.3 Les mutations de TET2, EZH et CALR**

Le gène Ten Eleven Translocation 2 (TET2) est localisé sur le chromosome 4q24. Il encode pour une méthylcytosine dioxygénase, qui oxyde le groupement méthoxyle de la 5'méthylcytosine en 5'hydroxyméthylcytosine. La modification en 5'hydroxyméthylcytosine entrainerait une déméthylation de l'ADN. La protéine TET2 agit donc dans la régulation épigénétique de la transcription des cellules souches hématopoïétiques.

TET2 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur dont l'inactivation par mutation joue un rôle oncogénique. Les mutations de TET2 ont été trouvées dans toutes les régions codantes des pathologies myéloïdes et peuvent être des mutations non-sens, faux sens ou décalantes. Elles sont détectées par séquençage notamment haut-débit. Les mutations touchant TET2 ont été décrites chez des patients atteints de PV, TE ou MFP avec des fréquences respectives de 16%, 5% et 17%. Elles sont associées ou non à la mutation JAK2V617F et peuvent coexister avec MPLW515L.

Les mutations EZH2Le gène EZH2 est localisé en 7q36.1. La protéine EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) est une histone méthyltransférase. Dans les pathologies myéloïdes, les mutations retrouvées dans les exons 10, 18, 20 inactivent probablement l'enzyme. Ces mutations sont retrouvées dans approximativement 3% des PV, dans 7 à 13% des myélofibroses primitives ou secondaires à une PV ou une TE mais pas dans la TE.

Récemment, un total de 36 types d'insertions et des suppressions cadre de décalage ont été détectés dans le gène CALR, qui code pour un rapport Ca<sup>2+</sup> la protéine de liaison à endoplasmique réticulum appelé calréticuline. Ces mutations sont localisées dans le neuvième exon du gène, conduisant à la mise en péril de C-terminale de la structure de la protéine et ont été signalés avoir une incidence de plus de 60% à 80% en JAK2 et MPL mutation négative ET et PMF patients (**Lamar, 2014**).



**Figure. 7-**Variation des fréquences de JAK2 exon12, JAK 2 V 617F MPL W515L/K et CALR exon 9 dans les mutations touchants le cadre de lecture. (**Lamar, 2014**).

### I.3.11 Detection de JAK2 V617F

De nombreuses méthodes sont utilisées afin de mettre en évidence la mutation JAK2 V617F. Elles reposent, le plus souvent, sur des PCR classiques comme la PCR allele refractory mutation system (ARMS), la PCR spécifique d'allèle, la PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), la discrimination allélique ou des PCR en temps réel spécifiques d'allèle (**Hammond et al, 2007**). Le matériel étudié est soit le sang total, soit des leucocytes totaux, soit les polynucléaires neutrophiles isolés. Selon le type de méthodologie et le matériel étudié, la méthode de détection de la mutation JAK2 V617F est plus ou moins sensible. Par exemple, une PCRARMS multiplexe réalisée sur de l'ADN extrait du sang total, a une limite de détection de 2 à 5% (détection de 2 à 5 % d'allèles mutés dans une majorité d'allèles sauvages). Afin d'effectuer un suivi moléculaire de la maladie, il est possible, comme dans le cas de BCR-ABL, d'effectuer un dosage des allèles JAK2 V617F (PCR spécifique d'allèle quantitative avec standards JAK2 mutés et sauvages).

# **Chapitre II :**

## **Matériels et méthodes.**

Cette étude a été réalisée au laboratoire du service d'immunologie du CHU Beni Messous dans l'unité d'immunogénétique pendant une période s'étalant de 21 février à Mai 2016.

### **Objectif de l'étude :**

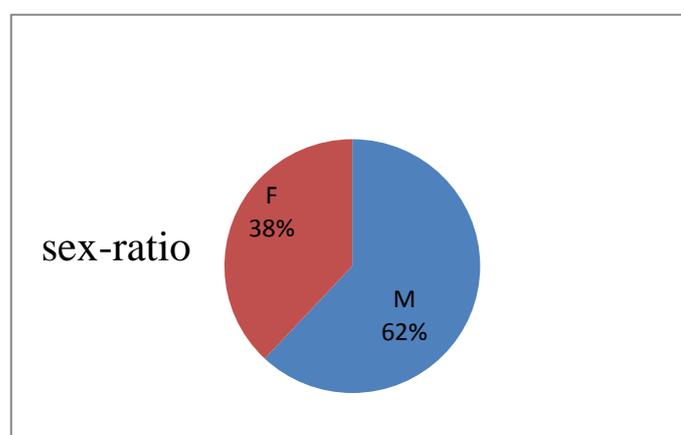
Dans ce travail nous avons recherché la mutation JAK2 V617F, chez 100 patients chez lesquels un syndrome myéloprolifératif classique a été suspecté, et ce par technique de PCR en temps réel (technologie Taqman). L'objectif principal est d'établir la prévalence de cette mutation dans les différents syndromes myéloprolifératifs classiques qui a été décrite comme étant mise en cause dans la plupart des syndromes myéloprolifératifs classique et recherché une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques.

La mutation du JAK2, est retrouvée dans environ 95% des cas de PV, 60% des TE et 50% des MFP.

### **II.1 Les Patients**

L'étude a porté sur 100 patients suspectés d'être porteurs du syndrome myéloprolifératifs. Leur recrutement a été fait en majorité au niveau du CHU Beni Messous parmi eux, 47 étaient suivis dans le service d'hématologie 46 au service médecine interne et les autres dans différents services.

La moyenne d'âge des patients est de 43.13 ans avec un écart type de 21.20 ans l'âge minimale est de 17ans et l'âge maximal est de 85 ans, avec 62 patients de sexe masculin et 38 patients de sexe féminin avec la fréquence 62% pour le sexe masculin et 38% pour le sexe féminin.



**Figure.8-** Graphique de répartition des patients selon le sexe.

Une étude des dossiers des patients a été réalisée.

Les critères diagnostics cliniques et biologiques des patients ont été repris dans des fiches de renseignements (**Voir Annexe 1**).

## II.2 Critères cliniques et biologiques des patients

### II.2.1 Critères cliniques

**Tableau.3-** Critères cliniques des patients .

	PV	TE	MFP
Nombre	36(36%)	57(57%)	7(7%)
Age (ans)	54,38	44,28	44,36
Sexe- ratio	F= 10 (28%) M= 26 (72%)	F=25(44%) M=32(66%)	F=3(43%) M=4 (57%)
Vertige	1 (2,7%)	1(1,7%)	
Fièvre		1(1,7%)	
Asthénie		4(7%)	
Céphalée	1(2,7%)		
Hépatomégalie	1(2,7%)		
Splénomégalie	8(22%)	9(15,7%)	3 (43%)
Thrombose	16(44,44%)	27(47,3%)	1 (14%)
Erythrose	4(11%)		
Thrombophlibite		1(1,7%)	
Neurofibrose		1(1,7%)	1(14%)
Hta	4(11%)	2(3,5%)	2(28,57%)
Htt	1(2,7%)	3(5,2%)	
Avc	1(2,7%)	2(3,5%)	
Embolie pulmonaire		2(3,5%)	
Budd-chiari	2(5,5%)	2(3,5%)	
Hyperviscosité	1(2,7%)	1(1,7%)	

36% des patients ont été suspecté PV l'âge moyen de ces patients est de 54.38 ans 28% de sexe féminin 72% de sexe masculin, 22% des cas présentent des splénomégalias 44.44%

présentent des thromboses 11% des érythrocytose 5.5 budd-chiari et certains autre anomalies HTA 11%.

57% des patients ont été suspecté TE l'âge moyen est de 44.28%, avec 44% des cas de sexe féminin et 66% des cas de sexe masculin, 15.7% présentent des splénomégalies ,47.3% des thromboses .7% asthénies et d'autres anomalies comme http 5.2%, budd-chiari (3.5%).

7 % des patients ont été suspecté MFP l'âge moyen est de 44.36 avec 43% des cas sexe féminin et 57% sexe masculin, 43% ont présenté splénomégalies 28.57% HTA 14% thrombose.

## II.2.2 Les Critères biologiques

**Tableau 4 :** critères biologiques des tableaux.

	PV	TE	MFP
anomalie érythrocytaire	18(50%)	8(14%)	
anomalie plaquettaire	3(8,33%)	31(54,3%)	3(43%)
anomalie leucocytaire	7(19%)	15(26,3%)	3(43%)

Les anomalies érythrocytaire sont présente chez 50% des cas PV et 14% des cas TE, les anomalies plaquettaires sont présente chez 8.33% des cas PV, 54.3% des cas TE et chez 43% des MFP, et les anomalies leucocytaire dans 19% des cas PV 26.3% des cas TE et 43% des cas MFP.

## **II.3 Méthode :**

### **II.3.1 Prélèvements**

La recherche de la mutation jak2 v617f a été effectuée sur des prélèvements du sang périphérique sur des tubes EDTA (4 ml).

## **II.4 Extraction et dosage de l'ADN**

### **II.4.1 EXTRACTION**

Protocole d'extraction par kit invitrogène :

- ✓ Ajouter 200 µl de sang total, dans un eppendorf stérile ;
- ✓ Rajouter 20 µl de protéinase K ;
- ✓ Rajouter 20 µl de RNase A ;
- ✓ Vortexer, laisser 2mn à température ambiante ;
- ✓ Rajouter 200 µl de pure link genomic lysis / binding buffer, vortexer ;
- ✓ Mettre au bain marie pendant 10 min à 55° C ;
- ✓ Rajouter 200 µl d'éthanol (96-100 %) au lysat ;
- ✓ Vortexer pendant 5 secondes ;
- ✓ Transvaser le lysat dans une colonne stérile ;
- ✓ Centrifuger à 10000 g pendant 1 min ;
- ✓ Placer la colonne dans la première poubelle ;
- ✓ Rajouter 500 µl du tampon 1 WASH BUFFER1 ;
- ✓ Centrifuge à 10000 g pendant 1 min à une température ambiante ;
- ✓ Placer la colonne dans la deuxième poubelle ;
- ✓ Rajouter 500 µl du tampon 2 WASH BUFFER2 ;
- ✓ Centrifuger à 14000 g (vitesse maximale) pendant 3 min à température ambiante ;
- ✓ Placer la colonne dans un eppendorf stérile ;

- ✓ Rajouter 25-100 µl de solution d'éluion (pure link genomic éluion buffer) ;
- ✓ Incuber pendant 1 min a température ambiante ;
- ✓ Centrifuger à 14000g pendant 1 min à température ambiante ;
- ✓ L'ependorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne).

## II.4.2 DOSAGE de l'ADN

Au cours de ce travail la concentration de l'ADN a été mesurée par un spectrophotomètre maestro nano.

Un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1.8-2

Si  $R \geq 2$  → présence d'ARN.

Si  $R \leq 1.5$  → excès de protéines.

## II.5 Recherche de la mutation par PCR en temps réel (real time PCR)

La recherche de la mutation était effectuée par une PCR en temps réel (7500 Applied Biosystems) en utilisant les sondes d'hydrolyse Taqman.

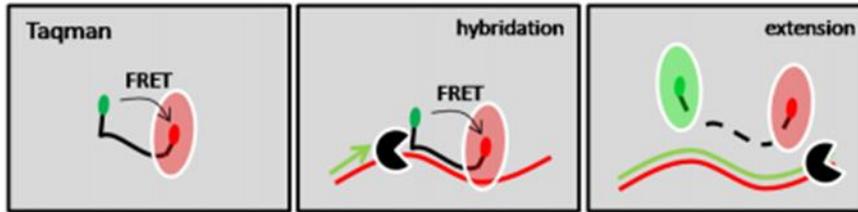
### II.5.1 Chimies de marquages

De nombreuses chimies de marquages fluorescents sont actuellement disponibles pour la RT-qPCR. Elles représentent toutes des solutions techniques différentes qui assurent le même principe commun, la mesure du signal émis par une molécule fluorescente (**F**).

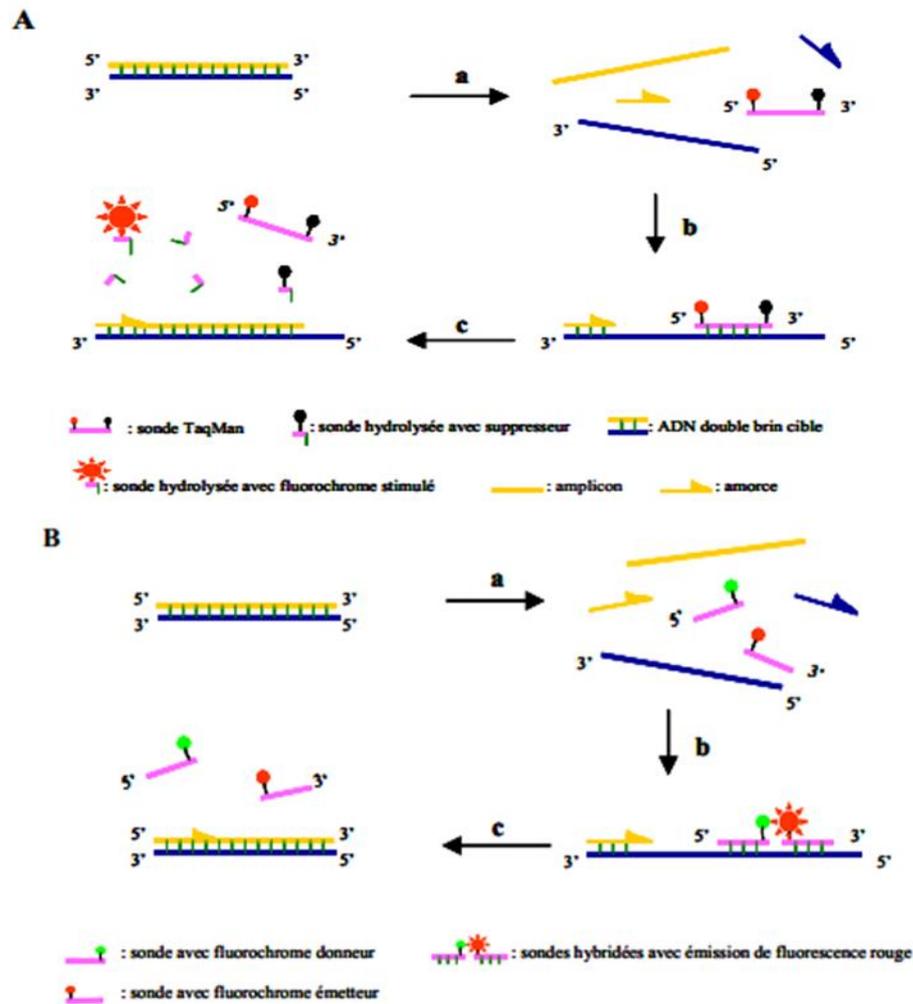
#### II.5.1.1 Les sondes d'hydrolyses(Taqman)

Le développement de méthode permettant de relier le signal de fluorescence à l'amplification de la cible de manière spécifique a été accompli grâce à l'introduction de sonde d'hydrolyse Taqman (**Holland et al, 1991**). Cette méthode permet la réaction de multiplexe, c'est-à-dire la détection spécifique de plusieurs amplicons dans un même milieu réactionnel. Cette chimie de marquage repose sur deux principes (**Fig. 6**). Le premier est le phénomène de FRET (**F**luorescence **R**ésonance **E**nergy **T**ransfert), le second est l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase. La sonde Taqman est marquée à ces deux extrémités avec deux marqueurs fluorescents possédant des spectres de

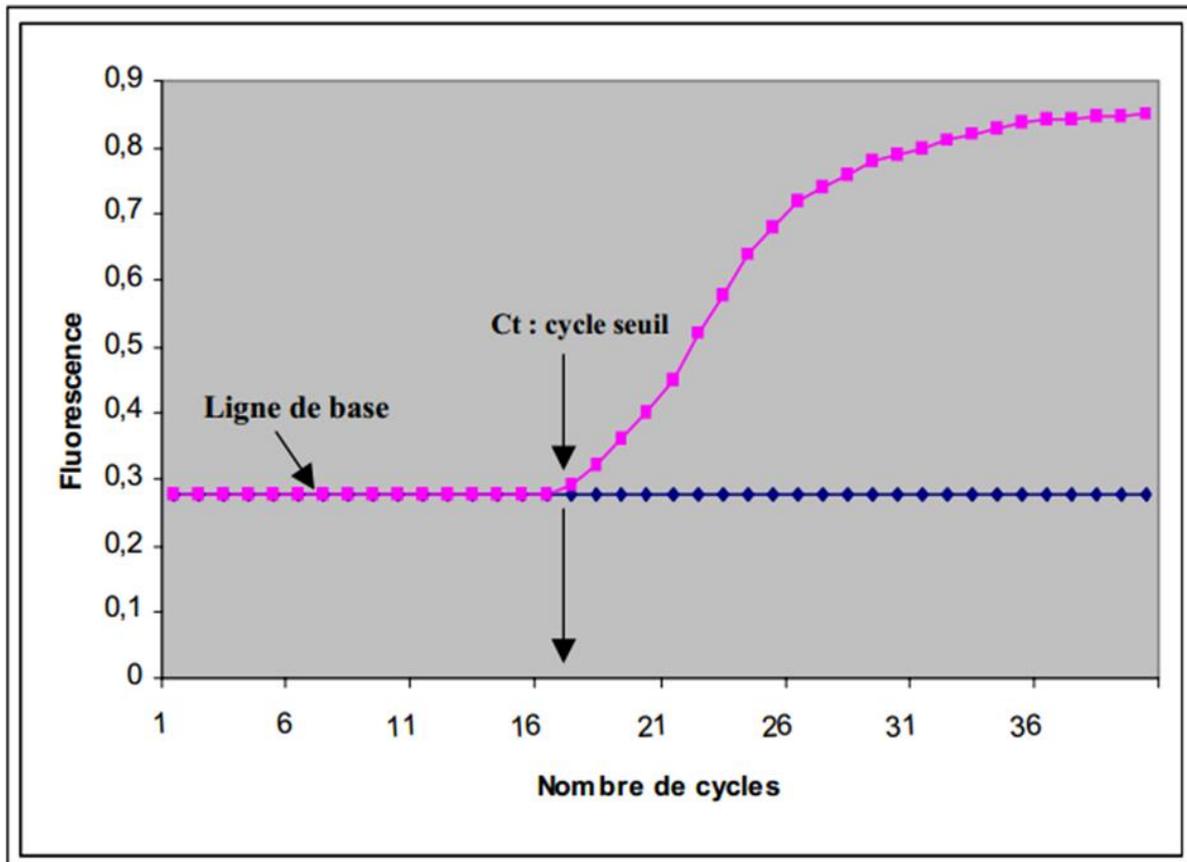
fluorescence propres. Le premier est un reporter (ex :FAM), le second en « quencher » (molécule inhibant la fluorescence du reporter par le phénomène de « quenching ») (ex : TAMRA). Quand la sonde est intacte, les deux fluorophores sont à proximité et le transfert d'énergie par fluorescence (FRET) s'effectue. La fluorescence émise par FAM est alors absorbée par TAMRA et restituée dans la longueur d'onde d'émission de celui-ci. Pendant la phase d'extension du cycle PCR, la sonde hybridée à sa cible est dégradée par l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase, et les fluorophores sont libérés dans le milieu réactionnel. N'étant plus à proximité l'un de l'autre, le transfert d'énergie entre le reporter et le quencher n'a plus lieu, ce qui se traduit par l'augmentation de la fluorescence dans le spectre propre au reporter FAM (**Heid et al, 1996**). La spécificité de la réaction est assurée premièrement par les amorces, mais aussi par la sonde, celle-ci étant dessinée de manière à s'hybrider à un produit de manière sélective. Cette méthode ne nécessite donc pas de validation post-amplification, et permet la discrimination de produits multiples par l'utilisation de sondes portant des fluorophores différents. Toutefois, le signal de fluorescence n'est pas ici strictement relié à la quantité de produits à un instant, mais à l'accumulation successive des produits des sondes hydrolysées à chaque cycle. La méthode de quenching utilisée est dynamique (transfert d'énergie à distance, 40-80% d'inhibition du signal), et ne permet pas d'inhiber le signal aussi efficacement que d'autres chimies de marquage récentes, utilisant des quenchers sombres (non-fluorescent, e.g. Dabcyl) et le phénomène de quenching statique (interaction physique entre le fluorophore et le quenseur ; 90-95% d'inhibition) (**Marras, et al, 2002; Sherrill et al, 2004**).



**Figure.9-** Représentation schématique de la chimie de marquage TaqMan .la chimie est représenté pendant la phase d'hybridation et en fin d'extension .quand le brin complémentaire est synthétisé par la Taq polymérase la molécule reporter est coloré en vert et la molécule reporter est coloré en vert et la molécule quencher en rouge.



**Figure. 10- A:**Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, 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 déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. **B:** Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution.



**Figure. 11-** 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. (Elyse, et Alain, 2002).

## II.5.1.2 Protocole opératoire

- Préparation du mélange réactionnelle par puits :
  - ✓ 10  $\mu$ l master mix (kit) élément nécessaire pour l'amplification (pH adéquat MgCl<sub>2</sub>).
  - ✓ 2  $\mu$ l de sonde.
  - ✓ 7 $\mu$ l d'eau distillé stérile (mélange réactionnelle 19 $\mu$ l pour 1 puits de master mix).
  - ✓ Pour les patients on met 2  $\mu$ l d'ADN dans chaque puits.

**Tableau.5-** Composition du mélange nécessaire a la détection de la mutation V617F.

<b>Composition du mix</b>	<b><i>pour une réaction (ul)</i></b>
<b>Master mix</b>	10 $\mu$ l
<b>Sondes d'hydrolyse</b>	2 $\mu$ l
<b>Eau distillé stérile</b>	7 $\mu$ l
<b>Volume réactionnel total</b>	19 $\mu$ l
<b>ADN</b>	2 $\mu$ l (dans chaque puits)

## II.5.1.3 Protocole d'amplification

L'amplification a été faite par le thermocycleur de l'Applied Biosystems 7500 selon le protocole suivant :

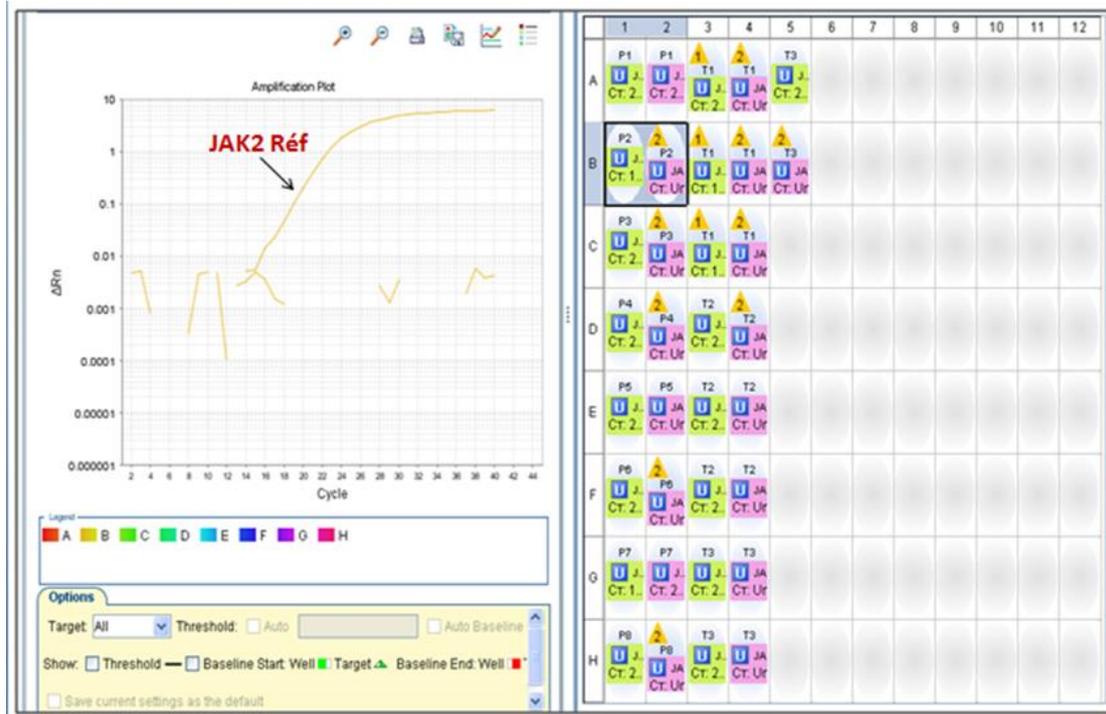
**Tableau 6 :** protocole d'amplification (jak2 v617f).

