

UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
FES



Année 2015

Thèse N°055/15

**MUTATION JAK2 DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES
AU CHU HASSAN II DE FES
(A propos 27 cas)**

THESE
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 26/03/2015

PAR
Mlle. NAJMI IMANE
Née le 15 MAI 1989 à Fès

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE

MOTS-CLES :

Protéine JAK2-JAK2 V617F-Hémopathies malignes-Syndromes myéloprolifératifs
PCR-AS-Inhibiteurs de JAK2

JURY

Mme. BONO WAFAA PRESIDENT
Professeur de Médecine Interne
M. OULDIM KARIM RAPPORTEUR
Professeur agrégé de Génétique
M. AMRANI HASSANI MONCEF..... } JUGES
Professeur agrégé d'Hématologie
Mme. BENNIS SANAE..... }
Professeur agrégée de Biologie cellulaire

PLAN

PLAN	-----	1
INTRODUCTION	-----	14
HEMATOPOIESE	-----	17
I. Généralités	-----	18
II. Compartiments hématopoïétiques	-----	19
III. Différentiation des cellules souches hématopoïétiques	-----	21
1. Erythropoïèse	-----	21
2. Granulopoïèse	-----	22
3. Monocytopoïèse	-----	23
4. Thrombocytopoïèse	-----	24
5. Lymphopoïèse	-----	25
IV. Régulation de l'hématopoïèse	-----	26
1. Microenvironnement	-----	26
2. Vitamines et oligoéléments	-----	26
3. Facteurs de croissance	-----	26
3.1. Facteurs positifs de l'hématopoïèse	-----	27
3.1.1 Facteurs synergiques ou de promotion	-----	27
3.1.2 Facteurs multipotents	-----	27
3.1.3 facteurs restreints ou spécifiques de lignée	-----	27
3.2. Facteurs négatifs de l'hématopoïèse	-----	27
4. contrôle génétique de l'hématopoïèse	-----	28
HEMOPATHIES MALIGNES	-----	29
I. Définition	-----	30
II. Circonstances favorisant la survenue d'une hémopathie	-----	31
III. Classification des hémopathies malignes	-----	32
1. Hémopathies malignes du tissu myéloïde	-----	32

2.	Hémopathies malignes du tissu lymphoïde	34
IV.	Différentes hémopathies malignes	36
1.	Hémopathies myéloïdes	36
1.1.	Syndromes myéloprolifératifs	36
1.1.1.	Historique des syndromes myéloprolifératifs	36
1.1.2.	Leucémie myéloïde chronique	37
1.1.3.	Polyglobulie de Vaquez	39
1.1.4.	Thrombocytémie essentielle	44
1.1.5.	Myélofibrose primitive	48
1.2.	Les syndromes myélodysplasiques	51
1.2.1	Définition	51
1.2.2	Caractéristiques	52
1.2.3	Epidémiologie	52
1.2.4	classification de la FAB	52
1.2.5	Facteurs pronostiques	53
1.3.	Leucémie myéloïde aigue	54
1.3.1	Définition	54
1.3.2	Epidémiologie	54
1.3.3	Leucémogénèse	55
2.	Hémopathies lymphoïdes	55
2.1	Généralités	55
2.2	Hémopathies malignes lymphoïdes chroniques	56
2.2.1	Hémopathies lymphoïdes matures B	56
2.2.2	Hémopathies lymphoïdes matures T ou à cellules NK	58
2.2.3	Maladie de Hodgkin	58
2.3	Hémopathies malignes lymphoïdes aigues	58

2.3.1	Leucémie aigue lymphoblastique	58
CYTOKINES ET RECEPTEURS LIES A JAK2 D'INTERET DANS LES SYNDROMES		
MYELOPROLIFERATIFS		
I.	Généralités sur les cytokines et leurs récepteurs	61
1.	Cytokines	61
2.	Récepteurs des cytokines	62
3.	Cas des cytokines hématopoïétiques	63
II.	Epo/EpoR	65
III.	Tpo/Mpl	67
IV.	Cytokines de la famille de l'IL-6 et leurs récepteurs	68
MUTATION DU GENE <i>JAK2</i> DANS LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS		
I.	Gène codant	71
II.	Protéine JAK2	71
1.	Généralités	71
2.	Famille de protéines	72
3.	Structure	74
4.	Fonctions	75
5.	Principales voies de signalisation	77
5.1.	Voie JAK/STAT canonique	80
5.2.	Voie PI3K/Akt	81
5.3.	Voie des MAPKs	82
5.4.	Régulateurs négatifs	83
6.	Déficit en JAK2	85
III.	Physiopathologie	85
1.	Mutation JAK2 V617F	85
2.	Mutations JAK2 autres que V617F	87

3. Modélisation moléculaire -----	88
4. Mécanismes des syndromes myéloprolifératifs liés à la mutation JAK2 ---	89
MATERIELS ET METHODES -----	91
I. Critères d'inclusion des patients -----	92
II. Recueil des données -----	92
III. Prélèvement des patients -----	92
IV. Extraction de l'ADN génomique -----	92
1. Extraction de l'ADN par sel -----	93
2. Extraction de l'ADN par KIT -----	93
3. Dosage de l'ADN -----	94
V. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR -----	95
1. Principe de l'amplification d'ADN par la PCR -----	95
2. Réactifs de la PCR -----	95
3. Limites de la PCR -----	96
4. Témoins de la PCR -----	96
5. Migration du produit PCR sur gel d'agarose à 2 % -----	96
RESULTATS -----	97
I. Données épidémiologiques -----	98
II. Données cliniques -----	99
III. Résultats de l'étude moléculaire -----	99
DISCUSSION -----	102
I. Mutation JAK2 -----	103
1. Conséquence sur la fonction de JAK2 -----	103
2. Conséquences sur les clones porteurs de la mutation JAK2 -----	103
2.1. Activation constitutive des voies de signalisation canoniques -----	103
2.2. Dérégulation de la transcription et de la traduction protéique -----	104

2.3. Altération du rétrocontrôle négatif -----	105
2.4. Impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique -----	106
2.5. Impact cellulaire de la mutation JAK2 V617F -----	106
II. Intérêt de la mutation JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs -----	108
1. Diagnostique -----	110
2. Thérapeutique -----	113
3. Pronostique -----	116
4. Suivi thérapeutique -----	118
III. Détection de la mutation JAK2 sur la moelle osseuse -----	119
CONCLUSION -----	121
RESUMES -----	123
REFERENCES -----	127
ANNEXES -----	151

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AKT	: Cellular homolog of the v-akt oncogene
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
BCL-XL	: B-cell/Lymphoma 2-like 1
BCR-ABL	: Breakpoint cluster region-Abelson tyrosine kinase
BFUE	: Burst forming unit erythroid
BOM	: Biopsie ostéo médullaire
Caspases	: Cysteinyl aspartate cleaving proteases
CD34	: Cluster of differentiation
CFU	: Colony forming unit
CFU-E	: CFU- Erythroid
CFU-GEMM	: CFU-Granulocyte/Erythrocyte/Megacaryocyte/Macrophage
CFU-GM	: CFU-Granulocyte/Macrophage
CHR	: Cytokine homologue receptor
CSF	: Colony stimulating factor
CSH	: Cellule souche hématopoïétique
EBV	: Epstein barr virus
EDTA	: Ethylène diamine tétra acétique
Epo	: Erythropoïétine
EpoR	: Erythropoietin Receptor
ERK	: Extracellular regulated signal

FERM	: 4-1 Ezrin, Radixin, Moesin
GF	: Growth factor
GM-CSF	: Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
GP130	: Glycoprotéine 130
HP1α	: Heterochromatin protein 1 α
IFN	: Interferon
Ig	: Immunoglobuline
IGF-1	: Insulin-like-growth factor-1
IL	: Interleukine
IPSS	: Index pronostique international dans les syndromes myélodysplasiques
JAK	: Janus kinase
JH	: JAK homology
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
KDa	: Kilodalton
LA	: Leucémie aigue
LAM	: Leucémie aigue myéloïde
LAL	: Leucémie aigue lymphoblastique
LDH	: Lactate déshydrogénase
LMC	: Leucémie myéloïde chronique
LMMC	: Leucémie myélomonocytaire chronique
MALT	: Mucosal associated lymphoid tissue
MAPK	: Mitogen activated protein kinase
MK	: Mégacaryocyte
MO	: Moelle osseuse

MP	: Myélobfibrose primitive
NaCl	: Chlorure de sodium
NK	: Natural killer
OMS	: Organisation mondiale de santé
PCR	: Polymerase chain reaction
Ph	: Philadelphie
PI3K	: Phosphatidyl Inositol 3 kinase
PIAS	: Protein inhibitor of activated STAT
PTP	: Protein tyrosine phosphatase
PV	: Polyglobulie de Vaquez
PVSG	: Polycythemia Vera study group
RE	: Reticulum endoplasmique
SCF	: Stem cell factor
SH2	: Src homology 2
SMD	: Syndrome myélodysplasique
SMP	: Syndrome myéloprolifératif
SOCS	: Suppressor of cytokine signaling
SP	: Sang périphérique
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
TE	: Thrombocytémie essentielle
TET2	: Ten eleven translocation 2
TGFβ	: Transforming growth factor β
TK	: Tyrosine kinase
TNF	: Tumor necrosis factor

TPO : Thrombopoïétine / TPO-R: TPO receptor

TYK2 : Tyrosine kinase 2

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VGT : Volume globulaire total

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VS : Vitesse de sédimentation

WHO : World health organization

WPSS : WHO classification based prognostic scoring system

W-S-X-W-S: Tryptophan-Sérine-X-Tryptophan-Sérine

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Schéma de l'hématopoïèse
- Figure 2** : l'altération de la balance physiologique concernant la prolifération, l'apoptose et la différenciation lors des hémopathies malignes
- Figure 3** : Découvertes majeures dans les syndromes myéloprolifératifs
- Figure 4** : La translocation t (9;22) (q34;q11)
- Figure 5** : famille des chaînes réceptrices membranaires des cytokines
- Figure 6** : situation du gène JAK2 sur le chromosome 9p, locus 9p24.1
- Figure 7** : représentation schématique du domaine kinase d'une protéine tyrosine kinase
- Figure 8** : organisation structurale de JAK2
- Figure 9** : L'implication différentielle des JAKs au niveau des récepteurs aux cytokines
- Figure 10** : Voie de signalisation JAK/STAT dans la régulation épigénétique
- Figure 11** : L'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK
- Figure 12** : Principales voies de signalisation activées par le complexe JAK2/récepteur aux cytokines
- Figure 13** : Activation de la voie JAK/STAT
- Figure 14** : A) Structure des protéines impliquées dans la régulation négative de la voie JAK/STAT. B) Régulation négative de la voie JAK/STAT par les phosphotyrosine phosphatases. C) Régulation négative de la voie JAK/STAT par les SOCS PIAS. D) SOCS1 cible JAK2 vers une dégradation par le protéasome
- Figure 15** : Séquences nucléotidiques et protéiques caractérisant la mutation V617F
- Figure 16** : Représentation schématique de la protéine JAK2 sauvage et mutée

- Figure 17** : structure de la valine et la phénylalanine
- Figure 18** : représentation de la protéine JAK2 et la localisation de V617F
- Figure 19** : NANODROP pour le dosage de l'ADN
- Figure 20** : répartition des malades en fonction de l'âge
- Figure 21** : répartition des malades en fonction du sexe
- Figure 22** : répartition des malades en fonction du diagnostic
- Figure 23** : répartition des malades selon leur statut mutationnel
- Figure 24** : profil d'électrophorèse des produits PCR chez un patient de notre série qui avait la mutation V617F du gène JAK2
- Figure 25** : profil d'électrophorèse des produits PCR chez un des patients de notre série n'avait pas la mutation V617F du gène JAK2
- Figure 26** : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la PV de notre série avec les autres séries
- Figure 27** : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la TE de notre série avec les autres séries
- Figure 28** : prévalence de la mutation JAK2 dans la MP selon les séries

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** : Hémopathies malignes du tissu myéloïde selon les classifications ICD-O-3 (OMS)
- Tableau 2** : Hémopathies malignes du tissu lymphoïde selon les classifications ICD-O-3 (OMS)
- Tableau 3** : index pronostique international dans les syndromes Myélodysplasiques (IPSS)
- Tableau 4** : index pronostique intégrant le besoin transfusionnel (WPSS)
- Tableau 5** : critères diagnostiques OMS 2008 des SMP en dehors de LMC
- Tableau 6** : principaux inhibiteurs des JAKs en étude clinique pour le traitement des SMP

INTRODUCTION

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.

Les hémopathies malignes sont l'ensemble des cancers du sang et des organes lymphoïdes qui résultent d'une altération de la balance physiologique concernant la prolifération, l'apoptose et la différenciation des cellules sanguines (augmentation de la prolifération et inhibition de l'apoptose). Ce dysfonctionnement peut être consécutif à une expression inadaptée ou à des altérations structurales de certains gènes suite à des mutations ponctuelles ou à des anomalies de structures telles que les translocations chromosomiques, cela touche les cellules hématopoïétiques. L'anomalie engendre une accumulation de cellules anormales, clonales et malignes.

Les classifications des hémopathies se sont succédées depuis le début des années 1970 pour aboutir à une classification internationale consensuelle publiée en 2000 sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé qui tient compte du tissu d'origine de la prolifération lymphoïde ou myéloïde puis des éléments cliniques, morphologiques ou histologiques, immunophénotypiques, génétiques et moléculaires pour définir chaque entité [1].

Les syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMP) sont des hémopathies malignes ayant pour caractéristiques communes une hyperplasie myéloïde globale et une hypersensibilité aux cytokines des progéniteurs hématopoïétiques. Ce sont des maladies acquises et clonales de la cellule souche hématopoïétique.

La classification des syndromes myéloprolifératifs distingue : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie primitive ou maladie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle, la splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive, le syndrome hyperéosinophilique et des syndromes myéloprolifératifs atypiques [2].

La mutation JAK2 V617F associée aux syndromes myéloprolifératifs a été décrite comme un événement génétique fréquent chez la majorité des patients atteints de polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose idiopathique. Cette mutation est caractérisée par un changement d'un nucléotide (un T pour un G) 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 [3].

L'identification de la mutation JAK2 V617F représente une avancée majeure dans la compréhension des syndromes myéloprolifératifs non-LMC, même si les mécanismes par lesquels une mutation unique aboutit à des phénotypes différents restent à élucider [4,5].

Sur un plan médical, la découverte de cette mutation permet pour la première fois de réaliser un test diagnostique moléculaire de ces maladies. Ainsi que, les perspectives de thérapie ciblée, ouvertes en hématologie comme en cancérologie par les inhibiteurs de tyrosine kinase [6,7], permettent d'espérer à moyen terme la mise au point d'un médicament spécifique des syndromes myéloprolifératifs JAK2 V617F.

L'objectif de ce travail est de déterminer la prévalence de la mutation JAK2 à travers une étude portant sur les dossiers des malades dans le laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique et le service de Médecine Interne du CHU Hassan II de Fès et présentant des syndromes myéloprolifératifs documentés par des données cliniques et biologiques, ainsi que d'identifier son impact clinique au cours de sa présence, et ses éventuelles implications dans l'établissement du diagnostic et les progrès thérapeutiques.

HEMATOPOIESE

I. Généralités :

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines du sang périphérique : les globules rouges ou hématies, les différentes familles de globules blancs ou leucocytes et les plaquettes.

C'est un phénomène physiologique, dynamique et continu qui assure une production quotidienne de 10 000 milliards de cellules sanguines.

L'hématopoïèse, chez l'homme, débute au niveau du tissu conjonctif embryonnaire jusqu'au 2ème mois, puis se retrouve au niveau du foie fœtal et devient médullaire à partir du 4ème mois. Après la naissance, le siège de l'hématopoïèse est essentiellement dans la moelle osseuse.

Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée : la cellule souche hématopoïétique (CSH). Cette cellule a deux propriétés essentielles : l'auto-renouvellement et le pouvoir de différenciation. [8,9].

L'hématopoïèse doit être contrôlée très finement afin de maintenir, en dépit des variations de consommation importantes liées à des circonstances pathologiques, comme une hémorragie, nécessitant la production rapide de globules rouges ou une infection, impliquant la production de globules blancs. Cette régulation repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux (facteurs de croissance) qui peuvent être stimulateurs ou inhibiteurs de l'hématopoïèse [10].

La dérégulation de l'homéostasie hématopoïétique peut être à l'origine des hémopathies malignes. Ce dysfonctionnement peut être consécutif à une expression inadaptée ou à des altérations structurales de certains gènes suite à des mutations ponctuelles ou à des anomalies de structures telles que les translocations chromosomiques [8,9].

II. Compartiments hématopoïétiques [11,12] :

Dans l'hématopoïèse, quatre compartiments cellulaires peuvent être définis : dans la moelle osseuse les cellules souches hématopoïétiques multipotentes, les progéniteurs et les précurseurs sont présents ainsi que les cellules matures qui vont passer dans le sang (Figure 1).

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) : cellules primitives ayant un haut pouvoir de prolifération, en effet elles sont capables de se renouveler, ce qui permet le maintien d'un nombre constant de cellules souches, et de se différencier, ce qui assure le renouvellement des cellules sanguines qui meurent physiologiquement après un certain délai.

Les progéniteurs : ce sont des cellules capables de se proliférer sans s'auto-renouveler et de se différencier, elles sont habituellement déterminées et déjà engagées vers une seule lignée cellulaire. Elles ont la particularité de subir de nombreuses divisions entre la cellule souche qui leur a donné naissance et les cellules différenciées, et de subir une différenciation progressive, qui va permettre à partir d'une cellule souche totipotente de donner une cellule irréversiblement destinée à se différencier en cellule de la lignée lymphoïde ou myéloïde. La cellule lymphoïde peut se différencier vers les deux types de lymphocytes B et T. La cellule myéloïde, appelée CFU-GEMM (Colony Forming Unit Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte) ou CFU-Mix est à l'origine des autres lignées granuleuses, érythroïdes, macrophages et mégacaryocytaires.

Les précurseurs : cellules déjà reconnaissables morphologiquement, correspondant à des cellules en cours de maturation avant leur passage dans la circulation sanguine.

Les **cellules matures** : cellules terminales, matures et fonctionnelles vont passer dans la circulation sanguine : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, hématies, plaquettes, lymphocytes et monocytes.

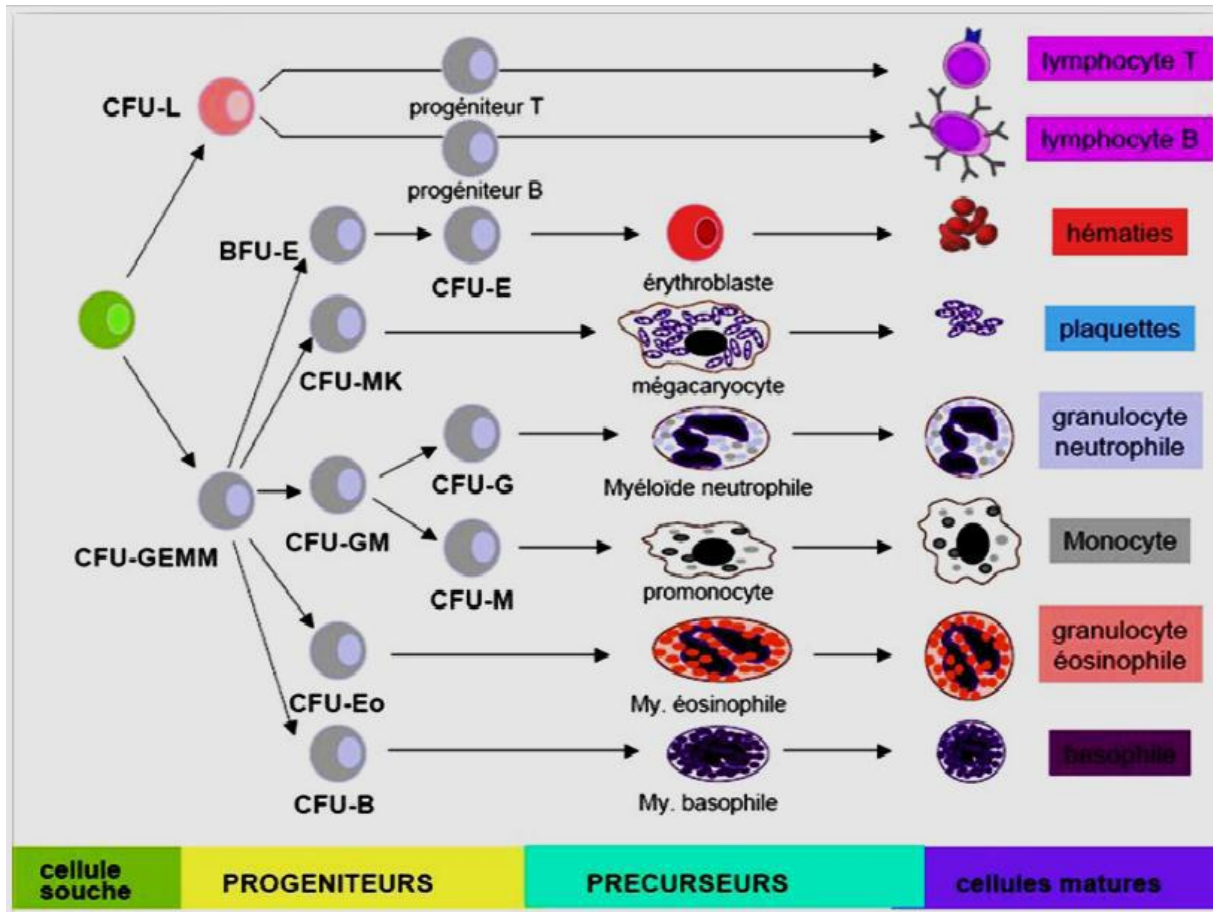


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse.

III. Différentiation des cellules souches hématopoïétiques :

Deux voies principales constituent l'hématopoïèse normale :

- La myélopoïèse comportant l'érythropoïèse, la granulopoïèse, la monocytopoïèse et la thrombocytopoïèse.
- La lymphopoïèse.

1. Erythropoïèse :

L'érythropoïèse prend naissance à partir d'une putative cellule souche hématopoïétique. Celle-ci va s'engager dans une voie de différenciation myéloïde, vers un progéniteur multipotent appelé CFU-GEMM qui va ensuite se différencier vers un progéniteur restreint dans la voie érythroïde appelé BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid). Le BFU-E va proliférer et se différencier par étapes successives pour aboutir à la formation de précurseurs érythroblastiques morphologiquement reconnaissables au niveau médullaire (érythroblastes) et de globules rouges matures dans le sang périphérique (figure1). L'engagement des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde semble s'effectuer grâce à une combinaison d'expression de facteurs de transcription et en particulier du facteur GATA-1 qui permet la régulation positive des promoteurs des gènes érythroïdes comme la glycophorine, l'hémoglobine et le récepteur à l'érythropoïétine (Epo).

Plusieurs facteurs de croissance agissent à différents niveaux. Deux facteurs semblent être indispensables, le stem cell factor (SCF) pour les phases précoces jusqu'au stade CFU-E et l'érythropoïétine à partir des BFU-E tardifs jusqu'au stade des érythroblastes [13].

2. Granulopoïèse :

La granulopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui permet la production de granulocytes qui sont des cellules dont le cytoplasme est riche en granulations, c'est ce qu'on appelle autrement les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles.

Les granulocytes naissent dans la moelle osseuse à partir des cellules souches déterminées stimulées par certains facteurs parmi lesquels le CSF (Cell Stimulating Factor) qui joue un rôle important.

La première cellule granuleuse identifiable est le myéloblaste. Après quatre à cinq mitoses et à la suite de phénomènes de maturation dominés par l'élaboration de granulations spécifiques, le myéloblaste aboutit au polynucléaire. Des critères surtout morphologiques ont permis de distinguer plusieurs stades : myéloblaste, promyélocyte, myélocyte, métamyélocyte qui, sans se diviser, se différencie en polynucléaire (figure1). Le polynucléaire quitte le secteur médullaire et gagne le secteur vasculaire où l'on distingue deux sous secteurs ou compartiments : l'un constitué par des polynucléaires circulants, l'autre par des polynucléaires marginés (adhérents aux parois des petits vaisseaux). Ces polynucléaires sanguins vont ensuite gagner le secteur tissulaire où ils accompliront leurs fonctions [14].

Les granulations, également appelées lysosomes, ont un rôle essentiel dans la fonction des lignées granuleuses après la phagocytose. Ce sont elles qui donnent leur spécificité aux différentes lignées neutrophile, basophile, éosinophile [15].

3. Monocytopoïèse :

Les monocytes-macrophages constituent le système de phagocytes mononucléés, autrefois appelé système réticulo-endothélial ou système réticulo-histiocytaire. Ils font partie des cellules de l'immunité innée dite non spécifique.

La CFU-GM médullaire est commune aux lignées monocyttaire et granulocytaire. Les CFU-GM continuent à se multiplier et sous l'effet du M-CSF évoluent en Monoblastes-Promonocytes encore appelés monocytes immatures (figure1), ce sont les premières cellules morphologiquement reconnaissables. Dans la moelle osseuse, les promonocytes se multiplient tout en continuant leur différenciation. Lorsque la maturation cellulaire est suffisante (en 24 à 48 h), les monocytes quittent la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang. Les 3/4 des monocytes du compartiment vasculaire sont marginés [16].

Les monocytes ont dans le sang une demi-vie brève (3 jours). Ils vont se localiser ensuite dans des territoires stratégiques (ganglions, rate, séreuses), ce qui leur permet de s'infiltrer dans les divers tissus où ils deviennent des macrophages. Au niveau des tissus, les macrophages adoptent des caractéristiques morphologiques spécifiques de l'organe de résidence (cellules de Kupffer du foie, histiocytes du tissu conjonctif..).

Les macrophages ont des fonctions métaboliques. Leur rôle est essentiel dans les processus d'épuration de l'organisme. Avec leurs propriétés de sécrétion et de phagocytose, ils interviennent avec efficacité au niveau de la défense spécifique et au niveau de la défense non spécifique.

4. Thrombocytopoïèse :

Le mégacaryocyte, précurseur médullaire des plaquettes provient lui même de la différenciation de la CSH multipotente, qui à travers différentes étapes de détermination va restreindre sa potentialité vers une cellule purement engagée dans la lignée mégacaryocytaire : le progéniteur mégacaryocytaire, cellule 2N capable de proliférer et, à un moment donné, va commuter son mécanisme de multiplication vers une polyploïdisation, processus appelé endomitose [17]. D'une façon quasi synchrone, le progéniteur mégacaryocytaire se différencie en promégacaryoblaste puis en mégacaryoblaste.

Le mégacaryoblaste se différencie successivement en mégacaryocyte basophile, en mégacaryocyte granuleux puis en mégacaryocyte thrombocytogène et va commencer à synthétiser les protéines plaquettaires, responsables essentiellement de leurs fonctions hémostatiques et thrombotiques. Cette maturation cytoplasmique va s'accélérer après l'arrêt des endomitoses avec le développement des organelles importantes du mégacaryocyte : les membranes de démarcation, invagination de la membrane cytoplasmique et les granules. Le mégacaryocyte à la fin de sa maturation forme de longues extensions appelées proplaquettes par déroulement des membranes de démarcation qui se fragmentent pour donner des plaquettes [18].

5. Lymphopoïèse [15] :

La différenciation des cellules lymphoïdes est, dans une certaine mesure, beaucoup mieux connue que leur multiplication. Par rapport aux cellules myéloïdes, les cellules lymphoïdes sont en effet physiologiquement caractérisées par l'importance des échanges intercellulaires. Ces échanges, appelés aussi coopération, nécessitent la présence à la membrane cellulaire de molécules spécifiques. Ces molécules sont antigéniques, et les anticorps monoclonaux ont permis de décrire toute une série de molécules membranaires dont l'apparition ou la disparition caractérise une étape de la différenciation lymphoïde.

Une première différenciation très précoce se fait entre la cellule lymphoïde B (qui va, au terme de sa maturation, fabriquer des anticorps) et la cellule lymphoïde T. La désignation B vient de la « bourse de Fabricius », qui est l'organe de production des cellules lymphoïdes B chez les oiseaux. La lettre T vient de thymus, organe de production et de différenciation des cellules lymphoïdes T.

Les cellules lymphoïdes B se différencient successivement en lymphoplasmocytes, puis en plasmocytes et sécrètent successivement des immunoglobulines IgD et IgM puis IgG – IgA ou IgE.

