

ANNEE: 2013

THESE N°: 78

**LA MUTATION JAK2 V617F :
TECHNIQUES DE RECHERCHE
ET APPLICATIONS**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. Amal LAABYECH

Née le 13 Octobre 1986 à Salé

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: JAK2 V617F – Protéine JAK2 – Syndromes myélo-prolifératifs
BCR-ABL négatifs – Inhibiteurs du JAK2

JURY

Mr. A. BELMEKKI

Professeur d'Hématologie Biologique

Mme. N.MESSAOUDI

Professeur Agrégé d'Hématologie Biologique

Mme. S. TELLAL

Professeur de Biochimie

Mr. A. MASRAR

Professeur d'Hématologie Biologique

Mme. S. EL HAMZAOU

Professeur de Microbiologie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما
علمتنا إنك أنت العليم الحكيم

صَلَّى
الْحَقَّ

سورة البقرة: الآية: 31





17 JUIN 2013

UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : **Professeur Abdelmalek FARAJ**
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Jamal TAOUFIK
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
Pr. BENSOUA Mohamed Anatomie
Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique
Pr. LAHBABI Naïma Physiologie

Novembre 1983

Pr. BELLAKHDAR Fouad Neurochirurgie
Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI Rhumatologie

Décembre 1984

Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil
Pr. MAAOUNI Abdelaziz
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
Pr. SETTAF Abdellatif

Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima
Pr. BENSAID Younes
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
Pr. IRAQI Ghali

Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie
Pneumo-phtisiologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYA OUI Mohamed

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed
Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie
Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

Pr. ADN AOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda
Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine Interne
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Neurologie
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia	Anatomie-Pathologique
Pr. AZZOUZI Abderrahim	Anesthésie Réanimation
Pr. BAYAHIA Rabéa	Néphrologie
Pr. BELKOUCHI Abdelkader	Chirurgie Générale
Pr. BENABDELLAH Chahrazad	Hématologie
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif	Chirurgie Générale
Pr. BENSOUDA Yahia	Pharmacie galénique
Pr. BERRAHO Amina	Ophtalmologie
Pr. BEZZAD Rachid	Gynécologie Obstétrique
Pr. CHABRAOUI Layachi	Biochimie et Chimie
Pr. CHERRAH Yahia	Pharmacologie
Pr. CHOKAIRI Omar	Histologie Embryologie
Pr. JANATI Idrissi Mohamed*	Chirurgie Générale
Pr. KHATTAB Mohamed	Pédiatrie
Pr. SOULAYMANI Rachida	Pharmacologie
Pr. TAOUFIK Jamal	Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed	Chirurgie Générale
Pr. BENSOUDA Adil	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
Pr. DAOUDI Rajae	Ophtalmologie
Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
Pr. JIDDANE Mohamed	Anatomie
Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine	Gynécologie Obstétrique
Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

Pr. AGNAOU Lahcen	Ophtalmologie
Pr. BENCHERIFA Fatiha	Ophtalmologie
Pr. BENJAAFAR Nouredine	Radiothérapie
Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
Pr. CAOUI Malika	Biophysique
Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques

Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. EL IDRISSE Lamghari Abdennaceur
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. BEDDOUCHE Amocrane*
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSE KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbas

Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale

Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. FERHATI Driss
Pr. HASSOUNI Fadil
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOSSI Ahmed
Pr. IBRAHIMY Wafaa
Pr. MANSOURI Aziz
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Oto-Rhino-Laryngologie
Gynécologie Obstétrique
Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOVAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. MOULINE Soumaya
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-ptisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN AMAR Abdesselem
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. DERRAZ Said
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Noureddine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. NAZI M'barek*
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Urologie
Neurologie
Radiologie
Neurochirurgie
Pédiatrie
Cardiologie
Radiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Cardiologie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Gastro-Entérologie
Neurologie
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENCHERIF My Zahid
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHAOUI Zineb
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. EL OTMANY Azzedine
Pr. HAMMANI Lahcen
Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. BENCHEKROUN Nabih
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie

Pr. EL IDGHIRI Hassan
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi

Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Traumatologie Orthopédie
Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil
Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BELMEKKI Mohammed
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouada
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BENYOUSSEF Khalil
Pr. BERRADA Rachid
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUHOUCHE Rachida
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. CHELLAOUI Mounia
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL MOUSSAIF Hamid
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. GOURINDA Hassan
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Ophtalmologie
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Dermatologie
Gynécologie Obstétrique
Rhumatologie
Anatomie
Cardiologie
Radiologie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique

Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL BARNOUSSI Leila
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. EL MANSARI Omar*
Pr. ES-SADEL Abdelhamid
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HADDOUR Leila
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. ISMAEL Farid
Pr. JAAFAR Abdeloïhab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. LAGHMARI Mina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
Pr. NAITLHO Abdelhamid*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Gynécologie Obstétrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie

Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*
Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KARMANE Abdelouahed
Pr. KHABOUZE Samira
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. SASSENOU ISMAIL*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie

Pr. BENHALIMA Hanane
Pr. BENHARBIT Mohamed
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZAOUI Sakina
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. KARIM Abdelouahed
Pr. KENDOUCI Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
Pr. ZERAIDI Najia

Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Ophtalmologie
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie
Pédiatrie
Radiologie
Ophtalmologie
Cardiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal
Pr. ESSAMRI Wafaa
Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. GHADOUANE Mohammed*
Pr. HARMOUCHE Hicham
Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
Pr. IDRIS LAHLOU Amine
Pr. JROUNDI Laila
Pr. KARMOUNI Tariq

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Gastro-entérologie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Urologie
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation
Microbiologie
Radiologie
Urologie

Pr. KILI Amina
Pr. KISRA Hassan
Pr. KISRA Mounir
Pr. LAATIRIS Abdelkader*
Pr. LMIMOUNI Badreddine*
Pr. MANSOURI Hamid*
Pr. OUANASS Abderrazzak
Pr. SAFI Soumaya*
Pr. SEKKAT Fatima Zahra
Pr. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saïda*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Psychiatrie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leïla
Pr. ACHOUR Abdessamad*
Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
Pr. AMHAJJI Larbi*
Pr. AMMAR Haddou
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed*
Pr. BALOUCH Lhousaine*
Pr. BENZIANE Hamid*
Pr. BOUTIMZIANE Nourdine
Pr. CHARKAOUI Naoual*
Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
Pr. ELABSI Mohamed
Pr. EL BEKKALI Youssef*
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GANA Rachid
Pr. GHARIB Noureddine
Pr. HADADI Khalid*
Pr. ICHOU Mohamed*
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
Pr. LOUZI Lhoussain*
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MAHI Mohamed*
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Traumatologie orthopédie
ORL
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Chirurgie cardio vasculaire
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Neuro chirurgie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Anesthésie réanimation
Microbiologie
Réanimation médicale
Radiologie
Pneumo phtisiologie
Hématologique

Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
Pr. MOUTAJ Redouane *
Pr. MRABET Mustapha*
hygiène
Pr. MRANI Saad*
Pr. OUZZIF Ez zohra*
Pr. RABHI Monsef*
Pr. RADOUANE Bouchaib*
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine*
Pr. SIFAT Hassan*
Pr. TABERKANET Mustafa*
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour*
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
Pr TAHIRI My El Hassan*

PROFESSEURS AGREGES :

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
Pr. AGDR Aomar*
Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
Pr. AKHADDAR Ali*
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMAHZOUNE Brahim*
Pr. AMINE Bouchra
Pr. AZENDOUR Hicham*
Pr. BELYAMANI Lahcen*
Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae*
Pr. BOUI Mohammed*
Pr. BOUNAIM Ahmed*
Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
Pr. CHAKOUR Mohammed *
Pr. CHTATA Hassan Toufik*
Pr. DOGHMI Kamal*
Pr. EL MALKI Hadj Omar

Anesthésier réanimation
Parasitologie
Médecine préventive santé publique et

Virologie
Biochimie-chimie
Médecine interne
Radiologie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Chirurgie vasculaire périphérique
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale

Médecine interne
Pédiatre
Chirurgie Générale
Neurologie
Neuro-chirurgie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Rhumatologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie
Chirurgie Générale
Traumatologie orthopédique
Hématologie biologique
Chirurgie vasculaire périphérique
Hématologie clinique
Chirurgie Générale

Pr. EL OUENNASS Mostapha*
Pr. ENNIBI Khalid*
Pr. FATHI Khalid
Pr. HASSIKOU Hasna *
Pr. KABBAJ Nawal
Pr. KABIRI Meryem
Pr. KADI Said *
Pr. KARBOUBI Lamya
Pr. L'KASSIMI Hachemi*
Pr. LAMSAOURI Jamal*
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. MESKINI Toufik
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
Pr. ZOUHAIR Said*

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. BOUAITY Brahim*
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. CHERRADI Ghizlan
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. LEZREK Mounir
Pr. MALIH Mohamed*
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Moutassir*
Pr. NAZIH Mouna*
Pr. RAISSOUNI Zakaria*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Microbiologie
Médecine interne
Gynécologie obstétrique
Rhumatologie
Gastro-entérologie
Pédiatrie
Traumatologie orthopédique
Pédiatrie
Microbiologie
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Pédiatrie
Hématologie biologique
Chirurgie Générale
Radiologie
Cardiologie
Pneumo-phtisiologie
Microbiologie

Anesthésie réanimation
Médecine interne
Physiologie
ORL
Microbiologie
Médecine aéronautique
Cardiologie
Biochimie chimie
Radiologie
Chirurgie pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie plastique et réparatrice
Urologie
Gastro entérologie
Anatomie pathologique
Ophtalmologie
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie générale
Hématologie
Traumatologie Orthopédie
Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. Abdelouahed AMRANI
Pr. ABOUELALAA Khalil*
Pr. Ahmed JAHID
Pr. BELAIZI Mohamed*
Pr. BENCHEBBA Drissi*
Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. Mouna EL ALAOUI MHAMDI
Pr. Mounir ER-RAJI
Pr. RAISSOUNI Maha*

Chirurgie Pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Traumatologie Orthopédique
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Chirurgie Pédiatrique
Cardiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

Pr. ABOUDRAR Saadia
Pr. ALAMI OUHABI Naima
Pr. ALAOUI KATIM
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
Pr. ANSAR M'hammed
Pr. BOUHOUCHE Ahmed
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
Pr. BOURJOUANE Mohamed
Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
Pr. DAKKA Taoufiq
Pr. DRAOUI Mustapha
Pr. EL GUESSABI Lahcen
Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Génétique Humaine
Applications Pharmaceutiques
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biotechnologie
Biologie
Chimie Organique
Biochimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

**Enseignants Militaires*

Mise à jour le 02/05/2013



Dédicaces





« A la mémoire de mes grands pères :

Qu'ALLAH, tout puissant, ait leurs âmes en sa sainte miséricorde »

A mes chers parents :

Pour l'affection dont ils m'ont toujours comblé et les sacrifices infinis qu'ils n'ont cessé de consentir, avec abnégation, pour mon éducation. Veuillez trouver à travers ce modeste travail, l'expression de mon amour et mon respect les plus sincères. Qu'ALLAH puisse vous accorder une longue vie pleine d'amour, de bonheur et de paix.