	<b>dénaturation</b>	<b>95°c</b>	<b>10min</b>
<b>5 cycles</b>	dénaturation	92°c	15s
	hybridation/élongation	58°c	1min
<b>40cycles</b>	dénaturation	92°c	15s
	hybridation/élongation	60°c	1min

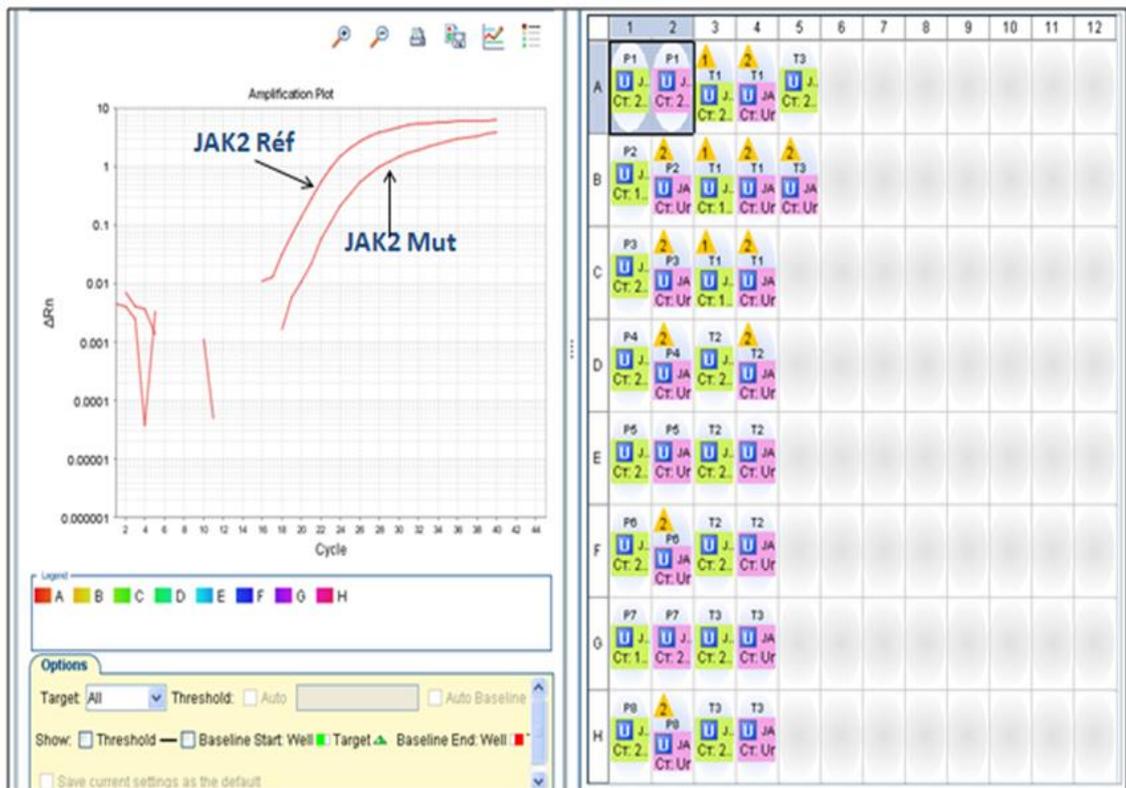
## II.6 Analyse statistique

Pour l'analyse statistique on a utilisé logiciel graphpad prism 5, le test khi2, test exact Fisher et test de Student.

Voici un exemple des résultats :



**Figure .12-**Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle non muté JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).



**Figure.13-** Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle muté et non muté (réfèrent) JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).

# **Chapitre III : Résultats et discussion**

### III.1 Résultats

Notre étude était réalisé sur 100 patients suspectés d'un syndrome myéloprolifératifs classique, la recherche de la mutation JAK2 V617F par PCR en temps réel a révélé la présence de cette mutation chez 44 patients(44%) , la mutation était présente chez 15/36cas PV(42.8%),26/57cas TE( 45.6%) , et3/7 cas (42.8%).

Tableau 7: Comparaison des critères cliniques entre le groupe PV JAK2V617F positif et le groupe PV JAK2V617F négatif

	PV JAK2 V617F +	JAK2 V617F-
Nombre	15(42%)	21(58%)
Age (ans)	57,33	52,28
Sexe- ratio	F=6/ M=9	F=4 / M=17
Vertige	1 (6,67%)	
Hépatomégalie	1(6,67%)	
Splénomégalie	7(46,67%)	1(4,7%)
Thrombose	3(20%)	7(33,33%)
Erythrose	4(26,66%)	
Hta	2(13,33%)	2(9,5%)
Http		1(4,7%)
Avc		1(4,7%)
Budd-chiari	1(6,67%)	1(4,7%)

Tableau.8- Comparaison des critères biologiques entre le groupe PV JAK2V617F positif et le groupe PV JAK2V617F négatif.

	PV JAK2 V617F +	JAK2 V617F-
Anomalie érythrocytaire	7(46,67%)	11(52%)
Anomalie plaquettaire	1(6,67%)	2(9,5%)
Anomalie leucocytaire	5(33,33%)	2(9,5%)

La moyenne d'âge des 15 patients PV JAK2 V617F + est de 57.33 ans , 60% sont de sexe masculin et 40% de sexe féminin ,ces patients présentent de différents caractères cliniques et biologiques dont des splénomégalies 46.67% , des érythrocytoses 26.66 % , des thromboses 20%, des anomalies érythrocytaires 46.67%, des anomalies leucocytaires 33.33% et de différents autres anomalies comme des HTA 13.33%.

La moyenne d'âge des 16 patients PV JAK2 V617Fnégatif est de 52.28 ans avec 20% de sexe féminin et 80% de sexe masculin les patients ont présenté surtout des thromboses 33.33% et des anomalies érythrocytaires 52%, d'autres anomalies comme des HTA 9.5% des anomalies plaquettaires 9.5%.

Tableau.9 - Comparaison des critères cliniques entre le groupe TE JAK2V617F positif et le groupe TE JAK2V617F négatif

	TE JAK2 V617F+	TE JAK2V617F-
Nombre	26(45,5%)	31(54,5%)
âge (ans)	56,29	43,19
sexe- ratio	F=12(46%) M=14(54%)	F=13(42%) M=18(58%)
Vertige		1(3,2%)
Fièvre		1(3,2%)
Asthénie		4(12,9%)
Splénomégalie	4(15,3%)	5(16,1%)
Thrombose	10(38,4)	17(54,8%)
Thrombophlébite	1(3,8%)	
HTA	2(7,6%)	
http	1(3,8%)	2(6,4%)
AVC		2(6,4%)
embolie pulmonaire		2(6,4%)
budd-chiari		2(6,4%)
Hyperviscosité	1(3,8%)	

Tableau.10- Comparaison des critères biologiques entre le groupe TE JAK2V617F positif et le groupe TE JAK2V617F négatif

	TE JAK2 V617F-	TE JAK2V617F-
anomalie érythrocytaire	3(11,5%)	5(16,1%)
anomalie plaquettaire	18(69,2%)	13(41,9%)
anomalie leucocytaire	9(34,6%)	6(19,3%)

L'âge moyen des 26 patients TE V617F+ est de 56.92 ans avec 46% des patients de sexe féminin et 54% de sexe masculin ces patients ont présenté des splénomégalias 15.3% des cas des thromboses 38.4% , des anomalies érythrocytaire 11.5% des anomalies plaquettaire 69.2% et des anomalies leucocytaire 34.6% en plus d'autres anomalies comme HTA 7.6%.

Pour les 31 patients TE JAK2 V617F- la moyenne d'âge est de 43.19ans avec 42% de sexe féminin et 58% de sexe masculin ,ils ont présenté des asthénie 12.9% des cas des splénomégalias 16.1% des cas des thromboses chez 58.56 des cas des anomalies érythrocytaire chez 16.1% des cas , des anomalies plaquettares chez 41.9% des cas et des anomalies leucocytaires 19.3% en plus d'autres caractéristiques comme des AVC6.4% HTA 6.4%.

Tableau.11- Comparaison des critères cliniques entre le groupe MFP JAK2V617F positif et le groupe MFP JAK2V617F négatif

	MFP JAK2 V617F+	MFP JAK2 V617F-
Nombre	3(43%)	4(57%)
Age (ans)	54,74	32,5
Sex- ratio	F=2(66,67%) M=1(33,33%)	F=2(50%) M=2 (50%)
Splénomégalie	2(66,67%)	1(25%)
Thrombose		1(25%)
Neurofibrose		1(25%)
LDH élevé	2(66,67%)	

Tableau.12-Comparaison des critères biologiques entre le groupe MFP JAK2V617F positif et le groupe MFP JAK2V617F négatif.

	MFP JAK2 V617F+	MFP JAK2 V617F-
anomalie plaquettaire	2(66,67%)	1(25%)
anomalie leucocytaire	3(100%)	

L'âge moyen des 3 patients MFP JAK2 V617F+ est de 57.47ans avec 66.67% des patients de sexe féminin et 33.33% de sexe masculin, les patients ont présenté des splénomégalias 66.67% , LDH élevé 66.67% des anomalies plaquettares 66.67% et des anomalies leucocytaires chez les 3patients (100%).

Pour les 4 patients MFP JAK2 V617F- l'âge moyen était de 32.5 ans avec 50% de sexe féminin et 50% de sexe masculin 25% ont présenté splénomégalie 25% thrombose, 25% anomalie plaquettaire.

### **III.2 La discussion**

La discussion s'articule sur deux parties :

1) Dans un premier temps nous nous intéresserons aux patients qui ont présenté la mutation JAK2 V617F ou on va faire la comparaison avec d'autres études du Maghreb et des résultats des pays occidentaux. et on fait une comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques des deux groupes JAK2 V617F positif et négatif

2) Puis, nous discuterons les autres patients qui n'ont pas présenté la mutation jak2 mais qui sont suspectés d'un syndrome myéloprolifératif

#### **III.2.1 première partie**

-Dans un travail réalisé sur 45 patients par un groupe de chercheurs tunisiens (Feki.N ;2011) dont le but était de déterminer l'intérêt diagnostique et pronostic de la mutation JAK2 V617F, ainsi que déterminer son rôle dans l'évaluation du risque thrombotique les résultats étaient :

Les 45 malades étaient répartis en PV (22 patients), TE (17 patients), MFI (trois patients) et SMP atypiques (trois patients). Dans la série la mutation JAK2 est retrouvée dans 64,4 % des cas. Elle est observée dans 72,7 % des cas de PV, 47 % des cas de TE, 66 % des MFP.

-Dans une autre étude marocaine réalisée sur 27 patients par Nadjmi en 2015 :

Ils ont recensé 27 cas des syndromes myéloprolifératifs hors LMC. L'âge moyen des patients était de 48 ans avec des extrêmes allant de 15 à 89 ans. La majorité des patients (74%) avait un âge inférieur à 60 ans. Dans la série, les hommes représentaient 44% versus 56% des femmes. Données cliniques :

Dans cette série d'étude, 56% des malades ont une polyglobulie de vagues et 44% ont une thrombocythémie essentielle. Résultats de l'étude moléculaire :

La recherche de la mutation en question se fait par la biologie moléculaire. Chez nos patients on recherche cette mutation par la technique « PCR allèle spécifique.

- Pour la série de polyglobulie de vagues : 47% des cas (7 patients) avaient la mutation V617F du gène JAK2, et 53% des cas (8 patients) n'avaient pas la mutation.

- Pour la série de thrombocytémie essentielle : 25% des cas (3 patients) avaient la mutation V617F du gène JAK2 et 75% des cas (9 patients) n'avaient pas la mutation.

- Dans une autre étude au maroc réalisée par Benmoussa sur 70 patients : 17/19 (89.10) PV 8/5 (62.50%) TE, 4/12(33.33%) MFP .

-Les Résultats d'un groupe algérien sur 344 cas suspectés syndrome myeloproliferatifs

Dans l' ensemble de l'étude de la population, il y avait 185 hommes (53,8%) et 159 femmes (46,2%). L'âge moyen au moment de diagnostic était de 52,8 (plage 8 - 89 ans). La période de suivi médian était de 42 mois.

Parmi les patients, 98 ont été diagnostiqués pour PV, 75 pour ET, 13 pour le PMF,

La mutation JAK2 V617F a été détectée chez 157 patients (45,63%), dont PV (81,6%), ET (58,7%) et PMF (46,1%).(Benguella et *al* ,2014)

Tableau.13- Comparaison entre notre groupe d'étude PV et d'autres groupes.

	notre série	Baxter	X <sup>2</sup>	IC	OR	P value
<b>n (PV)</b>	36	73	6,046	[1,176, 4,632]	2,334	0,0139
<b>PV (jak2+)</b>	15	71				
<b>fréquence</b>	42%	97%				
	notre série	Levine	3,055	[0,9275, 3,381]	1,771	0,0805
<b>n (PV)</b>	36	164				
<b>PV (jak2+)</b>	15	121				
<b>fréquence</b>	42%	73%				
	notre série	James	5,024	[1,102, 4,775]	2,293	0,0250
<b>n (PV)</b>	36	45				
<b>PV (jak2+)</b>	15	43				
<b>fréquence</b>	42%	96%				
	notre série	Klarovics	3,798	[0,989, 4,598]	2,133	0,0513
<b>n (PV)</b>	36	36				
<b>PV (jak2+)</b>	15	32				
<b>fréquence</b>	42%	89%				
	notre série	Jones	3,518	[0,9652, 3,873]	2,133	0,0607
<b>n (PV)</b>	36	72				
<b>PV (jak2+)</b>	15	58				
<b>fréquence</b>	42%	81%				
	notre série	Benguella	3,940	[1,002, 3,833]	1,959	0,0472
<b>n (PV)</b>	36	98				
<b>PV (jak2+)</b>	15	80				
<b>fréquence</b>	42%	81,60%				
	notre série	Nadjmi	0,04227	[0,3800, 3,301]	1,120	0,4175
<b>n (PV)</b>	36	15				
<b>PV (jak2+)</b>	15	7				
<b>fréquence</b>	42%	47%				
	notre série	Benmoussa	2,879	[0,8822, 5 ,227]	2,147	0,0897
<b>n (PV)</b>	36	19				
<b>PV (jak2+)</b>	15	17				
<b>fréquence</b>	42%	89,10%				
	notre série	Fekia	1,546	[0,7226, 4,216]	1,745	0,2138
<b>n (PV)</b>	36	22				
<b>PV (jak2+)</b>	15	16				
<b>fréquence</b>	42%	72,70%				

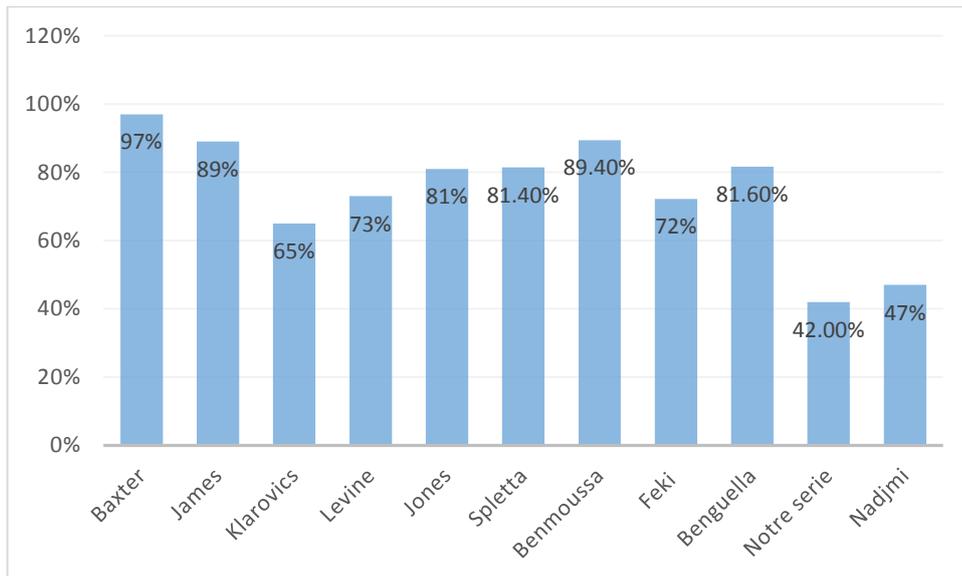


Figure.16-Comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la PV de notre série avec les autres séries.

On a réalisé une étude statistique afin de comparer nos résultats avec d'autres études des pays du Maghreb et des pays occidentaux , Pour la polyglobulie de vaquez nos résultat (42%) sont faibles par rapport à celui de la littérature(90-95%) ,il n'existe pas une différence significative entre notre groupe d'étude et le groupe d'étude de Fekri ,Benmoussa, Nedjmi ,Jones, Levine Klarovics et Benguella . il existe une différence entre notre groupe d'étude et le groupe d'étude de Baxter ,et de James cette différence pourrait s'expliquer par le faible effectif de patients positifs dans notre série d'étude ou pourrait être expliqué par l'absence de certain outils de diagnostic dans nos centres. Peut-être que certains cas de polyglobulie secondaire ont été inclus et considérés comme la polyglobulie essentielle. Ce diagnostic ambigu entre les deux groupes pourrait être expliqué par le manque de détermination d'érythropoïétine sérique (EPO) dans les tests de routine pour le diagnostic de PV dans nos centres, malgré les recommandations de l'OMS.

Tableau.14- Comparaison entre notre groupe d'étude TE et d'autres groupes.

	notre série	Benguella	X <sup>2</sup>	IC	OR	P-value
<b>n (TE)</b>	58	75	0,7905	[0,72, 2,37]	1,309	0,3739
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	44				
<b>fréquence</b>	45,50%	58,70%				
	notre série	Nadjmi				
<b>n (TE)</b>	58	12	0,737	[0,14, 2,14]	0,55	0,3906
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	3				
<b>fréquence</b>	45,50%	25%				
	notre série	Benmoussa				
<b>n (TE)</b>	58	8	0,291	—	—	0,5890
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	5				
<b>fréquence</b>	45,50%	62,50%				
	notre série	Fekia				
<b>n (TE)</b>	58	17	0,0098	—	—	0,9209
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	8				
<b>fréquence</b>	45,50%	47%				
	notre série	Baxter				
<b>n (TE)</b>	58	51	0,515	—	—	0,4726
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	29				
<b>fréquence</b>	45,50%	57%				
	notre série	Levine				
<b>n (TE)</b>	58	115	1,208	—	—	0,2717
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	37				
<b>fréquence</b>	45,50%	32,17%				
	notre série	Klarovics				
<b>n (TE)</b>	58	23	0,5503	—	—	0,458
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	14				
<b>fréquence</b>	45,50%	61%				
	notre série	Jones				
<b>n (TE)</b>	58	59	0,0825	—	—	0,7739
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	24				
<b>fréquence</b>	45,50%	41%				

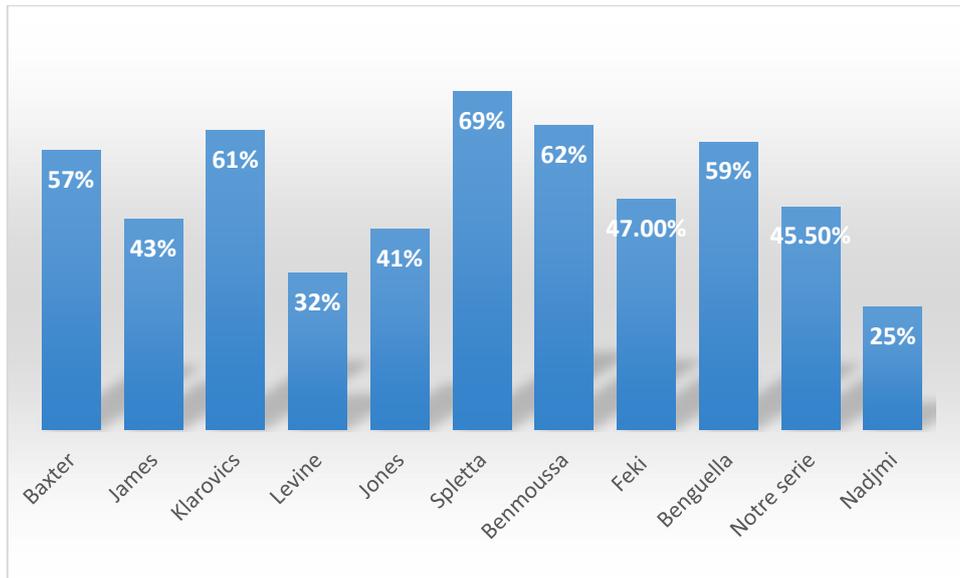


Figure.17- Comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la TE de notre série avec les autres séries.

Dans la thrombocytémie essentielle, il existe pas une différence significatif entre notre groupe d'étude et les autres groupes d'étude mutation JAK2 V617F était identifiée chez 45%TE et de notre série . Ce résultat corrobore celui des autres groupes d'études.

Tableau.15- Comparaison de notre groupe d'étude MFP avec d'autres groupes.

	notre série	Benguella	X <sup>2</sup>	P-value
<b>n (MFP)</b>	7	13	0,0076	0,9304
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	6		
<b>Fréquence</b>	43,00%	46,10%		
	notre série	benmoussa	0.0782	0,7798
<b>n (MFP)</b>	7	12		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	4		
<b>Fréquence</b>	43,00%	33,33%		
	notre série	Nedjmi	0,150	0,6985
<b>n (MFP)</b>	7	3		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	2		
<b>Fréquence</b>	43,00%	66,66%		
	notre série	Baxter	0,0358	0,8499
<b>n (MFP)</b>	7	16		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	8		
<b>Fréquence</b>	43,00%	50%		
	notre série	Levine	0,0779	0,7801
<b>n (MFP)</b>	7	46		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	16		
<b>Fréquence</b>	43,00%	35%		
	notre série	Klarovics	0,00	1
<b>n (MFP)</b>	7	7		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	3		
<b>Fréquence</b>	43,00%	43%		
	notre série	Jones	0,00	1
<b>n (MFP)</b>	7	35		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	15		
<b>Fréquence</b>	43,00%	43%		

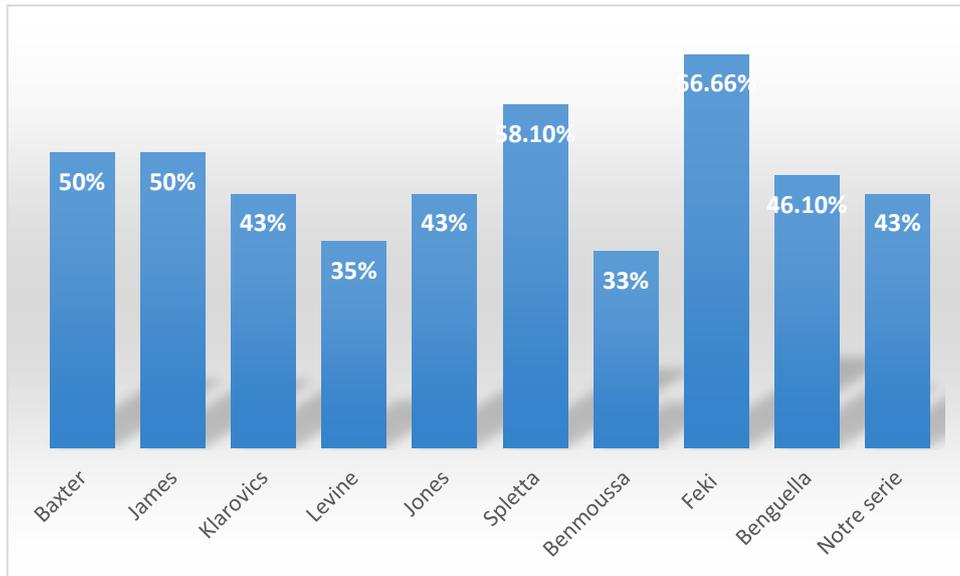


Figure16: comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la MFP de notre série avec les autres séries.

Dans la myélofibrose primitive la mutation v617f était identifiée chez 43% des MFP, d'après l'étude statistique il n'existe pas une différence significatif entre notre groupe d'étude et les autre groupe. La fréquence de la mutation dans notre groupe et la même que celle de Jones et klarovics et se rapproche des autres fréquences.

Tableau.16-Comparaison des critères cliniques et biologiques des groupes JAK2 V617F positifs et négatifs.

	tous les patients	jak2 v617f positif	jak2 v617f négatif	OR	IC	P valeur
<b>Nombre</b>	100	44(44%)	56(56%)			-
<b>Age (ans)</b>	48,13	57,47	46,09			0,0018
<b>Sex-ratio (M/F)</b>	62/38	22/20	38/18			-
<b>Splénomégalie</b>	20(20%)	13(29,5%)	7(12,5%)	0.4231	[0.1556-1.156]	0,938
<b>Thrombose</b>	36(36%)	12(27,2%)	24(42,8%)	1.571	[0.7077-3.489]	0,325
<b>Budd-chiari</b>	4(4%)	1(2,2%)	3(5,3%)	2.357	[0.3176-9.752]	0,631
<b>Anomalie érythrocytaire</b>	30(30%)	12(27,7%)	18(32,1%)	1.179	[0.5136-2.704]	0,834
<b>Anomalie plaquettaire</b>	38(38%)	22(50%)	16(28,5%)	0.571	[0.2684-1.216]	0,182
<b>Anomalie leucocytaire</b>	25(25%)	16(36,3%)	9(16%)	0.442	[0.1784-1.095]	0,116
<b>Anomalie du frottis</b>	10(10%)	6(13,6%)	4(7,1%)	0.523	[0.1391-1.972]	0,507
<b>Anomalie BOM</b>	13(13%)	7(15,9%)	6(10,7%)	0.673	[0.2111-2.148]	0,562
<b>Polyglobulie</b>	19(<19%)	7(15,9)	12(27,2%)	1.347	[0.4893-3.708]	0,621

On a utilisé le test exact de Fisher dans la comparaison des critères cliniques et biologiques présentés par les deux groupes JAK2 v617f positifs et négatifs, comme il est indiqué dans les résultats de l'étude du groupe algérien il y'a une différence significative dans la moyenne d'âge des deux groupes on peut dire que l'apparition de la mutation JAK2 v617f peut être lié à l'accumulation d'anomalies moléculaires et une instabilité génomique qui augmente progressivement. aucune différence significative n'a été observé dans les thrombose, dans budd Chiari et dans les anomalies érythrocytaire ,les polyglobulie ,la splénomégalie dans les d'anomalie plaquettaire et dans les anomalies leucocytaire cela permis

de faire l'hypothèse que c'est des événements peuvent survenir avant la mutation JAK2 V617F ou la mutation JAK2 V617F peut être un événement secondaire de ces anomalies.