Les cellules lymphoïdes T se différencient ultérieurement en cellules dites auxiliaires (en anglais : *helper*), caractérisées par la molécule de membrane T 4, et cellules T tueuses ou suppressives, caractérisées par la molécule de membrane T 8. Une autre catégorie de cellules T sont les cellules NK (pour *natural killer*), cellules T primitives dont les fonctions sont mal connues et qui tuent sans stimulus antigénique préalable.

IV. Régulation de l'hématopoïèse :

1. Microenvironnement :

Le microenvironnement constitue un milieu indispensable au maintien, à l'engagement et à la différenciation des cellules hématopoïétiques. Il est constitué de cellules stromales et d'une matrice extracellulaire. Les cellules stromales sont à l'origine de la sécrétion de nombreux facteurs de croissance indispensables à l'hématopoïèse. La matrice extracellulaire est constituée de protéines qui permettent l'adhésion des cellules hématopoïétiques.

L'interaction entre les cellules hématopoïétiques et le stroma médullaire est indispensable pour le maintien de l'auto-renouvellement et la survie des cellules hématopoïétiques. Elle se fait via des cytokines, dites hématopoïétiques, des chimiokines et des facteurs de croissance de colonies [19].

2. Vitamines et oligoéléments :

Des vitamines et oligoéléments sont indispensables à l'hématopoïèse:

- vitamine B12 et acide folique qui sont nécessaires à la synthèse de l'ADN et donc à la division cellulaire.
- fer, indispensable à l'érythropoïèse pour la synthèse de l'hémoglobine.

3. Facteurs de croissance :

Les facteurs de croissance sont des glycoprotéines qui agissent principalement de manière paracrine et qui modulent de façon positive ou négative la prolifération, la différenciation et la survie des cellules hématopoïétiques.

3.1. Facteurs positifs de l'hématopoïèse :

3.1.1 Facteurs synergiques ou de promotion :

Ils agissent, en présence des CSF, sur les précurseurs hématopoïétiques et les cellules souches. IL-1, IL-6 et LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ou encore le Stem Cell Factor (SCF) ont un rôle important dans l'entrée en cycle des cellules en présence de certains CSF [20].

3.1.2 Facteurs multipotents :

Ce sont principalement l'IL-3 et le GM-CSF (Granulocyte/Monocyte-CSF) pour les progéniteurs myéloïdes. Ils agissent sur les cellules souches les plus immatures après sensibilisation par les facteurs synergiques et ils permettent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules souches.

3.1.3 facteurs restreints ou spécifiques de lignée :

Ils agissent sur les cellules souches engagées dans une voie de différenciation et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont principalement : EPO (lignée érythroïde), TPO (lignée mégacaryocytaire), G-CSF (lignée granuleuse neutrophile), M-CSF (lignée monocytaire), l'IL-5 (lignée éosinophile), l'IL-4 (lignée basophile), l'IL-7 (lignée lymphocytaire).

3.2. Facteurs négatifs de l'hématopoïèse :

Les principaux facteurs de croissance régulant négativement l'hématopoïèse sont :

- TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β) est l'isoforme majoritairement retrouvé au cours de l'hématopoïèse. Il diminue la prolifération des

progéniteurs précoces in vitro et maintient l'état quiescent des cellules souches in vivo [21].

- Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est un facteur de croissance non hématopoïétique synthétisé par les monocytes et les lymphocytes T. Il a un rôle bidirectionnel en fonction des facteurs de croissance présents. In vivo, il inhibe l'érythropoïèse et stimule la myélopoïèse [22].

4. contrôle génétique de l'hématopoïèse :

Il s'agit de facteurs de transcription qui favorisent la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques dans un lignage particulier.

Quelle que soit la voie de transduction du signal mise en jeu, elle aboutit à une régulation génétique des facteurs de transcription qui vont orienter la réponse cellulaire, en termes d'auto renouvellement, de différenciation, de prolifération, d'apoptose, de sénescence, de migration ou encore d'adhésion. Ces choix cruciaux se font via la combinaison de nombreux facteurs de transcription, s'antagonisant ou synergisant souvent les uns les autres, exprimés à des stades de différenciation particuliers et permettant de diriger les cellules vers un lignage spécifique [23].

HEMOPATHIES

MALIGNES

I. Définition :

Les hémopathies malignes sont l'ensemble des cancers du sang et des organes lymphoïdes. Elles résultent d'anomalie de la balance physiologique concernant la prolifération, l'apoptose et la différenciation des cellules sanguines matures (responsables d'hémopathies chroniques) ou immatures (entraînant les hémopathies aiguës) [24]. Donc le principe est que pour un compartiment cellulaire donné: la balance entre la prolifération et la mort cellulaire sera altérée lors d'une hémopathie maligne. Cette altération est soit une diminution de la mort cellulaire soit une augmentation de la prolifération cellulaire.

Cela touche les cellules hématopoïétiques. L'anomalie engendre une accumulation de cellules anormales, clonales et malignes [25].

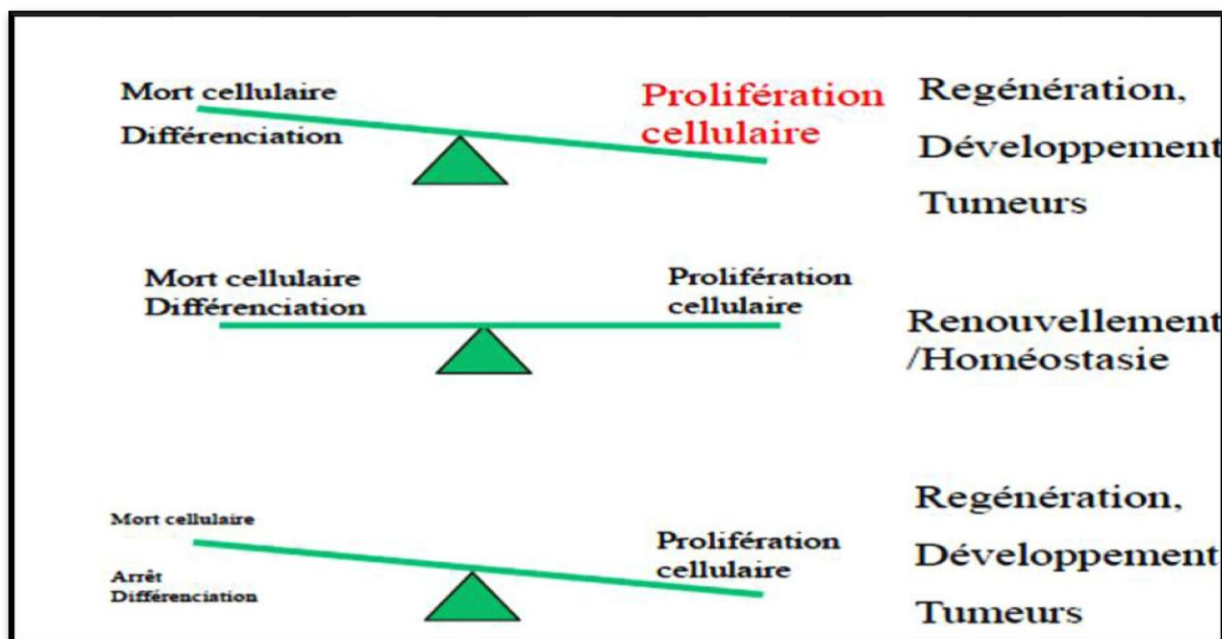


Figure2 : l'altération de la balance physiologique concernant la prolifération, l'apoptose et la différenciation lors des hémopathies malignes.

La cytogénétique conventionnelle, moléculaire et la biologie moléculaire ont transformées notre capacité à caractériser les hémopathies malignes et à comprendre les processus qui les induisent. Ces techniques aident au diagnostic, à l'évaluation du pronostic et au suivi du malade après le traitement. Sur un plan plus fondamental, l'analyse structurale et fonctionnelle des gènes dérégulés dans les leucémies et les lymphomes a beaucoup amélioré notre compréhension des mécanismes, à la fois oncogéniques et physiologiques [26].

II. Circonstances favorisant la survenue d'une hémopathie

maligne : [27,28]

- **L'exposition à des produits toxiques** tels que le benzène, pesticides, Oxyde d'éthylène, Formaldéhyde, Trichloréthylène, ou encore les hydrocarbures aromatiques entraînent l'augmentation de l'incidence des hémopathies. [29]
- **Les hémopathies peuvent être secondaires à des chimiothérapies.** Ces dernières peuvent induire une leucémie aigüe secondaire en agissant sur le matériel génétique, pouvant ainsi entraîner un processus de cancérisation.
- **Les radiations ionisantes** (accidentelles ou professionnelles) : il arrive que certaines hémopathies malignes soient provoquées par une irradiation iatrogène (radiothérapie). L'irradiation peut induire une myélodysplasie secondaire à cette thérapeutique, mais il faut savoir faire le choix entre le bénéfice espéré et le risque potentiel.
- **Les champs électromagnétiques.**
- **Certains terrains sont plus propices à développer des hémopathies malignes:**
 - Le terrain génétique tel que la Trisomie 21;
 - L'anomalie de réparation de l'ADN;

- **L'hématologie lymphoïde**: tout ce qui intervient sur le système lymphoïde modifie l'incidence des hémopathies malignes.
- **L'infection virale chronique**: L'EBV, responsable de la mononucléose infectieuse (maladie fréquente), peut persister éventuellement dans l'organisme et provoquer parfois la stimulation chronique du système lymphoïde pouvant être à l'origine des lymphomes.
- **L'immunodépression viro-induite** due au VIH ou thérapeutique (lors d'une greffe d'organe et de moelle, on provoque une immunodépression chez le receveur afin d'éviter le rejet du greffon) favorisent l'apparition des lymphomes.

III. Classification des hémopathies malignes : [30,31]

Les classifications des hémopathies se sont succédées depuis le début des années 1970 pour aboutir à une classification internationale consensuelle publiée en 2000 sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette classification est en fonction de :

- La lignée hématopoïétique atteinte (lymphoïde ou myéloïde),
- Leur évolution (aiguë ou chronique),
- Les éléments cliniques, morphologiques ou histologiques, immunophénotypiques, génétiques et moléculaires.

1. Hémopathies malignes du tissu myéloïde :

On distingue quatre grandes catégories de proliférations myéloïdes :

- Les syndromes myéloprolifératifs chroniques,
- Les syndromes myélodysplasiques,
- Une catégorie regroupant des entités intermédiaires dénommée « syndromes myélodysplasiques/myéloprolifératifs »
- Les leucémies aiguës myéloïdes.

Tableau1 : Hémopathies malignes du tissu myéloïde selon les classifications ICD-O-3 (OMS).

ICD-O-3	Hémopathies myéloïdes
	Syndromes myéloprolifératifs chroniques
9875/3	Leucémie myéloïde chronique
9950/3	Polyglobulie de Vaquez
9962/3	Thrombocytémie essentielle
9961/3	Splénomégalie myéloïde
	Syndromes myélodysplasiques
9980/3	Anémie réfractaire
9982/3	Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne
9983/3	Anémie réfractaire avec excès de blastes
9986/3	Syndrome 5q -
9985/3	Cytopénie réfractaire avec dysplasies multilignées
	Syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs
9945/3	Leucémie myélomonocytaire chronique
9946/3	Leucémie myélomonocytaire chronique juvénile
9876/3	Leucémie myéloïde chronique atypique
	Leucémies aiguës myéloïdes
	Avec anomalies cytogénétiques récurrentes
9896/3	t (8;21) (q22;q22), (AML1 /ETO)
9866/3	t (15;17) (q22;q12), (PML/RARa) (LAM3)
9871/3	inv(16) (p13q32) ou t(16;16) (p13;q22) (CBFb/MYH11)
9897/3	anomalie du 11q23 (MLL)
9895/3	Avec dysplasies multilignées
9920/3	Secondaires à des traitements (par des agents alkylants, par des inhibiteurs de la topoisomérase II, Autres)
9872/3	LAM peu différenciée (M0)
9873/3	LAM sans maturation (M1)
9874/3	LAM avec maturation (M2)
9867/3	LA myélomonocytaire (M4)
9891/3	LA monoblastique (M5)
9840/3	L'érythroblastique (M6)
9910/3	LA mégacaryoblastique (M7)
9870/3	LA à basophiles
9931/3	Panmyélose aiguë avec myélofibrose
9930/3	Sarcome granulocytaire
9805/3	LA avec ambiguïté de lignée

2. Hémopathies malignes du tissu lymphoïde : [32, 33, 34]

Dans le tissu lymphoïde, on distingue les proliférations développées à partir des cellules lymphoïdes B des celles développées à partir des cellules lymphoïdes T ou Natural-Killer. Les différentes formes de lymphomes de Hodgkin restent classées à part, bien qu'ayant une origine lymphoïde B, en raison de leurs caractéristiques cliniques et histopathologiques très particulières. Au sein des proliférations B ou T, il faut distinguer les proliférations développées à partir de cellules immatures donnant des leucémies aiguës ou des lymphomes lymphoblastiques, des proliférations développées à partir des cellules matures qui sont de loin les plus nombreuses et les plus variées.

Tableau2: Hémopathies malignes du tissu lymphoïde selon les classifications

ICD-O-3 (OMS).

ICD-O-3	hémopathies lymphoïdes
9727-8/3,	Leucémies aiguës lymphoblastiques/lymphomes lymphoblastiques
9835-6-7/3	Hémopathies B matures
9670/3,9823/3	Leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire
	Leucémie prolymphocytaire B
9833/3	Lymphome splénique à lymphocytes villeux
9689/3	Leucémie à tricholeucocytes
9940/3	Myélome multiple et variant
9732/3	Maladies des chaînes lourdes
9762/3	Lymphome associé aux muqueuses : MALT extranodal
9699/3	Lymphome de la zone marginale nodal
9690-1-5-8/3	Lymphome folliculaire
9680/3	Lymphome diffus à grandes cellules B
9687/3, 9826/3	Lymphome de Burkitt
	Hémopathies T/NK matures
9834/3	Leucémie prolymphocytaire T
9831/3	Leucémie à lymphocytes à grains T
9827/3	Leucémie/lymphome T de l'adulte (HTLV1)
9700/3	Mycosis fongoïde
9701/3	Syndrome de Sezary
9718/3	Atteintes cutanées primitives CD30+
9708/3	Lymphome T sous-cutané de type panniculite
9719/3	Lymphome T/NK extra-nodal de type nasal
9709/3	Lymphomes T cutanés autres
9714/3	Lymphome T ou nul anaplasique à grandes cellules
9650/3 à 9667/3	Lymphomes de Hodgkin
	Lymphomes de Hodgkin classiques
	Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire

IV. Différentes hémopathies malignes :

1. Hémopathies myéloïdes :

1.1. Syndromes myéloprolifératifs :

Les syndromes myéloprolifératifs (ou SMP) sont des maladies chroniques caractérisées par une prolifération clonale des cellules myéloïdes avec une conservation de leur capacité de différenciation. L'anomalie moléculaire somatique à l'origine des SMP touche une cellule souche myéloïde avec des conséquences plus ou moins spécifiques sur les lignées érythroïdes (Polyglobulie de Vaquez), granulocytaires (leucémie myéloïde chronique) et mégacaryocytaires (Thrombocytémie essentielle). Les SMP peuvent, au cours de leur évolution naturelle, se transformer en leucémie aigue avec arrêt de la différenciation cellulaire [35].

1.1.1. Historique des syndromes myéloprolifératifs :

La plupart des affections malignes regroupées aujourd'hui au sein des syndromes myéloprolifératifs ont été décrites dans la deuxième partie du XIXe siècle ; c'est le cas de la leucémie myéloïde chronique (LMC), de la myélofibrose primitive (MP) aussi appelée splénomégalie myéloïde et de la polyglobulie de Vaquez (PV) [36]. Il a fallu attendre la première moitié du XXe siècle pour que la thrombocytémie essentielle (TE) soit décrite et pour que le concept de SMP soit développé par William Dameshek [37].

- Les années LMC :

La seconde moitié du XXe siècle a permis des avancées majeures dans la description du marqueur moléculaire de la maladie, la leucémogénèse BCR-ABL et la thérapie moléculaire ciblée de la LMC : l'ère chromosomique. La LMC est liée à la présence de la translocation t (9 ; 22), à l'origine du chromosome de Philadelphie.

Cette anomalie chromosomique entraîne la présence dans la cellule d'une protéine de fusion, la protéine BCR-ABL responsable de la maladie [38].

- **La mutation JAK2 V617F :**

En 2005, quatre équipes indépendantes ont identifié une mutation de la protéine JAK2 (JAK2 V617F) présente chez une majorité de patients atteints de PV, de TE et MP. La découverte de la mutation JAK2 V617F a complètement modifié le diagnostic des PV et permet désormais, non seulement une meilleure compréhension des voies métaboliques conduisant à la pathologie, mais aussi le développement d'une thérapie moléculaire ciblée associée à un suivi moléculaire performant [39, 40, 41, 42].

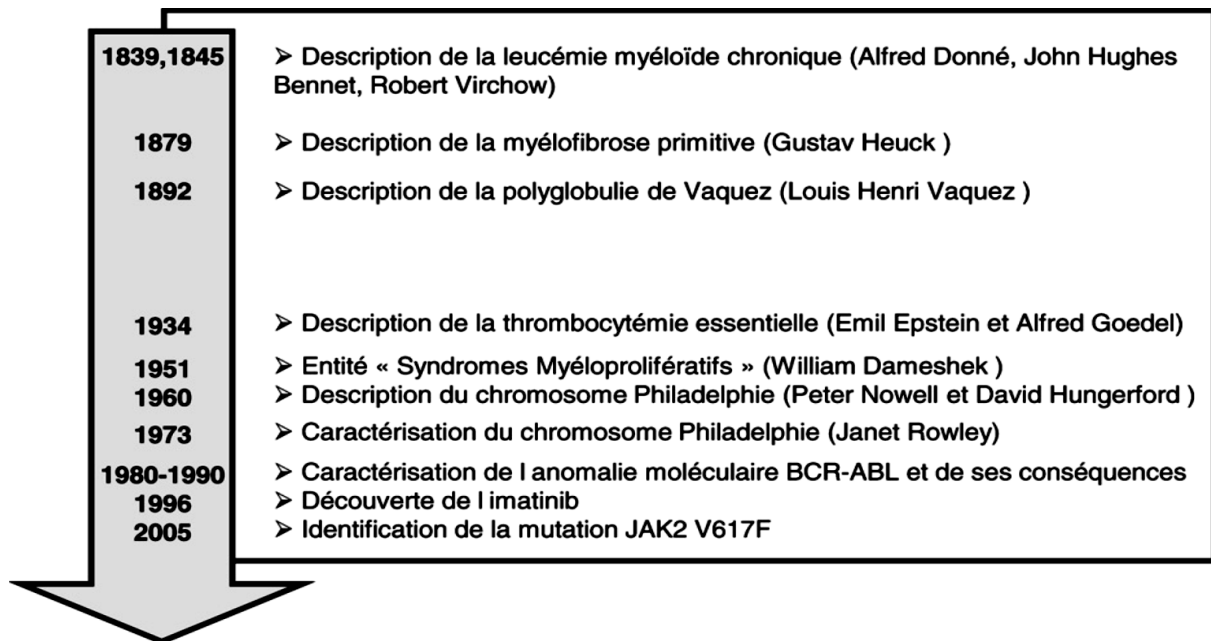


Figure 3: Découvertes majeures dans les syndromes myéloprolifératifs.

1.1.2. Leucémie myéloïde chronique :

C'est une prolifération myéloïde monoclonale sans blocage de la maturation prédominant sur la lignée granuleuse au niveau médullaire et splénique. Elle évolue, en l'absence de traitement, en trois phases : une phase chronique d'une durée de

trois à quatre ans, une phase d'accélération d'une dizaine de mois et enfin une phase de transformation en leucémie aiguë (ou phase blastique) de survenue inéluctable et fatale. La LMC possède une anomalie chromosomique acquise très caractéristique: la translocation t (9;22) (q34;q11).

La LMC représente environ 15 % des leucémies de l'adulte. Elle a une incidence d'un nouveau cas pour 100 000 habitants [43].

Le gène BCR-ABL :

Les remaniements entre les gènes BCR (chromosome 22) et ABL (chromosome 9) ont pour conséquence la formation du gène chimérique BCR-ABL sur le chromosome 22q- (chromosome Philadelphie ou Ph) et du gène réciproque ABL-BCR sur le chromosome 9q+ (Figure2). Il est admis que ces événements moléculaires ont lieu au sein de la cellule souche hématopoïétique pluripotente [44].

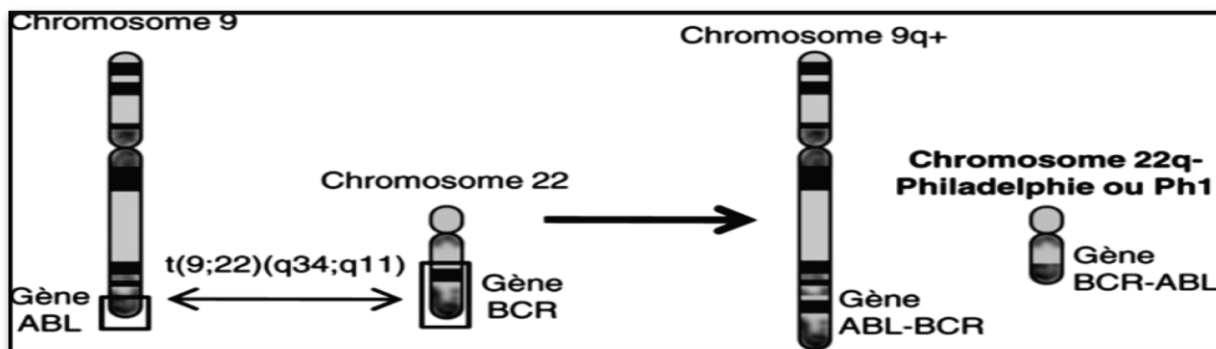


Figure 4: La translocation t (9;22) (q34;q11).

Oncogenèse induite par Bcr-Abl :

Si la protéine Abl effectue des navettes entre le noyau et le cytoplasme, l'oncoprotéine Bcr-Abl est exclusivement cytoplasmique. Lors de la translocation t (9;22), il y a perte de l'extrémité N-terminale d'Abl impliquée dans l'autoinhibition de l'activité tyrosine kinase [45]. De plus, la partie Bcr de Bcr-Abl est à l'origine de dimères ou de tétramères Bcr-Abl qui facilitent l'autophosphorylation de

l'oncoprotéine et son activation. La juxtaposition de Bcr à Abl a ainsi pour conséquence majeure l'activation constitutive de la fonction tyrosine kinase d'Abl [45]. La phosphorylation d'un grand nombre de substrats par la protéine p210BCR-ABL est directement responsable des caractéristiques de cette cellule leucémique. La protéine Bcr-Abl active différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire et la différenciation (voies mitogéniques de Ras et des MAPKinases, voie de la PI3K (ou Phosphatidyl Inositol-3 kinase), voie de JAK/STAT, Myc. . .) [46]. Bcr-Abl est aussi capable d'inhiber l'apoptose en activant notamment la voie PI3K/Akt et la voie JAK/STAT, en particulier STAT5 et STAT3 [47].

L'oncoprotéine Bcr-Abl est également impliquée dans la dérégulation de protéines de réparation de l'ADN et de protéines inhibitrices d'Abl en induisant leur dégradation via le protéasome [48]. Enfin, l'instabilité génétique est l'une des caractéristiques majeures des cellules Bcr-Abl [49].

1.1.3. Polyglobulie de Vaquez :

- Définition :

La polyglobulie de Vaquez (PV) (ou polyglobulie primitive ou maladie de Vaquez), est une affection rare décrite par Louis Vaquez en 1892. Il s'agit d'une hémopathie maligne clonale qui appartient à la catégorie des SMP chroniques, conséquence de l'atteinte de la cellule souche hématopoïétique multipotente devenue hypersensible à l'érythropoïétine secondairement à la mutation du gène d'une protéine de la transduction du signal : Janus Kinase 2. Il en résulte une hyperplasie des trois lignées myéloïdes prédominant sur la lignée érythroblastique avec une augmentation du nombre absolu des hématies ou polycythémie, de l'hématocrite et du volume sanguin total [50,51].

– **Epidémiologie :**

Son incidence annuelle est de 3–5 pour 100000 habitants par an. Il existe une légère prédominance masculine [52]. C'est généralement une maladie des personnes âgées [50,53].

– **Bases moléculaires de la maladie de Vaquez :**

L'anomalie moléculaire à l'origine de la maladie est restée inconnue jusqu'ici. Mais, par analogie à la LMC, il est probable que l'activation anormale d'une tyrosine kinase puisse être impliquée [54].

Les travaux ont permis de proposer que la mutation JAK2 V617F soit l'évènement moléculaire primaire et suffisant pour entraîner le développement d'une polyglobulie primitive.

– **Manifestations cliniques :**

La symptomatologie clinique débute de manière insidieuse. Les signes fonctionnels sont dominés par les manifestations neurologiques, on peut observer des céphalées, vertiges, acouphènes, troubles visuels, syncopes. Des manifestations neurologiques plus sévères (monoplégie, hémip légie, aphasie), en rapport avec une ischémie cérébrale sont possibles. Une hypertension artérielle est habituelle [50]. On peut observer également un prurit généralisé, classiquement après exposition à l'eau chaude (prurit aquagénique), une érythrose cutanéomuqueuse, prédominant au niveau de la face et aux extrémités des membres [51, 55]. Une splénomégalie modérée est palpable cliniquement ou retrouvée à l'échographie dans 75 % des cas, parfois associée à une hépatomégalie régulière [50].

Les complications les plus fréquentes sont de type thrombotiques et hémorragiques. Les complications thrombotiques peuvent être des thromboses veineuses profondes, cérébrales, une ischémie myocardique, un syndrome de Budd–

Chiari, ou une ischémie mésentérique. Les complications hémorragiques sont typiquement à type d'épistaxis, de gingivorragies, ou des hémorragies gastro-intestinales [56].

– **Examens paracliniques :**

Hémogramme :

Dans la plupart des cas l'hémogramme montre un nombre de globules rouges supérieur à 6 T/l avec un taux d'hémoglobine entre 18 et 24 g/dl chez l'homme et supérieur à 16 g/dl chez la femme et un hématocrite supérieur à 0,55 (0,48 chez la femme). Le signe d'appel le plus fiable est l'hématocrite. le nombre des réticulocytes n'est pas significativement augmenté, sauf en cas d'hémorragie. Une polynucléose neutrophile modérée est habituelle avec une thrombocytose [57, 58, 59].

Myélogramme et biopsie ostéo-médullaire :

Le myélogramme est peu informatif. Le frottis est difficile à étaler et souvent légèrement hémodilué. Il montre au début une moelle riche équilibrée avec une maturation normale des lignées myéloïdes et parfois une augmentation du rapport érythroblastes / granulocytes. Les mégacaryocytes sont volontiers de grande taille à noyau hyperlobé.

La biopsie ostéo-médullaire (BOM) est beaucoup plus informative et permet dans 96% des cas d'éliminer les polyglobulies secondaires. Elle montre une moelle riche avec une hyperplasie érythroïde. Les mégacaryocytes de grande taille et à noyau polylobé tendent à se regrouper autour des sinusoides médullaires. Les vésicules adipeuses sont raréfiées. La trame réticulinique est habituellement normale au début. Une myélofibrose peut s'observer avec l'évolution [53].

Mesure de la masse sanguine :

La mesure isotopique de la masse sanguine permet d'affirmer la polyglobulie et d'éliminer une hémococoncentration. Elle comporte la mesure du volume globulaire total (VGT) [53,60].

Dosage de l'Epo sérique :

La grande majorité de personnes ayant la maladie de Vaquez ont un taux bas d'Epo mais il peut aussi être normal [53].

Autres examens hématologiques et biochimiques :

La vitesse de sédimentation des hématies est très basse ou quasi nulle à cause de l'hyperviscosité sanguine. Le bilan d'hémostase est perturbé. La vitamine B12 sérique est augmentée et le fer sérique est souvent abaissé. La LDH (lactico-déshydrogénase) et l'uricémie sont augmentées dans 50% des cas à cause du syndrome myéloprolifératif [50].