A toute ma grande famille :

En reconnaissance des soutiens et encouragements. Que ce travail soit un témoignage de mon amour, ma gratitude et mon respect.

A ma Sœur et mon Frère :

Avec tous mes vœux de réussite et de bonheur, avec tout mon attachement et ma tendresse.

A toute la famille MOUNIM.

A Ilias MARMOUZI :

*Tu es quelqu'un de très sympathique,
garde ta joie de vivre et ce sourire qui te va si bien !*





A mes meilleurs amies

*(Kanza, lamiae, Aicha, Amal, hajiba, sanae,
najlae, zahra, hajar, zineb, latifa, safae...etc)*

que ce travail soit le témoignage de nos beaux souvenirs.

*A tous les amis pharmaciens de la promotion 2008/2009
de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat*

A Dr. Alban gildas colman zohoun,

Pour ta gentillesse et ta disponibilité.

*Je te suis très reconnaissante de tout ce que tu m'as appris
et de tous les conseils que tu m'as donnés tout au long de cette thèse.*

Je te souhaite tout plein de belles choses pour l'avenir.



Remerciements



*En préambule à ce mémoire nous remerciant
ALLAH qui nous aide et nous donne la patience
et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Ces remerciements vont tout d'abord
au corps professoral et administratif de la Faculté
de médecine et de pharmacie de RABAT,
pour la richesse et la qualité de leur enseignement
et qui déploient de grands efforts pour assurer
à leurs étudiants une formation actualisée*

À notre maitre et président de thèse

Monsieur le Professeur

Abdelkader BELMEKKI

*C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de
présider le jury de notre thèse.*

*Permettez nous Maitre de vous témoigner ici notre profonde
gratitude et notre respect.*

*Veillez accepter cher Maitre nos vifs remerciements pour la
présence et la sympathie dont vous avez fait preuve.*

Maître et Rapporteur de Thèse

Madame le Professeur

Nezha MESSAOUDI

*C'est un grand honneur que vous nous avez fait en acceptant
d'être le rapporteur de notre thèse.*

*Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail et vous avez su nous
guider avec simplicité et gentillesse jusqu'à sa réalisation.*

*Votre bonté et votre rigueur de travail resteront pour le meilleur
exemple.*

*Veillez accepter chère maitre nos vifs remerciements pour l'aide
et la compréhension que vous nous avez apporté durant
l'élaboration de ce travail.*

À notre maitre et juge de thèse

Madame le Professeur

Sakina EL HAMZAOUI

*Votre assistance parmi les membres du jury de thèse nous honore
beaucoup.*

Votre qualité d'enseignement nous a énormément imprégnés.

Votre sympathie et votre gentillesse

*Nous encouragent et nous incite d'avantage à vouloir puiser de
votre savoir.*

*Permettez-nous chère professeur de vous exprimer nos
remerciements les plus sincères*

À notre maître et juge de thèse

Monsieur le Professeur

Azz Larab MESSRAR

*Votre assistance parmi les membres de notre jury de thèse nous
honore.*

*Croyez cher professeur en notre sincère gratitude et pour l'estime
qu'on vous porte.*

*Nous vous exprimons nos plus vifs remerciements et nous vous
prions de trouver, ici, le témoignage de notre reconnaissance
et notre profond respect.*

À notre maître et juge de thèse

Madame le Professeur

Saida TELLAL

*Votre assistance parmi les membres de notre jury de thèse nous
honore.*

*Croyez chère professeur en notre sincère gratitude et pour l'estime
qu'on vous porte.*

*Nous vous exprimons nos plus vifs remerciements et nous vous
prions de trouver, ici, le témoignage de notre reconnaissance et
notre profond respect.*

ILLUSTRATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARMS : Système de Mutation Réfractaire par Amplification

ASXL1: Additional sex comb-like 1

BCL: B-cell CLL/lymphoma 2

Bcl-XL: BCL2-like 1

BCR-ABL: Break Cluster Region-Abelson

BFU-E: Burst Forming Unit - Erythroid

BOM : biopsie ostéo-médullaire

CBL : Casitas B lymphoma

c-FLIP short : FLICE-like inhibitory protein

EGF: epidermal growth factor

EPO: érythropoïétine

EPO-R : le récepteur à l'érythropoïétine

ERK: Extracellular signal Regulated Signal

EZH: Enhancer of Zeste homolog

FERM: Four-point one, Ezrin, Radixine, Moesin

FIP1L1-PDGFR α : Fip1-like-1 fused with platelet derived growth factor receptor alpha

Gab: Grb2-associated binder

G-CSF-R : récepteur du facteur de croissance granulocytaire

GM-CSF: Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

HP1: Heterochromatin protein 1

dHPLC : Chromatographie Liquide dénaturante à Haute Performance

HRM: High Resolution Melting

IFN: interféron

IGF : Insuline Like Growth Factor

IL-R : récepteur à l'interleukine

IRS: Insulin Receptor Substrat

JAK: Just an another kinase ,JANUS KINASE

JH: JAK Homology

JNKs: c-Jun N-terminal Kinase

Jun: oncogene *JUN*, alias *API*

KIR: kinase inhibitory region

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LMC : Leucémies Myéloïde Chronique

LMMC :Leucémie Myélomonocytaire Chronique

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MTOC : microtubule organizing complex

dNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

NFS : numération formule sanguine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDK: phosphatidylinositol -dependent kinase

PG : Polyglobulie

PH: Plextrin Homology

PIAS: protein inhibitors of activated STAT

PI3K: Phosphatidyl Inositol 3 Kinase

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

PMF: myélofibrose primitive

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

PTP : Protein Tyrosine Phosphatases

PV : polyglobulie de Vaquez

PVSG: Polycythemia Vera Study Group

RARS-T: Refractory anemia with ring sideroblasts and thrombocytosis

RSK: Ribosomal s6 kinase

SCF: stem cell factor

SHP : SH2-domain containing Phosphatase

SMP : syndromes myéloprolifératifs

SOCS: suppressor of cytokine signaling

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TC-PTP : T cell protein tyrosine phosphatase

TE : thrombocytémie essentielle

TET2: Ten Eleven Translocation 2

mTORC: mTOR complex 2

TPO: Thrombopoïétine

TYK: tyrosine Kinase

Tyr-P: tyrosines phosphorylées

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VGI : volume globulaire isotopique

SMD : syndrome myélodysplasique

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
1	Structure de la protéine JAK2	13
2	L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines.	17
3	Principales voies de signalisation activées par le complexe JAK2/récepteur aux cytokines	19
4	l'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK.	21
5	Schématisation des trois groupes majeurs de MAPKs et de leur signalisation	23
6	A. Structure des protéines impliquées dans la régulation négative de la voie JAK/STAT	25
	B. Régulation négative de la voie JAK/STAT par les phosphotyrosines phosphatases.	
	C. Régulation négative de la voie JAK/STAT par les SOCS et les PIAS.	
	D. SOCS1 cible JAK2 vers une dégradation par le protéasome .	
7	Voie de signalisation JAK/STAT non canonique	33
8	Structure de la mutation JAK2 V617F et de la protéine JAK2 sauvage	37
9	La protéine JAK2 mutée entraîne une hypersensibilité à l'érythropoïétine in vitro et une polyglobulie in vivo.	42
10	Implication de JAK2V617F dans la régulation épigénétique.	47
11	fréquences des anomalies moléculaires détectées au diagnostic dans la PV	54
12	L'analyse des courbes de fusion pour la détection de la mutation JAK2 c. 1849 G> T.	68
13	la démarche diagnostique devant un syndrome myéloprolifératif	84
14	Charge mutationnelle et homo- ou hétérozygotie	24

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°	Titre	Page
I	Approches diagnostiques pour la détection de la mutation JAK2 V617F.	58
II	Prévalence de la mutation JAK2 V617F dans les SMP.	72
III	Fréquence des mutations de JAK2 et MPL dans les hémopathies malignes.	76
IV	Variantes Non-V617F de JAK2 exon 14.	78
V	Fréquence de la mutation JAK2 V617F dans les SMP au Maroc.	80
VI	Critères diagnostiques OMS 2008 des SMP en dehors de LMC	86
VII	Données initiales et thromboses	91
VIII	Liste des principales médicaments inhibant les JAKs en étude clinique pour le traitement des SMP	101

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
MATERIEL ET METHODES : SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES	4
1. Recherche documentaire	5
2. Recherche bibliographique	5
3. Sélection	6
4. Exclusion	6
RESULTATS ET DISCUSSION	7
CHAPITRE I : HISTORIQUE	8
CHAPITRE II : LA JANUS KINASE 2 (JAK2)	11
II.1 DEFINITION	12
II.2 STRUCTURE	12
II.3 FONCTIONS	14
II.3.1 Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines	15
II.3.2 La voie JAK/STAT canonique	20
II.3.3 La voie PI3K/Akt	22
II.3.4 La voie des MAPKs	22
II.4 LES REGULATEURS NEGATIFS	24
II.4.1 Les phosphotyrosines phosphatases	24
II.4.2 Les SOCS	28
II.4.3 Les PIAS	30
II.5. LES FONCTIONS DE JAK2 DANS LA REGULATION EPIGENETIQUE	31