(Benguella et *al* ,2014)

### III.2.2 Deuxième partie

La mutation JAK2 V617F n'est pas spécifique des SMP Ph- classiques et son absence ne permet en aucun cas de récuser le diagnostic de SMP. L'étude réalisée par Julie MONDET (2011) a pu mettre en évidence que la mutation JAK2 V617F peut être un événement secondaire dans les SMP ou un événement d'échappement aux conditions létales et que lorsque les patients atteints d'un SMP ne présentent pas la mutation jak2 v617f ils sont porteurs d'autres mutations plus rares de l'exon 12 ou de l'exon 14 du gène. Dans la TE et la MFP, lorsque la mutation V617F n'est pas présente, on peut retrouver des mutations du récepteur Mpl. Il y a donc dans la majorité des cas, activation des voies de signalisation impliquant JAK2.

Les mutations de MPL retrouvée chez 10% des MFP et 3% des TE.

Les mutations de LNK Les mutations LNK sont rares (<10% des SMP) retrouvées dans de rares cas de PV JAK2V617F négatif. On retrouve également les mutations de LNK dans 3 à 6% des TE ou des myélofibroses.

Les mutations de TET2 Les mutations touchant TET2 ont été décrites chez des patients atteints de PV, TE ou MFP avec des fréquences respectives de 16%, 5% et 17%. Elles sont associées ou non à la mutation JAK2V617F et peuvent coexister avec MPLW515L. Ces mutations sont retrouvées dans approximativement 3% des PV, dans 7 à 13% des myélofibroses primitives ou secondaires à une PV ou une TE mais pas dans la TE .

Les mutations CALR. Ces mutations sont localisées dans le neuvième exon du gène, conduisant à la mise en péril de C-terminale de la structure de la protéine et ont été signalés avoir une incidence de plus de 60% à 80% en JAK2 et MPL mutation négative TE et PMF patients .(LAMAR.S ,2014)

Dans notre groupe JAK2 V617F négatif la présence des thromboses est un signe en faveur d'un SMP en comparaison avec l'étude de Julie MONDET :

Les thromboses sont des complications fréquentes de la PV et de la TE qu'elles soient révélatrices du diagnostic ou qu'elles surviennent lors du suivi du patient. Leur incidence varie selon les études de 22 à 38.6% et de 9.7 à 29.4% respectivement pour la PV et la TE. Le risque thrombotique est artériel ou veineux, avec des sites parfois inhabituels. En

effet, les syndromes myéloprolifératifs sont des facteurs de risques associés au développement de thromboses veineuses en particulier splanchniques ou cérébrales. Cinquante pour cent (de 45% à 58% selon les études) des patients atteints de syndromes de Budd Chiari sont affectés par un SMP Ph-. La physiopathologie du risque thrombotique dans ces hémopathies est multifactorielle.

L'augmentation de l'hématocrite dans la PV, la leucocytose, l'activation plaquettaire ou leucocytaire jouent un rôle très probable dans les mécanismes prothrombotiques. Des anomalies caryolytiques récurrentes sont décelées chez approximativement un tiers à 50% des patients atteints de myélofibrose primitive, 11 à 33% des PV et 5 à 7% des TE. Leurs fréquences augmentent avec l'âge et l'évolution de la maladie. Les anomalies sont retrouvées quel que soit le type de SMP Ph-. Les plus fréquemment retrouvées sont des délétions (del(20q), del(13q)...), des trisomies (trisomie 8, 9, 1q...) certaines anomalies sont également présentes dans les syndromes myélodysplasiques comme la délétion 20 q, les anomalies des chromosomes 5 et 7 et moins fréquemment la délétion 13q.

**Created by PDF Combine Unregistered Version**

**If you want to remove the watermark, Please register**

**Created by PDF Combine Unregistered Version**

**If you want to remove the watermark, Please register**

République algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université de Blida-1-

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie et de physiologie cellulaire



## MÉMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie

Option : **Génétique et Physiologie**

Thème :

**Intérêt de la recherche de la mutation v617f du gène JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs classiques.**

Présenté par : **HAMDAOUI Salah Eddine.**

Soutenue le : **29 Juin 2016.**

Devant le jury :

<b>Mme ANANEAssia</b>	MCA	USBD-1-	Présidente
<b>Mme CherrallahAmira</b>	MCB	USDB-1-	Examinatrice
<b>Mr DJIDJIK Reda</b>	Professeur	CHU Beni-Messous	Promoteur
<b>Mme Guessaibia Nadia</b>	MCB	USDB-1-	Co-promoteur

2015-2016

# Remerciement

Avant tout, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir accordé la force et la patience, la santé et le courage pour compléter ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance au Professeur DJIDJIK Réda chef du service d'immunologie médicale (CHU Béni Messous) pour avoir mis à ma disposition tous le matériel et produits, à Mme GUESSAIBIA Nadia, ainsi que Dr BERKANI Meriem pour leur disponibilité et conseils et surtout la confiance qu'ils m'ont accordé qui m'a permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme ANANE maitre-assistant à l'Université de Blida-1-d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme CHERRALLAH Amira Docteur à l'université de Blida-1-, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens à exprimer également mes profondes reconnaissances à l'ensemble des enseignants surtout Mr MOHAMED SAID Ramdhane qui ont contribué à ma formation.

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste mémoire à mes chers parents : HAMDAOUL Mohamed et ZORRANOU Djamilia, qui ont veillé sur moi et surtout, soutenu depuis toujours, à mes grands-parents que Dieu les fasse rejoindre à son vaste paradis, ma grand-mère BELAHOUD Aicha; que Dieu la protège; mes tantes, mes cousins et cousines, ainsi que mes sœurs, mon frère et à tous les membres des familles HAMDAOUL, ZORRANOU.*

*Je dédie ce mémoire aussi aux personnes qui m'ont beaucoup aidé et encouragé durant mes études, surtout mes chers amis KESSOULOU Imad, TAHERAOUL Aymen, Guillaud Abdelkader et à toute la promotion de Génétique et physiologie 2015/2016 de l'université SAAO DAHLEROU Slida-1.*

*Salah-Edine*

## **RESUME**

La Janus kinase 2 (JAK2) est une protéine de type tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire.

La mutation JAK2 V617F associée aux syndromes myéloprolifératifs a été décrite comme un événement génétique fréquent chez la majorité des patients atteints de la polyglobulie de Vaquez (90%), de la thrombocythémie essentielle (50%) et de la myélofibrose idiopathique (50%). Cette mutation est caractérisée par un changement d'un nucléotide (un G pour un T) sur l'exon 14 du gène JAK2 situé sur le chromosome 9, locus 9p24.1, conduisant à une substitution de la valine en phénylalanine en position d'acide aminé 617 de la protéine JAK2.

Dans ce travail nous avons recherché la mutation JAK2 V617F, chez 100 patients chez lesquels un syndrome myéloprolifératif classique a été suspecté, et ce par la technique de PCR en temps réel (technologie Taqman). L'objectif principal est d'établir la prévalence de cette mutation dans les différents syndromes myéloprolifératifs classiques et recherché une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques.

La mutation JAK2 V617F a été retrouvée chez 42% des PV, 45% des TE, et 43% des MFP. Ces résultats en plus de ceux de la littérature confirment l'importance de cette mutation dans la pathogénèse des syndromes myéloprolifératifs.

La découverte de ce marqueur a rapidement été prise en compte par l'OMS qui a considéré la positivité de la mutation JAK2 comme un critère majeur du diagnostic dans les syndromes myéloprolifératifs.

**Mots Clés : Protéine jak2-JAK2 V617F - Syndromes myéloprolifératifs.**

## **Abstract**

The Janus kinase 2 (JAK2) is a tyrosine kinase protein involved in several signaling pathways responsible mainly for the survival and cell proliferation.

The JAK2 V617F mutation associated with myeloproliferative disorders has been described as a common genetic event in the majority of patients with polycythemia Vera (90%) and essential thrombocythemia (50%) and idiopathic myelofibrosis (50%). This mutation is characterized by a change of a nucleotide (a T for a G) on the exon 14 of the gene JAK2 located on chromosome 9, locus 9p24.1, leading to a substitution of valine to phenylalanine in position of amino acid 617 of the protein JAK2.

In this work we looked for JAK2 V617F mutation, at 100 patients to whom a myeloproliferatif syndrome was suspected, we have used a real time PCR (Taqman technology) the main objective is to establish the prevalence of this mutation in different classic myeloprolifératifs disorders and sought an association between the presence of this mutation and certain clinical characteristics.

The JAK2 V617F mutation was founded in 42% of PV, 45% of TE, and 43% of MFP these results in addition to those in the literature confirm the importance of this mutation in the pathogenesis of myeloproliferative disorders.

The discovery of this marker was quickly taken into account by the WHO, which considered the positivity of the JAK2 as a major criterion for diagnosis

**Keywords : jak2Protein - JAK2 V617F –Myeloproliferativedisorders**

## ملخص

(JAK2) هو بروتين من عائلة تروزين كيناز, يشارك في عدة مسارات للإشارات المسؤولة أساسا عن بقاء وتكاثر الخلايا.

وصفت الطفرة JAK2v617F المرتبطة بأمراض التكاثر النقي كحدث وراثي شائع عند غالبية المرضى الذين يعانون من كثرة الحمر فيرا (90%), و كثرة الصفائح الأساسية (50%), و تليف النقي مجهول السبب (50%). و تتميز هذه الطفرة بتغير النوكليوتيدات من T الى G في القطعة الدالة 14 من مورثة JAK2, الواقعة على الصبغي رقم 9p24.19, مما يؤدي الى استبدال الحمض الأميني رقم 617 على مستوى البروتين من فالين الى فنيل الالين.

فمنا من خلال هذه الدراسة بالبحث عن هذه الطفرة عند 100 شخص يعانون من متلازمة التكاثر النقي عن طريق Real Time PCR, و الغاية من البحث هي مقارنة مدى انتشار هذه الطفرة عند مجموعتنا الدراسية مقارنة مع مجموعات أخرى, والتيتسعى الى ايجاد علاقة بين هذه الطفرة وبعض الخصائص السريرية.

تم العثور على طفرة JAK2v617F في 42% من حالات كثرة الحمر, 45% من حالات كثرة الصفائح الأساسية, و 43% من حالات تليف النقي مجهول السبب. هذه النتائج بالإضافة الى النتائج السابقة تؤكد على أهمية هذه الطفرة في التسبب في متلازمات التكاثر النقي.

تمأخذ اكتشاف هذه الطفرة بعين الاعتبار بسرعة من قبل منظمة الصحة العالمية, التي يتعتبر إيجابية الطفرة JAK2 كمعيار رئيسي في تشخيص متلازمات التكاثر النقي.

**الكلمات المفتاحية: البروتين jak2 - متلازمات التكاثر النقي- الطفرة JAK2 V617F**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Critères OMS 2008 pour le diagnostic des SMP.....	6
<b>Tableau 2 :</b> principale anomalies chromosomiques communément retrouvées dans PV, MFP, et TE.....	20
<b>Tableau 3:</b> critères cliniques des patients .....	26
<b>Tableau 4 :</b> critères biologiques des tableaux.....	27
<b>Tableau 5:</b> Composition du mélange nécessaire à la détection de la mutation v617f.....	34
<b>Tableau 6 :</b> protocole d'amplification (jak2 v617f) .....	34
<b>Tableau 7 :</b> Comparaison des critères cliniques entre le groupe PV JAK2v617f positif et le groupe PV jak2v617f négatif .....	36
<b>Tableau 8:</b> Comparaison des critères biologiques entre le groupe PV JAK2v617f positif et le groupe PV jak2v617f négatif.....	36
<b>Tableau 9:</b> Comparaison des critères cliniques entre le groupe TE JAK2v617f positif et le groupe TE jak2v617f négatif .....	37
<b>Tableau 10 :</b> Comparaison des critères biologiques entre le groupe TE JAK2v617f positif et le groupe TE jak2v617f négatif .....	38
<b>Tableau 11:</b> Comparaison des critères cliniques entre le groupe MFP JAK2v617f positif et le groupe MFP jak2v617f négatif.....	38
<b>Tableau 12:</b> Comparaison des critères biologiques entre le groupe MFP JAK2v617f positif et le groupe MFPjak2v617 négatif.....	39
<b>Tableau 13:</b> Comparaison entre notre groupe d'étude PV et d'autres groupes.....	41
<b>Tableau 14:</b> Comparaison entre notre groupe d'étude TE et d'autres groupes.....	43
<b>Tableau 15:</b> Comparaison de notre groupe d'étude MFP avec d'autres groupes.....	45
<b>Tableau 16:</b> Comparaison des critères cliniques et biologiques des groupes JAK2 v617f positifs et négatifs.....	47

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : les lignées hématopoïétiques.....	2
<b>Figure 2</b> : Structure de la protéine JAK2 .....	8
<b>Figure 3</b> :L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs à la cytokine.....	9
<b>Figure 4</b> : l'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK.....	11
<b>Figure 5</b> : Voie de signalisation JAK/STAT non canonique .....	14
<b>Figure 6</b> : Structure de JAK2 V617F .....	15
<b>Figure 7</b> :Variation frequency of JAK2 exon12, JAK 2 V 617F, MPL W515L/K and CALR exon 9 frame-shifting mutations. ....	23
<b>Figure 8</b> : graphique de répartition des patients selon le sexe .....	25
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique de la chimie de marquage TaqMan .....	31
<b>Figure 10</b> : A:Hydrolyse de sondes .....	32
<b>Figure 11</b> : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.....	33
<b>Figure 12</b> : Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle muté et non muté (réfèrent) AK2 par PCR en temps réel (Taqman).....	35

**Figure 13** : Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle muté et non muté (réfèrent) JAK2 par PCR en temps réel(Taqman).....36

**Figure 14** : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la PV de notre série avec les autres séries..... 42

**Figure 15** : Comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la TE de notre série avec les autres séries..... 44

**Figure 16** : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la MFP de notre série avec les autres séries..... 46

## Liste des abréviations

- ARMS** :Système de Mutation Réfractaire par Amplification.
- AVC** : accident vasculaire cérébrale.
- BCL**: B-cell CLL/lymphoma 2.
- Bcl-XL**: BCL2-like 1.
- BCR–ABL**: Break Cluster Region-Abelson.
- BFU-E**: Burst Forming Unit – Erythroid.
- BOM** : biopsie ostéo-médullaire.
- CBL** : Casitas B lymphoma.
- CHU** : Centre hospitalo-universitaire.
- EHP** : établissement hospitalier publique.
- EHS** : établissement hospitalier spécialisé.
- DO** : densité optique.
- EGF**: epidermal growth factor.
- EPO**: érythropoïétine.
- EPO-R** : le récepteur à l'érythropoïétine.
- ERK**: Extracellular signal Regulated Signal.
- FERM**: Four-point one, Ezrin, Radixine, Moesin.
- Gab**: Grb2-associated binder.
- G-CSF-R** : récepteur du facteur de croissance granulocytaire.
- GM-CSF**: Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor.
- Grb2**: Growth factor receptor-bound protein 2.
- GSK3**: Glycogen synthase kinase 3.
- HP1**: Heterochromatin protein 1.
- HTA** : Hypertension artérielle.
- HTP** : Hypertension portal.
- HB** : Hémoglobine.
- dHPLC** : Chromatographie Liquide dénaturante à Haute Performance.
- HRM**: Hight Resolution Melting.
- IFN**: interféron.
- IGF** : Insuline Like Growth Factor.
- IL-R** : récepteur à l'interleukine.

**IRS:** Insulin Receptor Substrat.

**JAK:** Just an another kinase , JANUS KINASE.

**JH:** JAK Homology.

**JNKs:** c-Jun N-terminal Kinase.

**Jun:** oncogene JUN, alias AP1.

**KIR:** kinase inhibitory region.

**LAM :** Leucémie Aiguë Myéloïde.

**LMC :** Leucémies Myéloïde Chronique.

**LMMC :** Leucémie Myélomonocytaire Chronique.

**MAPK :** Mitogen Activated Protein Kinase.

**MEC :** Matrice Extra-Cellulaire.

**dNTP:** Deoxyribonucleotide triphosphate.

**NFS :** numération formule sanguine.

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé.

**PCR:** Polymerase Chain Reaction.

**PDK:** phosphatidylinositol -dependent kinase.

**PG :** Polyglobulie.

**PH:** Plextrin Homology.

**PIAS:** protein inhibitors of activated STAT.

**PI3K:** Phosphatidyl Inositol 3 Kinase.

**Pim-1:** Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase.

**PMF:** myélofibrose primitive.

**PNN:** Polynucleaire netrophile.

**PNE:** polynucleaire eosinophile.

**PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog.

**PTP:** Protein Tyrosine Phosphatases.

**PV:** polyglobulie de Vaquez.

**PVSG:** Polycythemia Vera Study Group.

**RARS-T:** Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis.

**RSK:** Ribosomal s6 kinase.

**SCF:** stem cell factor.

**SMD :** syndrome myélodysplasique.

**SHP :** SH2-domain containing Phosphatase.

**SMP :** syndromes myéloprolifératifs.

**SOCS:** suppressor of cytokine signaling.

**SPM:** splénomégalie.

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription.

**TC-PTP :** T cell protein tyrosine phosphatase.

**TE :** thrombocytémie essentielle.

**TET2:** Ten Eleven Translocation 2.

**mTORC:** mTOR complex 2.

**TPO:** Thrombopoïétine.

**TYK:** tyrosine Kinase.

**Tyr-P:** tyrosines phosphorylées.

**VEGF :** Vascular Endothelial Growth Factor.

**VGI :** volume globulaire isotopique.

---

## Glossaire

**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 les plaquettes lors de la thrombocytopoïèse et les cellules de la lignée lymphoïde lors de la lymphopoïèse .

**Cellule souche multipotente** : des cellules souches multipotentes (cellules fœtales et adultes) capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires, comme les cellules souches myéloïdes de la moelle osseuse qui sont à l'origine des cellules sanguines (érythrocytes, monocytes, granulocytes...)

**Cyanose** : Coloration mauve ou bleutée de la peau due à la présence d'un taux anormalement élevé (supérieur à 50 grammes par litre de sang) d'hémoglobine non oxygénée dans les vaisseaux capillaires de la peau et qui prédomine sur les ongles et les lèvres.

**Dacryocyte** : est un terme issu du grec *dakuron*: larme et *kutos*: cellule Les dacryocytes sont des globules rouges en forme de larmes. Une prolifération de dacryocytes est appelée une "dacrycytose". Une dacrycytose se voit souvent dans les myélofibroses, les thalassémies et toute hématopoïèse extramédullaire.

**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.

**Glycoprotéine 130** : (également connu sous le gp130, IL6ST, IL6-bêta ou CD130) est une protéine transmembranaire qui est le membre fondateur de la classe de tous les récepteurs de cytokines . Elle forme une sous - unité du type I ,récepteur de cytokine au sein du récepteur de l' IL-6 famille

## Glossaire

**Hématopoïèse** : (du Grec αἷμα, αίματος : "le sang" et ποιεῖν : faire, fabriquer) désigne le processus physiologique de production des cellules sanguines ou bien éléments figurés du sang.

**Hypoxie** : désigne diminution des besoins tissulaires en oxygène et les apports. Elle peut être la conséquence de l'hypoxémie.

**La réticuline** : est une fibre des matrices extra-cellulaires, on la trouve en particulier dans les tissus hématopoïétiques, mais aussi dans le rein, le foie et les glandes endocrines. Elle mesure de 0.1 à 0.2 μm de diamètre et forme un réseau relativement fin autour des vaisseaux sanguins, autour des cellules musculaires, autour des cellules adipeuses ; et constitue la charpente de certains organes sur laquelle repose le parenchyme des organes. C'est le tout premier type de fibre produit au cours de l'histogenèse.

**Précurseurs** : cellules dérivant d'un progéniteur capable de se diviser et mûrissent

**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

RESUME.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iiiv
GLOSSAIRE.....	iiiv
INTRODOCTION GENERALE.....	ix
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....	1
I.1 Les syndromes myeloprolifératifs .....	2
I.1.1 L'hématopoïèse .....	2
I.1.2 Description générale.....	3
I.1.3 la Polyglobulie de Vaquez.....	3
I.1.3.1 Présentation clinique de la Polyglobulie de Vaquez.....	4
I.1.4 Thrombocythémie essentielle .....	5
I.1.5 Myélofibrose Primitive .....	5
I.2 JANUS KINASE (JAK2) .....	7
I.2.1 Définition : .....	7
I.2.1 Structure .....	7
I.2.3 Fonctions : .....	8
I.2.3.1 Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines : .....	9
I.2.3.2 La voie JAK/STAT canonique : .....	10
I.2.3.3 La voie PI3K/Akt : .....	11
I.2.3.4 La voie des MAPKs : .....	12
I.2.4 Les régulateurs négatifs.....	12
I.2.4.2 Les SOCS : .....	13
I.2.5 Les fonctions de jak2 dans la régulation épigénétique : .....	13
I.3 La mutation JAK2 V617F : .....	14

I.3.1 Description de la mutation JAK2 V617F.....	14
I.3.2 Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines :.....	15
I.3.3 La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique:.....	16
I.3.4 L'altération du rétrocontrôle négatif :.....	16
I.3.5 La régulation croisée du récepteur à l'IGF : .....	17
I.3.6 L'impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique :.....	17
I.3.7 JAK2 est l'événement initiateur de la PV .....	18
I.3.8 Une mutation — trois pathologies distinctes : .....	19
I.3.9 Pathogenèse JAK2 V617F : .....	19
I.3.10 Autres anomalies génétique présente dans les syndromes myéloprolifératifs classiques.....	21
I.3.10.1 Les mutations de MPL.....	21
I.3.10.2 Les mutations de LNK:.....	21
I.3.10.3 Les mutations de TET2,EZH et CALR.....	22
I.3.11 Détection de JAK2 V617F.....	23
CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES.....	24
II.1 Les Patients :.....	25
II.2 Critères cliniques et biologiques des patients :.....	26
II.2.1 Les Critères Cliniques.....	26
II.2.2 Les Critères Biologiques.....	27
II.3 Méthode :.....	28
II.3.1 Prélèvements.....	28
II.4 Extraction et dosage de l'ADN :.....	28
II.4.1 Extraction.....	28
II.4.2 Dosage de l'ADN .....	29
II.5 Recherche de la mutation par PCR en temps réel (real time PCR) .....	29
II.5.1 Chimies de marquages.....	29

II.5.1.1 Les sondes d'hydrolyses(Taqman) .....	29
II.5.1.2 Protocole opératoire : .....	33
II.5.1.3 Protocole d'amplification : .....	34
II.6 Analyse statistique : .....	34
CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION .....	35
III.1 Résultats .....	36
III.2 La discussion : .....	39
III.2.1 Première partie : .....	39
III.2.2 Deuxième partie .....	47
CONCLUSION .....	48
Références .....	50
Annexes .....	57

## Introduction générale

Les syndromes myéloprolifératifs (ou SMP) sont des hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale des cellules myéloïdes (Chomel et *al*, 2009)

La première description de ces pathologies hématologiques a été faite par William Dameshek en 1951 (Dameshek 1951). Les principales pathologies regroupées dans les SMP sont la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocythémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP). La Leucémie Myéloïde Chronique se distingue des autres SMP par la présence d'une translocation tr 9-22, appelée chromosome de Philadelphie (Phi), résultant en la protéine de fusion BCR-ABL, ce qui la place à part des autres SMP. La Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocythémie Essentielle et la Myélofibrose idiopathique sont désignées SMPPhi- (négatif pour le chromosome Philadelphie). En 2005, plusieurs groupes ont mis en évidence la présence de la mutation commune V617F de la tyrosine kinase JAK2 dans la plupart de ces pathologies. Cette mutation est retrouvée dans environ 90% des PV, 50% des MFP et 70% des TE (Baxter, Scott et al); (James, Ugo et al. 2005); (Kralovics, Passamonti et al. 2005); (Levine, Wadleigh et al. 2005). Plus récemment d'autres mutations au niveau de l'exon 12 de JAK2 ont été décrites (Scott, Tong et al. 2007). Le pronostic le plus favorable est celui de la TE, le plus mauvais étant celui de la MFP. La TE peut évoluer en PV, ces deux pathologies peuvent également évoluer en myélofibrose. Enfin, chacun de ces trois syndromes myéloprolifératifs peut se transformer en leucémie aigüe myéloïde.

Notre travail a été effectué sur 100 patients suspectés avoir un syndrome myéloprolifératif classique dans le but de chercher des liens entre la présence de mutations jak2 v617f et les différents critères cliniques et biologiques présentés par les patients.

CHAPITRE I :  
SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## Chapitre I : Etudes bibliographique

### I.1 LES SYNDROMES MYELOPROLIFERTIFS

#### I.1.1 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui conduit à la génération continue et régulée des cellules sanguines matures à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) dans un microenvironnement spécifique. C'est un processus complexe qui a lieu dans le thymus. Il y a deux grandes lignées de cellules hématopoïétique : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (lymphocytes). la lignée lymphoïde comprend les lymphocytes (Tet B)et les NK, La lignée myéloïde comprend la lignée granuleuse (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles), et la lignés mégacaryocytaire (plaquettes). au sein du thymus .les csh qui correspondent à une population très minoritaire, sont multipotentes et capables d'auto-renouvellement.