Culture de progéniteurs érythroïdes :

Elle permet d'affirmer le caractère primaire de la polyglobulie. Dans la PV, on a une hypersensibilité voire une indépendance des progéniteurs érythroïdes vis à vis de l'Epo. Sa spécificité est proche de 100% [53].

Caryotype et recherche de la mutation JAK2 :

Les aberrations génétiques les plus souvent rencontrées comprennent une délétion ou une translocation du chromosome 20, la trisomie 8 et la trisomie 9. Ces caryotypes sont aussi observés chez des patients qui présentent d'autres syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques [53].

La découverte récente de la mutation du gène de JAK2 a probablement une valeur diagnostique et pronostique de la maladie de Vaquez [61].

- **Diagnostics différentiels :**

Le diagnostic de la PV nécessite d'écarter les fausses polyglobulies, les polyglobulies secondaires par hémococoncentration, les autres syndromes myéloprolifératifs et les pseudopolyglobulies microcytaires [53].

- **Traitement et évolution :** [50, 51, 57]

La survie médiane est de l'ordre de 18 mois en l'absence de traitement, principalement liée aux complications thrombotiques, mais elle est supérieure à 10 ans avec les schémas thérapeutiques actuels.

Dans les trois premières années suivant le diagnostic, ce sont essentiellement les complications thrombotiques qu'il faudra appréhender au mieux, car elles constituent la première cause de mortalité. Les décès par complications hémorragiques sont beaucoup moins fréquents.

C'est souvent après la dixième année que diverses modifications hématologiques vont apparaître. Dans une partie des cas, la polyglobulie est suivie d'une anémie avec déformation érythrocytaire (hématies en larme, anisopoïkilocytose), une hyperleucocytose d'importance variable et une érythromyélocytose modérée. Une hématopoïèse prend place dans la rate qui peut devenir monstrueuse. Une thrombopénie ainsi que des blastes circulants peuvent se rencontrer. La biopsie ostéo-médullaire montrera l'installation progressive d'une myélofibrose collagène puis d'une véritable ostéomyélosclérose avec insuffisance médullaire. La métaplasie myéloïde avec myélofibrose ou splénomégalie myéloïde chronique est ainsi une complication tardive de la maladie de Vaquez. Le décès survient en moyenne 2 à 3 ans après l'apparition de la myélofibrose. L'évolution en leucémie aiguë constitue une cause importante de mortalité, représentant entre 15 et 20 % des causes de décès selon les études.

Le traitement fait appel aux saignées permettant une réduction rapide de l'hématocrite et donc des symptômes, le phosphore radioactif (^{32}P), les chimiothérapies essentiellement l'hydroxyurée, l'interféron qui a été récemment introduit dans le traitement de la PV avec thrombocytose, son mécanisme d'action est mal connu, vraisemblablement lié à un effet antiprolifératif sur les cellules souches hématopoïétiques.

La découverte de la mutation de JAK2 permet à présent de suivre l'évolution de la maladie (la mutation servant de marqueur) et constitue la promesse de nouveaux médicaments ciblés, tels les inhibiteurs de kinase. Il permettrait aussi dans les pays développés de poser très rapidement le diagnostic.

1.1.4. Thrombocytémie essentielle :

- Définition :

La thrombocytémie essentielle (TE) a été décrite pour la première fois en 1934 et a été intégrée en 1951 dans le groupe des syndromes myéloprolifératifs. C'est une anomalie clonale de la cellule souche hématopoïétique dont le phénotype est marqué par une hyperplaquettose parfois associée à une hyperleucocytose en règle modérée, voire à une discrète anémie.

- Epidémiologie :

L'incidence de la TE est estimée à 2,5/100 000 individus par an [62]. L'âge de survenue est de 50 à 60 ans. Un pic de fréquence est observé vers 30 ans avec une prépondérance féminine [63].

- Diagnostics différentiels :

Le diagnostic se pose devant un chiffre plaquettaire supérieur à $400 \times 10^9/\text{L}$ après avoir éliminé l'existence d'un syndrome inflammatoire concomitant (fièvre, VS,

fibrinogène, a2 globulines) ; la présence d'une carence martiale profonde (fer et ferritine sériques, anémie microcytaire) ; la présence d'une splénectomie/asplénie (corps de Jolly sur le frottis sanguin).

La TE doit être distinguée aussi des autres SMP: une LMC dans sa forme hyperplaquettaire par la demande d'un caryotype et/ou la recherche du BCR/Abl sur les granulocytes qui reviendra négative, une PV en considérant comme TE les formes où l'hématocrite est inférieur à 45 % chez la femme ou 48 % chez l'homme, une myélofibrose sur les critères histologiques médullaires et par ailleurs les tableaux de dysmyélopoïèse associés à une hyperplaquettose [64].

– **Manifestations cliniques :**

Lors du diagnostic initial, environ la moitié des patients sont symptomatiques [63] et souffrent de complications thrombo-hémorragiques sous forme de phlébites et/ou d'embolies pulmonaires [65]. Il faut noter par ailleurs dans la TE, comme dans les autres SMP, une plus grande incidence de thromboses veineuses à des sites inhabituels, à savoir les territoires porte, mésentérique ou splénique. Les complications thrombotiques les plus fréquentes touchent le territoire artériel [66], ils touchent trois territoires principaux : le cerveau (accident ischémique transitoire), le cœur (infarctus du myocarde) et les artères périphériques (occlusion artérielle). La manifestation thrombotique artérielle la plus répandue, puisque retrouvée dans 40 à 50 % des cas [66], correspond à une atteinte de la microcirculation, conduisant à une présentation clinique appelée érythromélgie. L'érythromélgie est le principal symptôme révélateur et le plus pathognomonique des TE et de polyglobulie de Vaquez avec thrombocytose. Elle se caractérise par l'association de rougeur des extrémités et de sensations douloureuses de brûlures. Ces symptômes sont considérablement réduits sous de faibles doses d'aspirine. Les fausses couches spontanées sont fréquentes dans la TE comme dans les autres syndromes

myéloprolifératifs (20 à 53 %) [65], surviennent au premier trimestre de grossesse et résultent probablement d'infarctus placentaires multiples.

Les complications hémorragiques, bien que moins fréquentes, sont de type cutanéomuqueux [66], Ces complications sont mineures dans les trois quarts des cas sous forme de gingivorragies, épistaxis, hématuries ou ecchymoses [67]. Les hémorragies digestives, cérébrales et les hématomes sont des complications hémorragiques majeures de la TE mais rares. Enfin, parmi les signes cliniques associés à la TE comme dans les autres SMP, la présence d'une splénomégalie modérée chez 50 % des patients au moment du diagnostic, et d'une hépatomégalie chez 15 à 20 % des patients [64].

- **Examens complémentaires :**

La TE se caractérise à l'hémogramme par une thrombocytose d'intensité variable (400 à $\geq 1\ 000 \times 10^9/L$), persistant plus de six mois, associée à un nombre de leucocytes et d'érythrocytes normaux dans la grande majorité des cas, sans érythromyélocytémie, ni blastose, ni basophilie.

L'examen du frottis sanguin permet d'observer une anisocytose plaquettaire, souvent accompagnée d'anomalies morphologiques des plaquettes de type hypogranulation ou anomalies de formes.

Le myélogramme et la biopsie médullaire sont plutôt hypercellulaires. Ils montrent la présence d'une hyperplasie mégacaryocytaire constituée de mégacaryocytes dystrophiques ou hyperfragmentés souvent regroupés en amas [68].

L'environnement réticulinique est normal ou modérément augmenté.

Actuellement, la culture de progéniteurs hématopoïétiques s'intègre aux éléments du diagnostic. Les progéniteurs mégacaryocytaires présentent une

croissance endogène anormale (comme retrouvé dans les érythroblastes de la polyglobulie primitive) non observée dans la majorité des TE.

La mise en évidence d'une population clonale peut être approchée par l'étude du caryotype. A ce jour, il n'a pas été décrit d'anomalie chromosomique spécifique de la TE [69].

La découverte de la mutation du gène JAK2 a probablement une valeur diagnostique de la TE.

- **Traitement et évolution :**

Le choix des stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de TE est conditionné par le bénéfice résultant de la prévention des accidents thrombo-hémorragiques, pondéré par le risque des effets secondaires et de la toxicité des molécules administrées.

Malgré l'absence de véritable consensus dans la prise en charge des patients souffrant de TE, les attitudes thérapeutiques commencent à s'homogénéiser. D'après la stratification du risque de Tefferi [70], les patients à risque élevé doivent recevoir un traitement cytoréducteur, tandis que les patients à risque faible ne sont pas traités. L'attitude reste mal définie pour les patients à risque intermédiaire. L'âge est un critère de sélection thérapeutique important puisque certains médicaments cytoréducteurs auraient un potentiel leucémogène.

L'évolution de la maladie peut se compliquer de manifestations thrombo hémorragiques conduisant à une morbidité certaine. Ces complications conditionnent l'attitude thérapeutique. La TE ne se transforme en leucémie aiguë ou en myélofibrose primitive que dans de rares cas (< 5 %), même après traitement par hydroxyurée (Hydréa®), bien que l'influence de ce traitement sur l'apparition d'hémopathies soit actuellement discutée [70].

1.1.5. Myélofibrose primitive :

- Définition :

Heuck décrit pour la première fois en 1879 la splénomégalie myéloïde, encore improprement appelée myélofibrose primitive (MP), comme un mode évolutif des leucémies [71] avec un tableau associant hépato-splénomégalie, image de sang leucémique (hyperleucocytose et anémie) et ostéosclérose médullaire. En 1951, Dameshek l'intègre dans son concept de syndrome myéloprolifératif, postulant que la leucémie myéloïde chronique, la polyglobulie de vaquez et la myélofibrose primitive sont des désordres médullaires néoplasiques apparentés, avec une propension commune à la transformation en leucémie aiguë [72].

Le terme de métaplasie myéloïde avec myélofibrose tend à remplacer, en France, celui de splénomégalie myéloïde, pour des raisons à la fois d'harmonisation avec les hématologistes d'autres pays et de meilleure adéquation au tableau clinique et biologique habituel [73]. L'étiologie de cette affection reste inconnue et sa physiopathologie mal comprise, probablement en partie du fait de sa complexité. Sa faible incidence, l'absence de traitement curatif ou entraînant une rémission complète expliquent le relatif désintérêt des hématologistes pour cette pathologie chronique.

- Epidémiologie :

La MP est une maladie rare (0,5-1,5 nouveaux cas pour 100 000 habitants), touchant essentiellement des sujets âgés (âge moyen au diagnostic entre 60 et 65 ans) [40].

- Manifestations cliniques :

La maladie est le plus souvent asymptomatique mais peut parfois s'accompagner d'une asthénie, d'un syndrome anémique et de signes généraux, signant le plus souvent une maladie évolutive ou en transformation.

La splénomégalie est la caractéristique prédominante, quasiment constante au diagnostic et de taille croissante avec l'évolution, son absence persistante doit faire remettre en cause le diagnostic. L'hépatomégalie est présente dans la moitié des cas, des adénopathies périphériques sont très rares et de volume modéré [74].

- Examens complémentaires :

L'hémogramme est très évocateur avec des déformations caractéristiques des hématies (en larmes) et une érythromyélocytose quasiment constante. L'hyperleucocytose est habituellement modérée, le taux de plaquettes est variable. Il existe une anémie dans $\frac{3}{4}$ des cas. Un taux d'hémoglobine normal, voire élevé justifie la réalisation d'une mesure isotopique du volume globulaire pour éliminer une polyglobulie.

La numération des progéniteurs CD34+ circulants peut être utile dans les cas difficiles, une augmentation étant caractéristique de la maladie (mais non spécifique), un taux normal (inférieur à 10/ μ l) permettant quasiment d'éliminer le diagnostic [74].

La ponction médullaire est habituellement vouée à l'échec en raison de la fibrose.

Sur le plan histologique, la biopsie médullaire est indispensable au diagnostic, montrant notamment la myélofibrose. D'autres caractéristiques sont très évocatrices : hypertrophie et dystrophie de la population mégacaryocytaire, remaniement vasculaire notamment.

L'analyse cytogénétique, rarement réalisable sur la moelle faute de possibilité d'aspiration, est souvent fructueuse sur prélèvement sanguin. Elle répond à l'exigence d'éliminer le diagnostic de leucémie myéloïde chronique (absence de chromosome Philadelphie et de remaniement bcr-abl) mais a surtout un intérêt pronostique (caractère péjoratif d'un caryotype anormal).

La recherche de la mutation V617F de JAK2, si elle est positive, confirme le diagnostic de syndrome myéloprolifératif.

D'autres examens paracliniques (scintigraphie médullaire, étude ferrocinétiq ue, IRM) sont rarement utiles sauf dans les formes atypiques.

– **Diagnostics différentiels :**

- Les autres syndromes myéloprolifératifs.
- Les autres causes de myélofibrose :
 - Autres maladies hématologiques,
 - Tumeurs solides avec métastases médullaires,
 - Maladies avec remaniements osseux : maladie de Paget, hyperparathyroïdie, carence en vitamine D,
- Maladies générales avec au moins quelques retentissements hématologiques : maladies auto immunes (LEAD), infections (VIH, Leishmaniose, tuberculose), moelles « toxiques » (incluant le traitement par agoniste de la TPO), hypertension pulmonaire, anomalies plaquettaires.
- Les autres causes de splénomégalie.

– **Traitement et évolution :**

La médiane de survie globale à partir du diagnostic se situe habituellement autour de 40 à 60 mois avec de grandes variations individuelles. L'insuffisance

médullaire, la transformation en leucémie aiguë, l'évolution vers l'hypertension porte sont des causes majeures de décès [74].

Les facteurs pronostiques durant l'évolution de la maladie et l'influence du traitement sont d'appréciation difficile en raison de la grande variabilité individuelle d'évolutivité [75].

Le traitement demeure souvent symptomatique (correction des carences, allopurinol et surtout transfusions chez les malades anémiés). Les principaux traitements classiques sont : la chimiothérapie orale basée sur l'hydroxyurée, l'androgénothérapie et la corticothérapie pour améliorer les cytopénies, la splénectomie en cas de splénomégalie massive, symptomatique, accompagnée de cytopénies (hypersplénisme) et après échec du traitement médical, et la radiothérapie splénique lorsque la chirurgie est contre indiquée [76].

Aucune étude n'a pu montrer à ce jour d'amélioration de la survie avec le traitement, qu'il soit médical ou chirurgical en dehors de l'allogreffe médullaire, seule thérapeutique permettant une guérison vraie.

1.2. Les syndromes myélodysplasiques :

1.2.1 Définition :

Il s'agit d'un groupe hétérogène de dysfonctionnement de l'hématopoïèse du à une anomalie monoclonale de la cellule souche pluripotente qui conduit à une insuffisance de production médullaire qualitative : hématopoïèse inefficace ou dyshématopoïèse. Ceci se caractérise, sur l'hémogramme par une ou plusieurs cytopénies diversement associées, qui contrastent avec une moelle riche où s'accumulent des cellules à morphologie anormale (dysplasiques) et aux capacités de prolifération et de différenciation altérées. Les cellules dysplasiques présentent également des anomalies fonctionnelles (ex : neutrophiles ou plaquettes

inefficaces). Il s'agit d'un état pré-leucémique (possibilité de transformation en leucémie aiguë myéloblastique) [77, 78].

1.2.2 Caractéristiques :

Il s'agit d'une hémopathie monoclonale caractérisée, à des degrés divers, par :

- Une destruction importante et anormale des globules rouges (hémolyse) intramédullaire,
- Une hématopoïèse inefficace qui ne peut plus produire suffisamment une, deux ou les trois sortes de cellules normales du sang périphérique,
- Des cytopénies progressives, débouchant sur une anémie arégénérative, une neutropénie ou une thrombopénie,
- Une moelle osseuse généralement riche à la ponction biopsie osseuse,
- Une production de cellules anormales, dites myélodysplasiques, portant sur une ou plusieurs lignées,
- Un taux de blastes (cellules immatures) variable.

Plus récemment, il a été mis en évidence des anomalies du gène TET2, porté par le chromosome 4, communes à l'ensemble des maladies de ces syndromes.

1.2.3 Epidémiologie :

Les syndromes myélodysplasiques sont des hémopathies dont la fréquence augmente avec l'âge de façon majeure, elle est globalement de cinq pour 100 000 habitants. Primitifs dans la grande majorité des cas, il existe des formes secondaires aux agressions de l'ADN ou à sa fragilité [78].

1.2.4 classification de la FAB : [79]

- L'anémie réfractaire sans sidéroblaste (AR)
- L'anémie réfractaire avec sidéroblastes (ARS)

- L'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB)
- L'anémie réfractaire avec excès de blastes, en transformation (AREB-t)
- La leucémie myélomonocytaire chronique.

1.2.5 Facteurs pronostiques :

Tableau 3 : index pronostique international dans les syndromes myélodysplasiques(IPSS).

	0 point	0,5 point	1 point	1,5 point	2 points
Blastes médullaires	<5%	5-10%		11-20%	21-30%
Caryotype	Normal, -Y Del 5q Del 20q	Autre	Complexe (>3 anomalies) Anomalies du chromosome 7		
Cytopénies	0/1 lignée atteinte	2/3 lignées atteintes			
	Groupes de risque		Points	Survie moyenne	
	Risque bas		0 point	11,8 ans	
	Risque intermédiaire 1 (Int-1)		0,5-1 point	5,2 ans	
	Risque intermédiaire 2 (Int-2)		1,5-2 points	1,8 an	
	Risque élevé		≥2,5 points	0,3 an	

L'IPSS est initialement basé sur des variables cliniques évaluées au diagnostic ne permettant pas d'être appliquées lors de la progression de la maladie. Afin de répondre à cette dernière question, un nouvel index pronostique, le WHO classification - based pronostic scoring system (WPSS), est publié et intègre la dépendance transfusionnelle aux anciens critères de l'IPSS. Le désavantage de ce nouvel index vient du caractère subjectif de certains de ses paramètres, comme celui des besoins transfusionnels qui peut varier selon le seuil transfusionnel choisi par le médecin [79, 80].

Tableau 4 : index pronostique intégrant le besoin transfusionnel (WPSS).

	0 point	1 point	2 points	3 points
Diagnostic OMS	AR, AR-SC, 5q-	CRDM, CRDM-RS	AREB-1	AREB-2
Caryotype	Normal, -Y Del 5q Del 20q	Autre	Complexe (> 3 anomalies) Anomalies du chromosome 7	
Hémoglobine diminuée (♂ < 9 g/dl, ♀ < 8 g/dl)	Non	Oui		
	Groupes de risque	Points	Survie moyenne	
	Très bas (0)	0 point	141 mois	
	Bas (1)	1 point	66 mois	
	Intermédiaire (2)	2 points	48 mois	
	Elevé (3-4)	3-4 points	26 mois	
	Très élevé (5-6)	5-6 points	9 mois	

OMS: organisation mondiale de la santé; AR: anémie réfractaire; AR-SC: anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne; CRDM: cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée; CRDM-SC: cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée et sidéroblastes en couronne; AREB-1: anémie réfractaire avec excès de blastes-1; AREB-2: anémie réfractaire avec excès de blastes-2; 5q-: syndrome myélodysplasique avec délétion isolée du chromosome 5.

1.3. Leucémie myéloïde aigue :

1.3.1 Définition :

La leucémie myéloïde aiguë est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération monoclonale intramédullaire de cellules hématopoïétiques myéloïdes anormales dont le processus de maturation est bloqué au stade de « blaste » [81]. Il en résulte une accumulation de ces blastes dans la moelle, dans le sang et éventuellement dans d'autres organes. Par ailleurs, il existe un déficit de production de cellules matures d'où l'anémie, la neutropénie et la thrombopénie et leurs conséquences cliniques [82].

1.3.2 Epidémiologie :

La leucémie myéloïde aigue s'observe surtout chez l'adulte (90 % des cas au-delà de 20 ans). Sa fréquence croît avec l'âge, en France elle est de l'ordre de 3 pour 100.000 habitants par an. La moitié des cas étant diagnostiqués après l'âge de 60 ans [83].

1.3.3 Leucémogénèse :

Au cours de la leucémie aigue, il y'a une transformation maligne d'une cellule devenue incapable de se différencier en réponse aux stimuli physiologiques normaux et qui se multiplie indéfiniment donnant naissance à un clone leucémique avec blocage de la différenciation cellulaire, source d'une accumulation de cellules blastiques dans la moelle osseuse, entraînant ainsi une défaillance de l'hématopoïèse normale. [84].Ce phénomène de leucémisation peut survenir à n'importe quel stade de l'hématopoïèse, depuis la cellule souche pluripotente jusqu'aux précurseurs déjà bien engagés dans une lignée précise [85].

L'accumulation des cellules leucémiques ne provient pas seulement d'une prolifération importante, mais bien plus d'une perte de la capacité de la différenciation totale pour arriver à des cellules matures, ce qui donne aux cellules leucémiques un avantage de survie lié à un échappement aux règles de la mort cellulaire programmée : Apoptose. Une notion a été longtemps admise, c'est qu'un événement majeur (le plus souvent une translocation chromosomique) pouvait à lui seul expliquer ce blocage de différenciation cellulaire [85].

2. Hémopathies lymphoïdes :

2.1 Généralités :

A chaque étape du développement lymphoïde peut se passer une cancérisation des cellules, donc un excès de prolifération et éventuellement une anomalie de la différenciation des cellules à un niveau plus ou moins primitif. Toutes les anomalies qui bloquent la lymphopoïèse immature donnent des leucémies aiguës dites lymphoblastiques.

Plus de 80 % des hémopathies lymphoïdes dérivent de la lignée B. La classification OMS distingue les proliférations des précurseurs lymphoïdes (B ou T), les lymphomes B, les lymphomes T et NK (natural killer) et la maladie de Hodgkin.

Les lymphomes touchent les ganglions lymphatiques, mais plus de la moitié des lymphomes ont une localisation initiale extra ganglionnaire, en particulier, les lymphomes développés à partir du système lymphoïde associé aux muqueuses (MALT : mucosal associated lymphoid tissu) [86].

2.2 Hémopathies malignes lymphoïdes chroniques :

2.2.1 Hémopathies lymphoïdes matures B :

Il s'agit des lymphomes ou leucémies dérivant de cellules lymphoïdes de la lignée B. Les lymphomes sont actuellement classés en fonction du stade de maturation des cellules dont ils dérivent.

- **La leucémie lymphoïde chronique (LLC) B et le lymphome lymphocytaire B** sont des proliférations de petits lymphocytes B matures exprimant le plus souvent le CD5 et le CD23. Ces proliférations évoluent sur un mode chronique, mais peuvent se transformer en lymphomes plus agressifs (syndrome de Richter) [87].
- **La macroglobulinémie de Waldenstrom et le lymphome lymphoplasmocytaire** sont souvent révélés par un pic monoclonal à IgM. Ce sont des proliférations de petites cellules B avec souvent une différenciation plasmocytaire. Leur évolution est souvent prolongée [88].
- **Les lymphomes B de la zone marginale**, qu'ils soient ganglionnaires, spléniques ou extra-ganglionnaires, sont des proliférations de petits lymphocytes B matures, généralement CD5 négatifs. Leur évolution est souvent indolente pendant de longues années. L'atteinte gastrique

(lymphome du MALT de faible grade) est le plus souvent liée à une infection par *Helicobacter pylori* [89].

- **Les lymphomes du manteau** dérivent des cellules situées en périphérie des centres germinatifs. Ils sont liés à une translocation chromosomique t (11 ; 14) qui induit une surexpression de la cycline D1 et donc une anomalie du contrôle du cycle cellulaire. Ils sont de plus mauvais pronostic que les autres lymphomes B matures [90].
- **Les lymphomes folliculaires** sont parmi les plus fréquents des lymphomes. L'atteinte ganglionnaire est d'architecture nodulaire avec un mélange de petites cellules (centrocytes) et de grandes cellules (centroblastes). La translocation chromosomique t (14 ; 18) est très fréquente et responsable de la surexpression de la protéine antiapoptotique Bcl2. Les lymphomes folliculaires peuvent se transformer en lymphomes agressifs [91].
- **Les lymphomes diffus à grandes cellules B** sont les lymphomes les plus fréquents (deux tiers des lymphomes agressifs ou « de haut grade »). Les grandes cellules (centroblastes et/ou immunoblastes) se disposent en plages diffuses [92].
- **Les lymphomes de Burkitt** sont des lymphomes très agressifs surtout observés chez l'enfant et l'adulte jeune, caractérisés par une prolifération intense de cellules B de taille moyenne contenant une translocation t (8 ; 14) ou plus rarement t (2 ; 8) ou t (8 ; 22). Malgré leur grande agressivité, ils répondent en général favorablement à une chimiothérapie lourde [93].

La plus fréquente des proliférations plasmocytaires est le myélome (myélome multiple ou maladie de Kahler), qui se manifeste souvent par une atteinte osseuse lytique et/ou par un pic d'immunoglobuline monoclonale.

2.2.2 Hémopathies lymphoïdes matures T ou à cellules NK :

Les hémopathies lymphoïdes (leucémies ou lymphomes) T ou à cellules NK sont plus rares que les lymphomes B. La principale entité est le mycosis fongoïde qui est une prolifération de lymphocytes T CD4+ de localisation cutanée.

Elles peuvent être de localisation ganglionnaire ou assez souvent extra ganglionnaire (ex : le mycosis fongoïde, lymphome T cutané primitif) [94].

2.2.3 Maladie de Hodgkin :

C'est une affection tumorale du tissu lymphoïde, touchant préférentiellement les sujets jeunes, caractérisée par une prolifération de cellules malignes de grande taille dont certaines, les cellules de Reed–Sternberg, sont nécessaires au diagnostic de la maladie. La nature des cellules de Reed–Sternberg est restée mystérieuse pendant de nombreuses années, mais il est maintenant établi qu'il s'agit de cellules lymphoïdes de la lignée B, dérivant du centre germinatif. Le diagnostic est d'ordinaire fait sur la biopsie exérèse d'un ganglion lymphatique périphérique. Les traitements actuels permettent le plus souvent d'obtenir la guérison des patients [95].

2.3 Hémopathies malignes lymphoïdes aigues :

2.3.1 Leucémie aigue lymphoblastique :

La leucémie aigue lymphoblastique (LAL) prend naissance dans les cellules souches lymphoïdes anormales et évolue rapidement. C'est le type de leucémie le plus fréquemment diagnostiqué chez les jeunes enfants et il affecte plus souvent les garçons que les filles.

Les formes cliniques vont des formes asymptomatiques à des formes aiguës avec hémorragies mettant en jeu le pronostic vital, infections ou épisodes de détresse respiratoire. Bien que les LAL affectent essentiellement la moelle osseuse et le sang périphérique, tous les organes ou tissus peuvent être infiltrés par les cellules

anormales. Les signes les plus fréquents sont : lymphadénopathies, hépatosplénomégalie, fièvre, signes hémorragiques ou douleurs osseuses. Environ 25 % des adultes atteints d'une LAL ont le chromosome Philadelphie (Ph) dans leurs cellules leucémiques. C'est une anomalie chromosomique acquise [96]. Les signes biologiques associent de façon variable une hyperleucocytose liée à la circulation des lymphoblastes, une anémie et une thrombopénie. Le diagnostic porté sur le myélogramme montre une infiltration par des cellules leucémiques.

Les protocoles internationaux de chimiothérapie comportent 4 phases : induction de la rémission complète, prévention de l'atteinte neuroméningée, consolidation de la rémission, traitement d'entretien. Il n'existe pas de consensus pour la prise en charge des rechutes, mais les cycles de chimiothérapie à haute dose et la transplantation de cellules souches sont de plus en plus utilisés [97].

**CYTOKINES ET RECEPTEURS LIES A
JAK2 D'INTERET DANS LES
SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS**

I. Généralités sur les cytokines et leurs récepteurs :

1. Cytokines :

Les cytokines sont des protéines solubles secrétées par de nombreuses cellules de l'organisme. Leur taille est généralement comprise entre 8 et 50 KDa. Elles ont pour but d'induire, de contrôler ou d'inhiber l'intensité et la durée de la réponse immunitaire, ainsi que les mécanismes de différenciation et de prolifération des cellules hématopoïétiques et d'autres types cellulaires.

Les cytokines ne sont pas généralement produites de manière constitutive, mais en réponse à des stimuli. Leur production ainsi que leur action sont en général brèves et intenses. On note également une grande redondance, probablement liée à la pluralité des cibles et à la complexité des réseaux de régulation et de signalisation [98, 99, 100].