II.6 LE DEFICIT EN JAK2	34
CHAPITRE III : LA MUTATION JAK2 V617F	35
III.1 DESCRIPTION DE LA MUTATION JAK2 V617F.....	36
III.2 EFFETS DE LA MUTATION V617F SUR LA PROTEINE JAK2	38
III.2.1 Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines.....	38
III.2.1.1 L'activation constitutive des voies de signalisation canoniques	39
III.2.1.2 La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique	43
III.2.1.3 L'altération du rétrocontrôle négatif.....	44
III.2.1.4 La régulation croisée du récepteur à l'IGF.....	45
III.2.2 L'impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique	46
III.2.3 L'impact de la mutation sur la localisation de JAK2.....	48
III.2.4 L'impact cellulaire de la mutation.....	49
III.2.4.1 L'avantage de survie	49
III.2.4.2 L'avantage prolifératif	51
III.2.4.3 JAK2 V617F et dommages de l'ADN	52
III.2.4.4 JAK2 V617F et microenvironnement.....	52
III.2.4.5 La JAK2 V617F et les autres mutations du JAK2.....	53
CHAPITRE IV : LA RECHERCHE DE LA MUTATION JAK2 V617F	55
AU LABORATOIRE	55
IV.1 LA PHASE PRE-ANALYTIQUE	56
IV.1.1 Type de l'échantillon.....	56
IV.1.2 Faut-il isoler les granulocytes du sang périphérique ?.....	57
IV.1.3 Le choix de l'acide nucléique.....	59
IV.2 LA PHASE ANALYTIQUE.....	60
IV.2.1 Techniques	60
IV.2.2 Le choix du test	61

IV.2.3 Les caractéristiques des techniques et des tests de diagnostic:	62
IV.2.3.a. Le séquençage direct de l'ADN	62
IV.2.3.b. PCR Allèle-spécifique (Amplification Refractory Mutation système (ARMS).	64
IV.2.3.c. PCR en temps réel et de l'ADN de fusion Curve.....	65
IV.2.4. Place de la quantification de JAK2 V617F au diagnostic.....	69
IV.2.5 Les Considérations relatives à la validation d'un test de détection de JAK2 V617	69
IV-3 PHASE POST-ANALYTIQUE.....	73
VI.3.1 Comment interpréter les résultats :	73
IV.3.2 Interprétation des mutations V617F JAK2 bas niveau au moment du diagnostic	74
IV.3.3 Les faux positifs	75
IV.3.4 Les faux faibles niveaux	77
CHAPITRE V : MUTATION JAK2 V617F ET PATHOLOGIES	79
V.1 LA MUTATION JAK2 V617F ET SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS (SMP).....	80
V.1.1. Recherche à visée diagnostique	80
a-Dans les polyglobulies.....	81
b-Dans les thrombocytoses	82
c-En cas de suspicion de myélofibrose.....	82
V.1.2. Place de la mutation JAK2 V617F dans la classification OMS 2008 des SMP en dehors de la LMC (tableau VI).....	85
a- Diagnostic de la polyglobulie de Vaquez (PV).....	87
b - Diagnostic de la myélofibrose primitive	87
c- Diagnostic de thrombocytémie essentielle.....	88
V.1.3 Influence de la mutation JAK2 V617F sur le risque thrombotique.....	89
V.1.4 Intérêt pronostique de la recherche de la mutation JAK2 V617F	92
V.1.5 Pour le suivi thérapeutique	96

V.2 LES AUTRES SITUATIONS IMPOSANT LA RECHERCHE DE LA MUTATION JAK2.....	97
V.2.1 Les thromboses du territoire veineux porte.....	97
V.2.2 Dans certains syndromes mixtes myéloprolifératifs-.....	97
CHAPITRE VI : LES INHIBITEURS DES JAKS.....	99
VI.2. LES EFFETS DES INHIBITEURS SUR LES SIGNES CLINIQUES	101
VI.2.1. L'effet sur la splénomégalie dans la MF.....	101
VI.2.2. L'effet sur les symptômes systémiques dans la MF	102
VI.2.3. L'effet sur les paramètres sanguins dans la MP, la PV et la TE.....	102
CONCLUSION.....	103
RÉSUMÉS	106
REFERECES.....	110

INTRODUCTION

Des progrès majeurs ont été réalisés ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs notamment les syndromes myélo-prolifératifs Philadelphie négatifs [1].

Des anomalies moléculaires ont été mises en évidence à partir de l'identification d'anomalies chromosomiques acquises dans certains de ces syndromes telles les protéines de fusion à activité tyrosine kinase BCR–ABL associée à la translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11) de la LMC et FIP1L1–PDGFRA associée à une délétion interstitielle dans la bande 4q12 pour la MEC et le SHE [2]. L'implication des tyrosines kinases a conduit dans ces cas à utiliser efficacement des inhibiteurs spécifiques des tyrosines kinases dans le traitement de ces affections. Cependant, les fondements génétiques des syndromes myéloprolifératifs (SMP) BCR/ ABL négatifs qui comprennent la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), et la myélofibrose primitive (PMF), restent mal compris et leurs diagnostic reposait auparavant sur une association de critères clinico-biologiques : classifications du PVSG (Polycythemia Vera Study Group) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Très récemment, la mise en évidence de la mutation V617F de JAK2 (Janus Kinase) chez la quasi-totalité des patients atteints de PV et plus de la moitié des patients souffrant de TE ou de MP, a permis à ces trois SMP de bénéficier d'un marqueur moléculaire qui a un impact important sur la compréhension de leur physiopathologie et de faire une avancée majeure dans les perspectives thérapeutiques dont la thérapie moléculaire ciblée [3-5].

Cette découverte, outre son intérêt physiopathologique, a rapidement révolutionné la prise en charge diagnostique des SMP, à tel point que l'OMS en a revu les critères diagnostiques pour y intégrer cette donnée moléculaire [6].

L'intérêt de notre sujet est double, d'une part mettre à la disposition des cliniciens et des biologistes une synthèse des connaissances actuelles sur la révolution JAK2 V617F, et d'autre part de proposer les outils et les références nécessaires à la mise en route du dépistage de la mutation à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.

Pour cela nos objectifs sont les suivants :

- Décrire la protéine JAK2 et sa mutation V617F.
- Décrire les différentes techniques de dépistage au laboratoire, leurs mises en œuvre et l'interprétation des résultats.
- Rappeler les nouveaux critères diagnostique de l'OMS (2008) sur la classification des SMP BCR/ ABL négatifs.

MATERIEL ET METHODES :
SOURCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Recherche documentaire :

Une recherche exhaustive des travaux de référence a été effectuée sur les banques de données disponibles :

- a. PubMed
- b. Sciences directe
- c. Hinari
- d. Google scholar
- e. Edimark

Mots clés utilisés: JAK2 ; JAK2V617F ; Mutation de JAK2 V617F; Chronic myeloid leukemia; Chronic myeloproliferative disorders; Essential thrombocythemia; Polycythemia vera; Idiopathic myelofibrosis; neoplasm, molecular diagnosis; Polyglobulie de Vaquez; Inhibiteur de tyrosine kinase; Polyglobulie; Thrombocytémie; Myélofibrose; Syndromes myéloprolifératifs chroniques bcr/abl-négatifs; myélogramme; diagnostic biologique; JAK/STAT; phosphotyrosine phosphatase; PIAS; SOCS; oncogenèse.

2. Recherche bibliographique :

Ce travail a porté sur des travaux rédigés en langue anglaise ou française et qui ont été publiés au cours des 15 dernières années (entre 1998 et 2013).

3. Sélection :

Nous avons sélectionné les articles traitant la protéine JAK2 et sa mutation JAK2V617F sur les plans physiologique, diagnostique et physiopathologique.

Une analyse synthétique de ces publications a été réalisée et nous avons retenu celles qui nous paraissent pertinentes.

Au total, 229 références bibliographiques ont été exploitées et réparties comme suit :

- ✓ **Articles originaux**
- ✓ **Revue systématique / mises au point**
- ✓ **Lettres / communications**
- ✓ **Sources disponibles en ligne : disponible à [www](#).**

4. Exclusion :

Les études de très faible qualité méthodologique (randomisation inadéquate, nombre de patients insuffisant, interventions imprécises, références non disponibles) ont été exclues.

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I :

HISTORIQUE

Le fait qu'un seul facteur moléculaire puisse entraîner la formation d'un cancer chez l'homme n'est pas fréquent en oncologie. Par conséquent, il semble judicieux de reprendre les étapes importantes qui ont effectivement permis l'identification de JAK2 V617F.

Durant l'année **2005**, six 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 [3-5, 7-9]. Leurs travaux sont parus dans des revues anglo-saxonnes prestigieuses, telles que Nature, the New England Journal of Medicine ou Lancet.

En **mars 2005**, Baxter et *al.* [3] dans une étude englobant 73 patients avec une PV, ont observé que 97 % d'entre eux présentaient la mutation JAK2 V617F.

En **avril 2005**, Levine et *al.* [5] ont estimé la fréquence de la mutation JAK2 V617F à 74 % chez 164 malades porteurs de PV.

Le même mois, James et *al.* [4] ont évalué la prévalence de la mutation JAK2 V617F à 89 % chez 45 patients ayant une PV ; Kralovics et *al.* [8] dans une étude incluant 128 PV, ont également dépisté la mutation JAK2 V617F dans 65 % des cas.

En **juin 2005**, Zhao et *al.* [7] ont retrouvés une mutation JAK2 V617F chez 83 % des patients atteints de PV (n = 20/24).

En **septembre 2005**, Jones et *al.* [10] ont signalé la présence de la mutation JAK2 V617F chez 81 % des 72 patients avec une PV.

Et enfin, le **18 novembre 2005**, 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. Douze orateurs, dont des représentants des équipes européennes qui ont découvert la mutation V617F de JAK2, le groupe français de William Vainchenker [4-5] et des experts internationaux dans le domaine des SMP, ont présenté des résultats biologiques et cliniques originaux permettant une meilleure compréhension de l'intérêt de cette mutation dans la physiopathologie et la prise en charge de ces maladies [9].

La découverte de la mutation JAK2 V617F a complètement modifié le diagnostic des SMP 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.

CHAPITRE II :

LA JANUS KINASE 2 (JAK2)

II.1 DEFINITION :

La protéine JAK2 est une tyrosine kinase dont le gène est localisé en 9p24 [11]. Elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire [12]. Elle peut se fixer à des récepteurs de facteurs de croissance homodimériques comme le récepteur à l'érythropoïétine (EPO-R), le récepteur à la thrombopoïétine (TPO-R ou MPL), le récepteur du facteur de croissance granulocytaire (G-CSF-R) ou hétérodimériques comme le récepteur à l'interleukine 3 (IL3-R) [13].