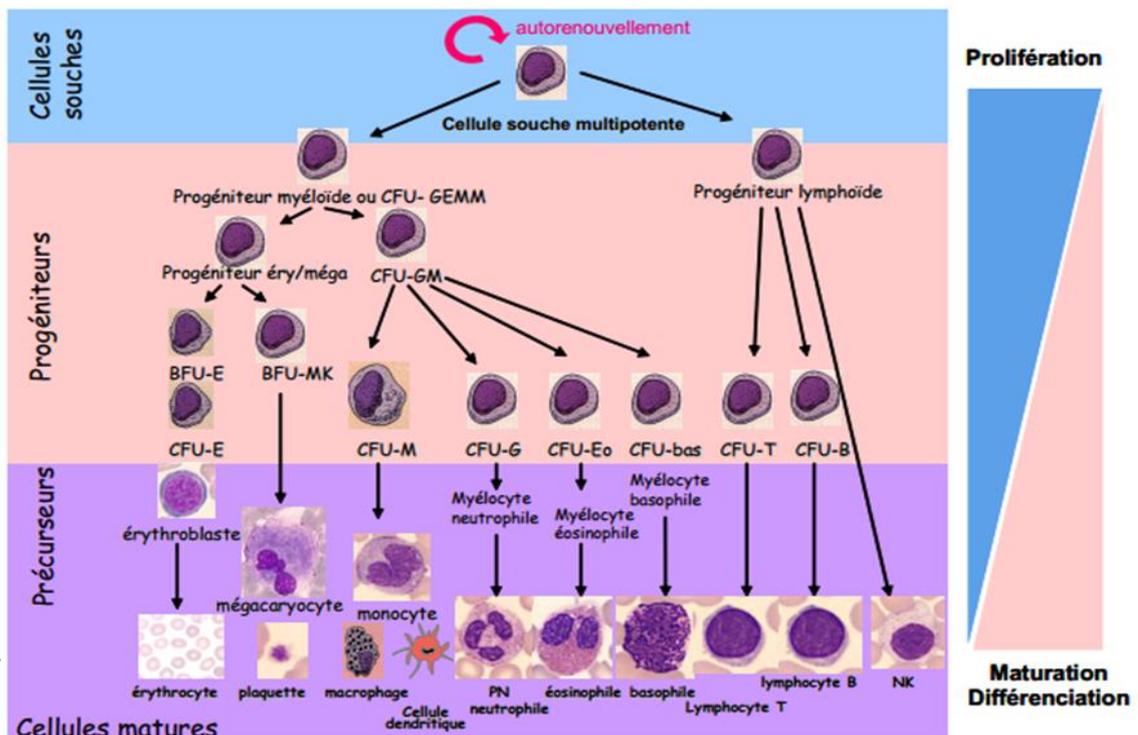


Figure.1-Les lignées hématopoïétiques.(Boissinot, 2008).

### I.1.2 Description générale

En 1951, **William Dameshek** fut le premier à décrire les syndromes myéloprolifératifs (SMP). En se basant sur des similarités phénotypiques de myéloprolifération il regroupa: la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP) (**Dameshek, 1951**).

Par la suite, une anomalie cytogénétique due à une translocation [t(9;22)(q34;q11)] ,dont résulte la protéine de fusion BCR-ABL (une tyrosine kinase constitutivement active et présente chez 100% des patients ), a permis de séparer les SMP en deux catégories :

- Les SMP Phi+, ou positifs pour le chromosome de Philadelphie : il s'agit de la LMC.
- Les SMP Phi-, ou négatifs pour le chromosome de Philadelphie : y sont classés la PV, la TE et la MFP.

Les SMP Phi- sont caractérisés par une prolifération clonale et une accumulation de cellules myéloïdes matures de la lignée érythrocytaire, granulocytaire, thrombocytaire ainsi que par le développement d'une fibrose ostéo-médullaire. En 2005, une mutation sur le gène codant pour la tyrosine kinase JAK2 a été mise en évidence. Cette mutation entraîne un changement d'acide aminé, d'une valine pour une phénylalanine, en position 617 (V617F) dans la protéine JAK2. Cette mutation est retrouvée dans environ 95% des cas de PV, 60% des TE et 50% des MFP .D'autres marqueurs génétiques ont récemment été identifiés et feront l'objet du paragraphe "Génétique des SMP". Parmi les SMP Phi-, la TE présente le meilleur pronostic, le plus mauvais étant celui de la MFP. De plus la TE peut évoluer en PV, qui peuvent toutes deux évoluer en MFP. Il est également à noter que ces trois syndromes peuvent se transformer en Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM).(**Cleytay,2010**).

### I.1.3 La Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez (PV) est le premier des SMP à avoir été reconnu comme une entité clinique. Hyprocrate avait déjà décrit quelques cas, mais c'est Luis Henri Vaquez, en 1892 qui publia le premier une description détaillée d'un patient dont il nomma la pathologie « cyanose avec hyperglobulie persistante »(**Vaquez, 1892; Skoda, 2007**). Plus

tard, **William Osler** rapporta quatre autres cas de patients souffrant de « vraie polyglobulie», en opposition avec les polyglobulies dues à l'hémoconstriction (**Osler, 1903; Osler,1908**). Depuis, les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis de mieux caractériser la PV. La PV est une maladie clonale, acquise, caractérisée par une augmentation de la prolifération de la lignée érythrocytaire principalement mais également des lignées granulocytaires et mégacaryocytaire. La PV se différencie des polyglobulies dites secondaires ou réactionnelles par l'absence d'hypoxie ou d'hyperproduction d'érythropoïétine (cardiaque ou respiratoire) Le diagnostic de la PV se fait sur des critères majeurs et mineurs dont le détail est présenté dans le Tableau 1. Globalement, ils comprennent l'élévation de l'hématocrite et de l'hémoglobine, la présence de la mutation JAK2V617F ou d'autres mutations de JAK2 (exon 12), un taux d'érythropoïétine sérique normal ou bas et enfin, une pousse endogène des progéniteurs en culture in vitro en l'absence de cytokines. Les patients atteints de PV sont généralement âgés (>60 ans).

De nombreux progéniteurs hématopoïétiques CD34+ sont présents dans le sang des patients, ce qui indique un changement de compartiment des cellules souches de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Ce phénomène conduit à une installation des progéniteurs dans la rate et ainsi à une splénomégalie.(**Boissinot, 2008**).

### **I.1.3.1 Présentation clinique de la Polyglobulie de Vaquez**

Les critères diagnostics des SMP sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Tableau 1**), la présence de la mutation V617F de JAK2 découverte en 2005 (**Baxter, Scott et al; James, Ugo et al, 2005; Kralovics, Passamonti et al, 2005; Levine, Wadleigh et al, 2005**) et les mutations de l'exon 12 de JAK2 font maintenant partie des critères majeurs de diagnostic de la PV (**Scott, Tong et al, 2007**). Dans certains cas, les patients développent une splénomégalie résultant d'une hématopoïèse extramédullaire, l'apparition d'un prurit est également courante. Les complications les plus fréquentes sont des thromboses, des hémorragies et dans moins de 10% des cas, on observe une transformation en leucémie aigüe myéloïde .(**Boissinot, 2008**).

### **I.1.4 Thrombocythémie Essentielle**

Les patients atteints de thrombocythémie essentielle (TE) présentent un taux de plaquettes très élevé souvent accompagné d'une élévation du taux de granulocytes. Les mégacaryocytes sont géants et ont des lobulations de noyaux atypiques. Le diagnostic de la TE est basé essentiellement sur des critères d'exclusion. Exclusion, tout d'abord, des critères des autres SMP (PV et MFP), et exclusion des causes de thrombocytose réactionnelle (**Tableau 1**). Les critères d'inclusion sont donc l'élévation du taux de plaquettes, la présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur clonal, prolifération de mégacaryocytes matures (**Tableau 1**). Les patients atteints de TE sont généralement des adultes mais on trouve aussi des cas de TE chez les enfants. Les complications courantes sont des accidents thrombotiques. (**Boissinot, 2008**).

### **I.1.5 Myélofibrose Primitive**

La myélofibrose primitive (MFP) appelée aussi myélofibrose idiopathique est caractérisée par une prolifération excessive de la lignée myéloïde associée à un envahissement progressif de la moelle osseuse par du tissu fibreux avec apparition d'une hématopoïèse extramédullaire, d'une splénomégalie et d'une anémie. Son incidence est de 0,5 à 1,3/100 000 habitants par an. L'âge moyen au moment du diagnostic se situe entre 60 et 65 ans. La MFP peut être la conséquence de l'évolution d'une MV ou d'une TE. Les risques majeurs de la maladie sont l'évolution en LAM et l'insuffisance médullaire. Dans la MFP, les progéniteurs érythroïdes sont également capables de former des CEE. La pousse spontanée des CFU-MK a également été mise en évidence dans cette pathologie (**Adams et al, 1988**).

**Tableau.1-Critères OMS 2008 pour le diagnostic des SMP, d'après (Tefferi, 2009).**

<b>Critères diagnostiques OMS 2008</b>			
	<b>Polyglobulie de Vaquez</b>	<b>Thrombocytémie Essentielle</b>	<b>MyéloFibrose Primitive</b>
<b>Critères Majeurs</b>	<p><b>1-</b> Hb &gt;18,5 g/dL (♂) &gt; 16,5 g/dL (♀) <i>Ou</i> Hb &gt;17 g/dL (♂) &gt; 15 g/dL (♀) si associé à une augmentation ≥2g/L de la valeur basale qui ne peut être attribuée à une correction d'une déficience en fer ou Augmentation ≥ 25% de la masse globulaire p/r à la moyenne <i>Ou</i> Taux d'Hb ou Hct &gt; 99% à la gamme de référence</p>	<p><b>1-</b> Taux de plaquettes ≥450.109/L</p>	<p><b>1-</b> Prolifération mégacaryocytaire atypique associée à une fibrose réticulinique et/ou collagénique <i>Ou</i> En absence de fibrose réticulinique, la prolifération mégacaryocytaire atypique doit être associée à une augmentation de la cellularité médullaire, d'une prolifération granulocytaire et fréquemment d'une baisse de l'érythropoïèse (i.e. MFP pré-fibrotique)</p>
	<p><b>2-</b> Présence de JAK2V617F (ou mutations similaires)</p>	<p><b>2-</b> Prolifération de mégacaryocytes de grande taille morphologiquement matures. Peu, ou pas, de prolifération érythroïde ou granulocytaire</p>	<p><b>2-</b> Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, les SMD et les autres SMP</p>
<b>Critères Mineurs</b>	<p><b>1-</b> Prolifération des 3 lignées myéloïdes dans la moelle osseuse</p> <p><b>2-</b> Taux d'Epo sérique inférieur à la normale</p> <p><b>3-</b> Pousse de CEE</p>	<p><b>3-</b> Absence des critères diagnostiques de l'OMS pour la LMC, la PV, la MFP, les SMD et les autres SMP</p>	<p><b>3-</b> Présence de JAK2V617F <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve de fibrose ostéo-médullaire réactionnelle</p>
		<p><b>4-</b> Présence de JAK2V617F <i>Ou</i> D'un autre marqueur de clonalité <i>Ou</i> Absence de preuve d'une thrombocytose réactionnelle</p>	<p><b>1-</b> Leuco-érythroblastose</p> <p><b>2-</b> Augmentation du taux de LDH sérique</p> <p><b>3-</b> Anémie</p> <p><b>4-</b> Splénomégalie palpable</p>

## I.2 JANUS KINASE (JAK2)

### I.2.1 Définition

La protéine JAK2 est une (protéine à fonction tyrosine kinase ) dont le gène est localisé en 9p24 (**Streak et al ,2007**) . fait partie de la sous-famille des protéines JAK (pour Janus Kinase)qui sont des molécules de signalisation intracellulaire non réceptrices. Cette sous-famille est impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables notamment de la survie et de la prolifération cellulaire (**Schindler et al,2002**). JAK2 peut se fixer à des récepteurs de facteur de croissance homodimériques comme le récepteur à l'érythropoïétine (EPO-R), le récepteur à la thrombopoïétine (TPO-R ou MPL), le récepteur du facteur de croissance granulocytaire (G-CSF-R) ou hétérodimériques comme le récepteur à l'interleukine 3 (IL3-R) ( **Parganas et al , 1998**).

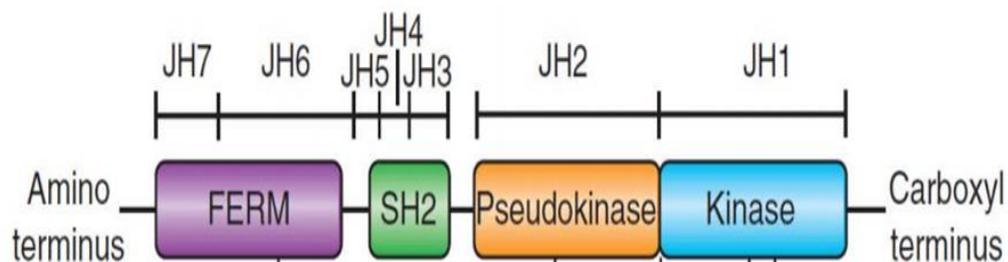
### I.2.2 structure

La tyrosine kinase (JAK2) appartient à la famille des Janus des tyrosines kinases appelées janus kinases, qui comprend également TYK2, JAK1 et JAK3.C'est une protéine cytosolique d'environ 130 kDa. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et est fortement conservée entre les espèces. Semblable aux autres JAKs, La protéine JAK2 comporte plusieurs domaines fonctionnels essentiels à son activité appelés JAK homologie (JH) de JH1 à JH7 .(**Lucet et al , 2006**) (**figure 1**) :

- **Le domaine JH1:** c'est le domaine catalytique. Il contient les résidus aminés tyrosine conservés et impliqués dans l'auto-régulation de l'activité kinase. La phosphorylation de ces tyrosines est nécessaire à l'activation de JAK1, JAK2 et TYK2.

-**Le domaine JH2 :** c'est le domaine pseudo-kinase. Il ne possède pas d'activité catalytique propre mais il est néanmoins nécessaire à la fonction catalytique des JAKs (Arora et al ;2003). En absence du domaine JH2, l'activité kinase des JAKs est fortement augmentée (Cargnello et al ;2011). Ces observations supposent donc un rôle inhibiteur du domaine JH2. D'autre part, le domaine JH2 de JAK1, JAK2 et JAK3 s'associe avec les facteurs de transcription de la famille STATs (**Hilkens et al ; 2001**).

- **Les domaines JH3 à JH7** : forment le domaine N-terminal et sont impliqués dans l'association des JAKs aux récepteurs des cytokines. Ils permettent aussi le recrutement d'autres substrats. Les domaines JH4 à JH7 forment un motif FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin). Ces motifs sont impliqués dans des interactions protéine/protéine et notamment dans les interactions avec les récepteurs (**Machida, and Mayer, 2005**). Ce motif semble ainsi être impliqué dans l'interaction entre JAK1 et la chaîne gp130 de certains récepteurs de cytokines tels que le récepteur à l'interleukine 6(IL6-R) (**Hebenstreit et al ; 2006**).



**Figure.2-Structure de la protéine JAK2 (Emilie-Fleur et al ;2011).**

La moitié carboxy-terminale de la protéine est composée de JH1 et JH2, régions qui codent respectivement pour les domaines kinase et pseudo-kinase. La moitié amino-terminale de JAK2 contient les domaines de JH3 à JH7. Le domaine N-terminal et surtout les résidus 32-58 du domaine JH7 sont indispensables à la fixation de JAK2 à l'EpoR.

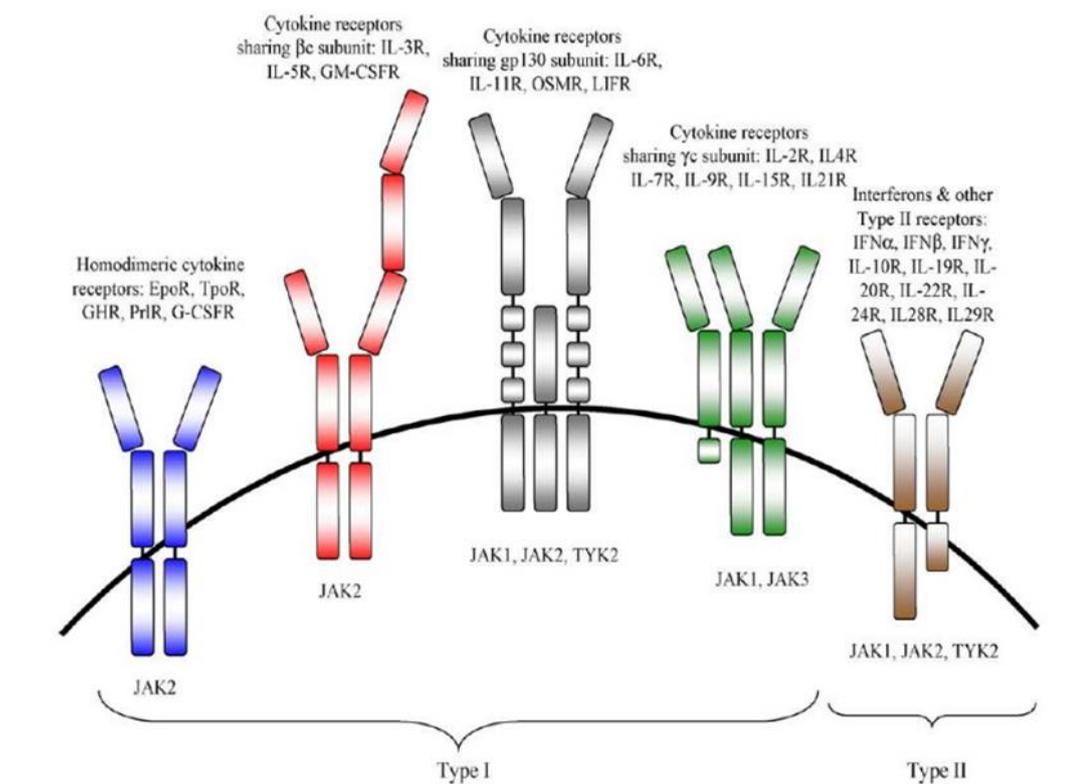
### **I.2.3FONCTIONS**

La voie JAK2/STAT est une étape clé dans la voie de signalisation de nombreuses cytokines, telles que l'EPO, les facteurs de croissance, la prolactine, la thrombopoïétine, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), l'IL -3 et l'IL -5. (**Nelson, ME., Steensma, DP ; 2006**).

### I.2.3.1 Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines

La prolifération, la survie et la différenciation cellulaire des lignées hématopoïétiques sont finement régulées par les cytokines. La première étape de transduction du signal des cytokines est la fixation de celles-ci sur leur récepteur.

Ainsi, JAK2 va être activée par l'EPO, la 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 $\alpha$  ou l'IFN $\beta$ .



**Figure.3-**L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines.(Vainchenker et al, 2008).

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  $\beta$ c. JAK3 est activé uniquement par les récepteurs possédant la sous-unité  $\gamma$ c. Les récepteurs possédant la sous-unité gp130, et les récepteurs

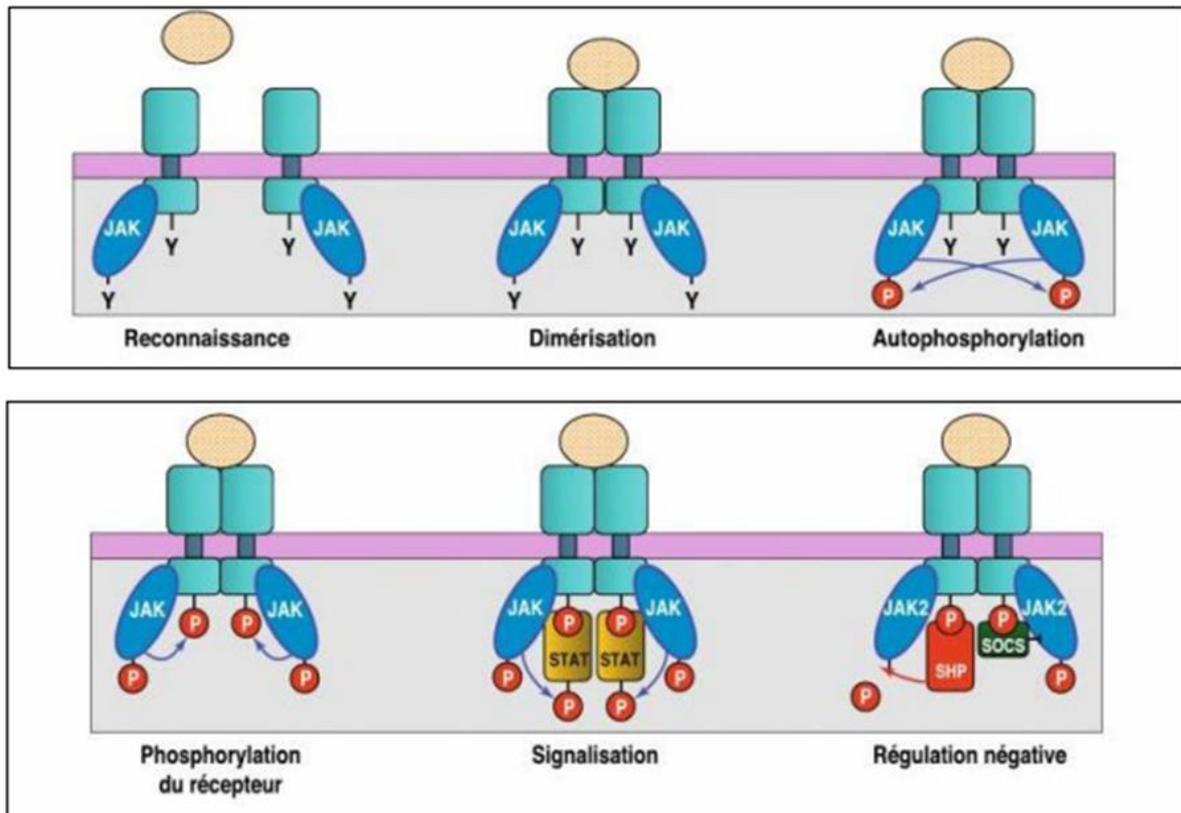
aux cytokines de type II utilisent JAK1, JAK2 et Tyk2 dans des combinaisons variées. D'après (Vainchenker et al, 2008).

### **I.2.3.2 La voie JAK/STAT canonique**

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. En aval de JAK2 sont activées les STAT 1, 3 et 5. Les STATs possèdent tous un résidu tyrosine conservé. Les kinases JAKs associées au récepteur se trans-phosphorylent et phosphorylent ensuite des résidus tyrosine spécifiques du domaine intra-cytoplasmique 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 dans le cytoplasme et transloquer dans le noyau où ils vont réguler l'expression de gènes cible et favoriser leur transcription (Li, 2008).

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. On compte, dans les cibles de STATs, des protéines impliquées 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, anti-prolifératif et proapoptotique. (Stephanou, and Latchman, 2005)



**Figure.4-**L'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK.(Jacques, 2010).

Les protéines JAK sont associées de façon constitutive aux récepteurs. La reconnaissance d'une cytokine permet la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation croisée des protéines JAK associées. Ces dernières phosphorylent également le récepteur, ce qui permet la reconnaissance de phosphotyrosines par divers protéines, dont les principales sont les protéines STAT, qui sont phosphorylées par les kinases JAK. La régulation négative de la signalisation est réalisée en particulier par les protéines SOCS qui prennent la place des protéines STAT sur les phosphotyrosines du récepteur et inhibent la kinase JAK, et par les phosphatases SHP qui se lient au récepteur et déphosphorylent les kinases JAK.(Jacques, 2010).

### I.2.3.3 La 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-dependent kinase 1) et par le complexe mTORC2 (mTOR complex 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).(Gautier, 2011).

### **I.2.3.4 La voie des MAPKs**

Les MAPKs sont des serine/thréonine kinases ubiquitaires dont la superfamille possède 11 membres : ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3, p38MAPKs (p38 $\alpha/\beta/\gamma$ ), ERK5, ERK3 et ERK7. 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.(GAUTIER, 2011).

### **I.2.4 LES REGULATEURS NEGATIFS**

La signalisation des récepteurs aux cytokines médiée par JAK2 possède également des protéines inhibitrices exerçant un rétrocontrôle négatif. Les trois classes de régulateurs négatifs les plus connues en aval de JAK2 sont : les protéines SOCS, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) et PTP (Protein Tyrosine Phosphatases). (LAABYECH.A ,2013).

#### **I.2.4.1 Les phosphotyrosines phosphatases**

Plusieurs protéines à activité phosphatase interviennent pour limiter la cascade de phosphorylation mise en jeu par la voie JAK/STAT .Elles agissent soit au niveau des

kinases JAK, soit au niveau des protéines phosphorylées par les JAK, en particulier les récepteurs de cytokines ou les facteurs STAT.(LAABYECH ,2013).

#### **I.2.4.2 Les SOCS**

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 [49]. Elles peuvent également être induites par d'autres stimuli qui n'activent pas la voie JAK/STAT, comme les lipopolysaccharides, l'insuline, l'EGF (epidermal growth factor) et le SCF (stem cell factor) .(De Sepulveda et al ,1999).

#### **I.2.4.2 Les PIAS :**

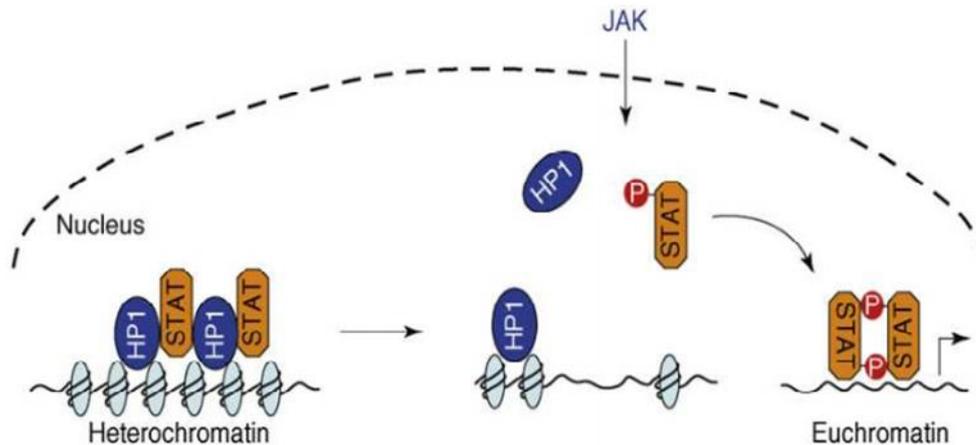
La protéine PIAS1 (proteininhibitors of activated STAT) a été identifiée comme partenaire de STAT1 dans des expériences de double hybride . Les autres membres de sa famille, PIAS3, PIASxa, PIASxb et PIASy, ont été identifiés sur la base d'homologies de séquence avec PIAS1 Ces protéines sont exprimées constitutivement, mais leur interaction avec les STAT est observée seulement après stimulation par des cytokines. En effet, les PIAS ne se lient qu'aux formes activées des STAT. Il existe parmi les PIAS une certaine sélectivité de reconnaissance des membres STAT . Les différentes PIAS utilisent des mécanismes différents pour inhiber la signalisation JAK/STAT.