On peut classer les cytokines en six groupes, selon leur mode d'action et leurs effets biologiques :

- **les interleukines (IL-)** : cytokines sans parenté biochimique ni de fonction. Il en existe environ 35 et des nouvelles sont découvertes régulièrement.
- **les interférons (IFNs)**.
- **les facteurs stimulant les colonies (CSFs, « Colony Stimulating Factors »)** : cytokines jouant un rôle dans l'hématopoïèse.
- **les facteurs de nécrose des tumeurs (TNFs, « Tumor Necrosis Factor »)**.
- **les facteurs de croissance (GFs, « Growth Factors »)**.
- **les chimiokines** : petites molécules capables d'induire une petite attraction (chimiotactisme) chez les cellules immunitaires.

2. Récepteurs des cytokines :

Les cytokines exercent leur effet biologique via leur fixation sur un récepteur spécifique exprimé à la surface des cellules immunitaires cibles. Les chaînes réceptrices des cytokines présentent des homologies structurales qui ont permis de les classer en neuf familles différentes :

- Les récepteurs de classe I (cytokines hématopoïétiques),
- Les récepteurs de classe II (familles des IFNs et de l'IL-10),
- Les récepteurs de classe III (cytokines de la superfamille des TNFs),
- Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines sans activité tyrosine kinase,
- Les récepteurs apparentés à la superfamille des immunoglobulines avec activité tyrosine kinase,
- Les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF- β ,
- Les récepteurs à domaine « sushi »,
- Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-17,
- Les récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines.

De nouvelles cytokines, de nouveaux récepteurs et de nouveaux modes d'action sont découverts chaque année. Ils révèlent que le système cytokinique est un système complexe où beaucoup de choses sont encore à découvrir et à comprendre.

intracanalaires successifs indispensables à la fonctionnalité du CHR (Cytokine Homologue Receptor) [102].

- Le deuxième domaine, situé au dessous, possède un motif W-S-X-W-S (X : acide aminé quelconque) conservé au sein de la famille des récepteurs hématopoïétiques et indispensable à la fixation du ligant [103].

La partie intracytoplasmique de ces récepteurs est de longueur variable et ne présentent aucune activité tyrosine kinase intrinsèque. Elle comporte cependant deux motifs conservés, « Box1 » et « Box2 », tous les deux essentiels pour la transduction du signal. Le motif « Box1 » possède un site riche en proline, nécessaire à l'ancrage des protéines tyrosine kinases cytoplasmiques de la famille des « Janus Kinases ». Le motif « Box2 », moins conservé, augmenterait l'affinité des JAKs pour la région intracytoplasmique des chaînes transductrices [101].

La fixation de la cytokine sur son récepteur induit une oligomérisation des sous-unités réceptrices et le rapprochement des domaines intracellulaires. Les JAKs constitutivement associées à ces domaines, sont alors activées et assurent leur propre phosphorylation et des domaines intracellulaires. Les tyrosines phosphorylées des chaînes réceptrices recrutent alors les « Signal Transducers and Activators of Transcription » (STATs), qui, une fois phosphorylés, seront transloqués dans le noyau et agiront en tant que facteurs de transcription [104].

La plupart des récepteurs de classe I n'induisent pas le signal par homodimérisation mais plutôt par hétérodimérisation [105]. La caractéristique particulière de tous ces récepteurs hétéro-oligomériques est qu'ils partagent une sous-unité réceptrice commune responsable de la transduction du signal et possèdent une chaîne spécifique de chaque cytokine.

On peut ainsi classer les cytokines hématopoïétiques en trois familles selon la chaîne réceptrice partagée :

- La famille utilisant la chaîne transductrice γ_c ,
- La famille utilisant la chaîne transductrice gp130,
- La famille utilisant la chaîne transductrice β_c .

C'est entre autre le fait que les chaînes transductrices soient souvent partagées par plusieurs cytokines qui expliquent la redondance fonctionnelle observée entre différentes cytokines.

II. Epo/EpoR :

Erythropoïétine (Epo) est une hormone de nature glycoprotéique. Elle joue un rôle crucial en tant que facteur de croissance stimulant l'érythropoïèse en favorisant la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes [106]. Elle est produite par les cellules fibroblastiques du cortex rénal chez l'adulte et par le foie chez le fœtus. Elle exerce son action sur les progéniteurs médullaires de façon paracrine [107]. L'Epo et son récepteur EpoR ont été également trouvés dans des tissus non érythroïdes comme le cerveau, la rétine et le cœur. Récemment, plusieurs études ont montré leur présence dans des cellules tumorales [108].

L'expression de l'érythropoïétine est régulée par l'hypoxie. Le gène de l'Epo contient un site de liaison pour l'Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α). En condition de normoxie, l'HIF1 α est dégradé par le protéasome. Par contre en condition d'hypoxie, l'HIF1 α n'est pas ciblé pour la dégradation par le protéasome. Il peut donc se fixer sur le gène de l'Epo et ainsi permettre une augmentation de la synthèse de l'ARN messager et donc de l'Epo [109].

L'Epo agit par liaison avec son récepteur EpoR qui appartient à la famille des cytokines de classe I.

Le récepteur à l'Epo est exprimé à la surface des progéniteurs érythroïdes au stade BFU-E matures. Son expression augmente au cours de la différenciation cellulaire et elle est maximale aux stades CFU-E et proérythroblaste. Elle diminue ensuite lors des étapes de maturation terminale. Les réticulocytes et les hématies sont dépourvus de sites de fixation spécifique pour l'Epo. Le nombre de récepteurs exprimés à la surface des progéniteurs est faible, ce nombre change selon l'étape de la différenciation érythroïde et il est étroitement régulé [110].

La majorité des EpoR synthétisés est dégradée dans le réticulum endoplasmique (RE). Seule une faible fraction est libérée du RE, et est exprimée à la surface des cellules, suggérant que l'EpoR pourrait se replier inefficacement dans le RE [111]. Il a été montré que JAK2, et plus spécifiquement son domaine N-terminal, se lie à l'EpoR dans le RE et est essentiel pour son expression sur la surface des cellules [112].

La fixation de l'Epo sur son récepteur EpoR qui existe en dimère préformé déclenche un changement de conformation permettant le rapprochement et la phosphorylation de JAK2, plusieurs voies de transmission du signal seront alors activées.

III. Tpo/Mpl :

La thrombopoïétine (TPO) est la cytokine clé de la mégacaryopoïèse. Elle a un rôle au niveau de la prolifération et de la différenciation des mégacaryocytes. De plus, elle est indispensable à la maturation afin d'obtenir les plaquettes [113]. C'est le seul facteur impliqué dans l'ensemble des étapes de la mégacaryopoïèse.

La TPO a été découverte en 1994 par cinq équipes différentes [114]. Elle est produite principalement par le foie mais également au niveau des reins, des muscles et par les cellules stromales [115]. Sa partie N terminale est responsable de l'activité biologique et elle est très homologue à l'érythropoïétine (23 à 50% d'homologie). Cette partie correspond au domaine qui est capable de se lier au récepteur, le Mpl [116]. Sa partie C terminale est un domaine riche en sérine, en thréonine et en proline et possède de nombreux sites de glycosylation. Ces sites ont un rôle dans la sécrétion de la TPO et augmentent sa demi-vie.

La TPO agit à différents niveaux. Elle est considérée comme le principal régulateur de la mégacaryopoïèse en contrôlant la prolifération mais également la différenciation. Sa principale fonction est de stimuler la mégacaryopoïèse, mais son rôle n'est pas restreint à cette lignée. En effet, la TPO peut également avoir un rôle sur les cellules souches [115] et par son homologie avec l'érythropoïétine, elle est également impliquée dans la différenciation érythroïde.

Le récepteur de la thrombopoïétine (Mpl) est une protéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines hématopoïétiques de type I. Ce récepteur est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules de lignée mégacaryocytaire, ainsi que par les plaquettes [101].

La TPO en se fixant à son récepteur (Mpl) exprimé de manière constitutive par les plaquettes, induit son homodimérisation. Cette homodimérisation entraîne l'activation des protéines JAK2 par autophosphorylation et par conséquent l'activation de plusieurs voies de signalisation. La principale voie induite par la TPO est la voie JAK-STAT, mais la TPO peut également induire la voie des MAPKinases.

IV. Cytokines de la famille de l'IL-6 et leurs récepteurs :

On connaît actuellement huit cytokines faisant parties de la famille de l'IL-6 : IL-6, IL-11, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor), OSM (OncoStatin M), CT-1 (CardioTrophin 1), CLC (CardioTrophin Like Cytokine) et l'IL-27 [117].

Toutes ces cytokines ont la particularité de posséder une chaîne réceptrice servant à la transduction du signal commune : la gp130. Dans la plupart des cas, l'affinité des cytokines pour cette chaîne commune est relativement faible et nécessite leur pré association avec un récepteur spécifique α pour former un complexe de haute affinité capable d'initier une cascade de signalisation intracellulaire.

- IL-6/IL-6R α :

L'interleukine-6 est une cytokine surexprimée en réponse à une blessure, une inflammation ou une infection [118]. Elle agit en synergie avec l'IL-3 dans le développement des mégacaryocytes et la production des plaquettes. L'IL-6 active la prolifération des cellules souches hématopoïétiques en stimulant leur entrée en phase G1.

Pour induire une signalisation, l'IL-6 s'associe avec la gp130 après avoir formé un complexe avec son récepteur spécifique l'IL-6R α , également appelé gp80 [119].

L'IL-6 peut activer les kinases JAK1, JAK2 et TYK2 et peut ainsi activer plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme JAK/STAT [120].

- IL-11/IL11R α :

L'interleukine 11 est une cytokine qui possède un large spectre d'action sur les différents types cellulaires. Elle peut agir en synergie avec l'IL-3, le SCF, le GM-CSF et autres cytokines. Ainsi elle joue un rôle dans à différents stades de la mégacaryocytopoïèse, stimule l'érythropoïèse, augmente la production des immunoglobulines et la différenciation des ostéoclastes [120, 121]. Elle exerce son action en stimulant l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et en diminuant la durée du cycle [122].

L'ARN messenger de l'IL-11R α est exprimé par les tissus hématopoïétiques, mais aussi le foie, le cerveau, le cœur, les reins, les muscles, les glandes salivaires et le tractus gastro intestinal.

Afin d'induire une signalisation cellulaire, l'IL-11 doit se fixer à son récepteur spécifique, pour former un complexe avec la chaîne de transduction commune gp130 selon le mécanisme similaire à celui de l'IL-6.

La cascade de signalisation activée en aval du complexe commence avec l'activation des tyrosines kinases de la famille JAK en particulier JAK1 mais aussi JAK2 [123].

MUTATION DU GENE *JAK2*
DANS LES SYNDROMES
MYELOPROLIFERATIFS

I. Gène codant :

Le gène de la protéine tyrosine kinase JAK2 humaine a été cloné en 1998. Il code pour 1132 acides aminés, avec un poids moléculaire de 131 KDa [124]. Il est situé sur le bras court du chromosome 9 à la position 24 (locus 9p24.1) et plus précisément à partir de la paire de bases 4.985.244 à 5.129.947 (figure6) [125].

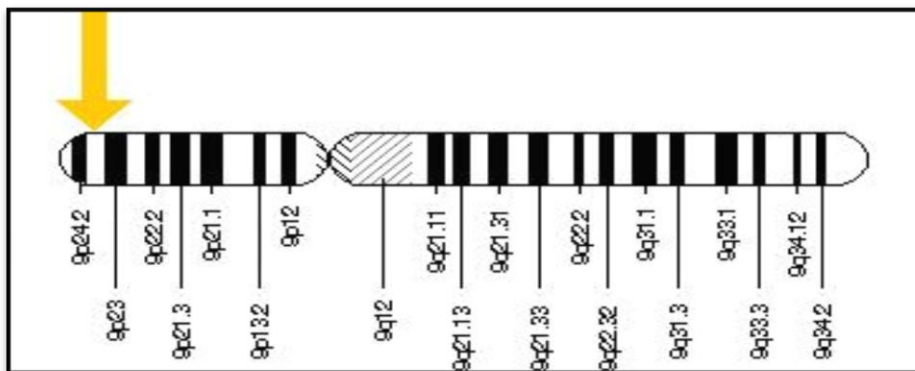


Figure 6 : situation du gène *JAK2* sur le chromosome 9p, locus 9p24.1

II. Protéine JAK2 :

1. Généralités :

La tyrosine kinase JAK2, et ses formes mutées, est impliquée dans la pathogenèse des SMP. JAK2 fait partie de la famille des Janus Kinases qui fut découvert en 1989, JAK signifiait alors "Just Another Kinase". Le nom de Janus Kinase vient de celui du dieu romain "Janus" veillant sur les ouvertures, les commencements et les fins et que Saturne doua d'une rare prudence, qui rendait le passé et l'avenir toujours présents à ses yeux, ce qui fut exprimé en le représentant avec deux visages tournés en sens contraire. Ceci faisant référence aux deux domaines "Kinase-like" que possèdent les JAKs [126].

2. Famille de protéines :

Les Janus Kinases (JAKs) sont des protéines cytoplasmiques solubles à activité tyrosine kinase. Elles sont composées de quatre membres chez les mammifères: JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Leur expression tissulaire est ubiquitaire sauf pour JAK3 dont l'expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques.

Les JAKs possèdent 7 domaines d'homologie appelés JH pour (JAK Homology domain) numérotés à partir de l'extrémité C-terminale des protéines JAK. Ils contiennent des tyrosines conservées [127].

Les fonctions des protéines tyrosine kinase :

Les protéines kinases sont des enzymes permettant la phosphorylation de protéines substrats sur des acides aminés particuliers. Environ 2 % des gènes du génome humain codent pour des protéines kinases [128].

Sur le plan physiologique, ces enzymes jouent un rôle fondamental dans les voies de transduction du signal. De très nombreuses protéines Kinases dérégulées sont à l'origine de cancers que ce soit des tumeurs solides ou des hémopathies malignes [129].

Ces enzymes catalysent le transfert d'un phosphate de l'ATP à un résidu tyrosine. Parmi les 90 protéines à fonction tyrosine kinase décrites, environ 60 sont des récepteurs transmembranaires, les autres sont intracellulaires (tyrosines kinases non récepteurs comme ABL et JAK2).

Toutes les protéines kinases possèdent un domaine tyrosine kinase (TK) dont la structure est très conservée. Le domaine TK est formé d'une succession de structures en hélice et en feuillet. Il comporte deux lobes (N et C) séparés par une

zone charnière qui permet la rotation d'un lobe par rapport à l'autre. Le domaine TK comprend le site de fixation de l'ATP, le site de fixation du substrat (ou site catalytique) ainsi qu'une boucle d'activation comprenant le site majeur d'autophosphorylation. Les domaines TK peuvent être soit dans une conformation inactive (boucle d'activation repliée vers l'intérieur), soit dans une conformation active (boucle d'activation dépliée vers l'extérieur). L'ATP ne pourra se fixer que sur la conformation active, qui accueillera ensuite la protéine substrat pour y être phosphorylée.

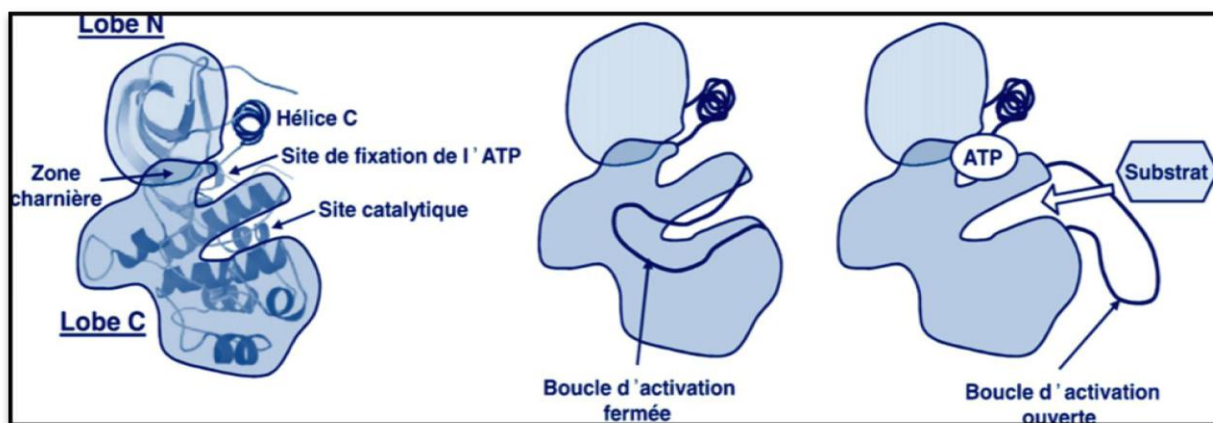


Figure 7 : représentation schématique du domaine kinase d'une protéine tyrosine kinase.

3. Structure :

Semblable aux autres JAKs, la protéine JAK2 comporte plusieurs domaines JH fonctionnels essentiels à son activité.

Le domaine JH1 en position C-terminale, qui est responsable de phosphorylation des substrats est suivi d'un domaine pseudokinase JH2. Il est appelé ainsi car il est homologue au domaine JH1, mais il n'a pas une activité kinase. La suppression du domaine JH2 dans Jak2 et Jak3 a augmenté la phosphorylation de ces deux protéines et de STAT-5 [130], suggérant que ce domaine ait des fonctions régulatrices négatives de l'activité kinase.

Les cinq autres domaines (JH3-JH7) constituent la région N terminale. Ces domaines sont impliqués dans l'association des JAKs aux récepteurs de cytokines.

Un domaine de type FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixine, Moesin) a été identifié entre JH4 et JH7 dans toutes les kinases de JAK [131]. Ce domaine est essentiel à la fixation de JAK2 aux récepteurs de cytokine.

Le domaine N-terminal et surtout les résidus 32-58 du domaine JH7 sont indispensables à la fixation de JAK2 à l'EpoR. JAK2 joue un rôle de molécule chaperonne pour l'EpoR, se fixant sur EpoR au niveau de réticulum endoplasmique, il permet un trafic vers la surface cellulaire.

Le domaine FERM régule également l'activité catalytique kinase [132]. Le domaine JH3 aurait un rôle dans le maintien d'une conformation spécifique facilitant le placement de JH7 dans une position permettant l'interaction avec l'EpoR [133].

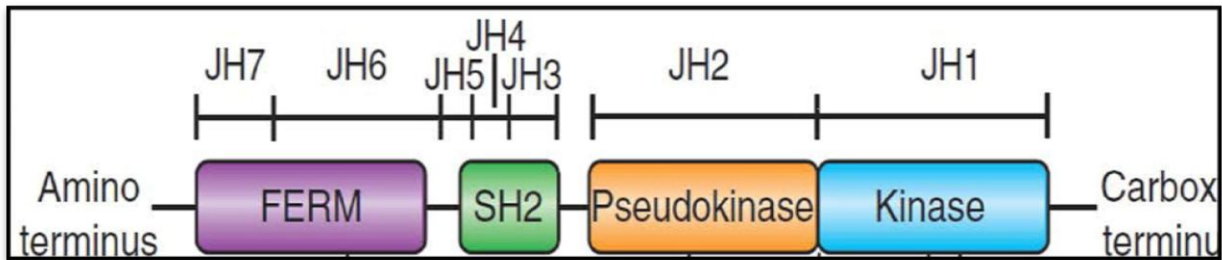


Figure 8 : organisation structurale de JAK2.

4. Fonctions :

Pour élucider la fonction de JAK2, il a été constaté que la région N-terminale de la protéine est liée à des récepteurs de cytokines. Des années plus tard il a été démontré que ; structurellement, C'est le domaine FERM de la protéine qui médie cette liaison [134, 135]. JAK2 médiatise les cytokines de signalisation en régulant l'expression du gène par l'activation des protéines STAT.

La déplétion de JAK2 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire. L'impact le plus important de la déplétion de JAK2 est une anémie sévère en raison d'une érythropoïèse inefficace montrant le rôle majeur de cette kinase dans l'érythropoïèse. De plus, les progéniteurs myéloïdes ne répondent plus à l'EPO, à la TPO, à l'IL-3, ni au CSF-GM suggérant un rôle clé de JAK2 dans la réponse à ces facteurs de croissance nécessaires à la myélopoïèse. En revanche, JAK2 n'apparaît pas requis dans la formation des progéniteurs lymphoïdes, ni dans leur amplification et leur différenciation [136].

La fonction la plus connue des JAKs est la transduction du signal des récepteurs aux cytokines de type I et II. On note une différence d'activation des JAKs en fonction des cytokines concernées [137]. Ainsi, JAK2 va être activée par l'EPO, la TPO, le GM-CSF ou encore l'IL-3.

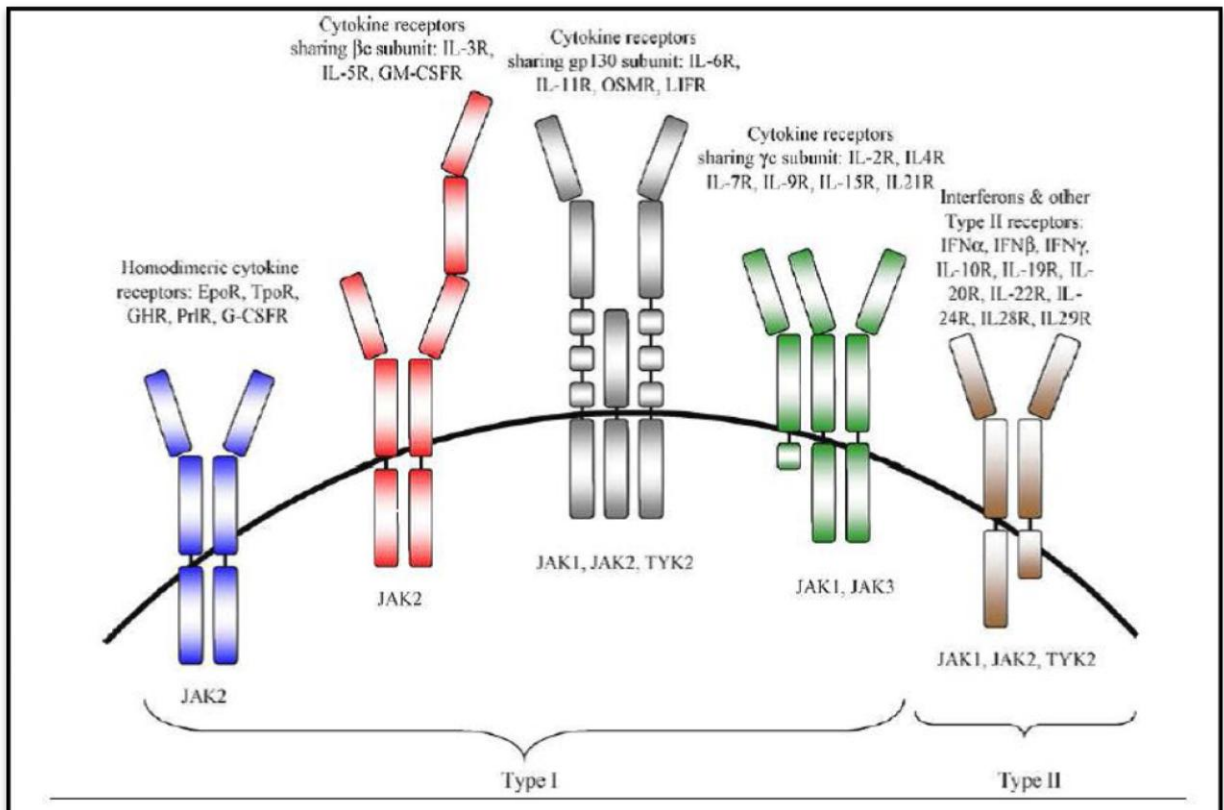


Figure 9 : L'implication différentielle des JAKs au niveau des récepteurs aux cytokines.

Il a été démontré que JAK2 a des fonctions dans la régulation épigénétique. Des travaux récents révèlent que JAK2, longtemps considéré comme constitutivement associé au récepteur et localisé au niveau de la membrane plasmique, peut également être localisé dans le cytoplasme et le noyau des cellules et avoir ainsi d'autres fonctions que la transduction du signal des récepteurs des cytokines. En effet, dans le noyau, JAK2 est capable de phosphoryler l'histone H3 sur tyrosine 41 induisant ainsi l'exclusion de la protéine HP1 α du promoteur de gènes rendant possible leur transcription indépendamment de STAT5 [138, 139].

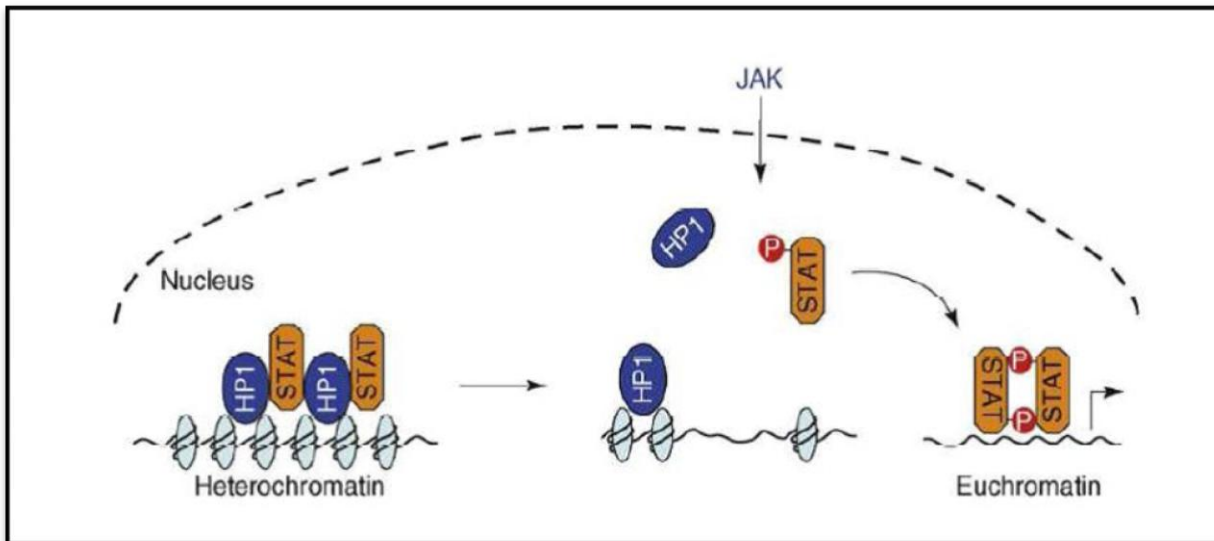


Figure 10 : Voie de signalisation JAK/STAT dans la régulation épigénétique.

5. Principales voies de signalisation :

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.

La fixation de la cytokine sur son récepteur engendre un changement conformationnel ou une dimérisation du récepteur rapprochant les JAK2. Ce rapprochement permet aux JAK2 de se transphosphoryler, puis de s'autophosphoryler et ainsi de s'activer. Les JAK2 une fois activées phosphorylent le récepteur. Cette phosphorylation est un signal de recrutement des STAT1, 3 et 5, de la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) et de protéines adaptatrices permettant l'activation des voies JAK2/STAT, PI3K/Akt et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). L'activation de ces voies de signalisation aboutit, par la transcription, la traduction ou la phosphorylation de cibles, à la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. JAK2 peut également agir sur la régulation épigénétique via la voie JAK2/STAT ou directement via la phosphorylation de cibles situées sur la chromatine [140] (figure 11, 12).