II.2 STRUCTURE :

La tyrosine kinase (JAK2) appartient à la famille des Janus des tyrosines kinases appelées janus kinases, qui comprend également TYK2, JAK1 et JAK3. C'est une protéine cytosolique d'environ 130 kDa. Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et est fortement conservée entre les espèces. Semblable aux autres JAKs, La protéine JAK2 comporte plusieurs domaines fonctionnels essentiels à son activité appelés **JAK homologie (JH)** de JH1 à JH7 [14-15] (*figure 1*) :

- **Le domaine JH1** : c'est le domaine catalytique. Il contient les résidus aminés tyrosine conservés et impliqués dans l'auto-régulation de l'activité kinase. La phosphorylation de ces tyrosines est nécessaire à l'activation de JAK1, JAK2 et TYK2 [16].

- **Le domaine JH2** : c'est le domaine pseudo-kinase. Il ne possède pas d'activité catalytique propre mais il est néanmoins nécessaire à la fonction catalytique des JAKs [17-18]. En absence du domaine JH2, l'activité kinase des

JAKs est fortement augmentée [19-20]. Ces observations supposent donc un rôle inhibiteur du domaine JH2. D'autre part, le domaine JH2 de JAK1, JAK2 et JAK3 s'associe avec les facteurs de transcription de la famille STATs [21].

- **Les domaines JH3 à JH7** : forment le domaine N-terminal et sont impliqués dans l'association des JAKs aux récepteurs des cytokines. Ils permettent aussi le recrutement d'autres substrats. Les domaines JH4 à JH7 forment un motif FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin). Ces motifs sont impliqués dans des interactions protéine/protéine et notamment dans les interactions avec les récepteurs [22]. Ce motif semble ainsi être impliqué dans l'interaction entre JAK1 et la chaîne gp130 de certains récepteurs de cytokines tels que le récepteur à l'interleukine 6(IL6-R) [23].

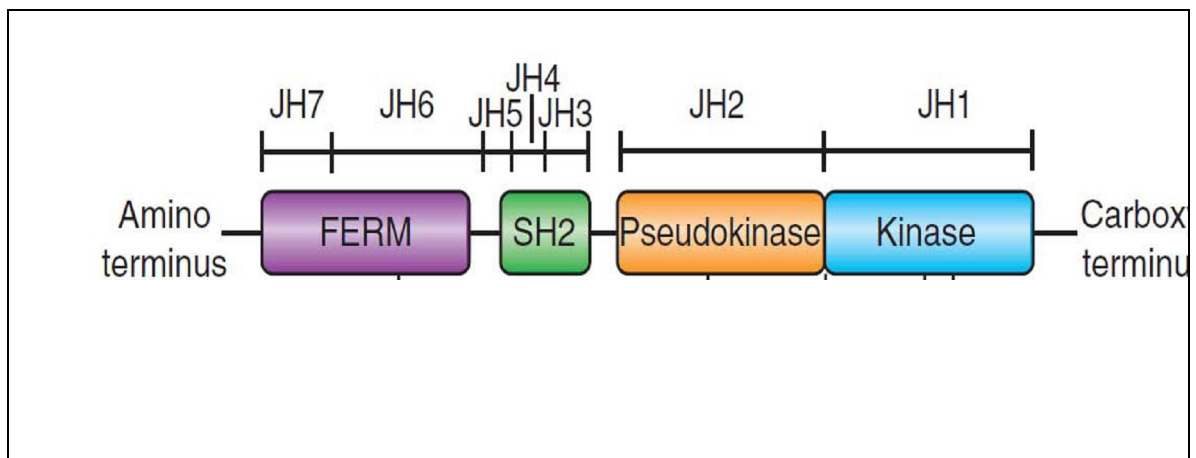


Figure 1 : Structure de la protéine JAK2 [15].

La moitié carboxy-terminale de la protéine est composée de JH1 et JH2, régions qui codent respectivement pour les domaines kinase et pseudo-kinase.

La moitié amino-terminale de JAK2 contient les domaines de JH3 à JH7. Le domaine N-terminal et surtout les résidus 32-58 du domaine JH7 sont indispensables à la fixation de JAK2 à l'EpoR.

II.3 FONCTIONS :

La voie JAK2/STAT est une étape clé dans la voie de signalisation de nombreuses cytokines, telles que l'EPO, les facteurs de croissance, la prolactine, la thrombopoïétine, le GM-CSF (Granulocyte Macrophage – Colony Stimulating Factor), l'IL-3 et l'IL-5 [13, 24-25].

Pour élucider la fonction des 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 [18-19]. 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 GM-CSF 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 [13]. Les souris hétérozygotes apparaissent, quant à elles, normales, viables, et fertiles [26].

II.3.1 Fonctions de JAK2 dans la signalisation des récepteurs aux cytokines :

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

Cependant, contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, les récepteurs des cytokines ne possèdent pas de domaine kinase cytoplasmique et nécessitent par conséquent la participation de protéines à activité kinase afin d'amorcer la cascade de signalisation induite par l'interaction cytokine/récepteur.

La fonction la plus connue des JAKs est la transduction du signal de récepteurs aux cytokines de type I et II (classés en fonction de leur structure tridimensionnelle). On note une différence d'activation des JAKs en fonction des cytokines concernées [27].

Ainsi, JAK2 va être activée par l'EPO, la TPO, le GM-CSF ou encore l'IL-3 alors que, JAK1 va être activée par l'IL-2 ou l'IL-15, bien qu'ils transduisent tous deux la signalisation d'autres cytokines comme l'IFN α ou l'IFN β .

La **(figure 2)** résume l'implication de chaque JAK dans la transduction du signal des récepteurs aux cytokines. JAK2 se fixe par son domaine SH2-like à une région intra-cytoplasmique des récepteurs aux cytokines riches en proline.

La fixation du substrat sur son récepteur entraîne un changement conformationnel du récepteur qui passe à un état dimérisé/oligomérisé actif avec un rapprochement des JAK2. Ceci permet aux protéines JAK2 de se transphosphoryler et s'autophosphoryler. Les JAK2 ainsi activées phosphorylent le récepteur auquel elles sont associées [28].

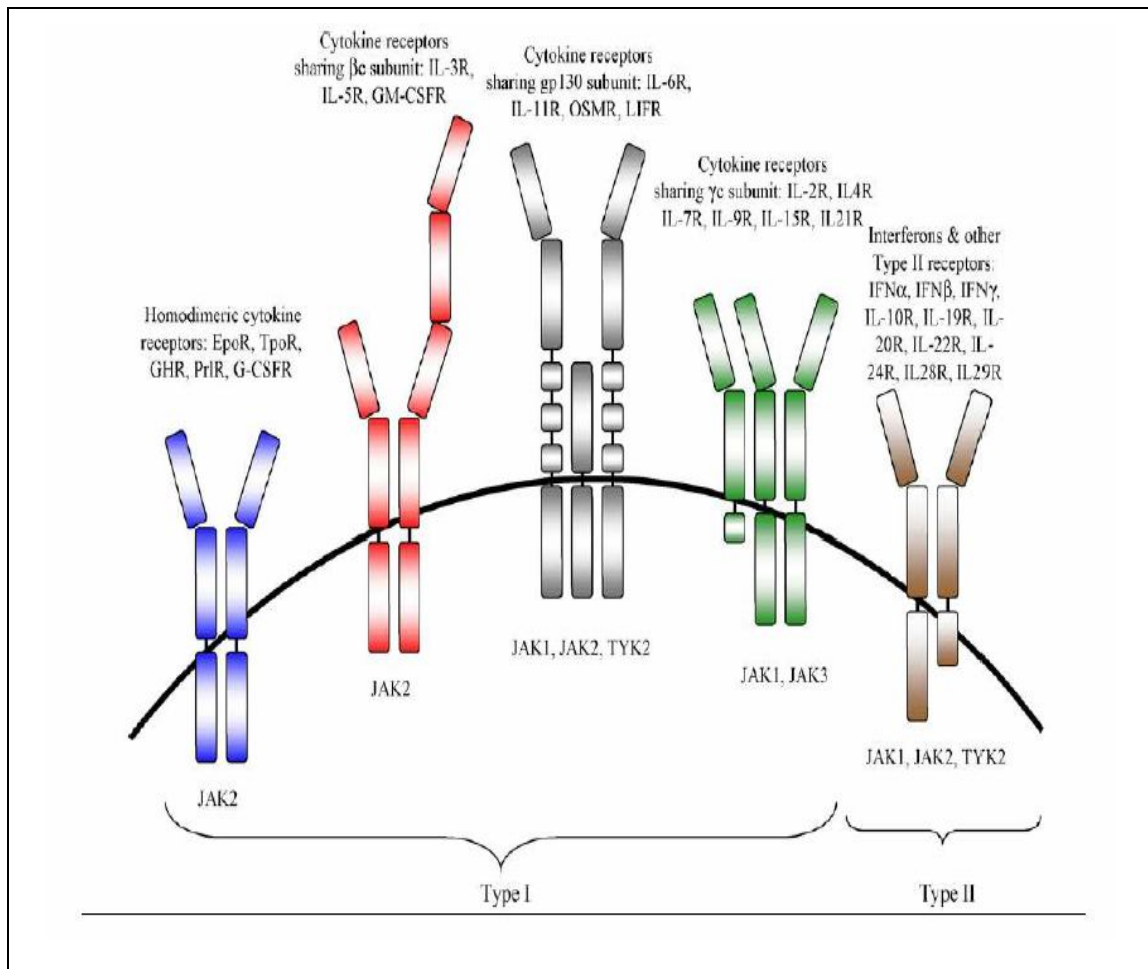


Figure 2 : L'implication différentielle des JAKs au niveau de récepteurs aux cytokines [15].

Les récepteurs aux cytokines ont des préférences propres pour les kinases JAK. Les récepteurs homodimériques utilisent presque exclusivement JAK2. Il en est de même des récepteurs possédant la sous-unité βc . JAK3 est activé uniquement par les récepteurs possédant la sous-unité γc . Les récepteurs possédant la sous-unité gp130, et les récepteurs aux cytokines de type II utilisent JAK1, JAK2 et Tyk2 dans des combinaisons variées [27].

Ces phosphorylations vont être un signal de recrutement de protéines possédant un domaine SH2. Parmi ces protéines, on trouve les facteurs de transcription STAT, la sous-unité p85 de la Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI3K), la tyrosine kinase Lyn, ou encore des protéines adaptatrices comme Cis (Cytokine inducible SH2-containing protein) et Grb2. D'autres protéines jouant un rôle négatif sur la transduction du signal sont également recrutées suite à ces phosphorylations, comme les protéines de la famille SOCS (suppressor of cytokine signaling) [29]. Le recrutement de l'ensemble de ces protéines entraîne une cascade de signalisation menant à la survie, la différenciation et la prolifération des cellules. Les voies de signalisation principales activées par JAK2 sont les voies JAK2/STAT5, 3 et 1, PI3K/Akt et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (**Figure 3**).