### **I.2.5 les fonctions de jak2 dans la regulation epigenetique**

Outre la voie canonique classique décrite ci-dessus, la voie JAK/STAT peut également agir de manière totalement différente, sans faire intervenir l'activité transcriptionnelle des STATs. En effet, des travaux réalisés chez la drosophile ont permis de mettre en évidence un autre mode d'action de la voie JAK/STAT.

Une partie des protéines STATs non phosphorylées est localisée dans le noyau, sur l'hétérochromatine, associée à la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1), une protéine majeure de l'hétérochromatine (Shi et al ;2008). La présence des STATs au niveau de l'hétérochromatine est essentielle pour le maintien de la localisation de HP1

et la stabilité de l'hétérochromatine. L'activation des STATs par phosphorylation induit un décrochage des STATs, ce qui entraîne un déplacement de HP1 et une déstabilisation de l'hétérochromatine (Shi et al, 2008). (Figure 05)



**Figure.5-** Voie de signalisation JAK/STAT non canonique. (Li, 2008).

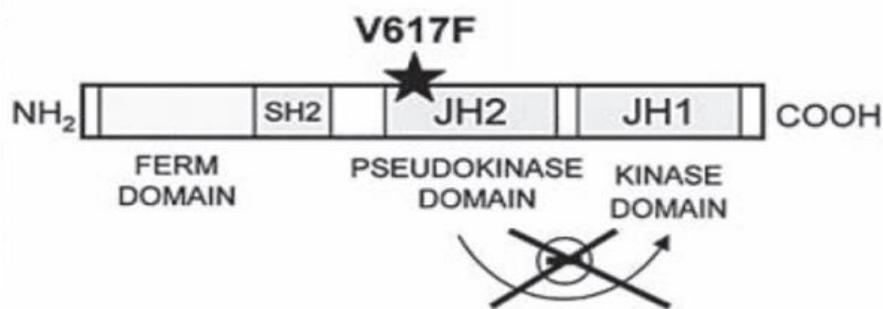
Dans le mode non-canonique de la voie JAK/STAT, les STATs non phosphorylés sont localisés dans le noyau, associés à HP1 au niveau de l'hétérochromatine. La phosphorylation de STATs par JAK entraîne une diminution de la quantité de STATs localisés sur l'hétérochromatine. Ceci mène au déplacement de HP1 et à une instabilité de l'hétérochromatine. Les STATs phosphorylés se fixent ensuite sur l'euchromatine afin d'activer la transcription de gènes cibles. Les STATs et autres facteurs de transcription ne peuvent pas accéder aux gènes localisés au niveau de l'hétérochromatine. (Li, 2008).

## I.3 LA MUTATION JAK2 V617F

### I.3.1 Description de la mutation JAK2 V617F

La mutation JAK2 V617F est une substitution de la guanine en position 1849 par la thymidine au niveau de l'exon 14 du gène de JAK2. Cette mutation ponctuelle entraîne, au niveau protéique, la substitution de la valine en position 617 par la phénylalanine à l'intérieur du domaine pseudo-kinase de JAK2. Cette substitution

empêche le domaine pseudo-kinase de JAK2 d'inhiber son domaine kinase. Au niveau fonctionnel, cette mutation confère à JAK2 une activation constitutive. La mutation JAK2 V617F, unique et clonale, est acquise. 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 (**Baxter et al, 2005**). La mutation JAK2 V617F est située dans le domaine JH2-pseudo-kinase qui régule négativement l'activité kinase de la protéine (**Zhao et al ,2005**).



**Figure.6-**Structure de JAK2 V617F.(LAABYECH.A ;2013)

### **I.3.2 Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines**

Dans les lignées cellulaires, l'introduction de la mutation entraîne une activation constitutive des voies de signalisation normalement activées en présence de cytokines en aval de JAK2 sauvage, notamment des voies JAK2/ STAT1, 3 et 5, MAPK et PI3K/Akt (**Garcon et al ,2006**). Il y a une phosphorylation anormalement élevée de STAT5, STAT3, mais également des molécules telles que : extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK 1/2), protéine kinase B (Akt), en l'absence d'érythropoïétine (**James et al , 2005**). La voie JAK2/STAT étant la voie la plus directe et la plus connue en aval de JAK2, c'est celle qui a été la plus étudiée.(**Laabyech, 2013**).

### **I.3.3 La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique:**

L'ensemble des voies activées en aval de la mutation JAK2 V617F entraîne la dérégulation transcriptionnelle de nombreux gènes. En effet, les protéines STATs étant des facteurs de transcription, leur activation en aval de l'oncogène entraîne une augmentation de la transcription de leurs gènes cibles. De plus, les voies des MAPKs et de la PI3K/Akt agissent sur des facteurs de transcription.

On peut donc supposer que la dérégulation de ces deux voies de signalisation en aval de JAK2 V617F entraîne une augmentation de la transcription de gènes. En plus d'une dérégulation transcriptionnelle, l'oncogène favorise la traduction d'ARNm en protéines. On constate une expression altérée de divers microARN, or le microARN joue sur la traduction des ARNm en se fixant sur leur 3' ou 5'UTR et en augmentant ou en diminuant leur stabilité ou directement leur traduction en protéine.

Une analyse de l'expression des microARN du sang dans la maladie de Vaquez (MV) révèle une expression aberrante de huit microARN (let-7a, miR-182, miR-143, miR-145, miR-223, miR26b, miR-30b, miR-30c and miR-150) à la fois dans les granulocytes, les cellules mononuclées, les plaquettes et les réticulocytes. (**Delhommeau, et al, 2006**).

### **I.3.4 L'altération du rétrocontrôle négatif**

Les voies classiques de signalisation étant activées constitutivement en aval de JAK2V617F, on aurait pu imaginer que les mécanismes de rétrocontrôle négatif seraient également amplifiés. Cependant, on note, en aval de JAK2 V617F, une altération du rétro-contrôle négatif de la transduction du signal des récepteurs aux cytokines impliquant JAK2. En effet, la présence de la mutation entraîne une hyper-phosphorylation de SOCS3.

Cette hyper-phosphorylation l'empêche d'agir comme régulateur négatif de la signalisation en aval de JAK2 muté, et même, au contraire, il favorise la croissance cellulaire (**Hookham et al , 2005**). Aussi, la présence de la mutation JAK2 V617F entraîne une surexpression de Lnk, une protéine adaptatrice régulant négativement la

transduction du signal de récepteurs aux cytokines. Cependant, JAK2 V617F interagit de manière plus forte avec la région N-terminale de Lnk que JAK2WT, ce qui pourrait créer un déséquilibre d'inhibition entre les deux formes de JAK2. Ces résultats sont néanmoins controversés. En effet, certains travaux suggèrent que Lnk est capable d'inhiber JAK2 V617F. Ces études ne sont cependant pas forcément contradictoires, l'action de Lnk pourrait dépendre du ratio JAK2 V617F/Lnk.

Cette altération du rétrocontrôle négatif amplifie d'autant plus la cascade de signalisation des récepteurs aux cytokines déclenchée par la présence de la mutation. Ces résultats suggèrent que le mécanisme oncogénique de JAK2V617F est plus complexe qu'il n'aurait pu le paraître, la mutation ne faisant qu'amplifier la signalisation activée en aval de la forme sauvage de JAK2; elle possède également des modes de régulation qui lui sont propres. (Laabye, 2013).

### **I.3.5 La régulation croisée du récepteur à l'IGF**

En plus de mimer une activation de récepteurs aux cytokines de type I et II en l'absence de ligand, JAK2V617F peut aussi activer le récepteur à l'IGF1 (Insuline Like Growth Factor 1) (Staerk et al, 2005). Notons que ce récepteur ne fait pas intervenir JAK2 lorsqu'il est sauvage. Des travaux antérieurs à cette découverte montraient une hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1. Or la présence de la mutation entraîne une prolifération cellulaire dépendante de l'IGF1 dans la lignée BA/F3 transduite afin d'exprimer l'oncogène. L'hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1 pourrait par conséquent être liée à cette activation croisée du récepteur de l'IGF1 par JAK2V617F et pourrait participer au phénotype des SMP. Par contre, l'activation du récepteur à l'IGF par JAK2 V617F ne paraît pas être directe mais pourrait faire intervenir l'expression d'adaptateurs induits par la signalisation de l'oncogène précédemment décrite.

### **I.3.6 L'impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique**

Dawson et al. ont montré que, tout comme JAK2 sauvage, JAK2 V617F est également capable de phosphoryler HP1 $\alpha$  et de lever ainsi sa répression sur

l'expression des gènes cible. Cependant, dans les SMP où l'on retrouve une activation constitutive de JAK2, la dérégulation de l'interaction de HP1 $\alpha$  à la chromatine pourrait lever son effet suppresseur de tumeur par une augmentation de l'expression de certains gènes, constituant ainsi un autre mécanisme de dérégulation transcriptionnelle. De plus, cette dérégulation, qui touche la chromatine, pourrait favoriser les recombinaisons mitotiques et l'instabilité génomique (**Dawson et al, 2009**). Cette régulation est cependant sujette à certaines controverses en raison du doute émis par les observations de Girodon et al. Sur la localisation nucléaire et cytoplasmique de JAK2 et JAK2 V617F (**Girodon et al, 2011**).

### **I.3.7 JAK2 est l'événement initiateur de la PV**

Deux types d'expériences ont démontré le rôle de la mutation JAK2 V617F dans la genèse d'une PV. In vitro, dans des modèles cellulaires, cette mutation induit une hypersensibilité aux cytokines ainsi que la transformation de cellules Ba/F3 (indépendance vis-à-vis de l'IL3 (**Levine et al, 2005**). Chez la souris, la greffe de cellules médullaires exprimant JAK2 mutée (infection rétrovirale) est à l'origine d'une érythrocytose (**James et al, 2005**). Ainsi, ces différents travaux démontrent que la mutation V617F de JAK2 est l'événement initiateur de la PV.

Incidence de la mutation JAK2 V617F 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 SMP 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 la mutation V617F était présente dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs plus matures. (**Jamieson et al, 2006**).

Autres mutations détectées dans les PV, TE et MP L'analyse complète de la partie codante du gène JAK2 a mis en évidence chez des patients atteints de PV ou d'érythrocytose idiopathique des mutations de l'exon 12 . Elles sont localisées en amont du domaine pseudokinase dans une zone extrêmement conservée au cours de l'évolution. Les mutations de

l'exon 12 de JAK2 entraînent les mêmes conséquences que la mutation V617F. L'incidence des mutations de l'exon 12 de JAK2 dans les PV est de l'ordre de 3 %. Des mutations du récepteur à la thrombopoïétine (MPL) ont été identifiées chez une minorité de patients présentant une MP ou une TE (Pardanani et al ;2006). De plus, dans des expériences réalisées chez la souris, il a été montré que les pathologies les plus fréquemment induites par les mutations de MPL étaient des thrombocytoses et des myélofibroses.

### **I.3.8 Une mutation — trois pathologies distinctes**

Comment 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 MP, 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, 2006**). Plus récemment, 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**).

### **I.3.9 Pathogenèse JAK2 V617F**

En dehors des mutations de JAK2 (V617F et exon 12) et de MPL, d'autres événements moléculaires pourraient être nécessaires à l'obtention du phénotype final. Il existe des SMP familiaux avec mutation JAK2 V617F, alors qu'il n'y a pas de transmission germinale de la mutation (**Bellanne-Chantelot et al , 2006**). Il existerait donc un mécanisme génétique de

prédisposition à l'acquisition de la mutation somatique de JAK2. Dans certains SMP, l'hématopoïèse apparaît clonale alors que la mutation V617F n'est retrouvée que dans un nombre faible de cellules (**Levine et al, 2006**). De plus, des anomalies cytogénétiques, telles que la délétion 20q (**Tableau II**), peuvent être observées dans des cas où la proportion de cellules présentant la mutation de JAK2 demeure faible( **Kralovics et al, 2006**). La mutation JAK2 V617F pourrait donc être un événement secondaire, voire un événement insuffisant à l'acquisition du phénotype final, ce qui est contradictoire avec le fait que cette mutation induit chez la souris un phénotype proche d'un SMP humain. Un modèle de pathogenèse des SMP a été proposé (**Levine , Gilliland , 2008**). Il inclut des données démontrées (mutations de JAK2 et de MPL) et des hypothèses (terrain génétique, mutations additionnelles) (**Pardanani et al , 2008**). De plus, des modifications génétiques ou épigénétiques pourraient jouer un rôle dans l'acquisition du phénotype final et dans l'évolution vers une MP (par exemple le type de récepteur homo- ou hétérodimérique sur lequel se fixe JAK2).(CHOMEL et al,2009).

**Tableau.2-** Principales anomalies chromosomiques communément retrouvées dans PV,MFP , et TE(**Bench et al, 2001**).

Chromosomes	Caryotype	Pourcentage		
		PV	MFP	TE
1	Trisomie 1q, translocations...	3-10*	≈3-10	<1
5	Délétion 5q, Monosomie 5...	3	1.5	<1
7	Délétion 7q, Monosomie 7...	≈1-3.6	4	<1
8	Trisomie 8 totale ou partielle...	5-27	5-8	≈1
9	Trisomie 9 totale ou partielle...	≈10	8	1-7
13	Délétion 13 q, duplications...	3-7	6-8	1-4
20	Délétion 20q...	≈10%	7-28	0.2-7
Caryotype anormal (à l'exclusion de -Y)		11-33	33-40	5-7

### **I.3.10 Autres anomalies génétique présente dans les syndromes myéloprolifératifs classiques**

Dans l'étude de Julie Mondet (**Julie Mondet , 2011**), il a rapporté que d'autres mutation que JAK2 v617f peuvent survenir dans les syndromes myéloprolifératifs classiques ces mutations peuvent co exister avec la mutation JAK2 v617f ou entre elle parmi les mutations les plus fréquente :

#### **I.3.10.1 Les mutations de MPL**

Le produit du gène MPL (MyeloProliferative Leukemia) correspond au récepteur de la thrombopoïétine. La protéine JAK2 intervient également comme transducteur du signal de la thrombopoïétine suite à sa fixation sur MPL. La mutation germinale Baltimore K39N au niveau de l'exon 2 retrouvée dans la population afro-américaine a participé à la découverte des mutations acquises de MPL. 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. Les mutations de MPL touchent approximativement 10% des MFP et 3% des TE , la plupart du temps sans association avec JAK2V617F. La mutation a également été rarement rapportée dans des cas de RARS-T.

Les TE MPL+ touchent préférentiellement les femmes âgées, avec un taux plaquettaire élevé et un taux d'hémoglobine bas .

#### **I.3.10.2 Les mutations de LNK**

LNK « lymphocyte spécifique adapter protéine» est une protéine adaptatrice dont la fonction est d'inhiber la phosphorylation de JAK2 (sauvage ou muté) après activation par les récepteurs à l'EPO ou à la TPO (140). Elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation JAK-STAT. Les mutations inhibitrices de LNK conduisent à une perte de fonction et entraînent une activation non régulée de la voie de signalisation JAK-STAT. Une quinzaine de mutations non-sens, faux-sens ou délétions, ont été décrites à ce jour .La

majorité des mutations identifiées touchent soit le domaine d'homologie à la plekstrine soit le domaine SH2 (Src homology 2) dont les rôles respectifs sont la localisation à la membrane cellulaire et la liaison simultanée au récepteur activé et à JAK2. Les mutations LNK sont rares (<10% des NMP) retrouvées dans de rares cas de PV JAK2V617F négatif. Cependant, une étude plus récente a montré que la région C terminale pouvait être mutée chez des patients également JAK2V617F positif. On retrouve également les mutations de LNK dans 3 à 6% des TE ou des myélofibroses, qu'elles soient primitives ou post-PV ou post-TE. Elles sont par contre fréquentes dans les phases blastiques ( $\approx 10\%$ ) des NMP.

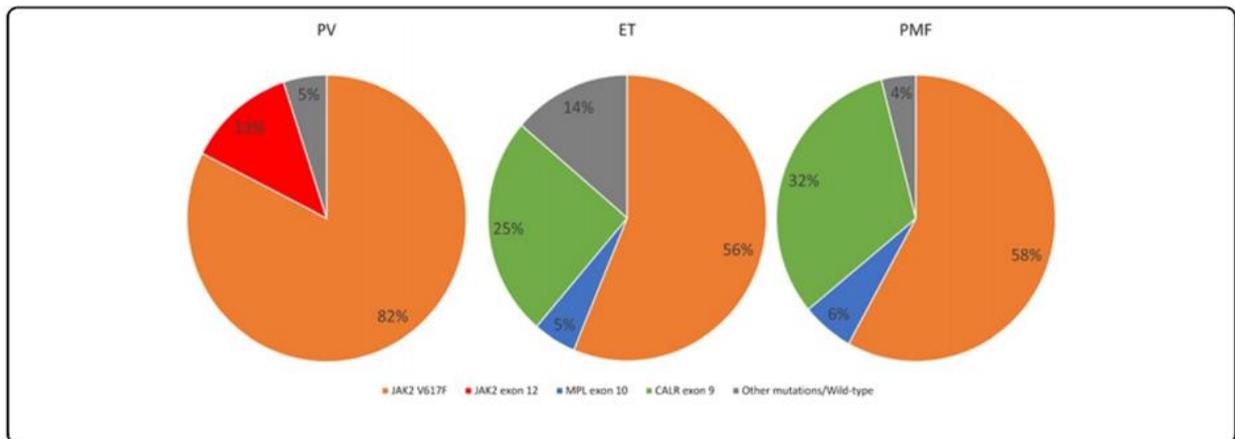
### **I.3.10.3 Les mutations de TET2, EZH et CALR**

Le gène Ten Eleven Translocation 2 (TET2) est localisé sur le chromosome 4q24. Il encode pour une méthylcytosine dioxygénase, qui oxyde le groupement méthoxyle de la 5'méthylcytosine en 5'hydroxyméthylcytosine. La modification en 5'hydroxyméthylcytosine entraînerait une déméthylation de l'ADN. La protéine TET2 agit donc dans la régulation épigénétique de la transcription des cellules souches hématopoïétiques.

TET2 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur dont l'inactivation par mutation joue un rôle oncogénique. Les mutations de TET2 ont été trouvées dans toutes les régions codantes des pathologies myéloïdes et peuvent être des mutations non-sens, faux sens ou décalantes. Elles sont détectées par séquençage notamment haut-débit. Les mutations touchant TET2 ont été décrites chez des patients atteints de PV, TE ou MFP avec des fréquences respectives de 16%, 5% et 17%. Elles sont associées ou non à la mutation JAK2V617F et peuvent coexister avec MPLW515L.

Les mutations EZH2Le gène EZH2 est localisé en 7q36.1. La protéine EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) est une histone méthyltransférase. Dans les pathologies myéloïdes, les mutations retrouvées dans les exons 10, 18, 20 inactivent probablement l'enzyme. Ces mutations sont retrouvées dans approximativement 3% des PV, dans 7 à 13% des myélofibroses primitives ou secondaires à une PV ou une TE mais pas dans la TE.

Récemment, un total de 36 types d'insertions et des suppressions cadre de décalage ont été détectés dans le gène CALR, qui code pour un rapport  $Ca^{2+}$  la protéine de liaison à endoplasmique réticulum appelé calréticuline. Ces mutations sont localisées dans le neuvième exon du gène, conduisant à la mise en péril de C-terminale de la structure de la protéine et ont été signalés avoir une incidence de plus de 60% à 80% en JAK2 et MPL mutation négative ET et PMF patients (**Lamar, 2014**).



**Figure. 7-**Variation des fréquences de JAK2 exon12, JAK 2 V 617F MPL W515L/K et CALR exon 9 dans les mutations touchants le cadre de lecture. (**Lamar, 2014**).

### I.3.11 Detection de JAK2 V617F

De nombreuses méthodes sont utilisées afin de mettre en évidence la mutation JAK2 V617F. Elles reposent, le plus souvent, sur des PCR classiques comme la PCR allele refractory mutation system (ARMS), la PCR spécifique d'allèle, la PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP), la discrimination allélique ou des PCR en temps réel spécifiques d'allèle (**Hammond et al, 2007**). Le matériel étudié est soit le sang total, soit des leucocytes totaux, soit les polynucléaires neutrophiles isolés. Selon le type de méthodologie et le matériel étudié, la méthode de détection de la mutation JAK2 V617F est plus ou moins sensible. Par exemple, une PCRARMS multiplexe réalisée sur de l'ADN extrait du sang total, a une limite de détection de 2à5%(détection de 2 à 5 % d'allèles mutés dans une majorité d'allèles sauvages). Afin d'effectuer un suivi moléculaire de la maladie, il est possible, comme dans le cas de BCR-ABL, d'effectuer un dosage des allèles JAK2 V617F (PCR spécifique d'allèle quantitative avec standards JAK2 mutés et sauvages).

# **Chapitre II :**

## **Matériels et méthodes.**

Cette étude a été réalisée au laboratoire du service d'immunologie du CHU Beni Messous dans l'unité d'immunogénétique pendant une période s'étalant de 21 février à Mai 2016.

### **Objectif de l'étude :**

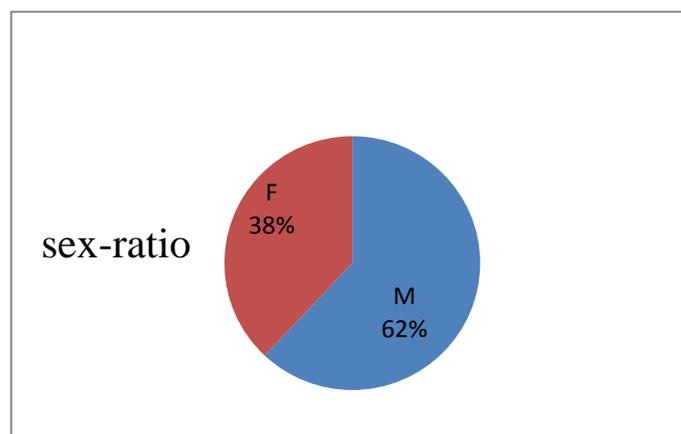
Dans ce travail nous avons recherché la mutation JAK2 V617F, chez 100 patients chez lesquels un syndrome myéloprolifératif classique a été suspecté, et ce par technique de PCR en temps réel (technologie Taqman). L'objectif principal est d'établir la prévalence de cette mutation dans les différents syndromes myéloprolifératifs classiques qui a été décrite comme étant mise en cause dans la plupart des syndromes myéloprolifératifs classique et recherché une association entre la présence de cette mutation et certaines caractéristiques cliniques.

La mutation du JAK2, est retrouvée dans environ 95% des cas de PV, 60% des TE et 50% des MFP.

### **II.1 Les Patients**

L'étude a porté sur 100 patients suspectés d'être porteurs du syndrome myéloprolifératifs. Leur recrutement a été fait en majorité au niveau du CHU Beni Messous parmi eux, 47 étaient suivis dans le service d'hématologie 46 au service médecine interne et les autres dans différents services.

La moyenne d'âge des patients est de 43.13 ans avec un écart type de 21.20 ans l'âge minimale est de 17ans et l'âge maximal est de 85 ans, avec 62 patients de sexe masculin et 38 patients de sexe féminin avec la fréquence 62% pour le sexe masculin et 38% pour le sexe féminin.



**Figure.8-** Graphique de répartition des patients selon le sexe.

Une étude des dossiers des patients a été réalisée.

Les critères diagnostics cliniques et biologiques des patients ont été repris dans des fiches de renseignements (**Voir Annexe 1**).

## II.2 Critères cliniques et biologiques des patients

### II.2.1 Critères cliniques

**Tableau.3-** Critères cliniques des patients .

	PV	TE	MFP
Nombre	36(36%)	57(57%)	7(7%)
Age (ans)	54,38	44,28	44,36
Sexe- ratio	F= 10 (28%) M= 26 (72%)	F=25(44%) M=32(66%)	F=3(43%) M=4 (57%)
Vertige	1 (2,7%)	1(1,7%)	
Fièvre		1(1,7%)	
Asthénie		4(7%)	
Céphalée	1(2,7%)		
Hépatomégalie	1(2,7%)		
Splénomégalie	8(22%)	9(15,7%)	3 (43%)
Thrombose	16(44,44%)	27(47,3%)	1 (14%)
Erythrose	4(11%)		
Thrombophlibite		1(1,7%)	
Neurofibrose		1(1,7%)	1(14%)
Hta	4(11%)	2(3,5%)	2(28,57%)
Htt	1(2,7%)	3(5,2%)	
Avc	1(2,7%)	2(3,5%)	
Embolie pulmonaire		2(3,5%)	
Budd-chiari	2(5,5%)	2(3,5%)	
Hyperviscosité	1(2,7%)	1(1,7%)	

36% des patients ont été suspecté PV l'âge moyen de ces patients est de 54.38 ans 28% de sexe féminin 72% de sexe masculin, 22% des cas présentent des splénomégalias 44.44%

présentent des thromboses 11% des érythrocytose 5.5 budd-chiari et certains autre anomalies HTA 11%.

57% des patients ont été suspecté TE l'âge moyen est de 44.28%, avec 44% des cas de sexe féminin et 66% des cas de sexe masculin, 15.7% présentent des splénomégalies ,47.3% des thromboses .7% asthénies et d'autres anomalies comme http 5.2%, budd-chiari (3.5%).