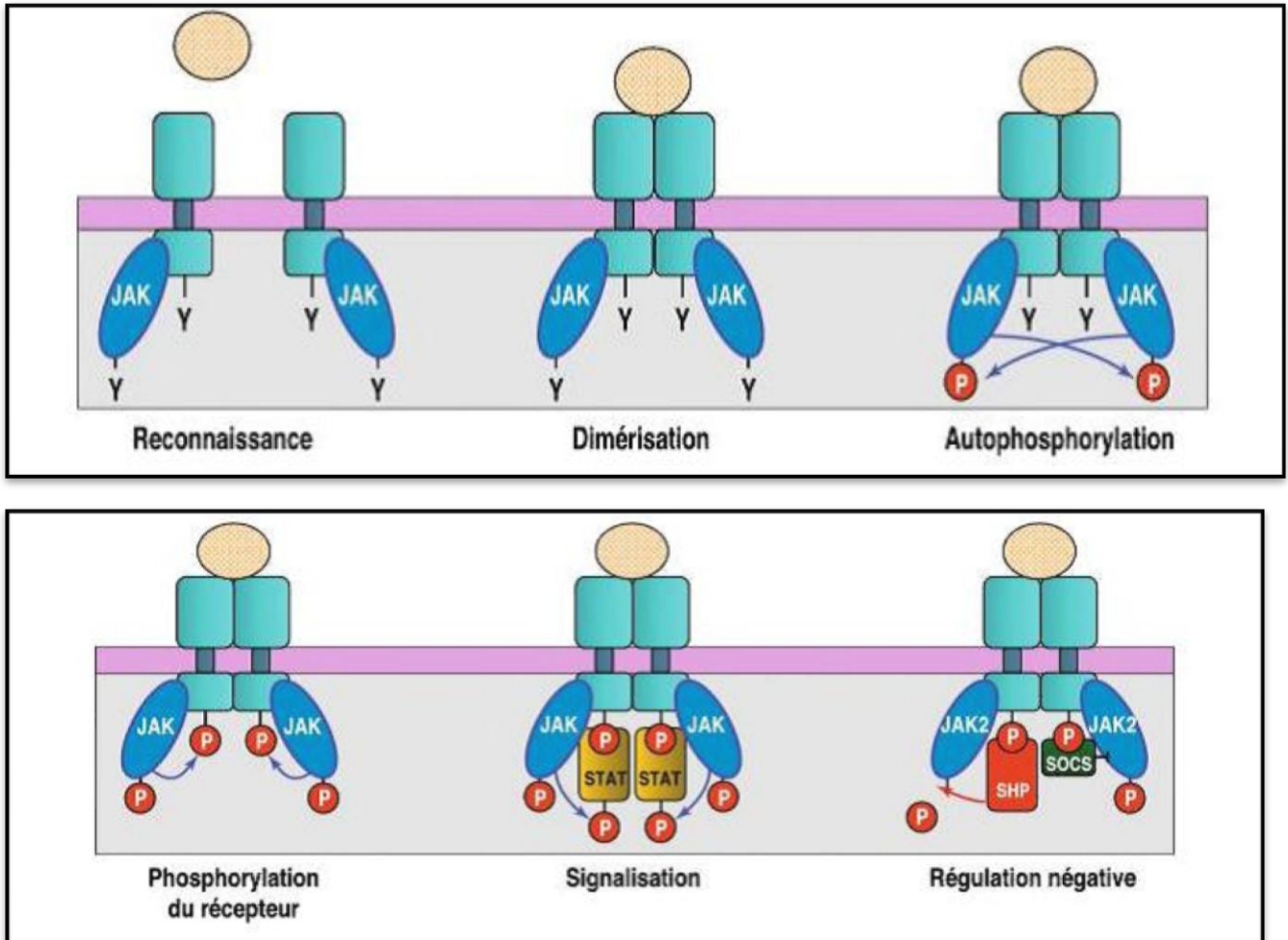


Figure 11 : L'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK.

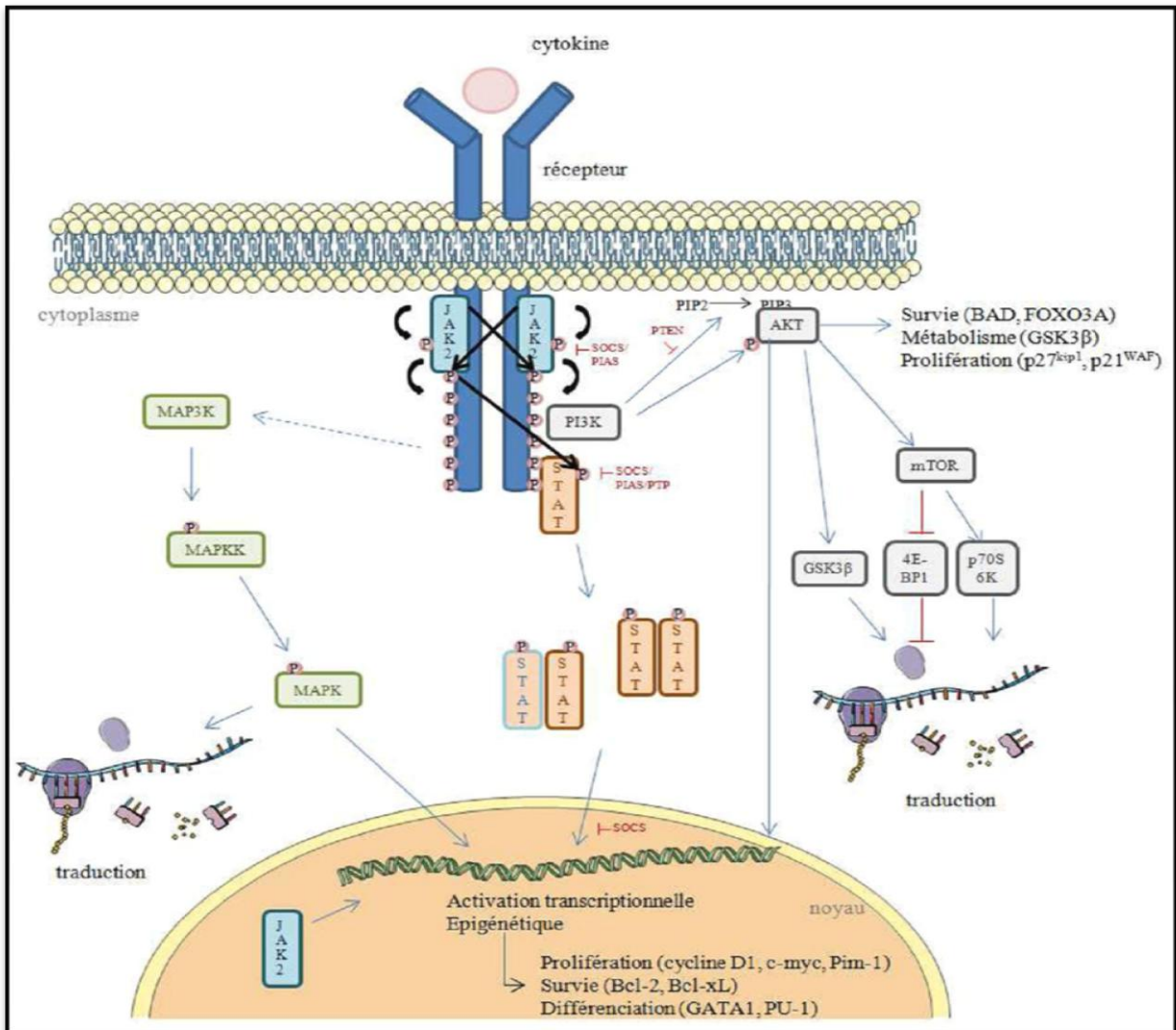


Figure 12 : Principales voies de signalisation activées par le complexe JAK2/récepteur aux cytokines.

5.1. 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 intracytoplasmique des chaînes du récepteur. Des sites d'ancrage (docking domains) qui permettent le recrutement d'autres protéines de signalisation contenant des domaines SH2 sont ainsi créés. Les facteurs de transcription de la famille STATs sont recrutés au niveau du récepteur activé. Ils sont à leur tour phosphorylés par les JAKs. Ils quittent ensuite le récepteur pour former des dimères dans le cytoplasme et transloquer dans le noyau où ils vont réguler l'expression de gènes cible et favoriser leur transcription [141, 142, 143].

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 [144].

On compte, dans les cibles de STATs, des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, 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 antiapoptotique, STAT1 aurait un rôle plutôt antagoniste, anti-prolifératif et pro-apoptotique [144].

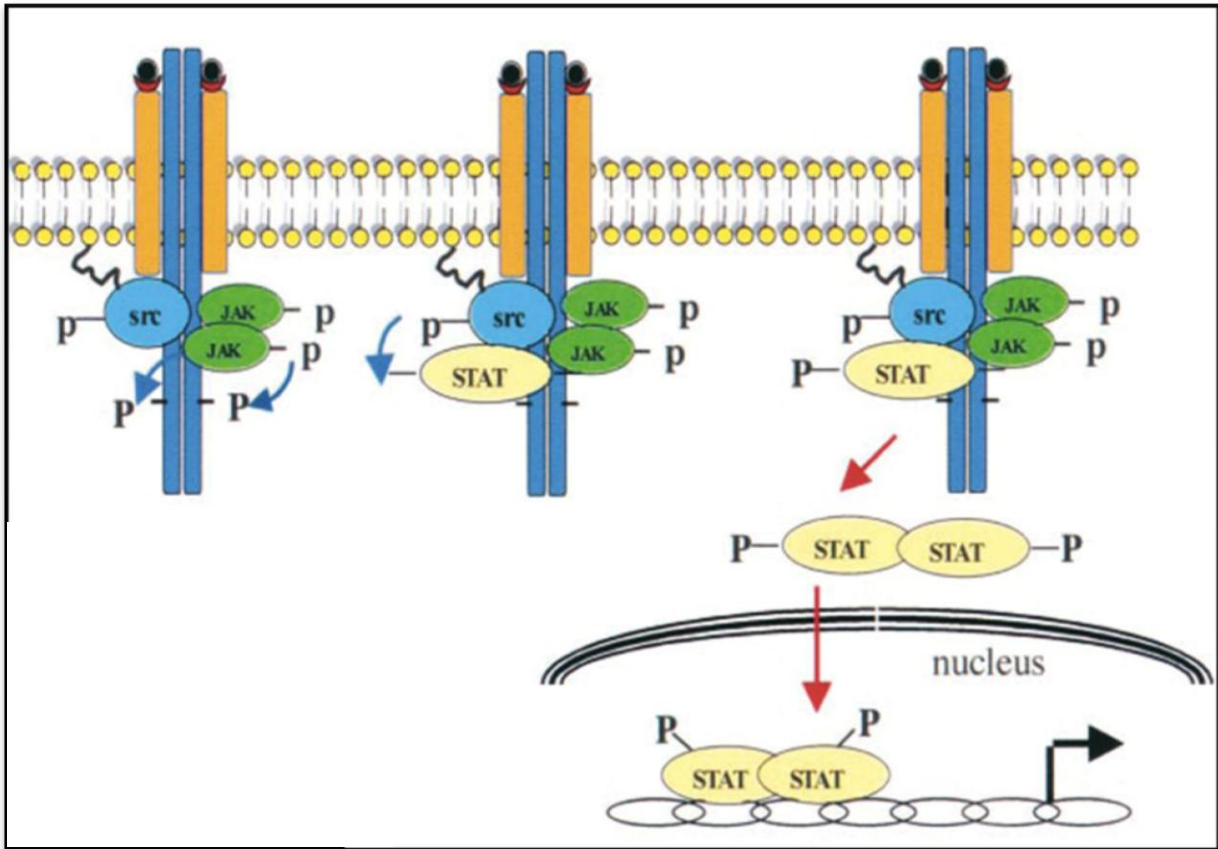


Figure 13 : Activation de la voie JAK/STAT.

5.2. 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 [145].

La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PI3, 4,5P3). Ce composé permet le recrutement de protéines possédant un domaine PH (Plextrin Homology) au niveau de la membrane plasmique, dont Akt. Akt est ensuite phosphorylée et activée par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dépendent kinase 1) et par le complexe mTORC2 (mTOR complex 2). AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles

impliquées dans la traduction protéique, dans la survie cellulaire, dans la prolifération ou encore le métabolisme.

5.3. Voie des MAPKs :

Les MAPKs sont des serine/thréonine kinases ubiquitaires dont la superfamille possède 11 membres : ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3, p38MAPKs (p38 α / β / γ), 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.

Les MAPKs Erk1 et Erk2, aussi connues sous le nom de p44MAPK et p42MAPK respectivement, ont été initialement identifiées comme des protéines stimulées par des facteurs de croissance, alors que les MAPKs des deux autres groupes (JNK1/2/3 et p38MAPK), ont été identifiées comme des kinases activées par divers stress comme le stress oxydatif ou les dommages à l'ADN. Cependant, les trois différentes cascades sont activées par les cytokines [146].

Les MAPKs possèdent de nombreuses cibles telles que des facteurs de transcription, des régulateurs de la traduction, des protéines du cytosquelette et favorisent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire [147].

5.4. Régulateurs négatifs :

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 (suppressor of cytokine signaling), PIAS (« Protein Inhibitor of Activated STAT ») et PTP (« Protein Tyrosine Phosphatases»).

Les PTP peuvent, grâce à leur domaine SH2, se fixer directement sur JAK2 ou sur les récepteurs aux cytokines lorsqu'ils sont phosphorylés. Une fois recrutées, elles déphosphorylent JAK2 et ses substrats réduisant ainsi leur activité. Certaines PTP sont nucléaires et peuvent directement désactiver les STATs [148].

Les mécanismes de rétrocontrôle négatif observés dans le cas des SOCS sont multiples. Il s'agit d'ubiquitine ligases, cibles transcriptionnelles des STATs, qui peuvent se fixer directement sur la tyrosine 1007 phosphorylée de JAK2 et entraîner son ubiquitination, ce qui constitue un signal d'adressage au protéasome où elle est dégradée. Certaines protéines SOCS peuvent également se fixer sur le domaine kinase de JAK2 et inhiber son activité catalytique. C'est le cas de SOCS1 et de SOCS3 [149]. SOCS1 et SOCS3 peuvent également inhiber l'activité de JAK2 en agissant comme pseudo-substrat. De plus, les protéines SOCS se fixent au niveau du récepteur activé et agissent comme compétiteurs pour les sites phosphorylés avec les cibles en aval [150].

Les protéines PIAS agissent plus en aval dans la voie JAK2/STAT en se fixant sur les STAT activés et en empêchant leur liaison à l'ADN [151].

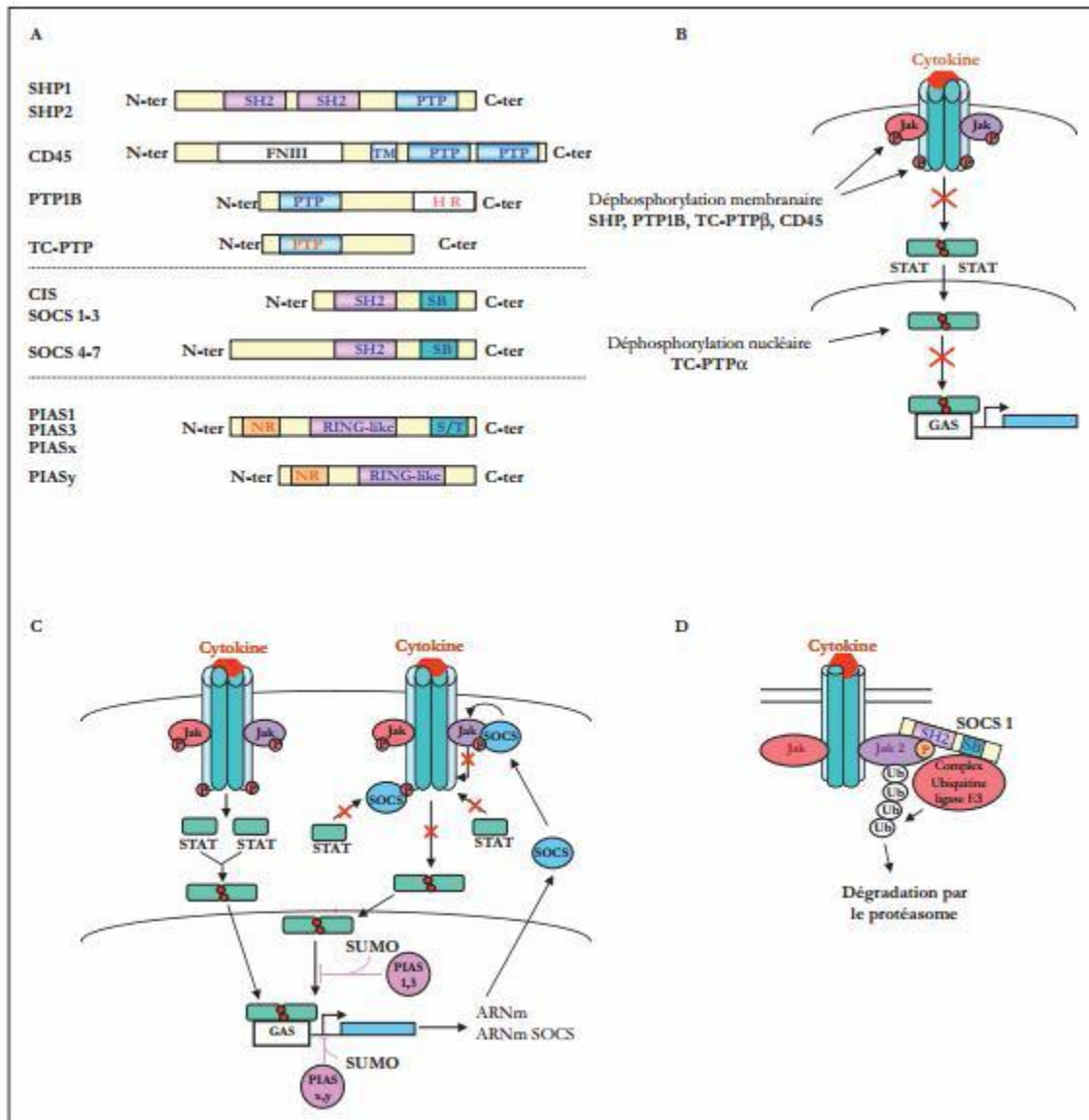


Figure 14 : A) Structure des protéines impliquées dans la régulation négative de la voie JAK/STAT. B) Régulation négative de la voie JAK/STAT par les phosphotyrosine phosphatases. C) Régulation négative de la voie JAK/STAT par les SOCS PIAS. D) SOCS1 cible JAK2 vers une dégradation par le protéasome.

6. Déficit en JAK2 :

L'absence de JAK2 est létale au 10ème jour de développement embryonnaire [136, 152]. La non-viabilité des embryons est due à l'absence d'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal.

La réponse à l'IL-3, l'IL-5 et au GM-CSF est également abolie, ce qui démontre le rôle crucial de JAK2 pour la réponse à ces cytokines. Par contre, le nombre de colonies granuleuses est strictement normal en réponse au G-CSF. Ceci indique que les progéniteurs hématopoïétiques sont présents chez les souris JAK2-/- quoiqu'en nombre réduit, hypothèse confortée par l'obtention de colonies de type CFU-E après infection de cellules de foie fœtal par un rétrovirus contenant Jak2 [136].

Le foie fœtal de souris JAK2-/- contient aussi des progéniteurs lymphoïdes. En effet, il peut reconstituer en cellules B et T fonctionnelles des souris mutantes pour JAK3. Ceci montre, en outre, que JAK2 n'est requise ni pour l'expansion, ni pour la maturation des cellules lymphoïdes.

III. Physiopathologie :

1. Mutation JAK2 V617F :

Durant l'année 2005, plusieurs équipes ont détecté la présence de cette mutation chez des patients ayant une PV, alors que celle-ci était absente chez l'ensemble des sujets témoins [40, 42, 153, 154]. Leurs travaux sont parus dans des revues anglo-saxonnes prestigieuses, telles que Nature, the New England Journal of Medicine ou Lancet. Ainsi que le premier symposium international sur la mutation JAK2 V617F dans les SMP a été organisé par le groupe PV-Nord sous l'égide de la Société française d'hématologie et de l'université Paris-XIII.

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 pseudokinase de JAK2. Cette substitution empêche le domaine pseudokinase de JAK2 d'inhiber son domaine kinase [155]. Au niveau fonctionnel, cette mutation confère à JAK2 une activation constitutive (figure15, 16).

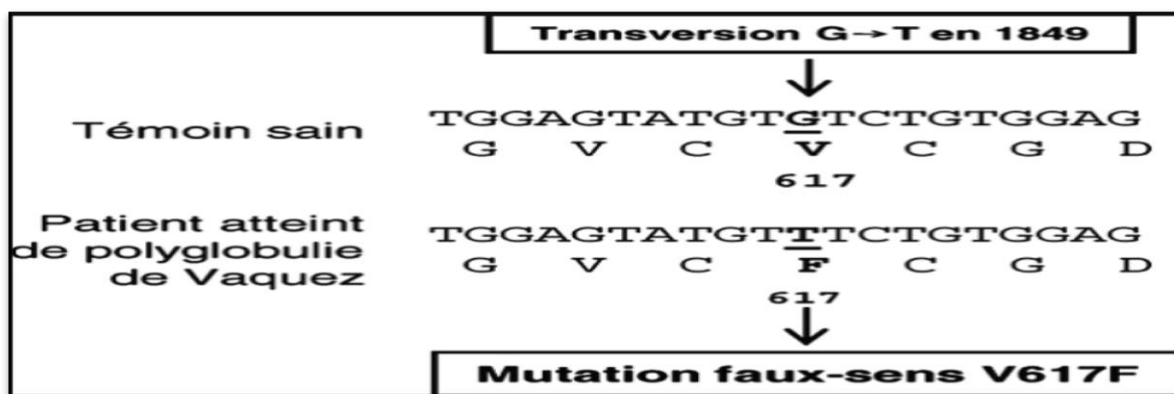


Figure15 : Séquences nucléotidiques et protéiques caractérisant la mutation V617F.

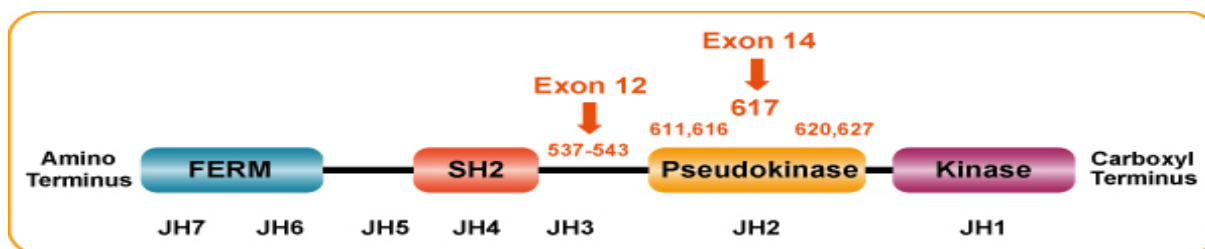
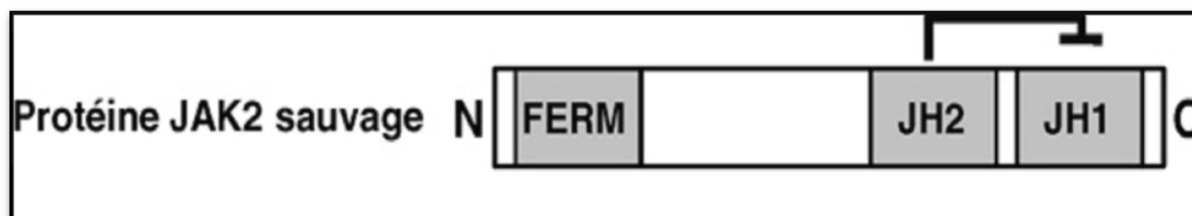


Figure16: Représentation schématique de la protéine JAK2 sauvage et mutée.

La mutation JAK2 V617F, unique et clonale, est acquise car elle n'est pas retrouvée au niveau de toutes les cellules dans la PV. En revanche, 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 [39, 41, 126].

2. Mutations JAK2 autres que V617F :

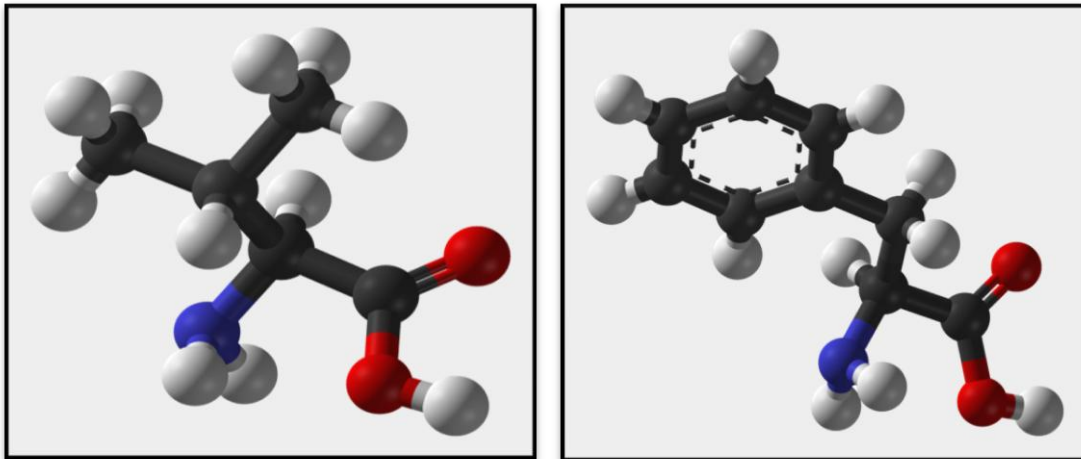
D'autres possibilités de mutation de la valine en position 617 de JAK2 ont été testées par mutagenèse dirigée. Les mutations V617W, V617M, V617I, V617L permettent d'obtenir une indépendance aux cytokines et une activation constitutive des voies de signalisation JAK/STAT, mais seul le mutant V617W induit une activation comparable à V617F. Cependant la mutation V617F semble rester la meilleure mutation possible, car après avoir testé toutes les possibilités, il ressort que la seule mutation permettant une activation comparable à celle de V617F soit V617W, qui nécessite la mutation de trois bases et qui a donc peu de chances d'être retrouvée chez un patient [156].

En 2007, d'autres mutations de JAK2 ont été identifiées, en particulier chez des patients présentant des critères de PV mais plus jeunes, présentant une érythrocytose plus marquée ainsi qu'une leucocytose et une thrombocytose plus faibles au diagnostic [157]. Ces mutations situées dans l'exon 12 du JAK2, sont localisées en amont du domaine pseudokinase dans une zone extrêmement conservée au cours de l'évolution. Elles entraînent les mêmes conséquences que la mutation V617F.

On compte aujourd'hui une vingtaine de mutations JAK2 autres que V617F, elles sont majoritairement retrouvées dans la PV et restent relativement rares [158].

3. Modélisation moléculaire :

La mutation V617F se caractérise par le changement de la valine en position 617 par une phénylalanine, c'est-à-dire dans le domaine JH2 de régulation de l'activité catalytique de la protéine.



Valine

Phénylalanine

Figure 17: structure de la valine et la phénylalanine.

La position 617 est stratégique, puisqu'elle se trouve à l'interface entre les deux domaines JH1 et JH2 de JAK2, au niveau de la boucle d'activation de la kinase.

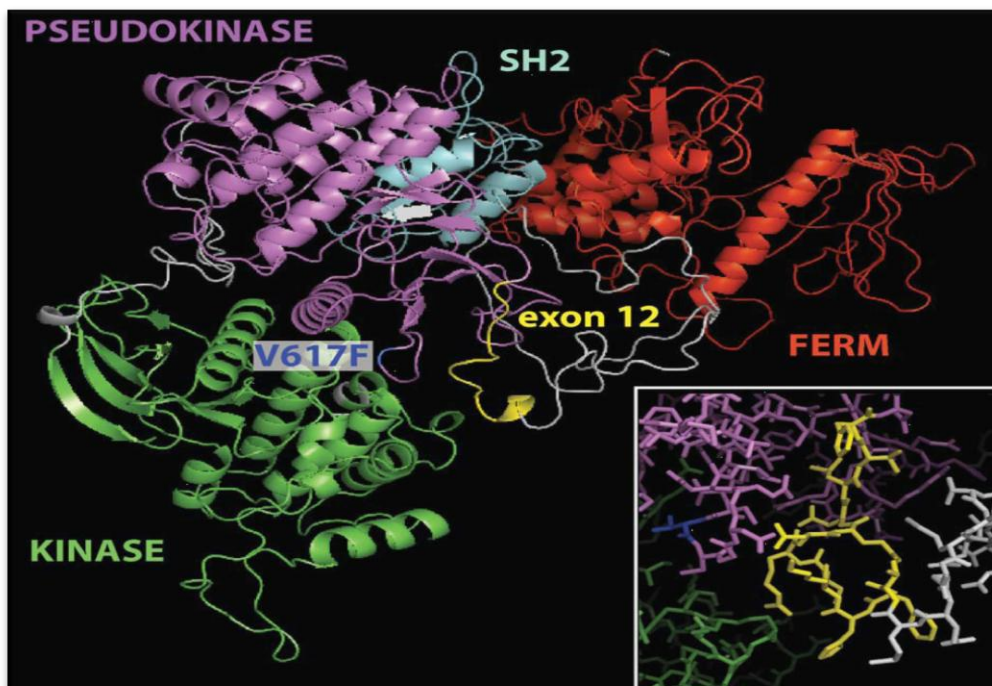


Figure18 : représentation de la protéine JAK2 et la localisation de V617F.