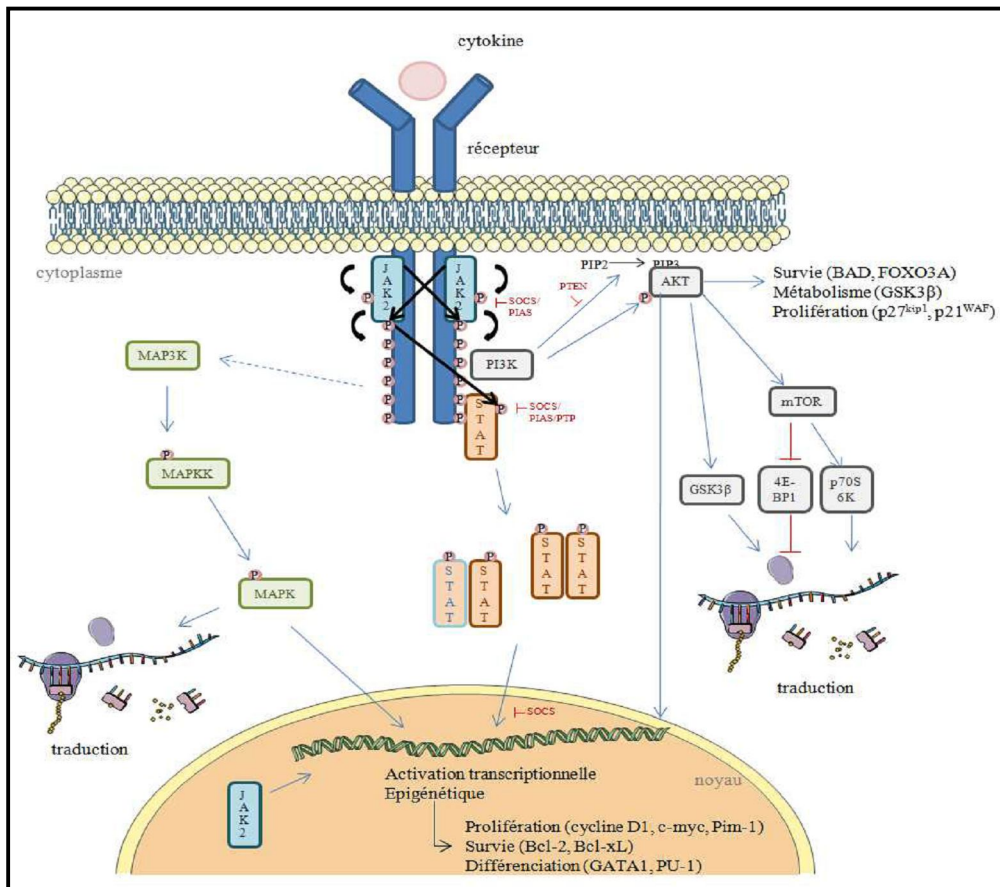


Figure 3 : Principales voies de signalisation activées par le complexe JAK2/récepteur aux cytokines [15].

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 et de protéines adaptatrices permettant l'activation des voies JAK2/STAT, PI3K/Akt et MAPK. 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.

II.3.2 La voie JAK/STAT canonique :

Les protéines STATs sont des facteurs de transcription. Chez les mammifères il existe sept gènes différents qui sont à l'origine des sept membres de la famille STAT : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. En aval de JAK2 sont activées les STAT 1, 3 et 5. Les STATs possèdent tous un résidu tyrosine conservé. Les kinases JAKs associées au récepteur se trans-phosphorylent et phosphorylent ensuite des résidus tyrosine spécifiques du domaine intra-cytoplasmique des chaînes du récepteur. Des sites d'ancrage (docking domains) qui permettent le recrutement d'autres protéines de signalisation contenant des domaines SH2 sont ainsi créés.

Les facteurs de transcription de la famille STATs sont recrutés au niveau du récepteur activé. Ils sont à leur tour phosphorylés par les JAKs. Ils quittent ensuite le récepteur pour former des dimères dans le cytoplasme et transloquer dans le noyau où ils vont réguler l'expression de gènes cible et favoriser leur transcription [28,30-31].

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 [33].

On compte, dans les cibles de STATs, des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (comme la cycline D1, c-myc ou encore pim-1), la survie (comme Bcl-2 ou bcl-xL), ou encore l'angiogenèse ou les métastases (comme le VEGF). Cependant, bien que STAT5 et STAT3 aient un effet pro-prolifératif et anti-apoptotique, STAT1 aurait un rôle plutôt antagoniste, anti-prolifératif et pro-apoptotique [33].

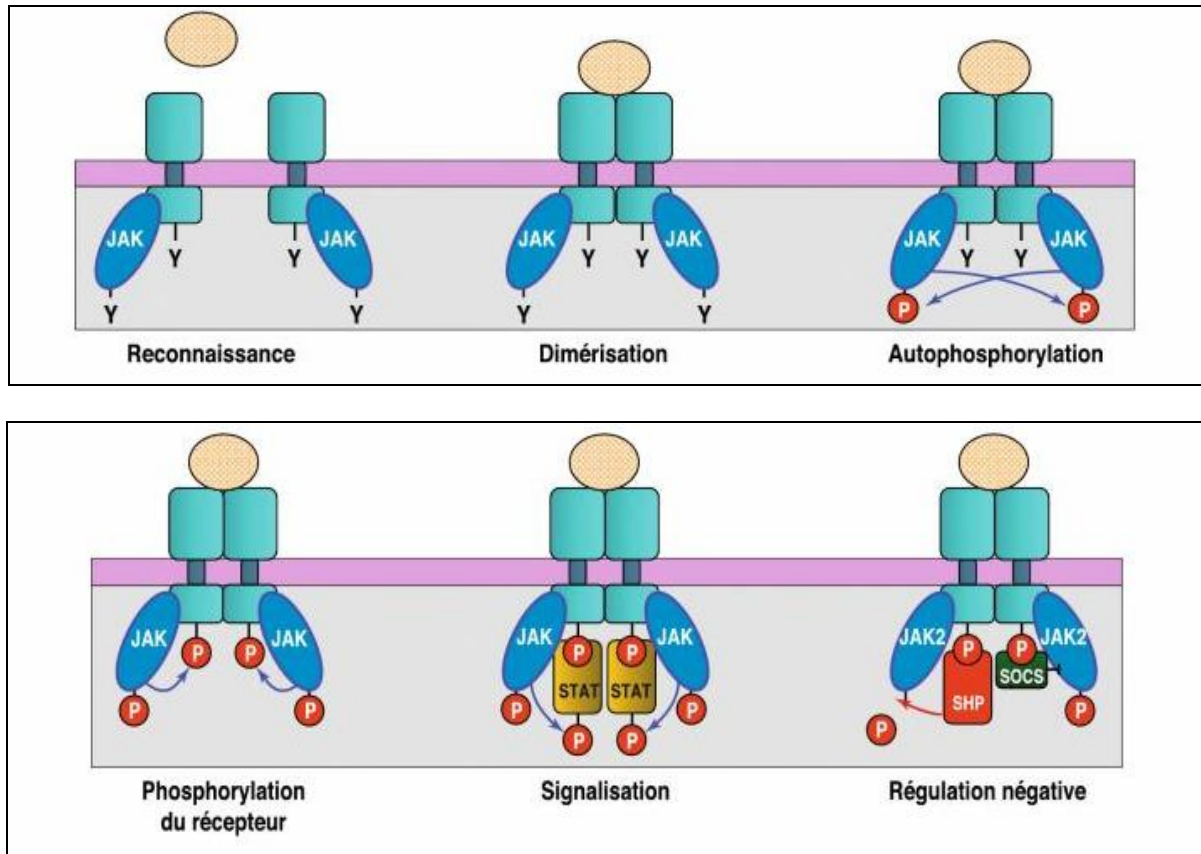


Figure 4 : L'activation des récepteurs des cytokines via les kinases JAK [36].

Les protéines JAK sont associées de façon constitutive aux récepteurs. La reconnaissance d'une cytokine permet la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation croisée des protéines JAK associées. Ces dernières phosphorylent également le récepteur, ce qui permet la reconnaissance de phosphotyrosines par divers protéines, dont les principales sont les protéines STAT, qui sont phosphorylées par les kinases JAK. La régulation négative de la signalisation est réalisée en particulier par les protéines SOCS qui prennent la place des protéines STAT sur les phosphotyrosines du récepteur et inhibent la kinase JAK, et par les phosphatases SHP qui se lient au récepteur et déphosphorylent les kinases JAK [34].

II.3.3 La voie PI3K/Akt :

La voie PI3K/Akt est activée par la fixation sur des tyrosines du récepteur phosphorylées par JAK2, soit de la sous-unité p85 de la PI3K elle-même, ou de protéines adaptatrices telle Gab1, Gab2, Cbl, Vav ou IRS-2 [29]. La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PI3,4,5P3). Ce composé permet le recrutement de protéines possédant un domaine PH (Plextrin Homology) au niveau de la membrane plasmique, dont Akt. Akt est ensuite phosphorylée et activée par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1) et par le complexe mTORC2 (mTOR complex 2). AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles impliquées dans la traduction protéique (comme mTOR qui cible 4E-BP1 et S6K), dans la survie cellulaire (comme BAD ou FOXO3A), dans la prolifération (comme p27kip1 ou p21WAF) ou encore le métabolisme (GSK3).

II.3.4 La voie des MAPKs :

Les MAPKs sont des serine/thréonine kinases ubiquitaires dont la superfamille possède 11 membres : ERK1, ERK2, JNK1, JNK2, JNK3, p38MAPKs (p38 $\alpha/\beta/\gamma$), ERK5, ERK3 et ERK7. Trois groupes majeurs de MAPKs activées en aval de JAK2 ont été caractérisés chez les mammifères : ERK1/2, JNKs et p38MAPK. Chaque groupe de MAPK est activé par des cascades de kinases distinctes dans lesquelles une MAP3K (ou MEKK) phosphoryle et active une MAP2K (ou MEK) qui, à son tour, stimule l'activité de la MAPK.

Une fois activée, la MAPK phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie (*figure 5*).