7 % des patients ont été suspecté MFP l'âge moyen est de 44.36 avec 43% des cas sexe féminin et 57% sexe masculin, 43% ont présenté splénomégalies 28.57% HTA 14% thrombose.

## II.2.2 Les Critères biologiques

**Tableau 4 :** critères biologiques des tableaux.

	PV	TE	MFP
anomalie érythrocytaire	18(50%)	8(14%)	
anomalie plaquettaire	3(8,33%)	31(54,3%)	3(43%)
anomalie leucocytaire	7(19%)	15(26,3%)	3(43%)

Les anomalies érythrocytaire sont présente chez 50% des cas PV et 14% des cas TE, les anomalies plaquettaires sont présente chez 8.33% des cas PV, 54.3% des cas TE et chez 43% des MFP, et les anomalies leucocytaire dans 19% des cas PV 26.3% des cas TE et 43% des cas MFP.

## **II.3 Méthode :**

### **II.3.1 Prélèvements**

La recherche de la mutation jak2 v617f a été effectuée sur des prélèvements du sang périphérique sur des tubes EDTA (4 ml).

## **II.4 Extraction et dosage de l'ADN**

### **II.4.1 EXTRACTION**

Protocole d'extraction par kit invitrogène :

- ✓ Ajouter 200 µl de sang total, dans un eppendorf stérile ;
- ✓ Rajouter 20 µl de protéinase K ;
- ✓ Rajouter 20 µl de RNase A ;
- ✓ Vortexer, laisser 2mn à température ambiante ;
- ✓ Rajouter 200 µl de pure link genomic lysis / binding buffer, vortexer ;
- ✓ Mettre au bain marie pendant 10 min à 55° C ;
- ✓ Rajouter 200 µl d'éthanol (96-100 %) au lysat ;
- ✓ Vortexer pendant 5 secondes ;
- ✓ Transvaser le lysat dans une colonne stérile ;
- ✓ Centrifuger à 10000 g pendant 1 min ;
- ✓ Placer la colonne dans la première poubelle ;
- ✓ Rajouter 500 µl du tampon 1 WASH BUFFER1 ;
- ✓ Centrifuge à 10000 g pendant 1 min à une température ambiante ;
- ✓ Placer la colonne dans la deuxième poubelle ;
- ✓ Rajouter 500 µl du tampon 2 WASH BUFFER2 ;
- ✓ Centrifuger à 14000 g (vitesse maximale) pendant 3 min à température ambiante ;
- ✓ Placer la colonne dans un eppendorf stérile ;

- ✓ Rajouter 25-100 µl de solution d'éluion (pure link genomic éluion buffer) ;
- ✓ Incuber pendant 1 min a température ambiante ;
- ✓ Centrifuger à 14000g pendant 1 min à température ambiante ;
- ✓ L'ependorf contient de l'ADN extrait (jeter la colonne).

## II.4.2 DOSAGE de l'ADN

Au cours de ce travail la concentration de l'ADN a été mesurée par un spectrophotomètre maestro nano.

Un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1.8-2

Si  $R \geq 2$  → présence d'ARN.

Si  $R \leq 1.5$  → excès de protéines.

## II.5 Recherche de la mutation par PCR en temps réel (real time PCR)

La recherche de la mutation était effectuée par une PCR en temps réel (7500 Applied Biosystems) en utilisant les sondes d'hydrolyse Taqman.

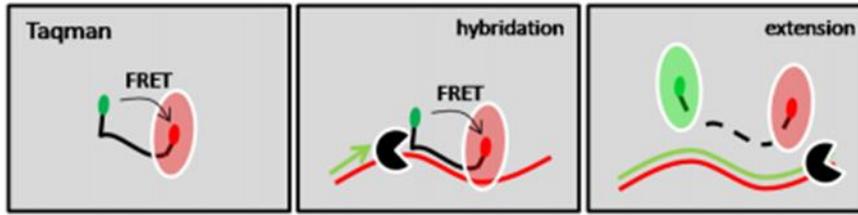
### II.5.1 Chimies de marquages

De nombreuses chimies de marquages fluorescents sont actuellement disponibles pour la RT-qPCR. Elles représentent toutes des solutions techniques différentes qui assurent le même principe commun, la mesure du signal émis par une molécule fluorescente (**F**).

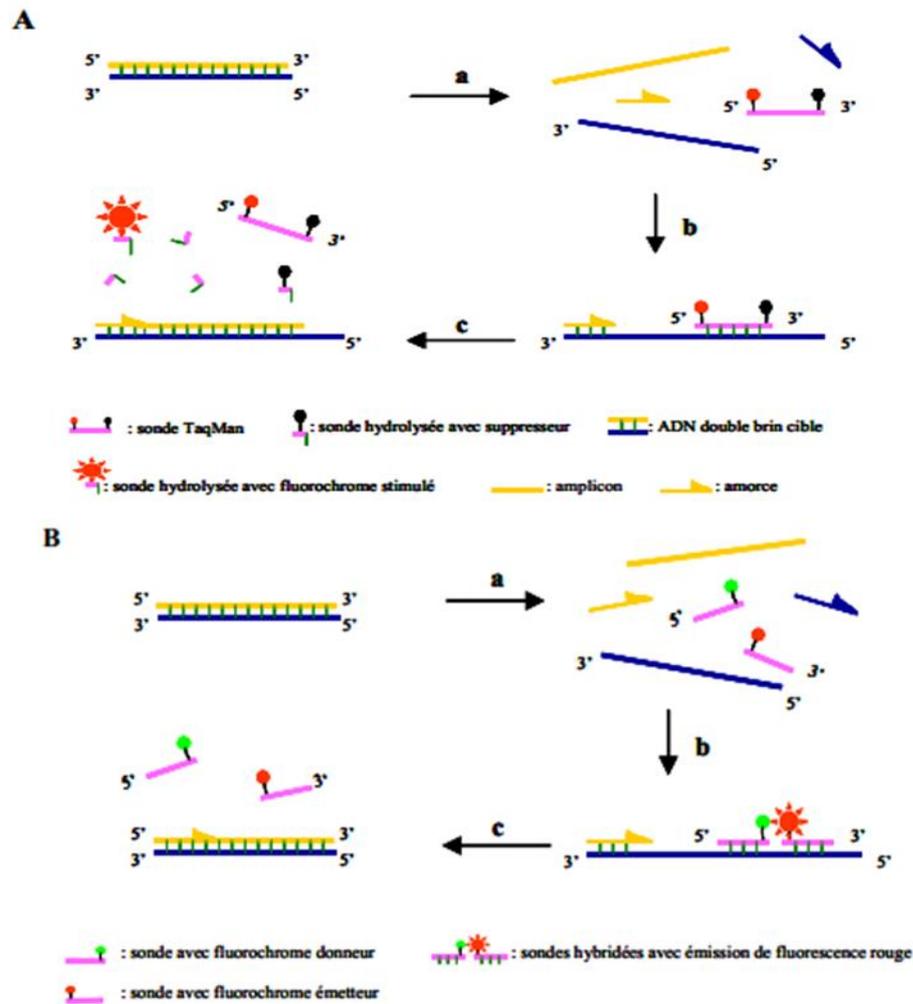
#### II.5.1.1 Les sondes d'hydrolyses(Taqman)

Le développement de méthode permettant de relier le signal de fluorescence à l'amplification de la cible de manière spécifique a été accompli grâce à l'introduction de sonde d'hydrolyse Taqman (**Holland et al, 1991**). Cette méthode permet la réaction de multiplexe, c'est-à-dire la détection spécifique de plusieurs amplicons dans un même milieu réactionnel. Cette chimie de marquage repose sur deux principes (**Fig. 6**). Le premier est le phénomène de FRET (**F**luorescence **R**ésonance **E**nergy **T**ransfert), le second est l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase. La sonde Taqman est marquée à ces deux extrémités avec deux marqueurs fluorescents possédant des spectres de

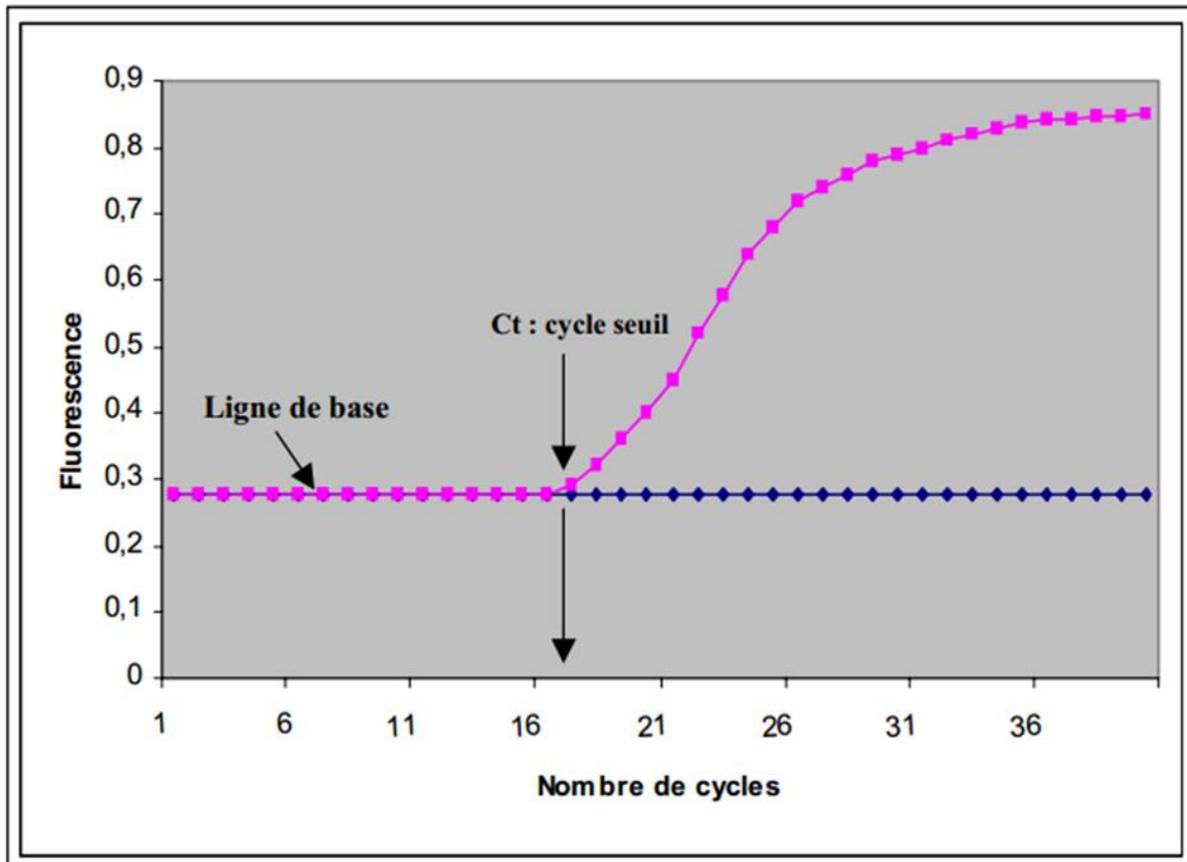
fluorescence propres. Le premier est un reporter (ex :FAM), le second en « quencher » (molécule inhibant la fluorescence du reporter par le phénomène de « quenching ») (ex : TAMRA). Quand la sonde est intacte, les deux fluorophores sont à proximité et le transfert d'énergie par fluorescence (FRET) s'effectue. La fluorescence émise par FAM est alors absorbée par TAMRA et restituée dans la longueur d'onde d'émission de celui-ci. Pendant la phase d'extension du cycle PCR, la sonde hybridée à sa cible est dégradée par l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase, et les fluorophores sont libérés dans le milieu réactionnel. N'étant plus à proximité l'un de l'autre, le transfert d'énergie entre le reporter et le quencher n'a plus lieu, ce qui se traduit par l'augmentation de la fluorescence dans le spectre propre au reporter FAM (**Heid et al, 1996**). La spécificité de la réaction est assurée premièrement par les amorces, mais aussi par la sonde, celle-ci étant dessinée de manière à s'hybrider à un produit de manière sélective. Cette méthode ne nécessite donc pas de validation post-amplification, et permet la discrimination de produits multiples par l'utilisation de sondes portant des fluorophores différents. Toutefois, le signal de fluorescence n'est pas ici strictement relié à la quantité de produits à un instant, mais à l'accumulation successive des produits des sondes hydrolysées à chaque cycle. La méthode de quenching utilisée est dynamique (transfert d'énergie à distance, 40-80% d'inhibition du signal), et ne permet pas d'inhiber le signal aussi efficacement que d'autres chimies de marquage récentes, utilisant des quenchers sombres (non-fluorescent, e.g. Dabcyl) et le phénomène de quenching statique (interaction physique entre le fluorophore et le quenseur ; 90-95% d'inhibition) (**Marras, et al, 2002; Sherrill et al, 2004**).



**Figure.9-** Représentation schématique de la chimie de marquage TaqMan .la chimie est représenté pendant la phase d'hybridation et en fin d'extension .quand le brin complémentaire est synthétisé par la Taq polymérase la molécule reporter est coloré en vert et la molécule reporter est coloré en vert et la molécule quencher en rouge.



**Figure. 10- A:**Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay) (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, 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 déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. **B:** Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution.



**Figure. 11-** 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. (Elyse, et Alain, 2002).

## II.5.1.2 Protocole opératoire

- Préparation du mélange réactionnelle par puits :
  - ✓ 10 µl master mix (kit) élément nécessaire pour l'amplification (pH adéquat MgCl<sub>2</sub>).
  - ✓ 2 µl de sonde.
  - ✓ 7µl d'eau distillé stérile (mélange réactionnelle 19µl pour 1 puits de master mix).
  - ✓ Pour les patients on met 2 µl d'ADN dans chaque puits.

**Tableau.5-** Composition du mélange nécessaire a la détection de la mutation V617F.

<b>Composition du mix</b>	<b>pour une réaction (ul)</b>
Master mix	10 µl
Sondes d'hydrolyse	2 µl
Eau distillé stérile	7 µl
<b>Volume réactionnel total</b>	19 µl
ADN	2 µl (dans chaque puits)

## II.5.1.3 Protocole d'amplification

L'amplification a été faite par le thermocycleur de l'Applied Biosystems 7500 selon le protocole suivant :

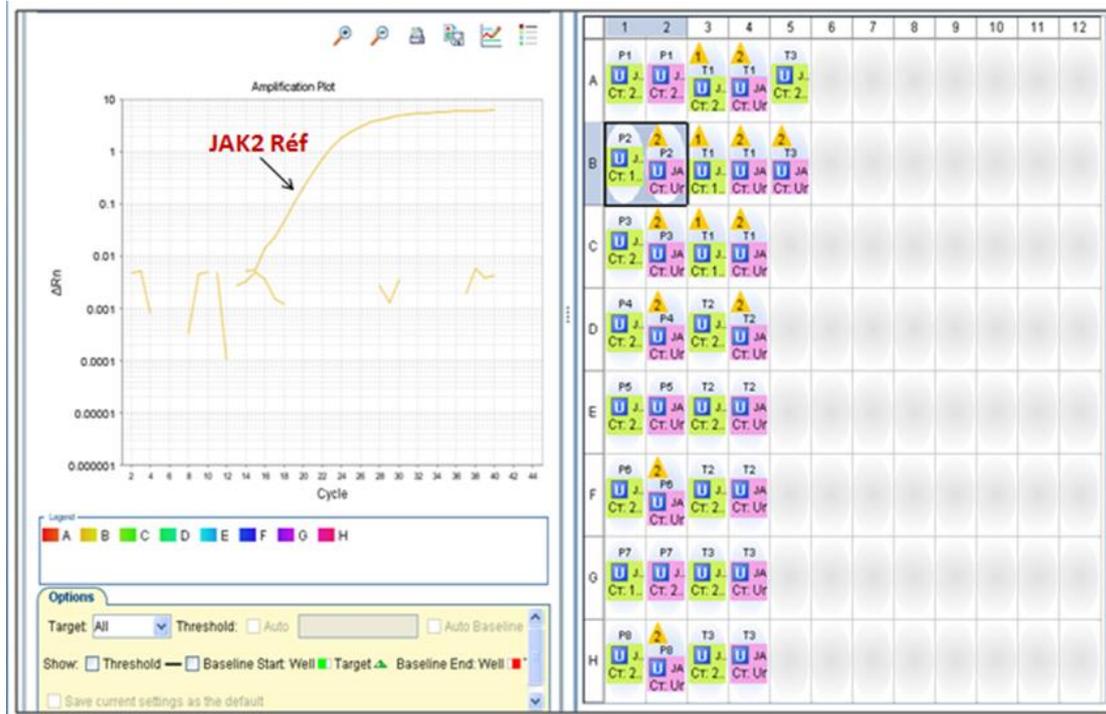
**Tableau 6 :** protocole d'amplification (jak2 v617f).

	<b>dénaturation</b>	<b>95°c</b>	<b>10min</b>
<b>5 cycles</b>	dénaturation	92°c	15s
	hybridation/élongation	58°c	1min
<b>40cycles</b>	dénaturation	92°c	15s
	hybridation/élongation	60°c	1min

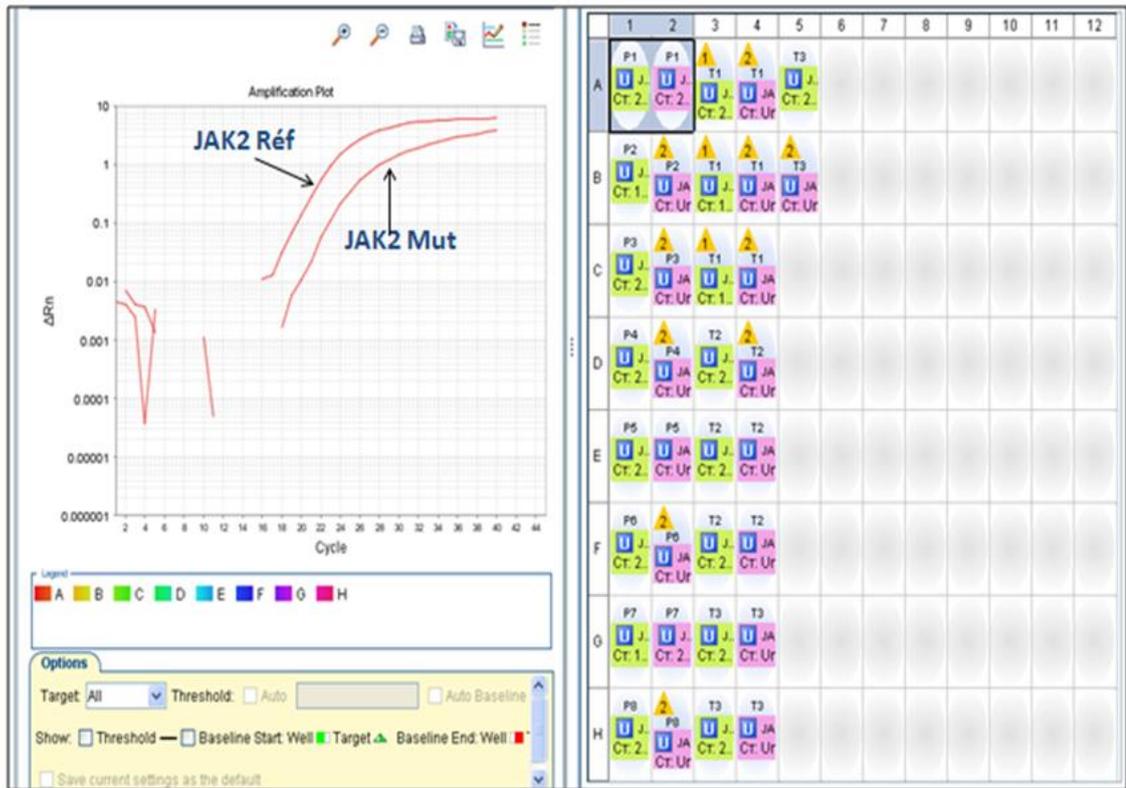
## II.6 Analyse statistique

Pour l'analyse statistique on a utilisé logiciel graphpad prism 5, le test khi2, test exact Fisher et test de Student.

Voici un exemple des résultats :



**Figure .12-**Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle non muté JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).



**Figure.13-** Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle muté et non muté (réfèrent) JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).

# **Chapitre III : Résultats et discussion**

### III.1 Résultats

Notre étude était réalisé sur 100 patients suspectés d'un syndrome myéloprolifératifs classique, la recherche de la mutation JAK2 V617F par PCR en temps réel a révélé la présence de cette mutation chez 44 patients(44%) , la mutation était présente chez 15/36cas PV(42.8%),26/57cas TE( 45.6%) , et3/7 cas (42.8%).

Tableau 7: Comparaison des critères cliniques entre le groupe PV JAK2V617F positif et le groupe PV JAK2V617F négatif

	PV JAK2 V617F +	JAK2 V617F-
Nombre	15(42%)	21(58%)
Age (ans)	57,33	52,28
Sexe- ratio	F=6/ M=9	F=4 / M=17
Vertige	1 (6,67%)	
Hépatomégalie	1(6,67%)	
Splénomégalie	7(46,67%)	1(4,7%)
Thrombose	3(20%)	7(33,33%)
Erythrose	4(26,66%)	
Hta	2(13,33%)	2(9,5%)
Htp		1(4,7%)
Avc		1(4,7%)
Budd-chiari	1(6,67%)	1(4,7%)

Tableau.8- Comparaison des critères biologiques entre le groupe PV JAK2V617F positif et le groupe PV JAK2V617F négatif.

	PV JAK2 V617F +	JAK2 V617F-
Anomalie érythrocytaire	7(46,67%)	11(52%)
Anomalie plaquettaire	1(6,67%)	2(9,5%)
Anomalie leucocytaire	5(33,33%)	2(9,5%)

La moyenne d'âge des 15 patients PV JAK2 V617F + est de 57.33 ans , 60% sont de sexe masculin et 40% de sexe féminin ,ces patients présentent de différents caractères cliniques et biologiques dont des splénomégalie 46.67% , des érythrocytose 26.66 % , des thromboses 20%, des anomalies érythrocytaires 46.67%, des anomalies leucocytaires 33.33% et de différents autres anomalies comme des HTA 13.33%.

La moyenne d'âge des 16 patients PV JAK2 V617Fnégatif est de 52.28 ans avec 20% de sexe féminin et 80% de sexe masculin les patients ont présenté surtout des thromboses 33.33% et des anomalies érythrocytaires 52%, d'autres anomalies comme des HTA 9.5% des anomalies plaquettaires 9.5%.

Tableau.9 - Comparaison des critères cliniques entre le groupe TE JAK2V617F positif et le groupe TE JAK2V617F négatif

	TE JAK2 V617F+	TE JAK2V617F-
Nombre	26(45,5%)	31(54,5%)
âge (ans)	56,29	43,19
sexe- ratio	F=12(46%) M=14(54%)	F=13(42%) M=18(58%)
Vertige		1(3,2%)
Fièvre		1(3,2%)
Asthénie		4(12,9%)
Splénomégalie	4(15,3%)	5(16,1%)
Thrombose	10(38,4)	17(54,8%)
Thrombophlébite	1(3,8%)	
HTA	2(7,6%)	
http	1(3,8%)	2(6,4%)
AVC		2(6,4%)
embolie pulmonaire		2(6,4%)
budd-chiari		2(6,4%)
Hyperviscosité	1(3,8%)	

Tableau.10- Comparaison des critères biologiques entre le groupe TE JAK2V617F positif et le groupe TE JAK2V617F négatif

	TE JAK2 V617F-	TE JAK2V617F-
anomalie érythrocytaire	3(11,5%)	5(16,1%)
anomalie plaquettaire	18(69,2%)	13(41,9%)
anomalie leucocytaire	9(34,6%)	6(19,3%)

L'âge moyen des 26 patients TE V617F+ est de 56.92 ans avec 46% des patients de sexe féminin et 54% de sexe masculin ces patients ont présenté des splénomégalias 15.3% des cas des thromboses 38.4% , des anomalies érythrocytaire 11.5% des anomalies plaquettaire 69.2% et des anomalies leucocytaire 34.6% en plus d'autres anomalies comme HTA 7.6%.

Pour les 31 patients TE JAK2 V617F- la moyenne d'âge est de 43.19ans avec 42% de sexe féminin et 58% de sexe masculin ,ils ont présenté des asthénie 12.9% des cas des splénomégalias 16.1% des cas des thromboses chez 58.56 des cas des anomalies érythrocytaire chez 16.1% des cas , des anomalies plaquettares chez 41.9% des cas et des anomalies leucocytaires 19.3% en plus d'autres caractéristiques comme des AVC6.4% HTA 6.4%.

Tableau.11- Comparaison des critères cliniques entre le groupe MFP JAK2V617F positif et le groupe MFP JAK2V617F négatif

	MFP JAK2 V617F+	MFP JAK2 V617F-
Nombre	3(43%)	4(57%)
Age (ans)	54,74	32,5
Sex- ratio	F=2(66,67%) M=1(33,33%)	F=2(50%) M=2 (50%)
Splénomégalie	2(66,67%)	1(25%)
Thrombose		1(25%)
Neurofibrose		1(25%)
LDH élevé	2(66,67%)	

Tableau.12-Comparaison des critères biologiques entre le groupe MFP JAK2V617F positif et le groupe MFP JAK2V617F négatif.

	MFP JAK2 V617F+	MFP JAK2 V617F-
anomalie plaquettaire	2(66,67%)	1(25%)
anomalie leucocytaire	3(100%)	

L'âge moyen des 3 patients MFP JAK2 V617F+ est de 57.47ans avec 66.67% des patients de sexe féminin et 33.33% de sexe masculin, les patients ont présenté des splénomégalias 66.67% , LDH élevé 66.67% des anomalies plaquettares 66.67% et des anomalies leucocytaires chez les 3patients (100%).