4. Mécanismes des syndromes myéloprolifératifs liés à la mutation

JAK2 :

La physiopathologie des SMP non LMC est longtemps restée inexpliquée. Des travaux anciens avaient documenté que les progéniteurs présentaient une hypersensibilité aux cytokines. Cette observation suggérait une anomalie dans la transduction du signal dans le contexte de la réponse aux cytokines. Cependant, aucune anomalie récurrente n'avait été mise en évidence tant au niveau de la structure des récepteurs, de sa signalisation, que de la régulation négative du signal (phosphatases). Ce n'est qu'en 2005 que l'identification de la mutation JAK2 V617F, la première anomalie moléculaire caractéristique à ces maladies, a été mise en évidence. Cette anomalie est présente dans plus de 95% des cas de PV et dans environ 50% des cas de TE et de MF. Etant donné qu'une faible proportion de patients atteints de PV et qu'une proportion significative de patients atteints de TE et MF n'étaient pas concernés par la mutation.

Une mutation — trois pathologies distinctes :

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 [159]. 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) [160]. Chez la souris, la surexpression du gène JAK2 muté dans la moelle osseuse est à l'origine d'un phénotype de PV [161]. 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 [87]. Toutes ces observations montrent l'importance du ratio allèles JAK2 V617F

mutés/ 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.

Il existe des SMP familiaux avec mutation JAK2 V617F, alors qu'il n'y a pas de transmission germinale de la mutation [162]. 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 [163]. De plus, des anomalies cytogénétiques, telles que la délétion 20q, peuvent être observées dans des cas où la proportion de cellules présentant la mutation de JAK2 demeure faible [164]. La mutation JAK2 V617F pourrait donc être un événement secondaire, voire un événement insuffisant à l'acquisition du phénotype final.

MATERIELS ET METHODES

I. Critères d'inclusion des patients :

Ont été inclus dans cette étude rétrospective les patients adressés du service de médecine interne au laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès pour suspicion de syndrome myéloprolifératif et ayant bénéficié de la recherche de la mutation JAK2 V617F depuis l'année 2010 jusqu'à l'année 2014.

II. Recueil des données :

Les données ont été recueillies à travers les dossiers médicaux des malades. Il s'agissait des données cliniques et para cliniques.

III. Prélèvement des patients :

Avant tout prélèvement, une fiche qui porte les renseignements, l'accord et le consentement de l'intéressé est obligatoire. On prélève deux tubes EDTA de sang, pour l'extraction d'ADN par kit ou par sel. Les tubes peuvent être conservés à +4°C ou -20°C pour utilisation ultérieure.

IV. Extraction de l'ADN génomique :

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction se fait selon deux méthodes : soit par SEL ou par KIT commercialisé (invitrogèn).

1. Extraction de l'ADN par sel :

L'extraction de l'ADN par sel se base sur quatre étapes essentielles :

- Lyse des globules rouges,
- Lyse des globules blancs,
- Dénaturation et précipitation des protéines et impuretés,
- Précipitation et lavage de l'ADN.

Principe :

Le sang doit être initialement et vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges. Le lysat est centrifugé et après élimination du surnageant, le culot cellulaire, contenant les leucocytes, est traité par une solution de lyse des globules blancs contenant la protéinase K (enzyme qui digère les protéines cellulaires). Les protéines seront par la suite éliminées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl et la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (-20 °C).

2. Extraction de l'ADN par KIT :

L'extraction de l'ADN par KIT se base aussi sur quatre étapes :

- Fixation de l'ADN,
- Digestion par protéase,
- Lavage de l'ADN,
- Elution de l'ADN.

Principe :

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, l'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre

solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution.

3. Dosage de l'ADN :

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. En effet, les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet. Le maximum de cette absorption se situe à 260nm.

Au laboratoire, nous utilisons la technologie « NANODROP» pour réaliser le dosage. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN pour connaître sa concentration, et la courbe qui renseigne sur sa pureté.



Figure 19 : NANODROP pour le dosage de l'ADN.

V. Amplification des séquences nucléotidiques par PCR :

1. Principe de l'amplification d'ADN par la PCR :

La PCR (Polymerase Chain Reaction) fut inventée par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Elle permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin,
- Hybridation des amorces spécifiques,
- Réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase.

Les températures et le nombre des cycles dépendent de chaque gène amplifié.

A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.

2. Réactifs de la PCR :

La PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un mélange réactionnel approprié (Mix). Le mélange contient :

- Taq (Thermus Aquaticus) polymérase 5 U/ μ l
- Tampon PCR10 \times : sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase

- MgCl₂ 50Mm : ils influent sur l'activité enzymatique de la Taq
- Eau pure : sert pour la dilution des réactifs de PCR.
- Désoxyribonucléotides (dNTP) à 2,5mM
- Amorces à 10μM : ce sont des polymères nucléotidiques, de séquences spécifiques du gène à amplifier.

Une fois le Mix distribué dans les tubes appropriés, les échantillons d'ADN sont ajoutés individuellement.

3. Limites de la PCR :

La première limite est celle de la taille de la séquence qu'on souhaite amplifier. Les amplifications des séquences dont la taille est supérieure à 3 Kb sont très difficiles à réaliser. La seconde limite est celle du nombre de copies d'ADN cible, ainsi que son extrême sensibilité de telle sorte qu'une très faible contamination de l'ADN peut engendrer des erreurs d'analyse, d'où la nécessité de réaliser des contrôles pour les détecter.

4. Témoins de la PCR :

- Témoin positif qui a pour fonction de s'assurer des bonnes conditions de la PCR, ce témoin est représenté par l'ADN d'un sujet sain.

- Témoin négatif qui permet de s'assurer de l'absence de contamination, auquel il n'y a pas d'ADN.

5. Migration du produit PCR sur gel d'agarose à 2 % :

Les produits PCR sont contrôlés sur gel d'agarose 2 % en présence d'un marqueur de taille, qui permet de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié. Après cette migration au temps convenable on visualise les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

RESULTATS

I. Données épidémiologiques :

Nous avons 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.

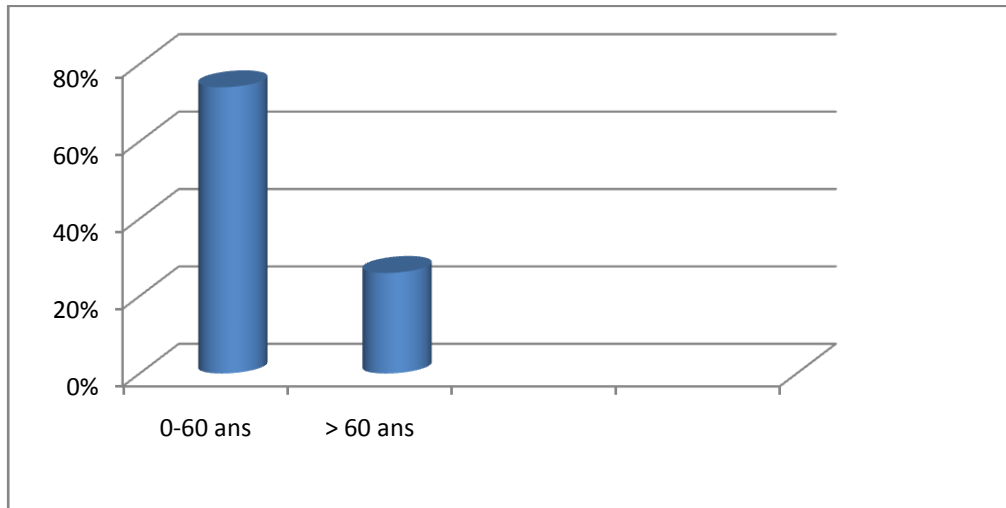


Figure 20 : répartition des malades en fonction de l'âge.

Dans notre série, les hommes représentaient 44% versus 56% des femmes.

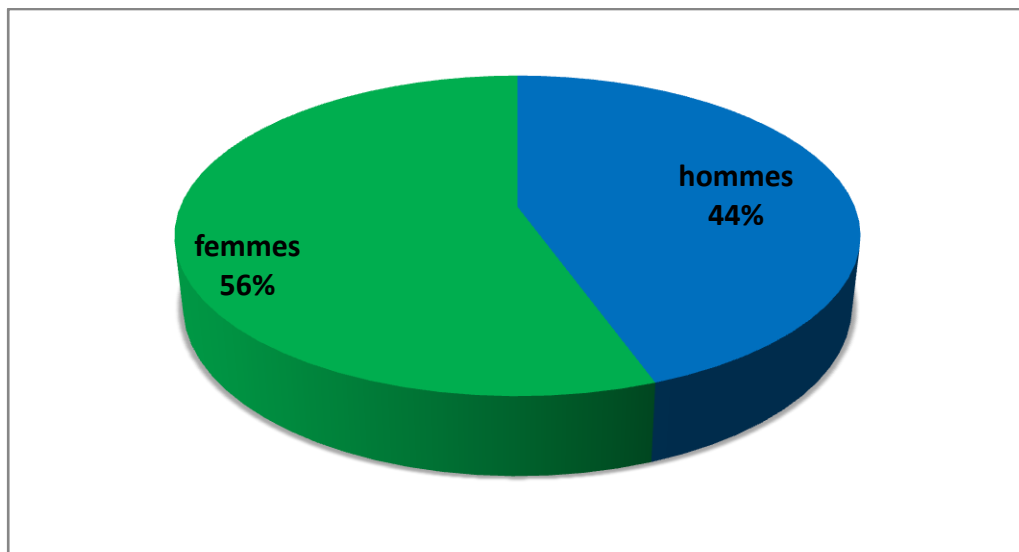


Figure 21 : répartition des malades en fonction du sexe.

II. Données cliniques :

Dans notre série d'étude, 56% des malades ont une polyglobulie de vaquez et 44% ont une thrombocytémie essentielle.

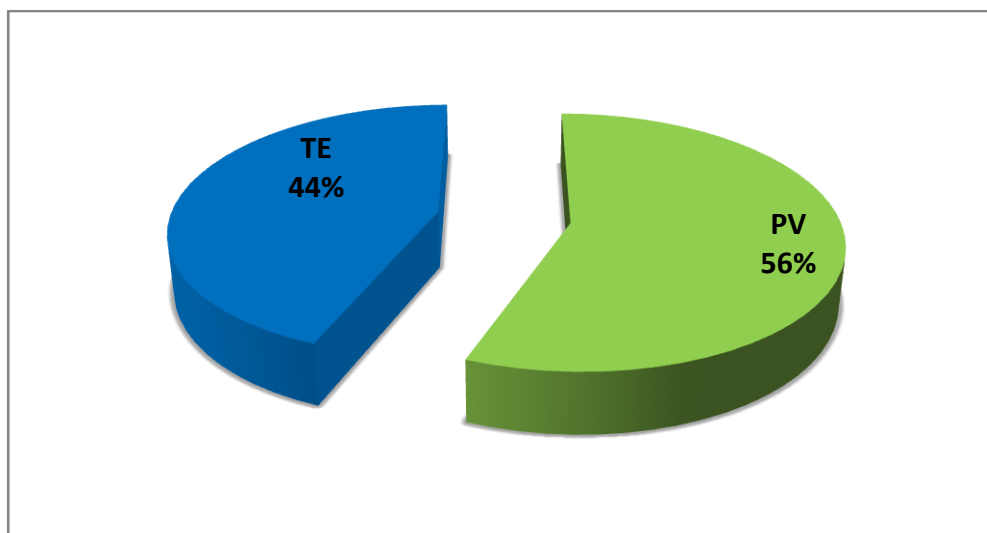


Figure 22 : répartition des malades en fonction du diagnostic.

III. 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 notre 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 notre 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.

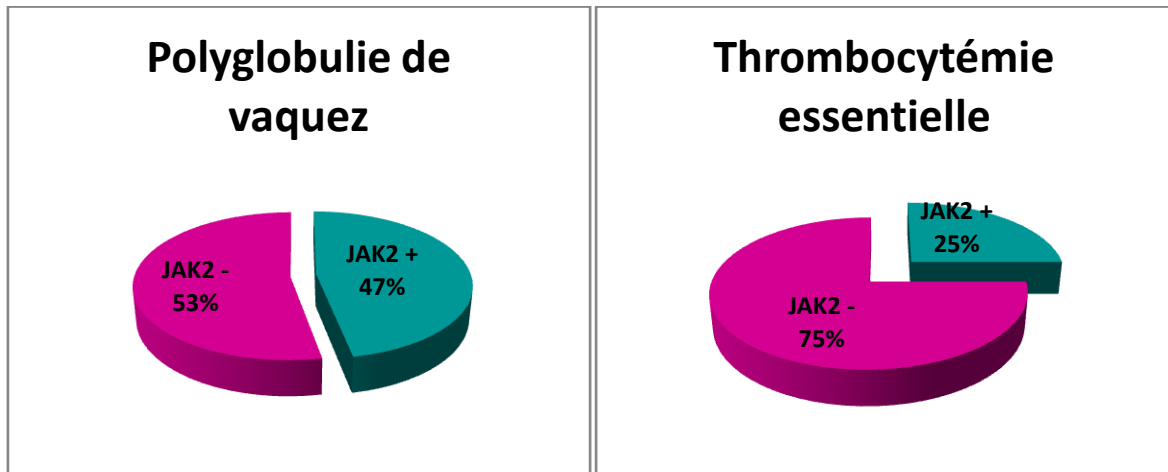


Figure 23 : répartition des malades selon leur statut mutationnel.

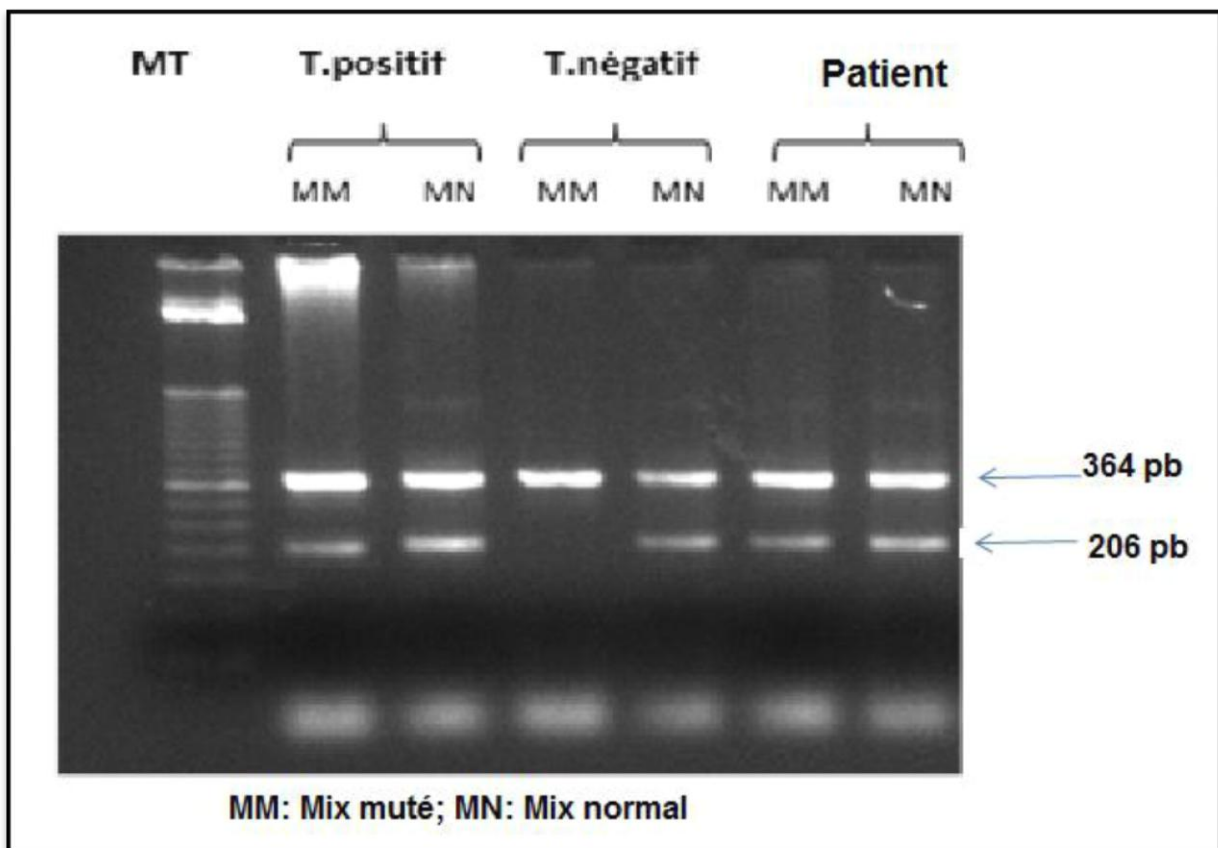


Figure 24 : profil d'électrophorèse des produits PCR chez un patient de notre série qui avait la mutation V617F du gène JAK2.

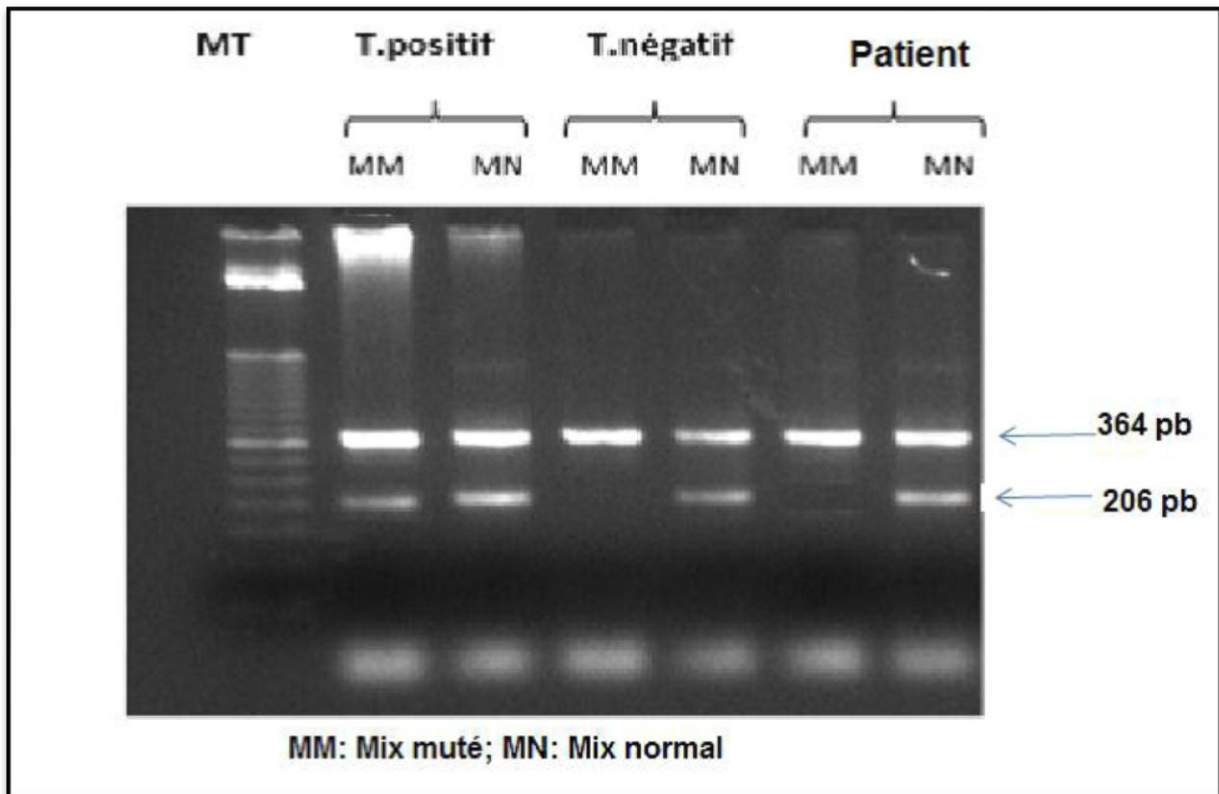


Figure 25 : profil d'électrophorèse des produits PCR chez un des patients de notre série n'avait pas la mutation V617F du gène JAK2.

DISCUSSION

I. Mutation JAK2 :

1. Conséquence sur la fonction de JAK2 :

La mutation V617F est localisée dans le domaine pseudokinase de la protéine JAK2. Ce domaine régulerait négativement l'activité kinase de JAK2 en bloquant sa boucle d'activation en position inactive. La mutation V617F perturberait ainsi l'interaction entre le domaine pseudo kinase et la boucle d'activation [165, 166]. L'expression de la protéine mutée dans des lignées cellulaires humaines et murines induit une hypersensibilité aux cytokines.

Des études portant sur les drosophiles (mouches) présentant la mutation JAK2, située dans le domaine JH2-pseudokinase, ont montré que ces insectes développaient une hyperactivité kinase de la protéine associée à un risque accru de syndromes myéloprolifératifs et de leucémies [167]. Elle est donc une mutation « gain de fonction ».

2. Conséquences sur les clones porteurs de la mutation JAK2 :

2.1. Activation constitutive des voies de signalisation canoniques :

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, il ya une phosphorylation anormalement élevée de STAT5, STAT3 [168].

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. Plusieurs travaux suggèrent un rôle majeur de STAT5 dans le caractère oncogénique de JAK2 V617F. Tout d'abord,

l'introduction d'une forme constitutivement active de STAT5 dans des progéniteurs CD34+, induit une différenciation érythroïde spontanée des cellules en absence d'EPO. De plus, la déplétion de STAT5 dans des progéniteurs érythroïdes CD36+ diminue leur capacité à former des colonies érythroïdes et l'expression de sa forme constitutivement active augmente la capacité des progéniteurs érythroïdes à former des BFU-E et des colonies érythroïdes endogènes [168].

Contrairement au STAT5, STAT3 n'apparaît pas être impliqué dans l'excès de prolifération induit par la présence de la mutation. En revanche, il est nécessaire à l'activation excessive des neutrophiles entraînée par JAK2 muté. Quant à STAT1, il interviendrait plutôt dans l'aiguillage de l'effet oncogénique sur la lignée mégacaryocytaire au détriment de la lignée érythrocytaire [169].

La nécessité de la présence d'un récepteur aux cytokines dans l'indépendance aux cytokines est discutée. Il semblerait que lorsque l'expression de JAK2 V617F est faible, le récepteur est nécessaire à l'autonomie de croissance. En revanche, lorsque le niveau de JAK2 V617F est élevé, il est capable de promouvoir l'autonomie de croissance seule [170]. De ce fait, sur des milieux de culture, dépourvus de facteur de croissance, la survie des cellules avec mutation JAK2 était prolongée, comparée à celle des cellules témoins [39].

2.2. 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.

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 des gènes.

En plus d'une dérégulation transcriptionnelle, l'oncogène favorise la traduction d'ARNm en protéines. Une analyse de l'expression des microARN du sang dans la PV révèle une expression aberrante de huit microARN à la fois dans les granulocytes, les cellules mononuclées, les plaquettes et les réticulocytes [171]. Cette dérégulation des différents niveaux de synthèse protéique favorise la surexpression des protooncogènes et la diminution du taux protéique des suppresseurs de tumeur pouvant participer aux mécanismes oncogéniques de JAK2 V617F.

2.3. 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 rétrocontrôle 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 [172]. 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 JAK2 V617F est plus complexe qu'il n'aurait pu le paraître.

2.4. Impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique :

Tout comme JAK2 sauvage, JAK2 V617F est également capable de phosphoryler HP1 α et de lever ainsi sa répression sur l'expression des gènes cibles. Cependant, dans les SMP où l'on retrouve une activation constitutive de JAK2, la dérégulation de l'interaction de HP1 α à la chromatine pourrait lever son effet suppresseur de tumeur par une augmentation de l'expression de certains oncogènes. De plus, cette dérégulation, qui touche la chromatine, pourrait favoriser les recombinaisons mitotiques et l'instabilité génomique [139].

2.5. Impact cellulaire de la mutation JAK2 V617F :

La présence de la mutation JAK2 V617F entraîne une amplification de la myélopoïèse terminale [173]. Par contre, elle ne semble pas influencer la proportion de cellules souches ou progénitrices [174]. Ce phénomène d'amplification est la résultante d'une augmentation de survie et de prolifération cellulaire.

Avantage de survie :

Certaines données suggèrent fortement que la présence de l'oncogène JAK2 V617F confère aux cellules un avantage de survie.

En premier lieu, l'acquisition de l'hypersensibilité aux cytokines confère aux cellules mutées une résistance face à la mort induite par le sevrage en facteur de croissance favorisant ainsi l'expansion clonale observée dans les SMP [175].

En deuxième lieu, en aval de l'oncogène, un défaut de réponse face à la stimulation de récepteurs d'apoptose. En effet, dans des circonstances physiologiques, la stimulation du récepteur CD95, un récepteur d'apoptose exprimé par les érythroblastes, entraîne une activation des caspases et un clivage du facteur de transcription GATA-1 [176]. Il s'ensuit une inhibition irréversible de la

prolifération cellulaire et une différenciation des érythroblastes ou, si la concentration en EPO est faible, leur mort. Bien qu'ayant une expression normale des récepteurs d'apoptose et de ses effecteurs, les érythroblastes portant la mutation JAK2 V617F possèdent une résistance à l'apoptose [177]. La conséquence est un défaut d'activation des caspases et de clivage de GATA-1 favorisant l'expansion érythrocytaire.

Enfin, JAK2 V617F entraîne la surexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-xL [178] et d'autres protéines impliquées de manière indirecte dans l'apoptose.

Avantage prolifératif :

De nombreux travaux suggèrent que l'oncogène JAK2 V617F favorise la prolifération cellulaire et notamment la transition G1/S. Une étude sur la différenciation mégacaryocytaire dans les SMP montre que les mégacaryocytes ont un fort potentiel prolifératif dans ces pathologies [179].

Au niveau moléculaire, l'inhibition de p27kip1 semble jouer un rôle dans l'excès de prolifération entraînée par la mutation. La protéine p27kip1 est un régulateur négatif de la transition G1/S du cycle cellulaire. Cette protéine est aussi un régulateur négatif de la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. De plus, l'expression de p27kip1 est plus faible en aval de l'oncogène qu'en aval de la forme sauvage de JAK2 et l'inhibition de JAK2 V617F entraîne une augmentation de son expression suggérant qu'il s'agit d'une cible de l'oncogène [180].

Une dérégulation d'autres protéines intervenant dans la prolifération cellulaire a été observée en aval de JAK2 V617F.

Domages de l'ADN :

La mutation de JAK2 est associée à une augmentation de la fréquence de recombinaisons homologues et d'instabilité génétique [181]. Ce phénomène pourrait être lié aux dérégulations épigénétiques présentes dans les SMP.

Cependant, l'augmentation de la prolifération cellulaire observée pourrait également participer à cette instabilité.

II. Intérêt de la mutation JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs :

Dans la polyglobulie de Vaquez, la mutation JAK2 V617F est identifiée chez 47% des patients de notre série. Ce résultat est relativement faible par rapport à celui de la littérature. Cette différence pourrait s'expliquer par le faible effectif de l'échantillon [39, 40, 41, 42, 182, 183].

Une autre étude réalisée au Maroc était la première à s'intéresser au statut de la mutation JAK2 V617F dans les SMP, elle a intéressée 70 patients et elle a été approuvée par le comité d'éthique local de la faculté de médecine de Casablanca. La mutation était identifiée chez 89.47% des patients [184].