Pour les 4 patients MFP JAK2 V617F- l'âge moyen était de 32.5 ans avec 50% de sexe féminin et 50% de sexe masculin 25% ont présenté splénomégalie 25% thrombose, 25% anomalie plaquettaire.

## III.2 La discussion

La discussion s'articule sur deux parties :

1) Dans un premier temps nous nous intéresserons aux patients qui ont présenté la mutation JAK2 V617F ou on va faire la comparaison avec d'autres études du Maghreb et des résultats des pays occidentaux. et on fait une comparaison des caractéristiques cliniques et biologiques des deux groupes JAK2 V617F positif et négatif

2) Puis, nous discuterons les autres patients qui n'ont pas présenté la mutation jak2 mais qui sont suspectés d'un syndrome myéloprolifératif

### III.2.1 première partie

-Dans un travail réalisé sur 45 patients par un groupe de chercheur tunisien (Feki.N ;2011) dont le but était de déterminer l'intérêt diagnostique et pronostic de la mutation JAK2 V617F, ainsi que déterminer son rôle dans l'évaluation du risque thrombotique les résultats étaient :

Les 45 malades étaient répartis en PV (22 patients), TE (17 patients), MFI (trois patients) et SMP atypiques (trois patients). Dans la série la mutation JAK2 est retrouvée dans 64,4 % des cas. Elle est observée dans 72,7 % des cas de PV, 47 % des cas de TE, 66 % des MFP.

-Dans une autre étude marocaine réalisée sur 27 patients par Nadjmi en 2015 :

Ils ont recensé 27 cas des syndromes myéloprolifératifs hors LMC. L'âge moyen des patients était de 48 ans avec des extrêmes allant de 15 à 89 ans. La majorité des patients (74%) avait un âge inférieur à 60 ans. Dans la série, les hommes représentaient 44% versus 56% des femmes. Données cliniques :

Dans cette série d'étude, 56% des malades ont une polyglobulie de vaquez et 44% ont une thrombocytémie essentielle. Résultats de l'étude moléculaire :

La recherche de la mutation en question se fait par la biologie moléculaire. Chez nos patients on recherche cette mutation par la technique « PCR allèle spécifique.

- Pour la série de polyglobulie de vaquez : 47% des cas (7 patients) avaient la mutation V617F du gène JAK2, et 53% des cas (8 patients) n'avaient pas la mutation.

- Pour la série de thrombocytémie essentielle : 25% des cas (3 patients) avaient la mutation V617F du gène JAK2 et 75% des cas (9 patients) n'avaient pas la mutation.

- Dans une autre étude au maroc réalisée par Benmoussa sur 70 patients : 17/19 (89.10) PV 8/5 (62.50%) TE, 4/12(33.33%) MFP .

-Les Résultats d'un groupe algérien sur 344 cas suspectés syndrome myeloproliferatifs

Dans l' ensemble de l'étude de la population, il y avait 185 hommes (53,8%) et 159 femmes (46,2%). L'âge moyen au moment de diagnostic était de 52,8 (plage 8 - 89 ans). La période de suivi médian était de 42 mois.

Parmi les patients, 98 ont été diagnostiqués pour PV, 75 pour ET, 13 pour le PMF,

La mutation JAK2 V617F a été détectée chez 157 patients (45,63%), dont PV (81,6%), ET (58,7%) et PMF (46,1%).(Benguella et *al* ,2014)

Tableau.13- Comparaison entre notre groupe d'étude PV et d'autres groupes.

	notre série	Baxter	X <sup>2</sup>	IC	OR	P value
<b>n (PV)</b>	36	73	6,046	[1,176, 4,632]	2,334	0,0139
<b>PV (jak2+)</b>	15	71				
<b>fréquence</b>	42%	97%				
	notre série	Levine	3,055	[0,9275, 3,381]	1,771	0,0805
<b>n (PV)</b>	36	164				
<b>PV (jak2+)</b>	15	121				
<b>fréquence</b>	42%	73%				
	notre série	James	5,024	[1,102, 4,775]	2,293	0,0250
<b>n (PV)</b>	36	45				
<b>PV (jak2+)</b>	15	43				
<b>fréquence</b>	42%	96%				
	notre série	Klarovics	3,798	[0,989, 4,598]	2,133	0,0513
<b>n (PV)</b>	36	36				
<b>PV (jak2+)</b>	15	32				
<b>fréquence</b>	42%	89%				
	notre série	Jones	3,518	[0,9652, 3,873]	2,133	0,0607
<b>n (PV)</b>	36	72				
<b>PV (jak2+)</b>	15	58				
<b>fréquence</b>	42%	81%				
	notre série	Benguella	3,940	[1,002, 3,833]	1,959	0,0472
<b>n (PV)</b>	36	98				
<b>PV (jak2+)</b>	15	80				
<b>fréquence</b>	42%	81,60%				
	notre série	Nadjmi	0,04227	[0,3800, 3,301]	1,120	0,4175
<b>n (PV)</b>	36	15				
<b>PV (jak2+)</b>	15	7				
<b>fréquence</b>	42%	47%				
	notre série	Benmoussa	2,879	[0,8822, 5 ,227]	2,147	0,0897
<b>n (PV)</b>	36	19				
<b>PV (jak2+)</b>	15	17				
<b>fréquence</b>	42%	89,10%				
	notre série	Fekia	1,546	[0,7226, 4,216]	1,745	0,2138
<b>n (PV)</b>	36	22				
<b>PV (jak2+)</b>	15	16				
<b>fréquence</b>	42%	72,70%				

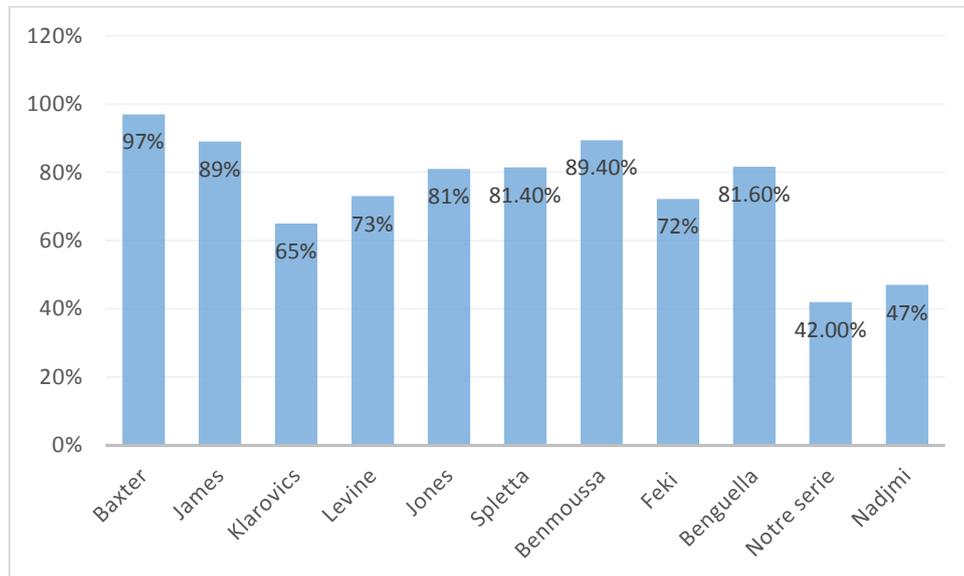


Figure.16-Comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la PV de notre série avec les autres séries.

On a réalisé une étude statistique afin de comparer nos résultats avec d'autres études des pays du Maghreb et des pays occidentaux, Pour la polyglobulie de vaquez nos résultat (42%) sont faibles par rapport à celui de la littérature(90-95%), il n'existe pas une différence significative entre notre groupe d'étude et le groupe d'étude de Fekri, Benmoussa, Nedjmi, Jones, Levine Klarovics et Benguella. il existe une différence entre notre groupe d'étude et le groupe d'étude de Baxter, et de James cette différence pourrait s'expliquer par le faible effectif de patients positifs dans notre série d'étude ou pourrait être expliqué par l'absence de certain outils de diagnostic dans nos centres. Peut-être que certains cas de polyglobulie secondaire ont été inclus et considérés comme la polyglobulie essentielle. Ce diagnostic ambigu entre les deux groupes pourrait être expliqué par le manque de détermination d'érythropoïétine sérique (EPO) dans les tests de routine pour le diagnostic de PV dans nos centres, malgré les recommandations de l'OMS.

Tableau.14- Comparaison entre notre groupe d'étude TE et d'autres groupes.

	notre série	Benguella	X <sup>2</sup>	IC	OR	P-value
<b>n (TE)</b>	58	75	0,7905	[0,72, 2,37]	1,309	0,3739
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	44				
<b>fréquence</b>	45,50%	58,70%				
	notre série	Nadjmi				
<b>n (TE)</b>	58	12	0,737	[0,14, 2,14]	0,55	0,3906
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	3				
<b>fréquence</b>	45,50%	25%				
	notre série	Benmoussa				
<b>n (TE)</b>	58	8	0,291	—	—	0,5890
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	5				
<b>fréquence</b>	45,50%	62,50%				
	notre série	Fekia				
<b>n (TE)</b>	58	17	0,0098	—	—	0,9209
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	8				
<b>fréquence</b>	45,50%	47%				
	notre série	Baxter				
<b>n (TE)</b>	58	51	0,515	—	—	0,4726
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	29				
<b>fréquence</b>	45,50%	57%				
	notre série	Levine				
<b>n (TE)</b>	58	115	1,208	—	—	0,2717
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	37				
<b>fréquence</b>	45,50%	32,17%				
	notre série	Klarovics				
<b>n (TE)</b>	58	23	0,5503	—	—	0,458
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	14				
<b>fréquence</b>	45,50%	61%				
	notre série	Jones				
<b>n (TE)</b>	58	59	0,0825	—	—	0,7739
<b>TE (jak2 v617f+)</b>	26	24				
<b>fréquence</b>	45,50%	41%				

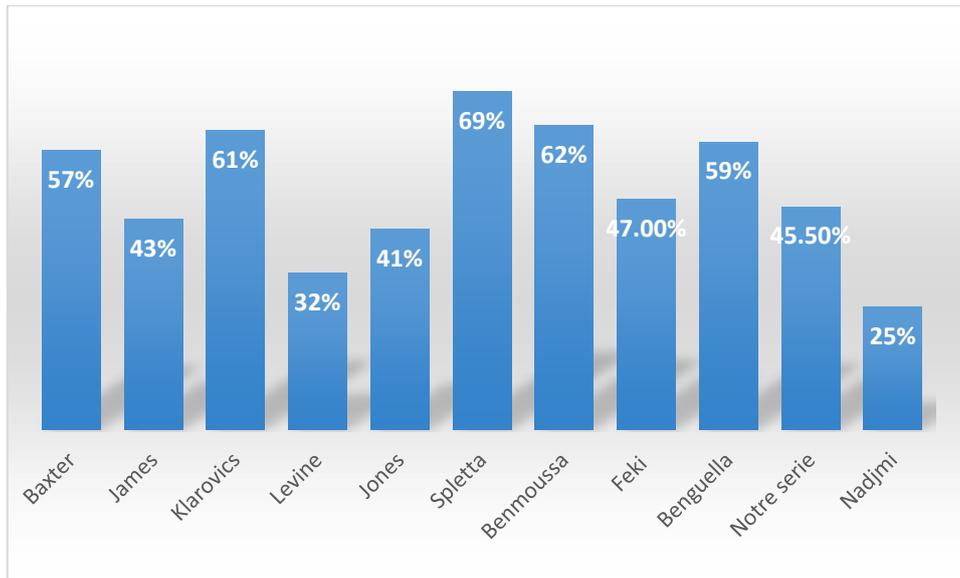


Figure.17- Comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la TE de notre série avec les autres séries.

Dans la thrombocytémie essentielle, il existe pas une différence significatif entre notre groupe d'étude et les autres groupes d'étude mutation JAK2 V617F était identifiée chez 45%TE et de notre série . Ce résultat corrobore celui des autres groupes d'études.

Tableau.15- Comparaison de notre groupe d'étude MFP avec d'autres groupes.

	notre série	Benguella	X <sup>2</sup>	P-value
<b>n (MFP)</b>	7	13	0,0076	0,9304
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	6		
<b>Fréquence</b>	43,00%	46,10%		
	notre série	benmoussa	0.0782	0,7798
<b>n (MFP)</b>	7	12		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	4		
<b>Fréquence</b>	43,00%	33,33%		
	notre série	Nedjmi	0,150	0,6985
<b>n (MFP)</b>	7	3		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	2		
<b>Fréquence</b>	43,00%	66,66%		
	notre série	Baxter	0,0358	0,8499
<b>n (MFP)</b>	7	16		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	8		
<b>Fréquence</b>	43,00%	50%		
	notre série	Levine	0,0779	0,7801
<b>n (MFP)</b>	7	46		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	16		
<b>Fréquence</b>	43,00%	35%		
	notre série	Klarovics	0,00	1
<b>n (MFP)</b>	7	7		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	3		
<b>Fréquence</b>	43,00%	43%		
	notre série	Jones	0,00	1
<b>n (MFP)</b>	7	35		
<b>MFP (jak2 v617f+)</b>	3	15		
<b>Fréquence</b>	43,00%	43%		

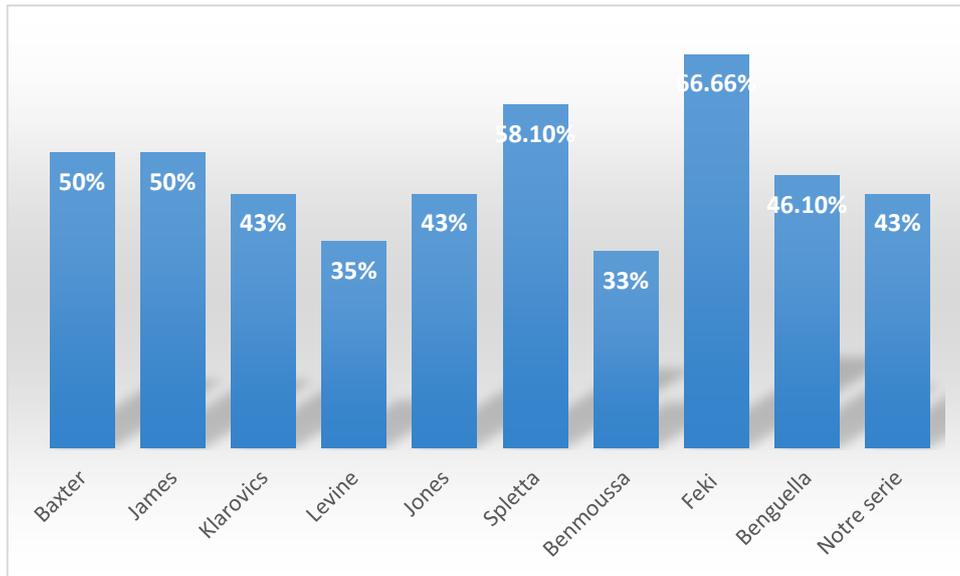


Figure16: comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la MFP de notre série avec les autres séries.

Dans la myélofibrose primitive la mutation v617f était identifiée chez 43% des MFP, d'après l'étude statistique il n'existe pas une différence significatif entre notre groupe d'étude et les autre groupe. La fréquence de la mutation dans notre groupe et la même que celle de Jones et klarovics et se rapproche des autres fréquences.

Tableau.16-Comparaison des critères cliniques et biologiques des groupes JAK2 V617F positifs et négatifs.

	tous les patients	jak2 v617f positif	jak2 v617f négatif	OR	IC	P valeur
<b>Nombre</b>	100	44(44%)	56(56%)			-
<b>Age (ans)</b>	48,13	57,47	46,09			0,0018
<b>Sex-ratio (M/F)</b>	62/38	22/20	38/18			-
<b>Splénomégalie</b>	20(20%)	13(29,5%)	7(12,5%)	0.4231	[0.1556-1.156]	0,938
<b>Thrombose</b>	36(36%)	12(27,2%)	24(42,8%)	1.571	[0.7077-3.489]	0,325
<b>Budd-chiari</b>	4(4%)	1(2,2%)	3(5,3%)	2.357	[0.3176-9.752]	0,631
<b>Anomalie érythrocytaire</b>	30(30%)	12(27,7%)	18(32,1%)	1.179	[0.5136-2.704]	0,834
<b>Anomalie plaquettaire</b>	38(38%)	22(50%)	16(28,5%)	0.571	[0.2684-1.216]	0,182
<b>Anomalie leucocytaire</b>	25(25%)	16(36,3%)	9(16%)	0.442	[0.1784-1.095]	0,116
<b>Anomalie du frottis</b>	10(10%)	6(13,6%)	4(7,1%)	0.523	[0.1391-1.972]	0,507
<b>Anomalie BOM</b>	13(13%)	7(15,9%)	6(10,7%)	0.673	[0.2111-2.148]	0,562
<b>Polyglobulie</b>	19(<19%)	7(15,9)	12(27,2%)	1.347	[0.4893-3.708]	0,621

On a utilisé le test exact de Fisher dans la comparaison des critères cliniques et biologiques présentés par les deux groupes JAK2 v617f positifs et négatifs, comme il est indiqué dans les résultats de l'étude du groupe algérien il y'a une différence significative dans la moyenne d'âge des deux groupes on peut dire que l'apparition de la mutation JAK2 v617f peut être lié à l'accumulation d'anomalies moléculaires et une instabilité génomique qui augmente progressivement. aucune différence significative n'a été observé dans les thrombose, dans budd Chiari et dans les anomalies érythrocytaire ,les polyglobulie ,la splénomégalie dans les d'anomalie plaquettaire et dans les anomalies leucocytaire cela permis

de faire l'hypothèse que c'est des événements peuvent survenir avant la mutation JAK2 V617F ou la mutation JAK2 V617F peut être un événement secondaire de ces anomalies.

(Benguella et *al* ,2014)

### III.2.2 Deuxième partie

La mutation JAK2 V617F n'est pas spécifique des SMP Ph- classiques et son absence ne permet en aucun cas de récuser le diagnostic de SMP. L'étude réalisée par Julie MONDET (2011) a pu mettre en évidence que la mutation JAK2 V617F peut être un événement secondaire dans les SMP ou un événement d'échappement aux conditions létales et que lorsque les patients atteints d'un SMP ne présentent pas la mutation jak2 v617f ils sont porteurs d'autres mutations plus rares de l'exon 12 ou de l'exon 14 du gène. Dans la TE et la MFP, lorsque la mutation V617F n'est pas présente, on peut retrouver des mutations du récepteur Mpl. Il y a donc dans la majorité des cas, activation des voies de signalisation impliquant JAK2.

Les mutations de MPL retrouvée chez 10% des MFP et 3% des TE.

Les mutations de LNK Les mutations LNK sont rares (<10% des SMP) retrouvées dans de rares cas de PV JAK2V617F négatif. On retrouve également les mutations de LNK dans 3 à 6% des TE ou des myélofibroses.

Les mutations de TET2 Les mutations touchant TET2 ont été décrites chez des patients atteints de PV, TE ou MFP avec des fréquences respectives de 16%, 5% et 17%. Elles sont associées ou non à la mutation JAK2V617F et peuvent coexister avec MPLW515L. Ces mutations sont retrouvées dans approximativement 3% des PV, dans 7 à 13% des myélofibroses primitives ou secondaires à une PV ou une TE mais pas dans la TE .

Les mutations CALR. Ces mutations sont localisées dans le neuvième exon du gène, conduisant à la mise en péril de C-terminale de la structure de la protéine et ont été signalés avoir une incidence de plus de 60% à 80% en JAK2 et MPL mutation négative TE et PMF patients .(LAMAR.S ,2014)

Dans notre groupe JAK2 V617F négatif la présence des thromboses est un signe en faveur d'un SMP en comparaison avec l'étude de Julie MONDET :

Les thromboses sont des complications fréquentes de la PV et de la TE qu'elles soient révélatrices du diagnostic ou qu'elles surviennent lors du suivi du patient. Leur incidence varie selon les études de 22 à 38.6% et de 9.7 à 29.4% respectivement pour la PV et la TE. Le risque thrombotique est artériel ou veineux, avec des sites parfois inhabituels. En

effet, les syndromes myéloprolifératifs sont des facteurs de risques associés au développement de thromboses veineuses en particulier splanchniques ou cérébrales. Cinquante pour cent (de 45% à 58% selon les études) des patients atteints de syndromes de Budd Chiari sont affectés par un SMP Ph-. La physiopathologie du risque thrombotique dans ces hémopathies est multifactorielle.

L'augmentation de l'hématocrite dans la PV, la leucocytose, l'activation plaquettaire ou leucocytaire jouent un rôle très probable dans les mécanismes prothrombotiques. Des anomalies caryolytiques récurrentes sont décelées chez approximativement un tiers à 50% des patients atteints de myélofibrose primitive, 11 à 33% des PV et 5 à 7% des TE. Leurs fréquences augmentent avec l'âge et l'évolution de la maladie. Les anomalies sont retrouvées quel que soit le type de SMP Ph-. Les plus fréquemment retrouvées sont des délétions (del(20q), del(13q)...), des trisomies (trisomie 8, 9, 1q...) certaines anomalies sont également présentes dans les syndromes myélodysplasiques comme la délétion 20 q, les anomalies des chromosomes 5 et 7 et moins fréquemment la délétion 13q.

# Références

**References :**

- Aaronson, DS., Horvath, CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 5573, (2002), 1653-5.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., and Shuai, K. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, (2003), 21327-21330.
- Baxter, EJ., Scott, LM., Campbell, PJ., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* (2005) ,365,1054–61.
- Baxter, E. J., L. M. Scott, et al. "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human *Cell Biol* 18, (2008), 545-551.
- Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:346—52.
- BOISSINOT.M JAK2, cytokines et recepteurs dans la polyglobulie de vaquez le 3 octobre 2008 16-19 .
- Cargnello, M., and Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, (2011), 50 83.
- Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007;9:272—6.
- Chomel\* J.-C, N. Sorel, C. Mayeur-Rousse, A.G. Turhan .Les syndromes myéloprolifératifs *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2009) 24, 69—85  
JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives ;2011 :22-63
- Clevenger, C. V. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 165, (2004), 1449-1460.
- Dawson, M.A., Bannister, A.J., Gottgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., and Kouzarides, T. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461, (2009), 819-822.
- Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 63, (2006), 2939-2953.

- De Sepulveda, P., Okkenhaug, K., Rose, J.L., Hawley, R.G., Dubreuil, P., Rottapel, R. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 18, (1999), 904-15.
- Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 63, (2006), 2939-2953.
- Elyse Poitras et Alain Houde ; La PCR en temps réel: principes et applications Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11
- 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 <http://thesesups.upstlse.fr/1625/1/2011TOU30314.pdf>.
- 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 .E, Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives ;2011 :22-63
- Giordanetto, F., and Kroemer, R. T. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng* 15, (2002), 727-737.
- Girodon, F., Steinkamp, M.P., Cleyrat, C., Hermouet, S., and Wilson, B.S. Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood* 118, (2011), 2633-2634.
- Hammond E, Shaw K, Carnley B, Pang S, James I, Herrmann R. Quantitative determination of JAK2 V617F by TaqMan: An absolute measure of averaged copies per cell that may be associated with the different types of myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007;9:242—8.
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, (2006), 173-188.
- HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK, and P. M. WILLIAMS. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*6: 986-994.
- HIGUCHI, R., G. DOLLINGER, P. S. WALSH, and R. GRIFFITH. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*10: 413 - 417.

- Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobl, B., Bates, P. A., Behrmann, I., and Kerr, I. M. A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 505, (2001), 87-91.
- HOLLAND, P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON, and D. H. GELFAND. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'  $\rightarrow$  3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88: 7276-7280.
- Hookham, M.B., Elliott, J., Suessmuth, Y., Staerk, J., Ward, A.C., Vainchenker, W., Percy, M.J., McMullin, M.F., Constantinescu, S.N., and Johnston, J.A. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 109, (2007), 4924-4929.
- 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.
- Jacques, R. Signalisation cellulaire et cancer : Un manuel pour les étudiants et les oncologues - Oncologie pratique , (2010), 75-80.
- James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, (2005) ,1144- 1148.
- 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).
- James, C., V. r. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive JB., et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *PatholBiol (Paris)* 55, (2007) , 88-91.
- Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6224—9.
- Kario, E., Marmor, MD., Adamsky, K., Citri, A., Amit, I., Amariglio, N., et al. Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 8, (2004), 7038-48.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, AS., Teo, SS., Tiedt, R., Passweg, JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, (2005) ,1779–90.
- 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.

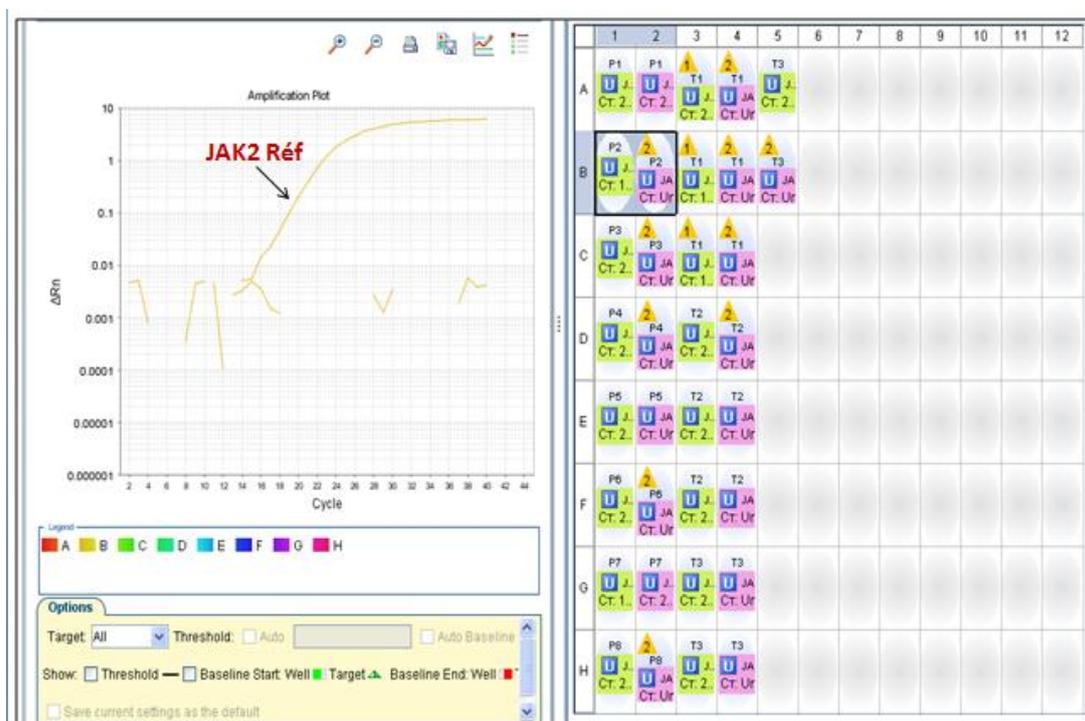
- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theoharides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:1377—80.
  