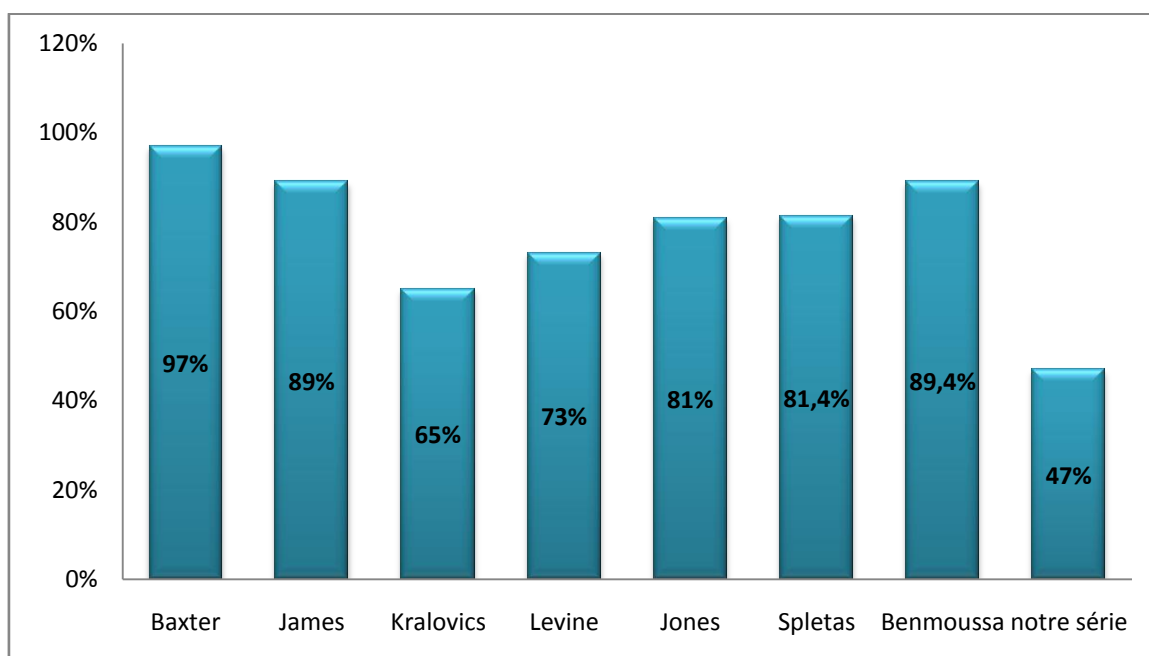


Figure 26 : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la PV de notre série avec les autres séries.

Dans la thrombocytémie essentielle, la mutation JAK2 est identifiée chez 25% des patients de notre série. Ce résultat corrobore celui des séries de James, Kralovics, Levine et Jones et contraste avec celui de Baxter, Spletas et Benmoussa qu'on peut l'expliquer également par le faible effectif de l'échantillon [39, 40, 41, 42, 182, 183, 184].

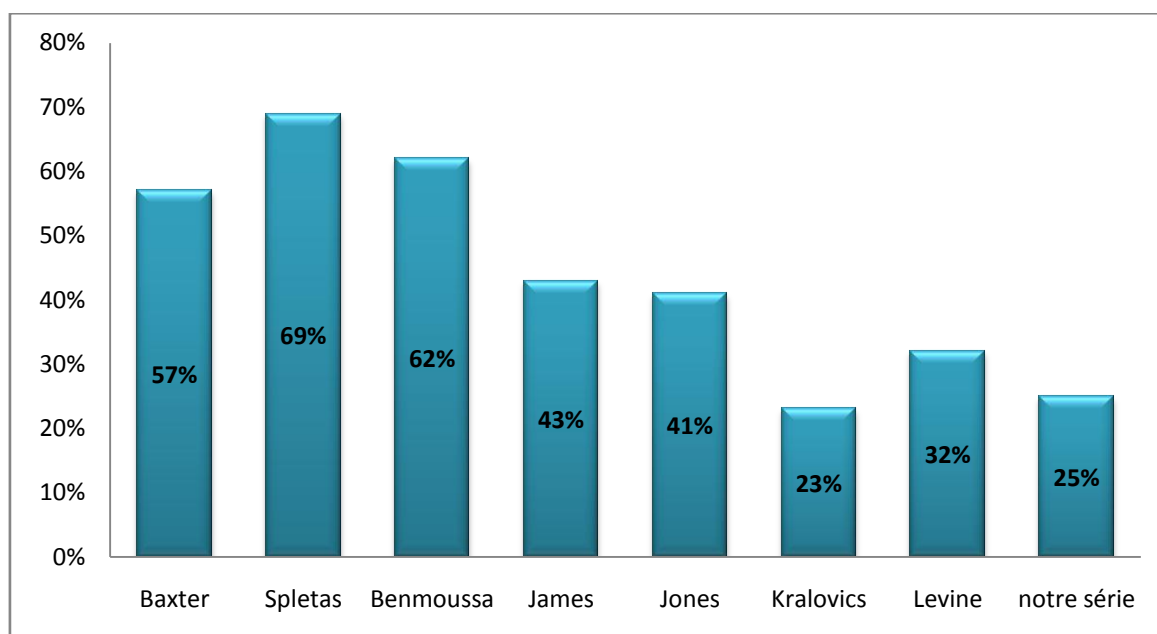


Figure 27 : comparaison de la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans la TE de notre série avec les autres séries.

Notre série ne contient pas des cas de myélofibrose primitive. En se référant aux résultats des séries de la littérature, la mutation JAK2 est identifiée chez un nombre non négligeable des patients [39, 40, 41, 42, 182, 183, 184].

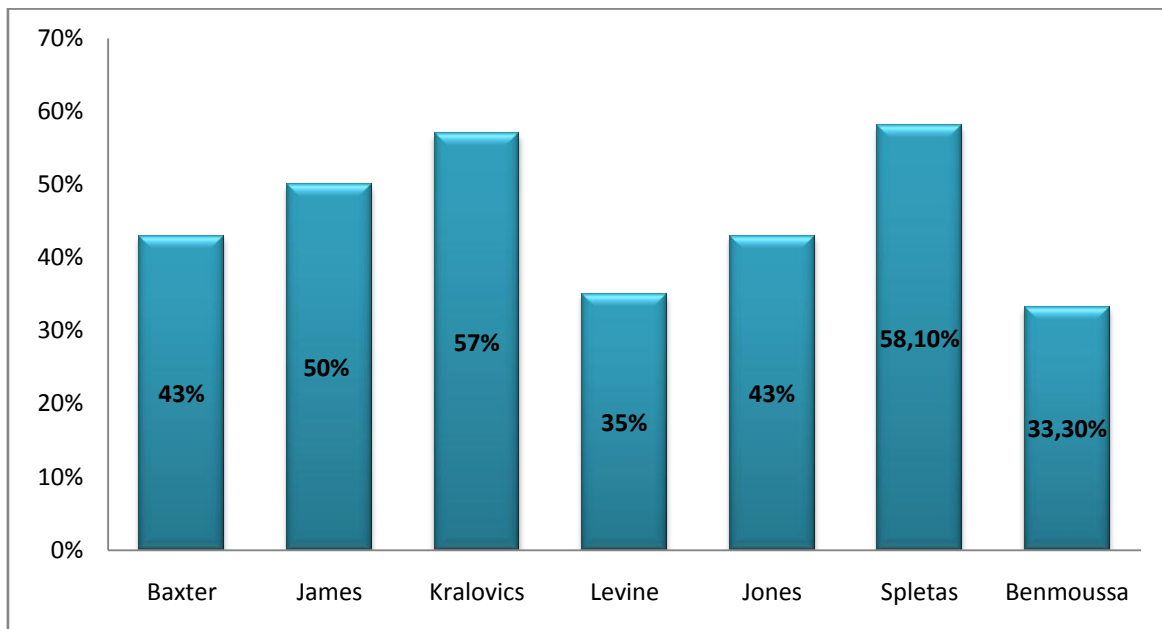


Figure 28 : prévalence de la mutation JAK2 dans la MP selon les séries.

1. Diagnostic :

Les résultats de ces études montrent la présence de la même mutation V617F de JAK2 dans la majorité des SMP Ph négatifs les plus communs : PV, TE, et MF. Ainsi, la découverte de cette mutation est une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans les SMP. En outre, la recherche de cette mutation constitue un nouvel outil diagnostique important dans les SMP autres que la LMC, ce qui a très rapidement conduit les experts de l’OMS à réviser leurs critères diagnostiques.

Tableau 5 : critères diagnostiques OMS 2008 des SMP en dehors de LMC.

	PV	TE	MP
Critères majeurs	<ul style="list-style-type: none"> • Polyglobulie définie par \uparrowHb > 18,5 g/dl (homme) ou > 16,5 g/ dl (femme) ou \uparrowHt* ou \uparrowVGI > à 125 % de la valeur théorique • Mutation JAK2V617F ou similaire (mutation de l'exon 12 de JAK2) 	<ul style="list-style-type: none"> • Plaquettes \geq 450G/l • Prolifération mégacaryocytaire avec une morphologie de grand mégacaryocytes matures • Absence de critères OMS diagnostiques de LMC, de PV, de MFP, de SMD ou de toute autre hémopathie • Présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre Marqueur de clonalité ou absence de cause de thrombocytose réactionnelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Prolifération et atypies mégacaryocytaires avec fibrose réticulinique et/ou collagène Ou, en l'absence de fibrose, les changements morphologiques des mégacaryocytes doivent être accompagnés d'une augmentation de la cellularité médullaire et d'une prolifération granuleuse (définition d'un stade pré-fibrotique de la MFP) • Absence de critères OMS diagnostiques de LMC, de PV, de SMD ou de toute autre hémopathie • Présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur de clonalité ou absence de cause de fibrose médullaire secondaire
Critères mineurs	<ul style="list-style-type: none"> • Myéloprolifération des 3 lignées sur la biopsie médullaire (panmyélose) • EPO sérique basse • Pousse spontanée de colonies érythroblastiques in vitro 		<ul style="list-style-type: none"> • érythromyélocytémie • LDH augmentées • Anémie • Splénomégalie palpable
Le diagnostic requiert :	Les 2 critères majeurs + 1 critère mineur Ou Le premier critère majeur et 2 critères mineurs	Les 4 critères sont nécessaires.	Les 3 critères majeurs + 2 critères mineurs

La découverte de la mutation JAK2 V617F a simplifié le diagnostic de la PV (critères diagnostiques OMS 2008) [185]. Le diagnostic repose désormais sur l'association de deux critères majeurs (taux d'hémoglobine ou hématokrite ou masse sanguine et analyse des mutations JAK2) et d'un critère mineur (par exemple le taux d'érythropoïétine). Ainsi, dans la plupart des cas, pour établir un diagnostic de PV, on peut se passer d'une BOM et d'une étude des progéniteurs hématopoïétiques in vitro. En ce qui concerne les TE et MP, la présence d'une mutation JAK2 (ou mutation similaire) n'est qu'un critère parmi d'autres et la BOM demeure indispensable au diagnostic.

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. Elle est très rarement retrouvée dans les leucémies aiguës [186], dans 3 à 9% des LMMC [187], dans 2% des leucémies à éosinophiles [188], dans 4% des mastocytoses systémiques [189], dans 11% à 20% des néoplasmes myéloprolifératifs inclassables [188], et dans environ 5% des SMD [187]. Concernant les PV, les patients présentent dans leur grande majorité la mutation. Son absence dans un contexte évocateur de SMP (érythropoïétinémie basse, pouce érythroïde endogène et/ou BOM en faveur d'un SMP) doit faire rechercher d'autres mutations plus rares de JAK2 notamment une mutation de l'exon 12. Pour les patients présentant une TE, la présence de la mutation JAK2 V617F affirme le caractère malin, le plus souvent myéloprolifératif mais pas nécessairement la TE (PV en cas de masse sanguine élevée, MP si l'histologie est en faveur) [190]. En cas de suspicion de MP, la présence de l'anomalie confirme l'existence d'un SMP devant une myélofibrose en histologie. Cependant la mutation n'est pas toujours détectée et des mutations du MPL sont retrouvées dans 10% des cas [191].

2. Thérapeutique :

La mise en évidence de la mutation V617F de JAK2 a permis d'orienter la recherche thérapeutique vers des molécules inhibitrices de l'activité JAK2. Il s'agit de substances non sélectives ou sélectives de JAK2. Dans ce dernier cas, il peut s'agir d'inhibiteurs des protéines JAK2 sauvages et mutées ou uniquement des protéines JAK2 mutées [192].

Aucune molécule n'est spécifique pour la mutation V617F. Cette importante caractéristique explique que les effets bénéfiques sont observés chez les patients porteurs ou non de la mutation JAK2V617F, mais démontre que les inhibiteurs des JAKs ne peuvent pas être considérés comme une thérapie ciblée des cellules tumorales [193].

La MP avancée a constitué leur principale indication étant donné la survie limitée de ces patients, l'importance des symptômes généraux et l'absence de traitement efficace. Dès 2007, les premiers patients atteints de MP ont été inclus dans des études cliniques utilisant le Ruxolitinib, le plus avancé des inhibiteurs des JAKs. Depuis lors, plus de 8 molécules sont en développement clinique dans la MP, et certaines d'entre elles sont également testées dans la PV et la TE. Toutes ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP [193].

Tableau 6 : principaux inhibiteurs des JAKs en étude clinique pour le traitement des SMP.

Agent	Cibles	Phase d'étude clinique	Effets cliniques	Effets secondaires principaux – Toxicité limitante
Ruxolitinib (INCBO18424)	JAK1, JAK2	III, publié	Splénomégalie, symptômes systémiques	Thrombopénie, anémie
SAR302503 TG101348	JAK2, FLT3, RET	III, en cours	Splénomégalie, symptômes systémiques	Thrombopénie, anémie hyperamylasémie, nausées, diarrhées
CYT387	JAK1, JAK2, CDK2, JNK1, PKD3, PKCmu, TBK1	II	Splénomégalie, symptômes systémiques, anémie	Thrombopénie, céphalées hyperamylasémie, neuropathie périphérique
CEP-701 (Lestaurtinib)	JAK2, FLT3, TRKA, VEGFR	II	Splénomégalie,	Nausées/diarrhées, anémie, thrombopénie
SB1518 (Pacritinib)	JAK2, FLT3	II	Splénomégalie, symptômes systémiques	Nausées, diarrhées

Effet des inhibiteurs de JAK sur la splénomégalie dans la MP :

Les études [194, 195] qui comparaient l'effet du Ruxolitinib à un placebo ou au meilleur traitement disponible chez des patients avec une MP avancée ont clairement démontré son effet bénéfique. Dans ces études, alors que le placebo ou tout autre traitement disponible n'avait aucun effet, 30 à 40 % des patients ont présenté une diminution de plus de 33 % du volume splénique mesuré par résonance magnétique, ce qui correspond une diminution de moitié du volume de la rate mesurée cliniquement. La diminution est rapide, maximale après quelques semaines, et sera durable. Cet effet permet d'améliorer les symptômes liés à la splénomégalie, comme la satiété précoce ou les douleurs abdominales. Cet effet sur la splénomégalie est dose-dépendant et sera rapidement réversible à l'arrêt des traitements. Cet effet bénéfique est partagé par tous les inhibiteurs de JAK2.

Effet sur les symptômes systémiques dans la MP :

La qualité de vie des patients atteints de MP est profondément altérée par l'existence de symptômes systémiques invalidants tels que des sueurs nocturnes, une cachexie et de la fatigue. L'anti-JAK2 entraîne une amélioration rapide et importante de ces symptômes chez une majorité des patients. L'état général va s'améliorer et les patients vont prendre du poids. Cet effet a été objectivé par l'amélioration significative de scores de qualité de vie sur différentes échelles utilisées dans les études COMFORT-I et -II [194, 196] et ne semble pas être dose dépendant.

Effet sur les paramètres sanguins :

En prescrivant un anti-JAK2, on note une amélioration de l'anémie et de la thrombopénie qui peuvent se manifester au cours de la MP avec diminution du besoin transfusionnel [196]. Cette diminution sera dose dépendante et démontre l'effet anti-myéloprolifératif des anti-JAK2.

Au cours de la PV, l'administration d'un anti-JAK2 permet de réduire, voire d'inhiber, la prolifération des progéniteurs médullaires et diminuer le nombre moyen de colonies érythrocytaires, ainsi qu'une diminution de la fréquence des saignées [197, 198].

3. Pronostique :

La présentation clinico-biologique et les modalités évolutives des SMP sont très hétérogènes.

Le statut mutationnel de JAK2 dans la TE a été étudié par plusieurs équipes. Les patients pour lesquels le diagnostic de TE a été retenu et qui présentent une mutation JAK2 V617F ont significativement un taux élevé d'Hb, de globules blancs et moins de plaquettes. La BOM est caractérisée par une plus grande cellularité, en particulier sur les lignées rouges et granuleuses. Leurs taux circulants d'érythropoïétine sont significativement plus bas [199].

Il n'y a pas de différence significative de survenue des complications évolutives propres à la TE entre les patients mutés et non mutés. Cependant, le risque thrombotique chez les patients mutés est retrouvé accru dans certaines études mais pas dans d'autres [200]. Les raisons de ces discordances d'appréciation du risque thrombotique sont probablement multiples, mais partiellement expliquées par le fait que ce n'est pas seulement la présence de la mutation JAK2 V617F qui doit être considérée, mais aussi la charge mutationnelle. En effet, les techniques quantitatives montrent des différences de « charge mutationnelle » V617F (proportion de gènes JAK2 mutés parmi tous les gènes JAK2) selon la pathologie, typiquement forte dans les PV, plus faible dans les TE [201]. Le groupe italien GIMEMA rapporte une fréquence de 50 % d'événements thrombotiques chez les patients souffrant de TE avec la mutation à l'état homozygote, 22% pour les hétérozygotes et 11% pour les non mutés [200]. Ainsi, JAK2 V617F augmente l'adhésion des globules rouges à l'endothélium par une modification d'expression de certaines molécules d'adhésion [202]. Une augmentation des taux solubles de p-sélectine (qui permet aux

plaquettes de se lier aux leucocytes, ce qui induit des agrégats plaquettes/leucocytes favorisant la thrombose) et une augmentation de l'expression de p-sélectine à la surface des plaquettes ont été rapportées chez les patients TE JAK2 V617F positifs [203, 204].

La charge JAK2 V617F, facilement mesurable en routine, reflète à la fois la taille du clone muté et la proportion de cellules homozygotes. Elle semble corrélée à certains paramètres cliniques tels que le prurit, la taille de la rate, la leucocytose ou l'évolution vers la myélofibrose pour les PV et probablement le risque thrombotique dans les TE [200, 205].

Dans la MP, la présence de la mutation JAK2 V617F est associée à un pronostic défavorable [206]. Il existe une corrélation entre la présence de la mutation, en particulier à l'état homozygote et une leucocytose plus élevée, une plus grosse rate et un plus grand risque de transformation leucémique [207]. Aussi, il existe une corrélation entre la présence de la mutation JAK2 V617F et la présence d'anomalies cytogénétiques, elles mêmes associées à une survie courte [205].

4. Suivi thérapeutique :

Il n'y a actuellement aucune recommandation de suivi moléculaire par quantification de la proportion d'allèles mutés. Cependant, lors du traitement pouvant modifier la quantité de cellules mutées circulantes (greffe de moelle, Interféron, ou inhibiteur de JAK2), il pourrait être intéressant d'effectuer un suivi quantitatif du clone pathologique [208].

Le suivi de la charge peut servir à apprécier l'efficacité des traitements. En effet, certains traitements entraînent seulement une réponse hématologique alors que d'autres, comme l'interféron par exemple, entraînent une diminution de la charge JAK2 V617F (réponse moléculaire) [208]. Ces derniers en agissant préférentiellement sur les cellules clonales sont vraisemblablement plus efficaces à long terme et peuvent faire espérer des guérisons.

Le suivi moléculaire est aussi utile pour la surveillance des patients allogreffés pour une myélofibrose montrant ainsi la disparition du clone muté [209].

III. Détection de la mutation JAK2 sur la moelle osseuse : [210, 211]

Les sources d'ADN utilisé pour la recherche de la mutation JAK2 sont : le sang périphérique (SP) et la moelle osseuse (MO), ce qui a pousser les auteurs à mettre en question l'équivalence de la sensibilité et la spécificité de la détection de la mutation et l'équivalence de la mesure de la charge allélique selon qu'on prélève du SP ou de la MO.

Plusieurs études sont réalisées pour répondre à ces questions en travaillant sur des groupes de patients ayant des SMP selon les critères diagnostiques de l'OMS et chez qui on a utilisé des échantillons d'ADN extrait du SP et de la MO pour PCR à la recherche de la mutation JAK2 V617F durant la même période.

Tous les patients qui ont été négatifs pour la mutation JAK2 sur les échantillons du SP étaient également négatifs pour la mutation sur les échantillons de la MO et vice versa mettant la sensibilité et la spécificité de la détection de la mutation JAK2 sur le SP et la MO à 100%. Aussi, la charge allélique de JAK2 V617F dans le SP était équivalente à celle dans la MO.

Ces résultats montrent que l'utilisation de la MO dans la détection de la mutation JAK2 ou la quantification de la charge allélique n'est pas requise car le test sur le SP est fortement fiable d'où un résultat négatif de la mutation JAK2 sur un échantillon du SP peut être considéré fiable et l'obtention d'échantillon de la MO pour la détection de la mutation n'est pas nécessaire. Autrement dit ces résultats dénie le fait qu'on a besoin d'une aspiration de la MO ou d'une BOM pour vérifier la présence ou l'absence de la mutation JAK2 V617F. En plus, l'hétérogénéité des échantillons (SP vs MO) ne doit pas être prise en considération lors des

interprétations de la corrélation entre la charge allélique de JAK2 mutée et la symptomatologie clinique.

Ces données permettent de comparer les niveaux de détection de la mutation JAK2 entre le SP et la MO et d'utiliser les valeurs de manière interchangeable surtout chez les patients dont les valeurs initiales ont été obtenues partir de la MO. Cela rend beaucoup plus facile la surveillance à long terme de la charge allélique JAK2 mutée dans les essais cliniques avec les nouveaux agents thérapeutiques et le suivi post greffe des cellules souches hématopoïétiques.

CONCLUSION

La pathogénèse des SMP est complexe et reste mal connue. Il paraît qu'ils résultent des dérégulations profondes impliquant les acteurs des grandes voies de signalisation cellulaire, de la maîtrise et de la réponse à l'environnement cytokinique, à la transduction du signal et la régulation de l'expression des gènes.

La mutation JAK2 V617F est de découverte assez récente. La recherche de cette mutation constitue un nouvel outil diagnostique important dans les SMP non LMC. Son implication dans la pathogénie des SMP est actuellement confirmée et constitue une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans les SMP. Elle a conduit l'OMS à revoir et à adopter de nouveaux critères diagnostiques de ce groupe d'hémopathies.

Auparavant, apanage de laboratoire spécialisé, la détection de la mutation JAK2 V617F constitue actuellement un test de routine pratiqué dans les laboratoires de biologie médicale en utilisant des techniques spécifiques et sensibles (PCR allèle spécifique).

Actuellement, en cas de suspicion d'un SMP, la recherche de la mutation JAK2V617F est devenue l'examen clé. Lorsqu'elle est positive, le diagnostic de SMP est certain et il reste ensuite à classer l'hémopathie.

De plus, la découverte de cette anomalie moléculaire acquise offre une perspective de recherche et de développement de nouvelles thérapeutiques plus ciblées de ces syndromes comme les inhibiteurs de JAKs.

RESUMES

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 thrombocytémie essentielle (50%) et de la myélofibrose idiopathique (50%). Cette mutation est caractérisée par un changement d'un nucléotide (un T pour un G) 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.

L'objectif de ce travail est de déterminer la prévalence de la mutation JAK2 à travers une étude rétrospective portant sur 27 dossiers des malades dans le laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique et le service de Médecine Interne du CHU Hassan II de Fès et présentant des syndromes myéloprolifératifs documentés par des données cliniques et biologiques, ainsi que d'identifier son impact clinique au cours de sa présence et ses éventuelles implications dans l'établissement du diagnostic et les progrès thérapeutiques.

La mutation JAK2 V617F a été retrouvée chez 47% des PV et 25% des TE. 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. Aussi, cette découverte offre une perspective de recherche et de développement de nouvelles thérapeutiques plus ciblées de ces syndromes comme les inhibiteurs de JAKs.

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.

The aim of this work is to determine the prevalence of JAK2 mutation through a retrospective study of 27 cases of patients in the laboratory of medical genetics and cancer genetics and Internal Medicine Department of the University Hospital Hassan II of Fez and presenting myeloproliferative syndromes documented by clinical and laboratory data, and identify its clinical impact during its presence and its possible implications in the diagnosis and treatment progress.

The JAK2 V617F mutation was found in 47% of PV and 25% of TE. 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. Also, this discovery provides a perspective on research and development of new therapies more targeted for these syndromes such as inhibitors of JAKs.

ملخص

(JAK2) Janus kinase 2 هو بروتين من نوع تيروسين كيناز يشارك في عدة مسارات للإشارة المسؤولة أساسا عن بقاء وتكاثر الخلايا.

وقد وصفت الطفرة JAK2 V617F المرتبطة باضطرابات التكاثر النقوي كحدث وراثي شائع عند غالبية المرضى الذين يعانون من كثرة الحمر فيرا (90%) وكثرة الصفائح الأساسية (50%) وتليف النقوي مجهول السبب (50%). وتتميز هذه الطفرة بتغير النوكليوتيدات (G U T) في اكسون 14 من الجينة JAK2 التي تقع على الصبغي 9 موضع p24.19، مما يؤدي إلى إجراء تبديل من الفينيل ألانين إلى الفالين في موقف الأحماض الأمينية 617 من البروتين JAK2.

الهدف من هذا العمل هو تحديد مدى انتشار الطفرة JAK2 من خلال دراسة استعادية ل 27 حالة من المرضى في مختبر الأمراض الوراثية و مصلحة الطب الباطني بالمستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس و الذين يعانون من متلازمات التكاثر النقوي التي وثقتها البيانات السريرية والمخبرية وتحديد تأثيرها السريري خلال وجودها ومشاركتها المحتملة في التشخيص و تقدم العلاج.

تم العثور على طفرة JAK2 V617F في 47% من كثرة الحمر فيرا و 25% من كثرة الصفائح الأساسية. هذه النتائج، بالإضافة إلى نتائج أبحاث مشابهة تؤكد على أهمية هذه الطفرة في التسبب في اضطرابات التكاثر النقوي.

وقد أخذ اكتشاف هذه العلامة بسرعة بعين الاعتبار من قبل منظمة الصحة العالمية، والتي تعتبر إيجابية JAK2 كمعيار رئيسي لتشخيص المرض. أيضا، يقدم هذا الاكتشاف منظور على البحث وتطوير علاجات جديدة أكثر استهدافا لهذه المتلازمات مثل مثبطات JAK.

REFERENCES

1. L .BOUGUENOUGH¹, I.SAMRI¹, H.SAYEL¹, I.OTMANI¹, H.HAMDAOUI¹, S.TRHANINT¹, W.BONO², K.OULDIM¹
2. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO): classification of myeloid neoplasms. *Blood* 2002 ; 100 : 2292–302.
3. V Pargade, L Darnige, P Gaussem – *Annales de Biologie Clinique*, 2006.
4. Goldman JM. A unifying mutation in chronic myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352: 1744–6.
5. Shannon K, Van Etten RA. JAKing up hematopoietic proliferation. *Cancer Cell* 2005; 7: 291–3.
6. Pardanani A, Tefferi A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood* 2004; 104: 1931–9.
7. Wadleigh M, De Angelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in others malignancies. *Blood* 2005; 105: 22–30.
8. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57– 70.
9. Sawyers, C.L., Denny, C.T. and Witte, O.N. (1991) Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell*, 64, 337–350.
10. Info cancer, l'hématopoïèse. 2011.
11. C. BENNET Cours d'hématologie Faculté de médecine –Tours– 2003.
12. Zandecki Hématologie biologique Faculté de Médecine – CHU 49000 Angers France.
13. Iscove NN, Sieber F, Winterhalter KH, 1974; Tepperman AD, Curtis JE, McCulloch EA, 1974; Casadevall N, Vainchenker W, 1993.
14. Précis d'histologie humaine – Roger Coujard, Jacques Poirier.
15. Bruno VARET, « SANG – Formation », Encyclopædia Universalis.

16. cour d'HÉMATOLOGIE UNIVERSITÉ DE MONASTIR-TUNISIE.
17. Chang Y., Bluteau D., Debili N., Vainchenker W. — From hematopoietic stem cells to platelets. *J. Thromb. Haemost.*, 2007, 5 Suppl 1, 318–327.
18. Patel S.R., Hartwig J.H., Italiano J.E. — The biogenesis of platelets from Megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.*, 2005, 115, 3348–3354.
19. Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell*. 2004; 118:149–161.
20. Kaushansky K. Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2006; 17:423–430.
21. Fortunel N HJ, Aoustin L, Batard P, Ducos K, Monier MN, Charpentier A, Hatzfeld A. Specific dose–response effects of TGF–beta1 on developmentally distinct hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. *Hematol J*. 2000; 1:126–135.
22. Grigorakaki C, Morceau F, Chateauvieux S, Dicato M, Diederich M. Tumor necrosis factor alpha–mediated inhibition of erythropoiesis involves GATA 1/GATA–2 balance impairment and PU.1 over–expression. *Biochemical Pharmacology*. 2011; 82:156–166.
23. Rosenbauer, F. and D. G. Tenen (2007). "Transcription factors in Myeloid development balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol* 7(2): 105–117.
24. Bernard J, Lévy J P, Varet B, Claudel JP, Rain JD, Sultan Y. *Hématologie. Abrégé*. Masson, 9ème ed. Paris ; 1998:352p.
25. Robert J, Morère J.F, signalisation cellulaire et cancer un manuel pour les étudiants et les oncologues pages 17–18–230 (2010).

26. Asnafi. V, Macintyre. E, Delabesse E. Application of molecular biology techniques to malignant haematology *Transfusion Clinique et Biologique* 10 (2003) 335–352.
27. Giorgio. M–T. risques professionnels exposent aux hémopathies malignes « *Atousanté.com* » décembre 2011 Guerraoui M.H. Leucémie myéloïde chronique : aspects évolutifs et thérapeutiques. Thèse en médecine. Faculté de MED V de Rabat 1997 ; 225.
28. Fédération Leucémie Espoir : FLE.
29. Fritschi L, Benke G, Hughes AM, Krickler A, Vajdic CM, et coll. Risk of non Hodgkin lymphoma associated with occupational exposure to solvents, metals, organic dusts and PCBs (Australia). *Cancer Causes Control* 2005, 16 : 599–607.
30. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112(12):4384–4399.
31. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001, 411: 342–348.
32. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008; 112(12):4384–4399.
33. Ralf Küppers, Ph.D., Ulf Klein, Ph.D., Martin–Leo Hansmann, M.D., and Klaus Rajewsky, M.D. *N Engl J Med* 1999; 341:1520–1529.
34. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, MA C, Lossos IS, et al. Distinct types of diffuse large B–cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000, 403: 503–511.
35. J.–C. Chomel, N. Sorel, C. Mayeur–Rousse, A.G. Turhan April 2009.

36. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2008; 22:3—13.
37. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951; 6:372—5.
38. Heisterkamp, N. *et al.* *Nature* 315, 758–761 (1985).
39. James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J. L., Constantinescu, S. N., Casadevall, N., Vainchenker, W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. 2005. *Nature* 434: 1144–1148.
40. Ross L. Levine^{1, 2, 11}, Martha Wadleigh^{2, 11}, Jan Cools⁶, Benjamin L. Ebert^{2, 8}, Gerlinde Wernig¹, Brian J.P. Huntly¹, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis Volume 7, Issue 4, April 2005, Pages 387–397.
41. Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J. R., Tichelli, A., Cazzola, M., Skoda, R. C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *New Eng. J. Med.* 2005. 352: 1779–1790.
42. 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.
43. F.X. Mahon, "Chronic myelogenous leukemic and tyrosine kinase inhibitors.", *REV MED IN*, 22(9), 2001.
44. Lukasova, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Kjeronska, J., Ryznar, L., Horakova, J., Krahlcova, E., and Horneck, G. (1997).

45. Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G. Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 2002;108:247—59.
46. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000; 96:3343—56.
47. Van Etten RA. Oncogenic signaling: new insights and controversies from chronic myeloid leukemia. *J Exp Med* 2007; 204:461—5.
48. Deutsch E, Dugray A, AbdulKarim B, Marangoni E, Maggiorella L, Vaganay S, et al. BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 2001;97:2084-90.
49. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 1999; 341:164—72.
50. Godon A, Dib M, Geneviève F, Ifrah N, Zandecki M. Découverte de blastes sanguins au décours de la polyglobulie de Vaquez. *Ann Biol Clin.* 2002; 60: 701-706.
51. Tefferi A, Solberg LA, Silverstein MN. A clinical update in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2000, 109: 141-149.
52. Axel Rüfer, Stefan Balabanov, Jeroen S. Goede. *Maladie de Vaquez* 2013.
53. Cao M, Randall J, Olsen, Zu Y. Polycythemia Vera, New clinicopathologic perspectives. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1126-1132.
54. Spivak J L. Polycythemia Vera: myths, mechanisms and management. *Blood* 2002, 100: 4272-4290.
55. Diehn F, Tefferi A. Pruritus in polycythaemia Vera: prevalence, laboratory correlates and management. *Br J Haematol.* 2001 ; 115 : 619-621.
56. Lamy O, Ciernik I. Maladie de Vaquez : une présentation inhabituelle. *Schweiz Med Wochenschr* 2000, 130: 523.

57. Means RT. Polycythemia Vera. In : Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM, eds. Wintrobe's Clinical Hematology, 10th edition. Volume 2. Baltimore : Williams et Wilkins, 1999 : 2374–2389.
58. Sébahoun G. Maladie de Vaquez. In : Hématologie clinique et biologique. Vélizy–Villacoublay : Arnette, 1998 : 221–225.
59. Pearson T C. Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia Vera. *Semin Hematol* 2001; 38 (Suppl. 2): 21–24.
60. Jaffe E S, Harris N L, Stein H, Vardiman J W. Eds. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. World Health Organisation Classification of Tumours. Vol 3, Lyon, France: IARC Press. 2001:32–34.
61. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med*. 2005; 11: 546–554.
62. Imbert M, Pierre R, Thiele J, Vardiman JW, Brunning RD, Flandrin G. Essential thrombocythaemia. In : Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. WHO classification tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon : IARC Press, 2001 : 39–41.
63. Cortelazzo S, Viero P, Finazzi G, D'Emilio A, Rodeghiero F, Barbui T. Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. *J Clin Oncol* 1990 ; 8 : 556–62.
64. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol* 1997; 34 : 29–39.

65. Schafer AI. Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Rev* 2001; 15: 159–66.
66. Michiels JJ. Platelet-mediated microvascular inflammation and thrombosis in thrombocythemia vera : a distinct aspirin-responsive arterial thrombophilia, which transforms into a bleeding diathesis at increasing platelet counts. *Pathol Biol (Paris)* 2003; 51: 167–75.
67. Hoffman R. Quality of life issues in patients with essential thrombocythemia and polycythemia Vera. *Semin Oncol* 2002; 29: 3–9.
68. Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders with: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol* 2003 ; 82 : 148–52.
69. BENCH AJ, CROSS NC, HUNTLY BJ, NACHEVA EP, GREEN AR. Myeloproliferative disorders. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, 2001, 14, 531–551.
70. Tefferi A, Solberg LA, Silverstein MN. A clinical update in polycythemia Vera and essential thrombocythemia. *Am J Med* 2000 ; 109 : 141–9.
71. Heuck G. Zwi Fälle von Leukämie mit eigenthümlichem blut-resp. Knochenmarksbefund. *Virch Arch A* 1879 ; 79 : 475–96.
72. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951 ; 6 : 372–6.
73. Dupriez B, Demory JL, Martyré MC, Bilhou-Nabera C, Le Bousse-Kerdilès MC, Praloran V. Métaplasie myéloïde primitive avec myélofibrose. In : *Hématologie*, 13011. *Encycl. Méd. Chir. Paris : Elsevier*, 13-011-B60, 2001, 12 p.
74. Dupriez B, Demory JL, Diagnostic et traitement de la splénomégalie myeloïde. *La revue du praticien* 2005 ; 55 : 1080–85.

75. Dupriez B, Morel P, Demory JL, et al. Prognostic factors in agnogenic meloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996 ; 88 : 1013–8.
76. Bousser J, Savoie JC. Les splénomégalias myéloïdes chroniques de l'adulte. *Sang* 1953 ; 24 : 772–803.
77. Bruno Varet. Livre de l'interne Hématologie 2ème édition 2003.
78. HARRISSON Médecine Interne Chapitre 109 14ème Edition – McGraw Hill–2001.
79. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292—302.
80. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079–88.
81. Ching–Hon Pui Childhood leukemias. Cambridge University Press 1999.
82. Valensi, F masterpod.univ–rennes La Leucémogénèse IMMUNO–HEMATO FONDAMENTALE et PATHOLOGIQUE. Octobre 2008.
83. Kebriaei P, Anastasi J, et al. (2002) Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Brest Pract Res Clin Heamatol*. 2002; 15:597–621.
84. Larsen C. Physiopathologie des leucémies aiguës : des avancées significatives *Bull Cancer* vol. 94, n° 10, octobre 2007.
85. Valensi, F .Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé *Encyclopédie Médico–Chirurgicale* 13–018–G–05.
86. Collège Français des Pathologistes (CoPath). 2012.
87. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al.: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: *Blood* 111 (12): 5446–56, 2008.

88. Poulain S, Wemeau M, Balkaran S, Hivert B, Hautecoeur A, Rossignol J, Fernandez J, Daudignon A, Roumier C, Soenen V, Lepelley P, Lai J.-L, Morel P, Leleu X. Macroglobulinémie de Waldenström. May 2010. Vol 31, Pages 385–394.
89. Voinchet H, Etienne G, Ghiringelli C.-B, Pellegrin J.-L, Viallard J.-F, Parrens M, Longy-Boursier M. Lymphomes spléniques de la zone marginale et auto-immunité : à propos de six cas. Volume 31, Issue 1, January 2010, Pages 4–11
90. Decaudin D. Lymphome du manteau : un modèle biologique et clinique EMC – Hématologie, Volume 1, Issue 3, August 2004, Pages 69–82.
91. Doyen C, Delos M, Michaux L, Bosly A. Lymphomes folliculaires. EMC – Hématologie, Volume 1, Issue 4, November 2004, Pages 83–105.
92. Thierry Jo Molina, Agnès Le Tourneau, Diane Damotte, Jacques Diebold, Josée Audouin. Pathologie moléculaire des lymphomes diffus à grandes cellules B : intérêt diagnostique et pronostique pour l’histopathologiste. Revue Francophone des Laboratoires, Volume 2011, Issue 428, January 2011, Pages 57–64.
93. Farhat N, Elloumi I, Moetamri R, Slama A, Ommezine M, Khochtali H. O 17–9 Les lymphomes de burkitt des maxillaires chez l’enfant : à propos de 7 cas Volume 106, Issue 4, Supplement 1, September 2005, Page 66.
94. Carrié E, Buzyn A, Fraitag S, Hermine O, Bodemer C. Mycosis fongoïde transformé chez un enfant : traitement par transplantation médullaire allogénique avec effet « graft-versus-lymphoma » Annales de Dermatologie et de Vénérologie, Volume 134, May 2007, Pages 471–476.
95. Drouet F, X. Cahu, Y. Pointreau, F. Denis, M.A. Mahé. Lymphome de Hodgkin. Cancer/Radiothérapie, Volume 14, November 2010, Pages S198–S209.

96. The Leukemia & Lymphoma Society (2006, October). Acute Lymphocytic Leukemia.
97. fiche du patient rédigée par les médecins de la société française d'hématologie mars 2009.
98. "Cytokine" in John Lackie. A Dictionary of Biomedicine. Oxford University Press. 2010.
99. "Cytokine" in Stedman's Medical Dictionary, 28th ed. Wolters Kluwer Health, Lippincott, Williams & Wilkins (2006).
100. Horst Ibelgaufts. Cytokines in Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia Version 31.4 (Spring/Summer 2013 Edition).
101. Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(18): 6934-6938.
102. Yawata, H., K. Yasukawa, et al. (1993). "Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130." *EMBO J* 12(4): 1705-1712.
103. de Vos, A. M., M. Ultsch, et al. (1992). "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex." *Science*. 255(5042): 306-312.
104. Leonard, W. J. and J. J. O'Shea (1998). "Jaks and STATs: biological implications." *Annu Rev Immunol* 16: 293-322.
105. Wang, X., P. Lupardus, et al. (2009). "Structural biology of shared cytokine receptors." *Annu Rev Immunol* 27: 29-60.
106. Krantz, S. B. (1991). "Erythropoietin." *Blood* 77(3): 419-434.

107. Zwezdaryk, K. J., S. B. Coffelt, et al. (2007). "Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 35(4): 640–652.
108. Arcasoy MO, Amin K, Chou SC, Haroon ZA, Varia M, Raleigh JA. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in head and neck cancer: relationship to tumor hypoxia. *Clin Cancer Res* 2005; 11:20–7.
109. Lacombe, C. and P. Mayeux (1998). "Biology of erythropoietin." *Haematologica* 83(8): 724-732.
110. Yoshimura, A., A. D. D'Andrea, et al. (1990). "Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11): 4139-4143.
111. Hilton DJ, Watowich SS, Murray PJ, Lodish HF. Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:190–4.
112. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001;8:1327–38.
113. Zucker-Franklin, D. and Kaushansky, K. (1996). Effect of thrombopoietin on the development of megakaryocytes and platelets: an ultrastructural analysis. *Blood* 88, 1632–8.
114. Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 86, 419–31.
115. Alexander, W. S. (1999). Thrombopoietin and the c-Mpl receptor: insights from gene targeting. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1027–35.
116. Kaushansky, K. (1998a). Thrombopoietin. *N Engl J Med* 339, 746–54.

117. Taga T and T Kishimoto 1997, gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15:797-819.
118. Scheller, J. and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." *Med Microbiol Immunol* 195(4): 173-183.
119. Hilbert, D. M., M. Kopf, et al. (1995). "Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms." *J Exp Med* 182(1):243-248.
120. Heinrich P C, Behrmann I et al 2003, principles of IL-6 type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J* 374.
121. Girasole, G., G. Passeri, et al. (1994). "Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development." *J Clin Invest* 93(4): 1516-1524.
122. Cherel M, Sorel M et al (1995), Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine IL-11, *Blood* 86(7) 2534-2540.
123. Du, X. and D. A. Williams (1997). "Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use." *Blood* 89(11): 3897-3908.
124. Saltzman A, Stone M, Franks C, Searfoss G, Munro R, Jaye M, Ivashchenko Y. Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:627-33.
125. Pritchard MA, Baker E, Callen DF, Sutherland GR, Wilks AF. Two members of the JAK family of protein tyrosine kinases map to chromosomes 1p31.3 and 9p24. *Mamm Genome*. 1992;3:36-8.
126. Wilks, A. F., A. G. Harpur, et al. (1991). "Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase related catalytic domain, define a new class of protein kinase." *Mol Cell Biol* 11(4): 2057-2065

127. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs : biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293–322.
128. G. manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam *Science* 6 December 2002: Vol. 298 no. 5600 pp. 1912–1934.
129. Levitzki A, Gazit A , *science* 1995 Mar 24;267(5205):1782–8.
130. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:3387–95.
131. Girault JA, Labesse G, Mornon JP, Callebaut I. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction. *Mol Med* 1998;4:751,69.
132. Funakoshi-Tago M, Pelletier S, Moritake H, Parganas E, Ihle JN. Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity. *Mol Cell Biol* 2008 ;28:1792–801 .
133. Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001;8:1327–38.
134. Clevenger, C. V. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 165, (2004), 1449–1460.
135. 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.
136. 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.

137. Vainchenker, W., Dusa, A., and Constantinescu, S.N. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 19, (2008), 385–393.
138. Noon–Song, E.N., Ahmed, C.M., Dabelic, R., Canton, J., and Johnson, H.M. Controlling nuclear JAKs and STATs for specific gene activation by IFN γ . *Biochem Biophys Res Commun* 410, (2011), 648–653.
139. 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 HP1 α from chromatin. *Nature* 461, (2009), 819–822.
140. 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.
141. Li, W.X. Canonical and non–canonical JAK–STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18, (2008), 545–551.
142. 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.
143. Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, (2004), 1281–1283.
144. Stephanou, A., and Latchman, D.S. Opposing actions of STAT–1 and STAT–3. *Growth Factors* 23, (2005) , 177–182.
145. Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15,(2005) , 146–155.
146. Geest, C.R., and Coffey, P.J. MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 86, (2009), 237–250.

147. 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.
148. Valentino, L., and Pierre, J. (2006). JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol* 71, 713–721.
149. Ward, A.C., Touw, I., and Yoshimura, A. (2000). The Jak–Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19–29.
150. Piessevaux, J., Lavens, D., Peelman, F., and Tavernier, J. (2008). The many faces of the SOCS box. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 371–381.
151. Shuai, K. (2006). Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res* 16,196–202.
152. Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U., and Pfeffer, K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 93, (1998), 397–409.
153. 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.
154. Kiladjiana, J.J., Casadevallb, N., Vainchenker, W., Fenaux, P. The first international meeting on V617F JAK2 mutation and its relevance in Philadelphia–negative myeloproliferative disorders 55, (2007) , 85–87.
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.

156. Dusa, A., J. Staerk, et al. (2008). "Substitution of pseudokinase domain residue Val-617 by large non-polar amino acids causes activation of JAK2. *Biol Chem* 283(19):12941–12948.
157. Scott, LM., Tong, W., Levine, RL., *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 356, (2007), 459–68.
158. Yoo, J. H., T. S. Park, et al. (2009). "JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera a case study and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 189(1):43–47.
159. 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.
160. 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.
161. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like.
162. 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.
163. 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.

- 164.** Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006;108:1377–80.
- 165.** Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002; 277:47954,63.
- 166.** Lindauer K, Loerting T, Liedl KR, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng* 2001;14:27,37.
- 167.** Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, WP., Lee, S., Roberts, TM., et al. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* 17, (1997), 1562–71.
- 168.** 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.
- 169.** Oku, S., Takenaka, K, Kuriyama, T, Shide, K, Kumano, T, Kikushige, Y., Urata, S., Yamauchi, T., Iwamoto, C., Shimoda, H.K., et al. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150, (2010), 334–344.
- 170.** Lu, X., Levine, R., Tong, W., Wernig, G., Pikman, Y., Zarnegar, S., Gilliland, D.G., and Lodish, H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, (2005), 18962–18967.

171. 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.
172. 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.
173. Dupont, S., Masse, A., James, C., Teyssandier, I., Lecluse, Y., Larbret, F., Ugo, V., Saulnier, P., Koscielny, S., Le Couedic, J.P., et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* 110, (2007), 1013–1021.
174. Anand, S., Stedham, F., Beer, P., Gudgin, E., Ortmann, C.A., Bench, A., Erber, W., Green, A.R., and Huntly, B.J. Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood* 118, (2011), 177–181.
175. 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.
176. De Maria, R., Zeuner, A., Eramo, A., Domenichelli, C., Bonci, D., Grignani, F., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Testa, U., and Peschle, C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase–mediated cleavage of GATA–1. *Nature* 401, (1999), 489–493.

177. Zeuner, A., Pedini, F., Signore, M., Ruscio, G., Messina, C., Tafuri, A., Girelli, G., Peschle, C., and De Maria, R. Increased death receptor resistance and FLIPshort expression in polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood* 107, (2006), 3495–3502.
178. Gozgit, J.M., Bebernitz, G., Patil, P., Ye, M., Parmentier, J., Wu, J., Su, N., Wang, T., Ioannidis, S., Davies, A., et al. Effects of the JAK2 inhibitor, AZ960, on Pim/BAD/BCL-xL survival signaling in the human JAK2 V617F cell line SET-2. *J Biol Chem* 283, (2008), 32334–32343.
179. Balduini, A., Badalucco, S., Pugliano, M.T., Baev, D., De Silvestri, A., Cattaneo, M., Rosti, V., and Barosi, G. In vitro Megakaryocyte differentiation and proplatelet formation in Ph-negative classical myeloproliferative neoplasms: distinct patterns in the different clinical phenotypes. *PLoS One* 6, (2011), e21015.
180. Walz, C., Crowley, B.J., Hudon, H.E., Gramlich, J.L., Neuberg, D.S., and Podar, K. Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J Biol Chem* 281, (2006), 18177–18183.
181. Plo, I., Nakatake, M., Malivert, L., de Villartay, J.P., Giraudier, S., Villeval, J.L., Wiesmuller, L., and Vainchenker, W. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 112, (2008), 1402,1412.
182. Jones AV, Kreil S, Zoi K, *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005 ; 106 : 2162–8.
183. Speletas M , Katodritou E , Daiou C , Mandala E , Papadakis E , Kioumi A et al. Correlations of JAK2–V617F mutation with clinical and laboratory findings in patients with myeloproliferative disorders 2007 Aug;31(8):1053 ,62.

- 184.** A. Benmoussa , H. Dehbi , S. Fehri , A. Quessar , S. Nadifi : JAK2– V617F mutation in Moroccan patients with myeloproliferative disorders: Contribution, diagnosis and therapeutic prospects, *Pathologie Biologie* 59 (2011) ,e89–e92.
- 185.** Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14—22.
- 186.** Levine, RL., Loriaux, M., Huntly, BJ., Loh, ML., Beran, M., Stoffregen, E., et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106, (2005) , 3377– 9.
- 187.** Steensma, DP., Dewald, GW., Lasho, TL., Powell, HL., McClure, RF., Levine, RL., Gilliland, DG., et Tefferi, A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* 106 , (2005) ,1207–1209.
- 188.** Jones, A.V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., Score, J., Seear, R., Chase, A.J., Grand, F.H., White, H., Zoi, C., Loukopoulos, D., Terpos, E., Vervessou, E.C., Schultheis, B., Emig, M., Ernst, T., Lengfelder, E., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Oscier, D., Silver, R.T., Reiter, A. & Cross, N.C. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106, (2005) , 2162–2168.
- 189.** Lim, KH., Tefferi, A., Lasho, TL., Finke, C., Patnaik, M., Butterfield, JH., et al. Systemic mastocytosis in 342 consecutive adults: survival studies and prognostic factors. *Blood* 113, (2006), 5727–36.
- 190.** Lippert, E. La détection des mutations de JAK2 .Correspondances en Onco-hématologie – Vol. III – n° 3, (2008), 153–4.

191. Tefferi, A. Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2 V617F Era. ASH educational book, (2006), 240–5.
192. Pardanani A. JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia* 2008;22:23–30.
193. Alfonso Quintás–Cardama* Department of Leukemia, Division of Cancer Medicine, M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA.
194. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. Consistent benefit of ruxolitinib over placebo in spleen volume reduction and symptom improvement across subgroups and overall survival advantage: results from COMFORT–I. *Blood* 2011;118 [abstract 278].
195. Harrison, C et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* (2012) ; 366, 787–798, doi:10.1056/NEJMoa1110556.
196. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Gisslinger H, Passamonti F, Al–Ali HK, Sirulnik LA, et al. Reductions in JAK2V617F allele burden with ruxolitinib treatment in COMFORT–II, a phase III study comparing the safety and efficacy of Ruxolitinib to best available therapy (BAT). *J Clin Oncol* 2012;30.
197. Oehler L, Jaeger E, Eser A, Sillaber C, Gisslinger H, Geissler K. Imatinib mesylate inhibits autonomous erythropoiesis in patients with polycythemia vera in vitro. *Blood* 2003; 102:2240–2.
198. Silver RT. Imatinib mesylate (Gleevec(TM)) reduces phlebotomy requirements in polycythemia vera. *Leukemia* 2003;17:1186–7.
199. Campbell, PJ., Scott, LM., Buck, G., et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status : a prospective study. *Lancet* (2005) ; 366 , 1945–53.

200. Vannucchi, AM., Barbui, T. Thrombocytosis and thrombosis. Hematology Am Soc Hematol Educ Program (2007) ; 363–70.
201. Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V., Boiret-Dupre´, N., Skoda, R.C. & Hermouet, S. The JAK2– V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood, 108, (2006), 1865–1867.
202. Wautier, MP., El Nemer, W., Gane, P., et al. Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin alpha5 chain and Lu/BCAM. Blood (2007) ; 110,894,901.
203. Arellano-Rodrigo, E., Alvarez-Larrán, A., Reverter, JC., Villamor, N., Colomer, D., Cervantes, F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. Haematologica(2006);91,169, 75.
204. Robertson, B., Urquhart, C., Ford, I., Townend, J., Watson, HG., Vickers, MA., Greaves, M. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases : relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. J Thromb Haemost (2007); 5, 1679–85.
205. Tefferi, A., Strand, JJ., Lasho, TL., et al. Respective clustering of unfavorable and favorable cytogenetic clones in myelofibrosis with myeloid metaplasia with homozygosity for JAK2(V617F) and response to erythropoietin therapy. Cancer (2006) ; 106 , 1739–43.
206. Campbell, PJ., Griesshammer, M., Dohner, K., et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. Blood (2006) ; 107 , 2098–100 ; (Epub 05 Nov 17).

207. Barosi, G., Bergamaschi, G., Marchetti, M., et al. JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. *Blood* (2007) ; 110, 4030–6 ; (Epub 2007 Aug 21).
208. Kiladjian, JJ., Cassinat, B., Turlure , P., et al. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha–2a. *Blood* (2006) ; 108 , 2037–40 ; (Epub 06 May 18).
209. Kroger, N., Badbaran, A., Holler, E., et al. Monitoring of the JAK2 V617F mutation by highly sensitive quantitative real–time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* (2007) ; 109, 1316–21 ; (Epub 2006 Oct 3).
210. Koichi Takahashi,^{1,2} Keyur P. Patel,³ Hagop Kantarjian,⁴ Rajyalakshmi Luthra,² Sherry Pierce,⁴ Jorge Cortes,⁴ and Srdan Verstovsek : JAK2 p.V617F detection and allele burden measurement in peripheral blood and bone marrow aspirates in patients with myeloproliferative neoplasms. *BLOOD*, 28 NOVEMBER 2013 x VOLUME 122, NUMBER 23.
211. TS Larsen^{1,2}, N Pallisgaard², MB Møller² and HC Hasselbalch : Quantitative assessment of the JAK2 V617F allele burden: equivalent levels in peripheral blood and bone marrow. *Leukemia* (2008) 22, 194–195; doi:10.1038/sj.leu.2404861; published online 12 July 2007.

ANNEXES

ANNEXE 1

Fiche d'exploitation

Numéro du dossier :

Identité :

Nom et prénom :

Sexe :

Age :

Motif d'hospitalisation/ de consultation :

Diagnostic retenu :

Etude génétique demandée :

Mutation JAK2 V617F :

ANNEXE 2

Composition des produits utilisés

1. Solutions utilisées pour extraction d'ADN par sel :

Lyse des hématies : TE 20/5 :

- 20ml de Tris-HCl, pH 7.6, 1M
- 10ml d'EDTA disodique, pH 8, 0.5M
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 1l

Lyses des globules blancs :

- 10ml de Tris-HCl, pH 7.6, 1M.
- 20ml d'EDTA disodique, pH 8, 0.5M.
- 20ml de SDS 10% (Sodium Dodécyl Sulfate).
- 10ml de NaCl.
- Protéinase K.

Dénaturation et précipitation des protéines :

- NaCl 5M.

Précipitation de l'ADN et lavage :

- Ethanol 100%.
- Ethanol 75%.
- Eau stérile

Solutions de conservation de la méduse d'ADN (200ml) TE 10/1:

- 2ml de Tris-HCl, pH 7.6, 1M.
- 400µl d'EDTA disodique, pH 8, 0.5M.
- Compléter jusqu'à 200ml d'eau distillée.

2. Mélange réactionnel de PCR allèle spécifique (JAK2) :

MIX	V/tube
Tampon Gold	2.5µl
MgCl ₂	2µl
Dntp	2µl
JAK2-AS-1R	2,5µl
JAK2-AS-1F	1,25µl
JAK2-IC-1F	1,25µl
Taq Gold Polymerase	0,1 µl
H ₂ O	8,5µl
Total MIX	20µl
+AND(20ng/µl	5µl

3. Amorces utilisées pour la PCR :

Amorce F allèle spécifique : JAK2-AS-1F 5' AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG
TAT ATT3'

Amorce F allèle sauvage : JAK2-WT-1F 5' AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG
TAT ATG3'

Amorce F contrôle interne : JAK2-IC-1F 5' ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG
AGA AAG3'

Amorce R commune : JAK2-AS-1R 5' CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA
GTT TCA3'

4. Programme PCR JAK2-ADN :

Température	Temps
95 °C	7 min
94 °C	30 s
58 °C	1 min
72 °C	1 min
72 °C	10 min
18 °C	∞

5. Conditions de migration des produits PCR :

Gel	Agarose 2%
Dépôt	10µl
Migration	130V 140 min

6. Tailles attendues des bandes :

PCR contrôle interne	364 pb
PCR allèle spécifique	203 pb