- Kralovics, R., S.-S. Teo, et al. (2006). "Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders." *Blood* 108(4): 1377-80
  
- LAABYECH.A, LA MUTATION JAK2 V617F :TECHNIQUES DE RECHERCHE ET APPLICATIONS.2013 :10-52
  
- Laubach, J.P., Fu, P., Jiang, X., Salter, K.H., Potti, A., and Arcasoy, M.O. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp Hematol* 37, (2009), 1411-1422.
  
- 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.
  
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;112:2190—8.
  
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." *Cancer cell* 7(4): 387-97.
  
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673—83.
  
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387—97.
  
- Li, W.X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends*
  
- Lucet, IS., Fantino, E., Styles, M., Bamert, R., Patel, O., Broughton, SE., et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 107, (2006), 176-83.
  
- Machida, K., and Mayer, B. J. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* 1747, (2005), 1-25.

- Martyré, M. C., M. C. Le Bousse-Kerdiles, et al. (1997). "Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis." *British journal of haematology* 97(2): 441-8.
- 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.
- Nelson, ME., Steensma, DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 47 , (2006), 177-94.
- Osler, W. (1903). "Chronic cyanosis with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity." *Am J Med Sci* 126: 187-201 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Osler, W. (1908). "A clinical lecture on erythraemia (polycythaemia with cyanosis, maladie de Vaquez)." *Lancet* 1: 143-146 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, (1998), 385-395.
- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:2785—9.
- 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.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93:385—95.
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, (2004), 1281-1283.
- Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15,(2005) , 146-155.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 20, (2000), 3387–3395.
- 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.

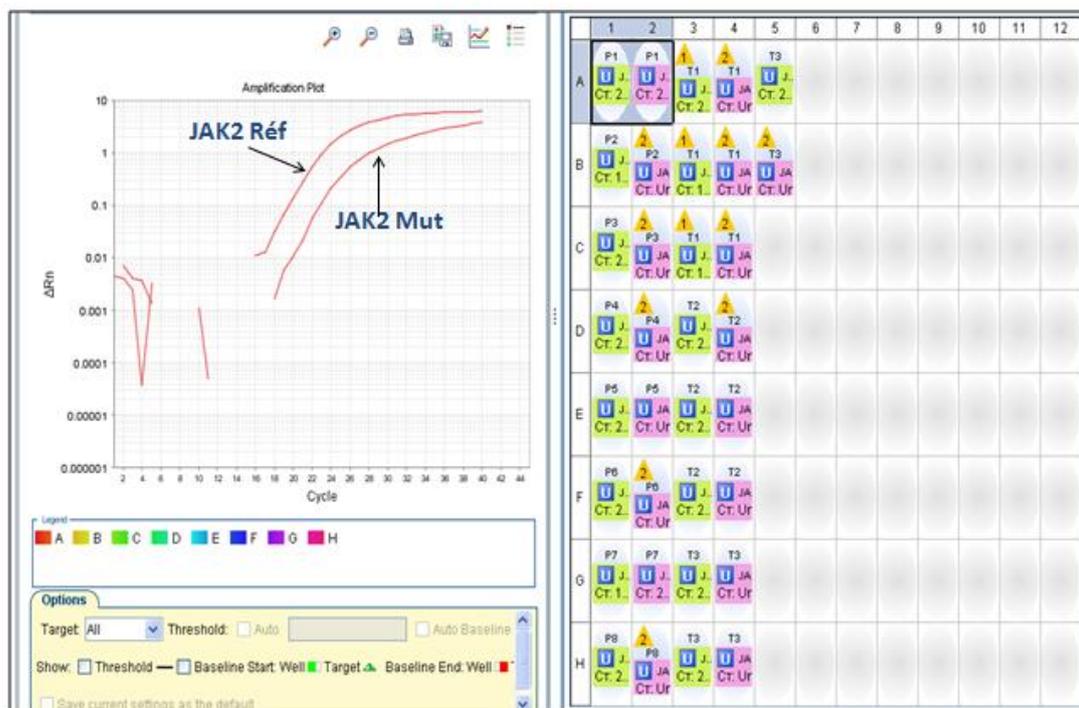
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006;108:2435—7.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *New Engl J Med* 2007;356:459—68.
- 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.
- Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S.J., Dutta, P., Yan, S.J., and Li, W.X. *Drosophila* STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol* 10, (2008), 489-496.
- 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.
- Staerk, J., Kallin, A., Royer, Y., Diaconu, CC., Dusa, A., Demoulin,
- Stephanou, A., and Latchman, D.S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, (2005) , 177-182.
- Tefferi, A., Spivak, JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol* 42, (2005) , 206–20.
- 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.
- Vaquez, L. H. (1892). "Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante." *CR Soc Bio (Paris)* 44: 384-388  
%Uhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=Vaquez%20H&sourceid=mozillasearch&db=pubmed&orig\_db=PubMed&dispmax=20&dopt=DocSum.
- Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006;107:4274—81.
- Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, SB., et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 280, (2005) ,22788–92.

# Annexes

Nom :	<i>Etablissement hospitalier :</i>
Prénom :	<i>Service :</i>
Age :    ans                      Sexe :	<i>Wilaya :</i>
	N° d'échantillon :
<i>Antécédents personnels/familiaux :</i>	..... ..... .....
<p><b><u>Clinique :</u></b></p> <p><input type="checkbox"/> fatigue,      <input type="checkbox"/> sudations nocturnes,      <input type="checkbox"/> perte pondérale      <input type="checkbox"/> dyspnée      <input type="checkbox"/> saignements.  <input type="checkbox"/> Phosphènes<input type="checkbox"/> acouphènes<input type="checkbox"/> vertiges      <input type="checkbox"/> céphalées      <input type="checkbox"/> syndrome tumorale  <input type="checkbox"/> hépatomégalie                      <input type="checkbox"/> splénomégalie      <input type="checkbox"/> prurit</p> <p><input type="checkbox"/> Thromboses                      <i>localisation :</i>.....</p> <p><input type="checkbox"/> Erythrodermie localisation .....</p> <p>*Autres :..... .....</p> <p><b><u>Biologie :</u></b></p> <p>*Anomalie(s) de la lignée érythrocytaire <input type="checkbox"/>:  <input type="checkbox"/> ↑hémoglobine (Hb) .....<input type="checkbox"/> ↑GR .....  <input type="checkbox"/> ↑hématocrite (Ht) .....<input type="checkbox"/> EPO sérique .....      <input type="checkbox"/> LDH.....</p> <p>*Anomalie(s) de la lignée plaquettaire <input type="checkbox"/>:  <input type="checkbox"/> Thrombocytose<input type="checkbox"/> Thrombopénie    Plaquettes.....  <input type="checkbox"/> perturbation du bilan de la coagulation .....</p> <p>*Anomalie(s) des leucocytes <input type="checkbox"/>: .....</p> <p><input type="checkbox"/> Anomalie(s) du frottis sanguin.....  <input type="checkbox"/> Anomalie(s) du frottis médullaire.....  <input type="checkbox"/> Anomalie(s) de la biopsie ostéomédullaire.....  <input type="checkbox"/> Fibrose réticulinique et/ou collagène</p> <p>*Autres :..... .....</p>	
<p><b><u>Suspicion :</u></b></p> <p><input type="checkbox"/> Polyglobulie de vaquez                      <input type="checkbox"/> Thrombocytémie essentiel  <input type="checkbox"/> Myelofibrose primitive                      <input type="checkbox"/> Leucémie myéloïde chronique</p> <p><b><u>Recherche de la mutation JAK2 V617F (PCR en temps réel) :</u></b> <input type="checkbox"/> Positive                      <input type="checkbox"/> Négative</p>	



Annexes 1

**Fiche de renseignements médicale**

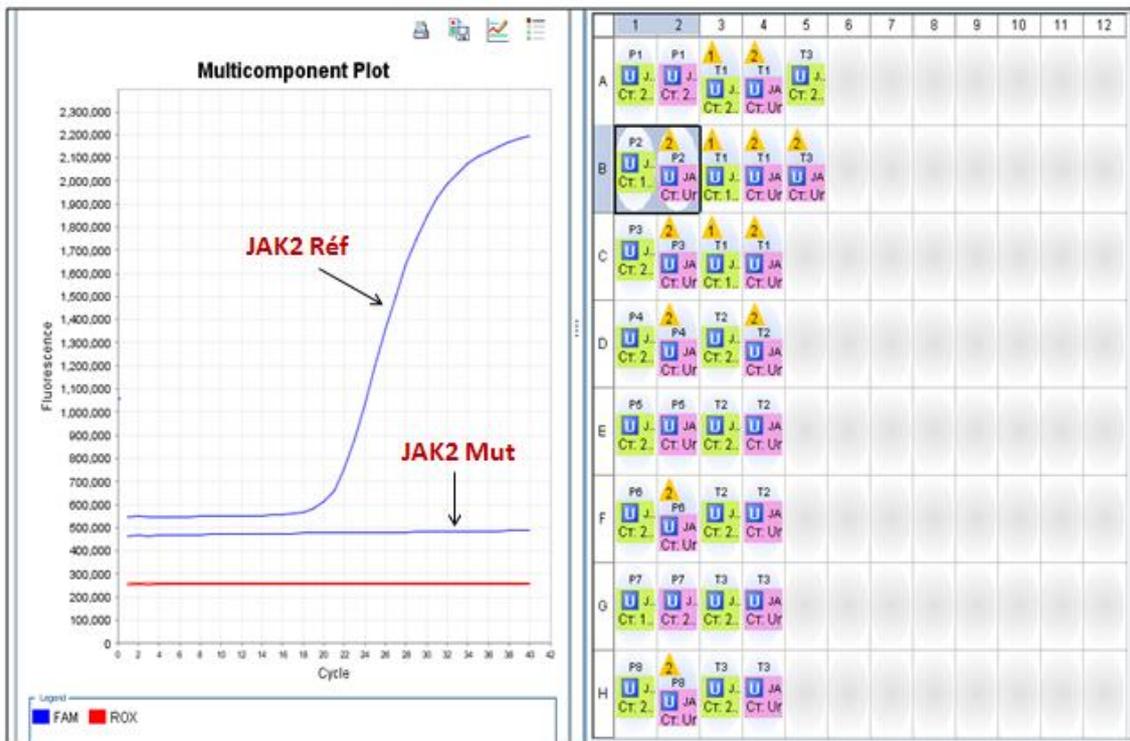
Annexe 2

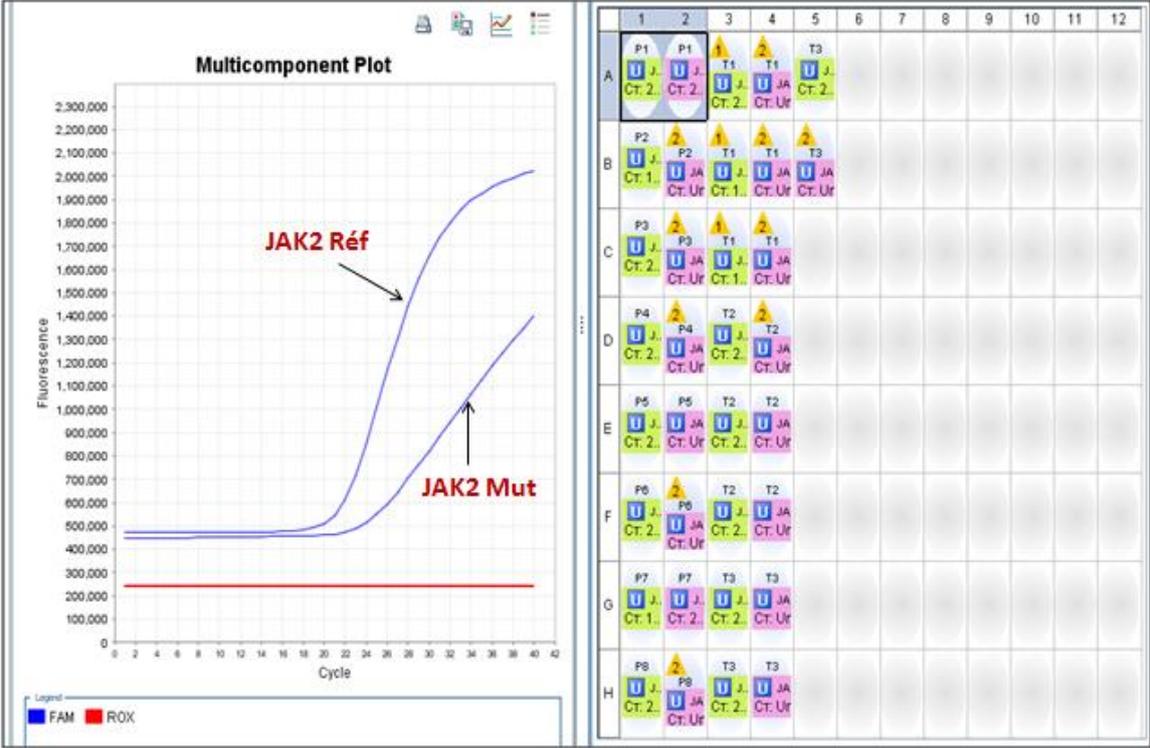
Figure - Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle non muté JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).

Figure- Schéma représentant résultat positif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel.

Figure : schéma représentant résultat positif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel

Figure : schéma représentant résultat négatif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel





# Références

**References :**

- Aaronson, DS., Horvath, CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 5573, (2002), 1653-5.
- Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., and Shuai, K. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, (2003), 21327-21330.
- Baxter, EJ., Scott, LM., Campbell, PJ., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* (2005) ,365,1054–61.
- Baxter, E. J., L. M. Scott, et al. "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human *Cell Biol* 18, (2008), 545-551.
- Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:346—52.
- BOISSINOT.M JAK2, cytokines et recepteurs dans la polyglobulie de vaquez le 3 octobre 2008 16-19 .
- Cargnello, M., and Roux, P.P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, (2011), 50 83.
- Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007;9:272—6.
- Chomel\* J.-C, N. Sorel, C. Mayeur-Rousse, A.G. Turhan .Les syndromes myéloprolifératifs *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2009) 24, 69—85
- JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives ;2011 :22-63
- Clevenger, C. V. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 165, (2004), 1449-1460.
- Dawson, M.A., Bannister, A.J., Gottgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., and Kouzarides, T. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461, (2009), 819-822.
- Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 63, (2006), 2939-2953.

- De Sepulveda, P., Okkenhaug, K., Rose, J.L., Hawley, R.G., Dubreuil, P., Rottapel, R. Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 18, (1999), 904-15.
- Delhommeau, F., Pisani, D.F., James, C., Casadevall, N., Constantinescu, S., and Vainchenker, W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci* 63, (2006), 2939-2953.
- Elyse Poitras et Alain Houde ; La PCR en temps réel: principes et applications Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11
- 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 <http://thesesups.upstlse.fr/1625/1/2011TOU30314.pdf>.
- 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 .E, Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives ;2011 :22-63
- Giordanetto, F., and Kroemer, R. T. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng* 15, (2002), 727-737.
- Girodon, F., Steinkamp, M.P., Cleyrat, C., Hermouet, S., and Wilson, B.S. Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood* 118, (2011), 2633-2634.
- Hammond E, Shaw K, Carnley B, Pang S, James I, Herrmann R. Quantitative determination of JAK2 V617F by TaqMan: An absolute measure of averaged copies per cell that may be associated with the different types of myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007;9:242—8.
- Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, (2006), 173-188.
- HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK, and P. M. WILLIAMS. 1996. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*6: 986-994.
- HIGUCHI, R., G. DOLLINGER, P. S. WALSH, and R. GRIFFITH. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nature Biotechnology*10: 413 - 417.

- Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobl, B., Bates, P. A., Behrmann, I., and Kerr, I. M. A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 505, (2001), 87-91.
- HOLLAND, P. M., R. D. ABRAMSON, R. WATSON, and D. H. GELFAND. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 88: 7276-7280.
- Hookham, M.B., Elliott, J., Suessmuth, Y., Staerk, J., Ward, A.C., Vainchenker, W., Percy, M.J., McMullin, M.F., Constantinescu, S.N., and Johnston, J.A. The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* 109, (2007), 4924-4929.
- 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.
- Jacques, R. Signalisation cellulaire et cancer : Un manuel pour les étudiants et les oncologues - Oncologie pratique , (2010), 75-80.
- James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, (2005) ,1144- 1148.
- 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).
- James, C., V. r. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive JB., et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *PatholBiol (Paris)* 55, (2007) , 88-91.
- Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6224—9.
- Kario, E., Marmor, MD., Adamsky, K., Citri, A., Amit, I., Amariglio, N., et al. Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 8, (2004), 7038-48.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, AS., Teo, SS., Tiedt, R., Passweg, JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, (2005) ,1779–90.
- 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.

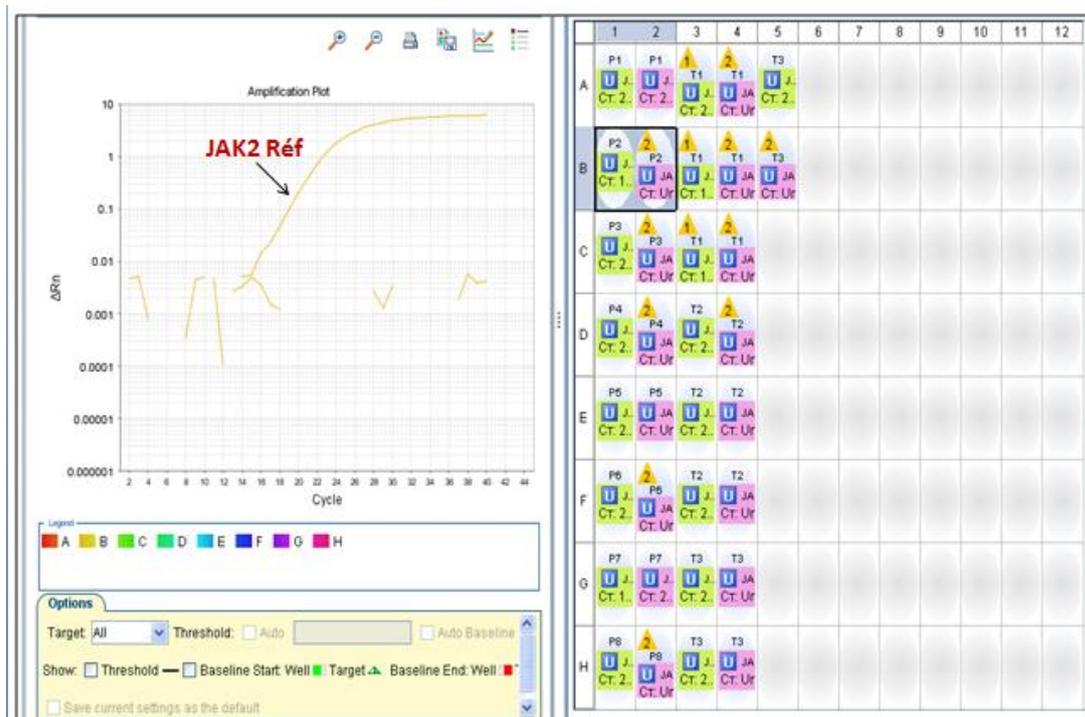
- Kralovics R, Teo SS, Li S, Theodorides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:1377—80.
  
- Kralovics, R., S.-S. Teo, et al. (2006). "Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders." *Blood* 108(4): 1377-80
  
- LAABYECH.A, LA MUTATION JAK2 V617F :TECHNIQUES DE RECHERCHE ET APPLICATIONS.2013 :10-52
  
- Laubach, J.P., Fu, P., Jiang, X., Salter, K.H., Potti, A., and Arcasoy, M.O. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp Hematol* 37, (2009), 1411-1422.
  
- 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.
  
- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;112:2190—8.
  
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." *Cancer cell* 7(4): 387-97.
  
- Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7:673—83.
  
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387—97.
  
- Li, W.X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends*
  
- Lucet, IS., Fantino, E., Styles, M., Bamert, R., Patel, O., Broughton, SE., et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 107, (2006), 176-83.
  
- Machida, K., and Mayer, B. J. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* 1747, (2005), 1-25.

- Martyré, M. C., M. C. Le Bousse-Kerdiles, et al. (1997). "Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis." *British journal of haematology* 97(2): 441-8.
- 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.
- Nelson, ME., Steensma, DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 47 , (2006), 177-94.
- Osler, W. (1903). "Chronic cyanosis with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity." *Am J Med Sci* 126: 187-201 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Osler, W. (1908). "A clinical lecture on erythraemia (polycythaemia with cyanosis, maladie de Vaquez)." *Lancet* 1: 143-146 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., van Deursen, J.M., et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, (1998), 385-395.
- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:2785—9.
- 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.
- Parganas E, Wang D, Stravopodis D, Topham DJ, Marine JC, Teglund S, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 1998;93:385—95.
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, (2004), 1281-1283.
- Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15,(2005) , 146-155.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 20, (2000), 3387–3395.
- 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, Ekins 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.

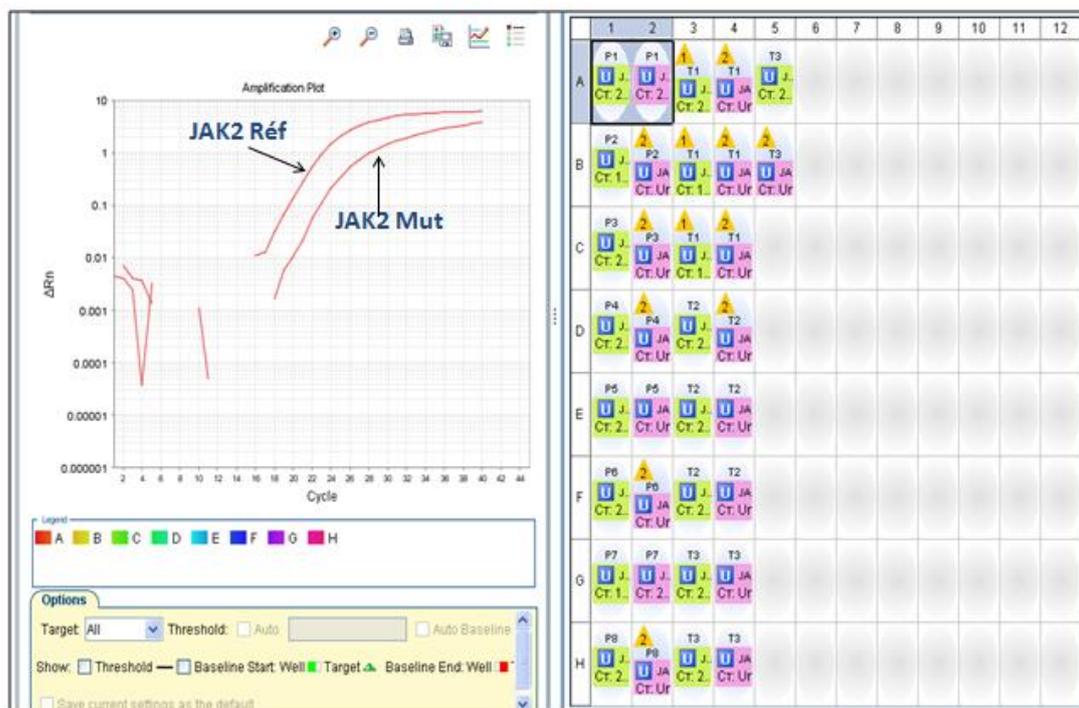
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* 2006;108:2435—7.
- Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *New Engl J Med* 2007;356:459—68.
- 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.
- Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S.J., Dutta, P., Yan, S.J., and Li, W.X. *Drosophila* STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol* 10, (2008), 489-496.
- 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.
- Staerk, J., Kallin, A., Royer, Y., Diaconu, CC., Dusa, A., Demoulin,
- Stephanou, A., and Latchman, D.S. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, (2005) , 177-182.
- Tefferi, A., Spivak, JL. Polycythemia vera: scientific advances and current practice. *Semin Hematol* 42, (2005) , 206–20.
- 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.
- Vaquez, L. H. (1892). "Sur une forme speciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante." *CR Soc Bio (Paris)* 44: 384-388  
%Uhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=Vaquez%20H&sourceid=mozillasearch&db=pubmed&orig\_db=PubMed&dispmax=20&dopt=DocSum.
- Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006;107:4274—81.
- Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, SB., et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 280, (2005) ,22788–92.

# Annexes





Annexes 1

**Fiche de renseignements médicale**

Annexe 2

Figure - Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle non muté JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).

Figure- Schéma représentant résultat positif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel.

Figure : schéma représentant résultat positif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel

Figure : schéma représentant résultat négatif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel