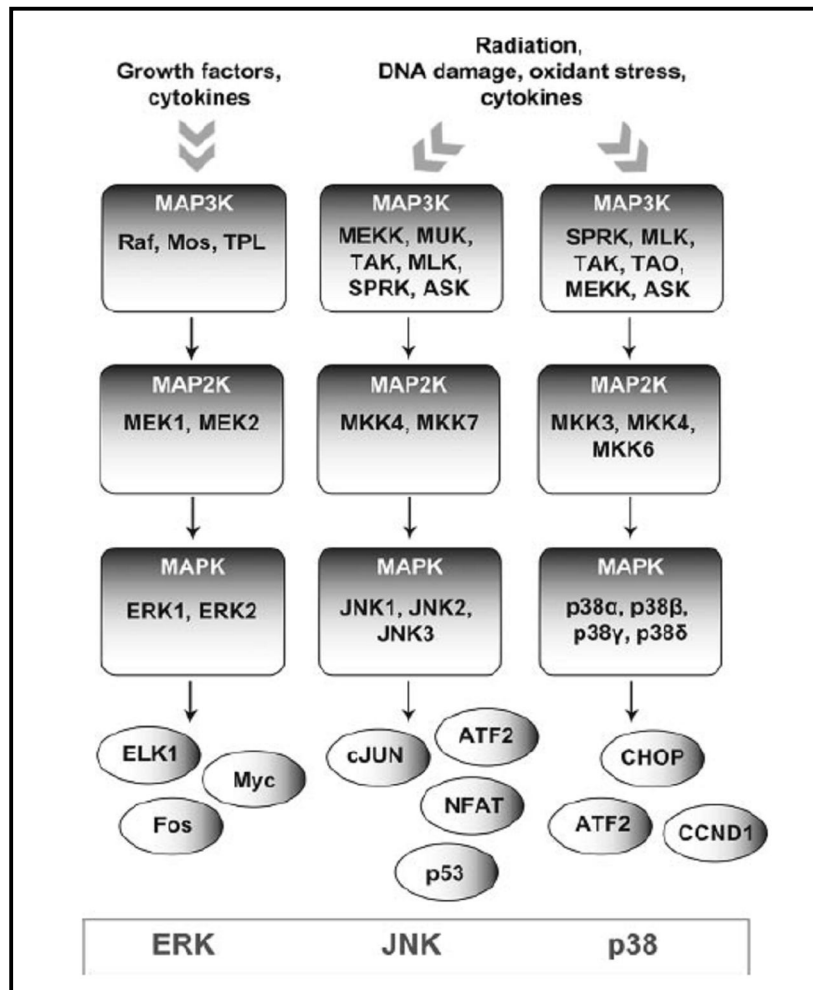


Figure 5 : Schématisation des trois groupes majeurs de MAPKs et de leur signalisation [15].

La présence de cytokines permet l'activation, via JAK2, de MAP3K, qui phosphorylent et activent des MAP2K. Les MAP2K phosphorylent et activent à leur tour les MAPKs. Les 3 groupes de MAPK connues pour être activées en aval de JAK2 sont les kinases Erk 1 et 2, JNK et p38. Une fois activées, les MAPK peuvent elles mêmes phosphoryler des protéines sur résidu sérine et thréonine [35].

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 [35]. Les MAPKs possèdent de nombreuses cibles telles que des facteurs de transcription (comme c-myc, STAT3 ou c-fos), des régulateurs de la traduction (comme RSK), des protéines du cytosquelette (telles que la paxillin) et favorisent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire [20].

II.4 LES REGULATEURS NEGATIFS :

La signalisation des récepteurs aux cytokines médiée par JAK2 possède également des protéines inhibitrices exerçant un rétrocontrôle négatif. Les trois classes de régulateurs négatifs les plus connues en aval de JAK2 sont : les protéines SOCS, PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) et PTP (Protein Tyrosine Phosphatases). (*figure 6 A*)

II.4.1 Les phosphotyrosines phosphatases :

Plusieurs protéines à activité phosphatase interviennent pour limiter la cascade de phosphorylation mise en jeu par la voie JAK/STAT (*figure 6 B*). Elles agissent soit au niveau des kinases JAK, soit au niveau des protéines phosphorylées par les JAK, en particulier les récepteurs de cytokines ou les facteurs STAT. Historiquement, les premières phosphatases identifiées comme régulant la voie JAK/STAT ont été les protéines de la famille SHP, SHP1 et SHP2 (SH2-domain containing phosphatases).

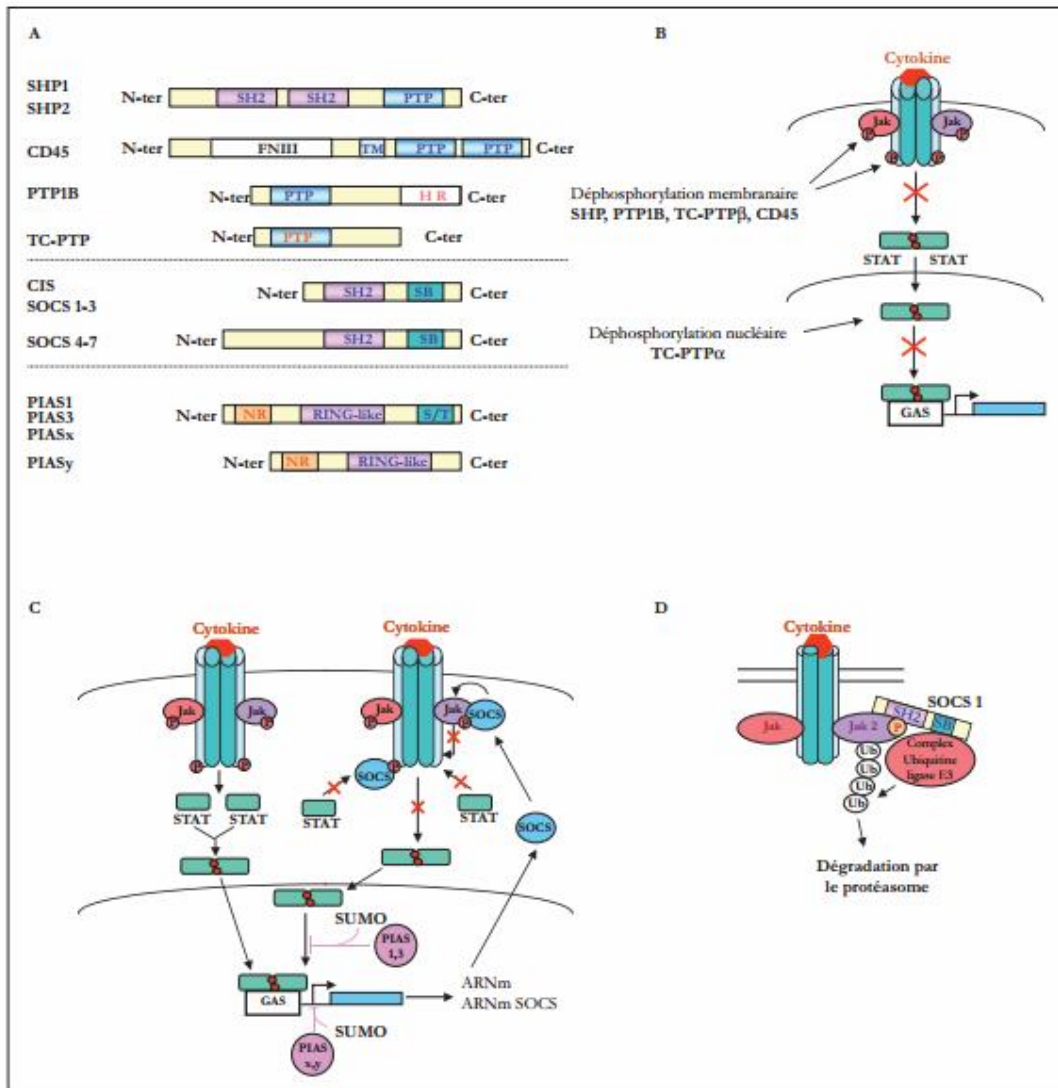


Figure 6 [36] :

- 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.

Ces protéines, essentiellement cytoplasmiques, sont constituées d'un domaine PTP (protein tyrosin phosphatase) classique de 250 acides aminés et de deux domaines SH2 consécutifs dans leur partie N-terminale (*figure 6A*). Il semble que leur domaine phosphatase détermine la spécificité de substrats entre SHP1 et SHP2 [36]. Leurs domaines SH2 leur permettent de s'associer aux tyrosines phosphorylées (Tyr-P) des récepteurs activés, à celles des molécules de signalisation comme IRS1, voire aux JAK elles-mêmes [37].

Cette association entre domaine SH2 et Tyr-P induit l'activation enzymatique des SHP et la déphosphorylation des protéines associées. La déphosphorylation du récepteur interrompt la cascade de signalisation située en aval : les facteurs STAT ne pourront plus être recrutés au niveau du récepteur activé et, en conséquence, ils ne pourront pas être phosphorylés (*figure 6B*).

SHP1 est exprimée principalement dans les cellules hématopoïétiques mais aussi dans les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales [38]. La délétion du gène SHP1 chez la souris conduit à une hyper-prolifération des cellules lymphoïdes B et T. Cela reflète la régulation négative opérée par SHP1 sur l'activation des récepteurs impliqués dans la prolifération de ces cellules [39]. L'absence de SHP1 conduit à une hyper-phosphorylation des kinases JAK2 en réponse à l'EPO [40-41].

La phosphatase SHP2 présente 55% d'homologie en séquence protéique avec SHP1. Contrairement à cette dernière, elle est exprimée de façon ubiquitaire. SHP2 est un puissant inhibiteur de la signalisation en réponse à l'IL6 et de l'activation des récepteurs associés à la protéine gp130 [42]. Cependant, la protéine SHP2 peut également fonctionner comme un régulateur

positif du signal de transduction en activant la voie JAK/STAT en réponse à différentes cytokines. En effet, elle stabilise la protéine JAK2 activée par la prolactine en inhibant sa dégradation [43]. Elle est capable aussi d'induire l'activation des kinases de la famille Src [44].

D'autres protéines à activité phosphatase interviennent dans la régulation négative de la voie JAK/STAT. Parmi elles, la protéine tyrosine phosphatase trans-membranaire CD45 (*figure 6A*) est exprimée dans les cellules hématopoïétiques. La délétion du gène CD45 conduit à une hyper-activation de JAK2, associée à la perte de réponse des cellules lymphoïdes B et T aux antigènes [45].

Ni le domaine phosphatase des SHP, ni celui de CD45, ne s'associe directement avec les JAK ou ne permet leur déphosphorylation, indiquant que d'autres phosphatases doivent être responsables de la désactivation de ces kinases JAK, initiatrices de la voie JAK/STAT. Les phosphatases PTP1B (phosphotyrosine phosphatase 1B) et TC-PTP (T cell protein tyrosine phosphatase) (*figure 6A*) présentent une grande similitude dans leur domaine catalytique. PTP1B est exprimée dans de nombreux tissus et elle est localisée sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique grâce à une région hydrophobe située dans sa région C-terminale [46].

JAK2 est l'un des substrats de cette phosphatase. En effet, la surexpression de PTP1B inhibe la transcription des gènes induits en réponse aux deux types d'IFN. De plus, des fibroblastes de souris invalidées pour le gène codant pour cette protéine présentent une hyper-phosphorylation de JAK2 [46].

La protéine TC-PTP est surtout exprimée dans les cellules hématopoïétiques. La délétion de son gène affecte particulièrement le lignage hématopoïétique, avec une splénomégalie et une anémie conduisant à une morte périnatale des animaux [48].

PTP1B et TC-PTP reconnaissent sélectivement un motif centré sur un tandem de tyrosine à l'intérieur d'une séquence polypeptidique. Une telle séquence existe dans le domaine d'auto-activation des JAK : D/E-pYpY-K/R pour JAK2 et Tyk2, D/E-pYpY-T/V pour JAK1 et JAK3. Ces différences de séquences sont responsables des sélectivités d'association de PTP1B et TC-PTP avec les membres de la famille JAK.

II.4.2 Les SOCS :

Les protéines SOCS (suppressor of cytokine signaling) sont induites en réponse aux stimulations par de nombreuses cytokines et hormones dont les récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs de cytokines [49]. Elles peuvent également être induites par d'autres stimuli qui n'activent pas la voie JAK/STAT, comme les lipopolysaccharides, l'insuline, l'EGF (epidermal growth factor) et le SCF (stem cell factor) [49-50]. La famille des SOCS comprend huit membres : SOCS1 à 7 et CIS issus de différents gènes. Ces protéines contiennent un domaine SH2 central flanqué d'un domaine N-terminal de taille variable et d'un domaine C-terminal conservé, de 40 acides aminés, appelé SOCS-box (*figure 6A*) [51]. Les protéines de cette famille utilisent différents mécanismes pour exercer leur effet inhibiteur. D'une part, via leur domaine SH2, les SOCS peuvent se lier aux résidus tyrosines phosphorylés des

récepteurs ou à ceux des JAK activées (*figure 6C*) et ainsi, soit bloquer par compétition le recrutement des facteurs STAT aux motifs tyrosine phosphorylés du complexe récepteur activé-JAK, soit bloquer l'activité catalytique des tyrosines kinases JAK elles-mêmes en bloquant les tyrosines du domaine d'auto-activation de ces enzymes.

D'autre part, via leur domaine SOCS, elles peuvent entraîner la dégradation de leur cible par la voie dépendante du protéasome [51]. En effet, ce domaine s'associe aux élongines B et C, ce qui permet le recrutement du complexe d'ubiquitine ligase E3 et ainsi l'ubiquitination des protéines associées (*figure 6C*) [52]. Par ailleurs, très récemment, il a été démontré que SOCS1 colocalise et interagit avec la sous-unité 20S du protéasome au niveau du complexe d'organisation des microtubules MTOC (microtubule organizing complex) [53].

SOCS1 s'associe à JAK2 via son domaine SH2. Cependant, pour l'inhibition de l'activité de JAK2, les deux domaines SH2 et KIR (kinase inhibitory region) sont requis [54]. SOCS1 possède un domaine SH2 similaire à celui de STAT3 et peut ainsi entrer aussi en compétition avec STAT3 pour les mêmes tyrosines phosphorylées. L'expression de SOCS1 est inhibée dans les cellules provenant d'hépatocarcinomes et de myélomes suite à l'hyperméthylation de son gène, ce qui doit favoriser l'action de facteurs de croissance pour la cellule tumorale [55-56]. L'activité de SOCS1 peut aussi être altérée par des mutations, comme cela a été récemment décrit dans des cellules issues de lymphome mais également par de courtes délétions/insertions nucléotidiques qui affectent le domaine SH2 ou la boîte SOCS [57]. De plus,

l'inactivation de SOCS1 peut conduire à une croissance anormale des cellules d'hépatocarcinome, suggérant un rôle suppresseur de tumeur pour cette protéine [58]. Paradoxalement, l'expression de SOCS1 peut être aussi anormalement élevée dans des cellules issues de certaines leucémies. Cette expression accrue pourrait favoriser l'échappement de la cellule tumorale.

II.4.3 Les PIAS :

La protéine PIAS1 (protein inhibitors of activated STAT) a été identifiée comme partenaire de STAT1 dans des expériences de double hybride [59]. Les autres membres de sa famille, PIAS3, PIASxa, PIASxb et PIASy, ont été identifiés sur la base d'homologies de séquence avec PIAS1. Chaque PIAS est codée par un gène particulier, sauf PIASxa et PIASxb qui sont codées par le même gène et varient dans leur partie C-terminale par épissage alternatif. Au niveau structural, les PIAS contiennent un domaine central de type RING finger homologue au domaine présent dans les protéines Siz de levures qui fonctionnent comme des E3 SUMO-ligases [60] (*figure 6A*).

Ces protéines sont exprimées constitutivement, mais leur interaction avec les STAT est observée seulement après stimulation par des cytokines. En effet, les PIAS ne se lient qu'aux formes activées des STAT [59]. Il existe parmi les PIAS une certaine sélectivité de reconnaissance des membres STAT. Ainsi, PIAS1, PIASy et PIASx sont capables d'interagir spécifiquement avec STAT1, PIAS3 avec STAT3 et PIASy avec STAT4 et STAT1. Les différentes PIAS utilisent des mécanismes différents pour inhiber la signalisation JAK/STAT. En effet, PIAS1 et PIAS3 se lient aux dimères STAT1 et STAT3 respectivement,

pour inhiber leur association avec l'ADN, alors que ni PIASx ni PIASy n'empêchent leurs cibles STAT de s'associer à l'ADN [61] (*figure 6C*). En revanche, il a été démontré que PIASx se comporte en corépresseur transcriptionnel et pourrait être impliqué dans la régulation de la structure chromatinienne par le recrutement d'histones déacétylases [62], alors que PIASy délocaliserait des partenaires, comme décrit pour LEF1, au niveau des corps nucléaires [63].

On compte également d'autres régulateurs négatifs comme la protéine adaptatrice Lnk qui se fixe sur JAK2 [64] ou encore PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), qui est un antagoniste de la PI3K et déphosphoryle le PI3, 4 et 5P3.

II.5. LES FONCTIONS DE JAK2 DANS LA REGULATION EPIGENETIQUE :

Outre la voie canonique classique décrite ci-dessus, la voie JAK/STAT peut également agir de manière totalement différente, sans faire intervenir l'activité transcriptionnelle des STATs. En effet, des travaux réalisés chez la drosophile ont permis de mettre en évidence un autre mode d'action de la voie JAK/STAT. Une partie des protéines STATs non phosphorylées est localisée dans le noyau, sur l'hétérochromatine, associée à la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1), une protéine majeure de l'hétérochromatine [65].

La présence des STATs au niveau de l'hétérochromatine est essentielle pour le maintien de la localisation de HP1 et la stabilité de l'hétérochromatine. L'activation des STATs par phosphorylation induit un décrochage des STATs, ce qui entraîne un déplacement de HP1 et une déstabilisation de l'hétérochromatine [65] (*figure 7*).

Chez les mammifères, il a été montré qu'une partie des STATs non phosphorylées est associée à l'histone H3 à l'état basal et qu'un traitement des cellules par l'IFN γ entraîne sa dissociation et ensuite sa réassociation à l'état phosphorylé [66]. De plus, les protéines STAT3 et STAT5A non phosphorylées ont été localisées de manière majoritaire dans le noyau [28].

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 tels que le facteur de transcription lmo2 (LIM-Only) rendant possible leur transcription indépendamment de STAT5 [66-67]. Cette localisation nucléaire et cytoplasmique de JAK2 est cependant controversée par une étude réalisée par Girodon *et al* qui suggère que la visualisation de cette kinase au niveau du noyau et du cytoplasme des cellules serait en partie due à un manque de spécificité d'un anticorps commercial [68].

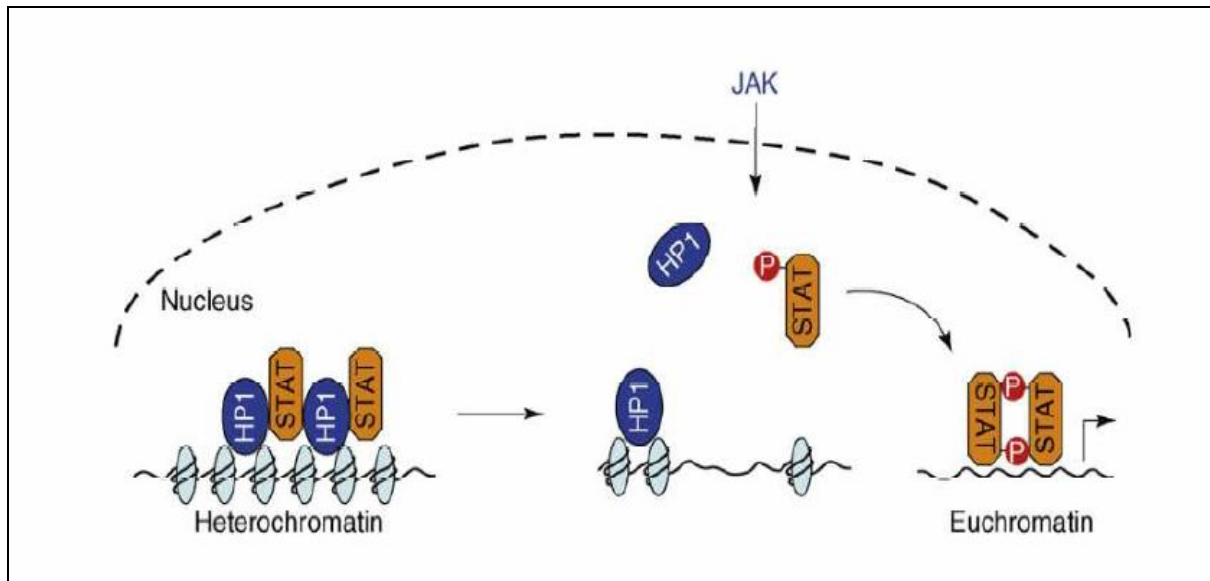


Figure 7 : Voie de signalisation JAK/STAT non canonique [15].

Dans le mode non-canonique de la voie JAK/STAT, les STATs non phosphorylées sont localisées dans le noyau, associées à HP1 au niveau de l'hétérochromatine. La phosphorylation de STATs par JAK entraîne une diminution de la quantité de STATs localisés sur l'hétérochromatine. Ceci mène au déplacement de HP1 et à une instabilité de l'hétérochromatine. Les STATs phosphorylés se fixent ensuite sur l'euchromatine afin d'activer la transcription de gènes cibles. Les STATs et autres facteurs de transcription ne peuvent pas accéder aux gènes localisés au niveau de l'hétérochromatine [28].

II.6 LE DEFICIT EN JAK2 :

L'absence de JAK2 est létale au 10^{ème} jour de développement embryonnaire [13,26]. La non-viabilité des embryons est due à l'absence d'érythropoïèse définitive dans le foie fœtal. Le déficit de la lignée érythroïde des souris JAK2^{-/-} est encore plus prononcé que celui des souris EpoR^{-/-} [69], vraisemblablement en raison d'une non-réponse à la TPO des progéniteurs issus de souris JAK2^{-/-}. En effet, il avait été montré que la TPO permet la formation de colonies érythroïdes à partir de foie fœtal d'embryons EpoR^{-/-} [70]. 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 [13].

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.

Enfin, il est observé que contrairement aux souris Jak1^{-/-}, la réponse aux cytokines apparentées à l'IL-6 est normale chez les souris JAK2^{-/-}. Comme cela était prévisible, la réponse aux interférons alpha/beta est normale alors que celle à l'interféron gamma est abolie.

CHAPITRE III :
LA MUTATION JAK2 V617F

III.1 DESCRIPTION DE LA MUTATION JAK2 V617F :

La mutation JAK2 V617F est une substitution de la guanine en position 1849 par la thymidine au niveau de l'exon 14 du gène de JAK2. Cette mutation ponctuelle entraîne, au niveau protéique, la substitution de la valine en position 617 par la phénylalanine à l'intérieur du domaine pseudokinase de JAK2. Cette substitution empêche le domaine pseudo-kinase de JAK2 d'inhiber son domaine kinase. Au niveau fonctionnel, cette mutation confère à JAK2 une activation constitutive.

La mutation JAK2 V617F, unique et clonale, est acquise 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 [3, 8, 71]. La mutation JAK2 V617F est située dans le domaine JH2-pseudo-kinase qui régule négativement l'activité kinase de la protéine [3, 7, 71 - 73].

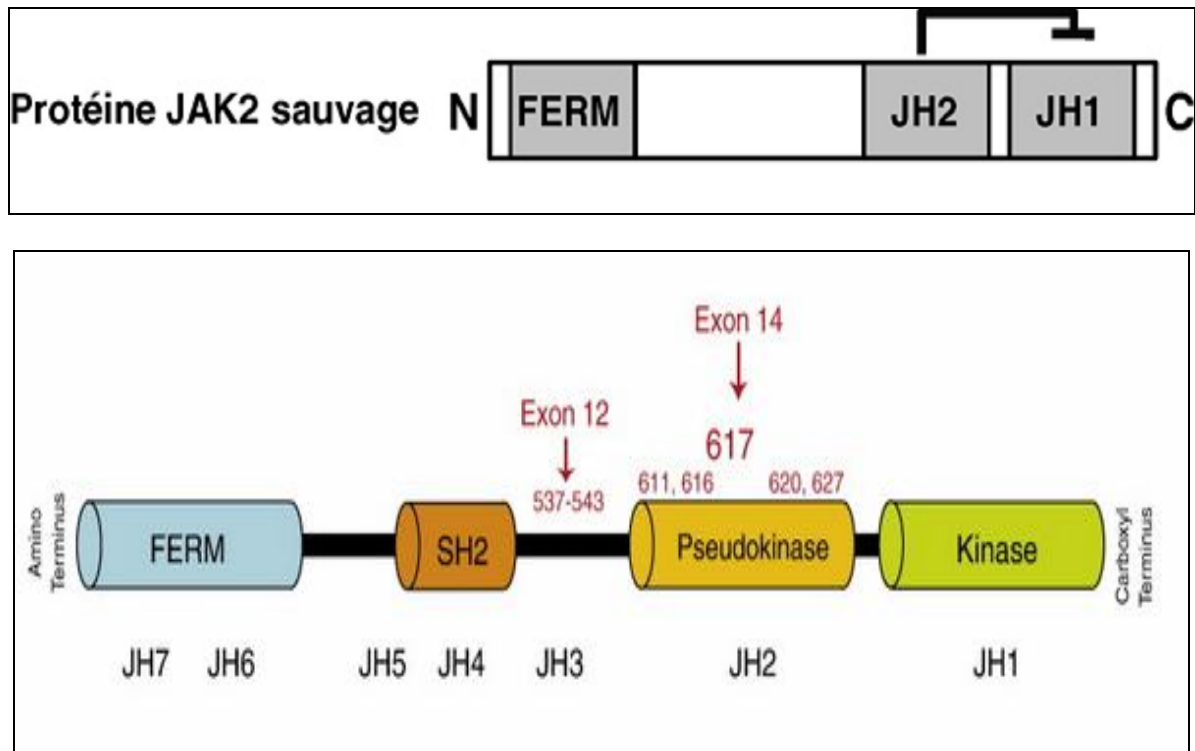


Figure 8 : Structure de la mutation JAK2 V617F et de la protéine JAK2 sauvage [6,15].

La mutation JAK2 V617F est une substitution de la valine 617 en phénylalanine au niveau du domaine pseudokinase JH2 de JAK2. Le domaine pseudokinase muté ne peut plus exercer son rôle d'inhibition du domaine kinase JH1 et donc d'autoinhibition de la protéine JAK2 [74].

III.2 EFFETS DE LA MUTATION V617F SUR LA PROTEINE JAK2 :

La mutation V617F est localisée dans le domaine pseudo-kinase de la protéine JAK2 (*figure 8*). Ce domaine régule négativement l'activité kinase de JAK2 en bloquant sa boucle d'activation en position inactive [12,75]. La mutation V617F perturbe ainsi l'interaction entre le domaine pseudo-kinase et la boucle d'activation. Comme dans le cas de la fusion BCR-ABL, une dérégulation de l'activité tyrosine kinase de JAK2 est observée, la mutation aboutie aussi à une hyperactivité kinase, à une phosphorylation des protéines STAT contribuant à la prolifération anormale des cellules hématopoïétiques [3, 7, 71-73]. La mutation V617F est donc une mutation « **gain de fonction** ».

III.2.1 Impact de la mutation sur la signalisation des récepteurs aux cytokines :

Des études portant sur les drosophiles (mouches) présentant la mutation JAK, située dans le domaine JH2-pseudokinase, ont montré que ces insectes développaient une hyperactivité kinase de la protéine associée à un risque accru de syndromes myéloprolifératifs et de leucémies [76-77]. Ensuite, des travaux fondamentaux, *in vitro*, ayant pour objectif d'évaluer le retentissement fonctionnel de la mutation JAK2 V617F, ont été réalisés sur des lignées cellulaires (comme BAF3). Ils ont montré que cette mutation a un rôle dans :

- L'activation constitutive des voies de signalisation canoniques
- La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique
- L'altération du rétro-contrôle négatif
- La régulation croisée du récepteur à l'IGF

III.2.1.1 L'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 [84]. Il ya une phosphorylation anormalement élevée de STAT5, STAT3, mais également des molécules telles que : extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK 1/2), protéine kinase B (Akt), en l'absence d'érythropoïétine [7, 8, 71,78-83].

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 la lignée UT7 (lignée possédant des propriétés érythroïdes) ou 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 (Burst Forming Unit Erythroid) et des CEE (Colonie Erythroïde Endogène) [84]. De plus, lorsque le récepteur à l'EPO est muté sur son site d'interaction avec STAT5, empêchant ainsi l'activation de STAT5, ou lorsque STAT5 est délétée à l'aide d'un shRNA, l'oncogène JAK2 V617F perd ses capacités de transformation [85].

Peu de données ont été publiées sur l'implication de STAT1 et STAT3. 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 [86]. Quant à STAT1, il interviendrait plutôt dans l'aiguillage de l'effet oncogénique sur la lignée mégacaryocytaire au détriment de la lignée érythrocytaire [87].

Concernant la voie PI3K/Akt, des travaux récents montrent que des inhibiteurs de cette voie induisent une mort par apoptose de lignées possédant l'oncogène, suggérant qu'elle est importante dans la survie des cellules mutées. Ceci est appuyé par le fait qu'une mutation du récepteur de l'EPO empêchant l'activation de cette voie de signalisation en aval de l'oncogène diminue ses capacités anti-apoptotiques [88].

L'implication d'Erk1 et Erk2 n'a été que très peu étudiée et les données ne soulèvent pas, pour l'instant, de rôle majeur de ces kinases en aval de JAK2 muté. En effet, leur inhibition pharmacologique n'a pas de conséquence majeure sur la différenciation érythroïde spontanée de progéniteurs de patients atteints de PV [89] et elle diminue la croissance des érythroblastes dans la PV avec une sensibilité moins importante que des érythroblastes de donneurs sains [88]. Quant au rôle des autres MAPKs, il reste à évaluer.

La nécessité de la présence d'un récepteur aux cytokines homodimériques dans l'indépendance aux cytokines est discutée. Il semblerait que lorsque l'expression de JAK2 V617F est faible, le récepteur homodimérique soit 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 [59]. Dans ce sens, des récepteurs hétérodimériques sont aussi capables d'activer JAK2 V617F. C'est le cas du récepteur à l'IL27 [90].

De ce fait, sur des milieux de culture, dépourvus de facteur de croissance, la survie des cellules avec mutation JAK2 était prolongée (plusieurs semaines), comparée à celle des cellules témoins (inférieure à 36 heures dans 100% des cas) [71].

De même, Kralovics *et al.* [8] ont constaté que le taux de survie à J10 des cellules mutées pour JAK2 était supérieur aux cellules témoins (0 % de survie) associé à une prolifération importante.

Dans des modèles murins, *in vivo*, des équipes ont observé que, lors du suivi à quatre semaines, des souris greffées avec des cellules de moelle osseuse exprimant la protéine JAK2 mutée développaient une polyglobulie ainsi qu'une splénomégalie (*Figure 9*) [71,78].

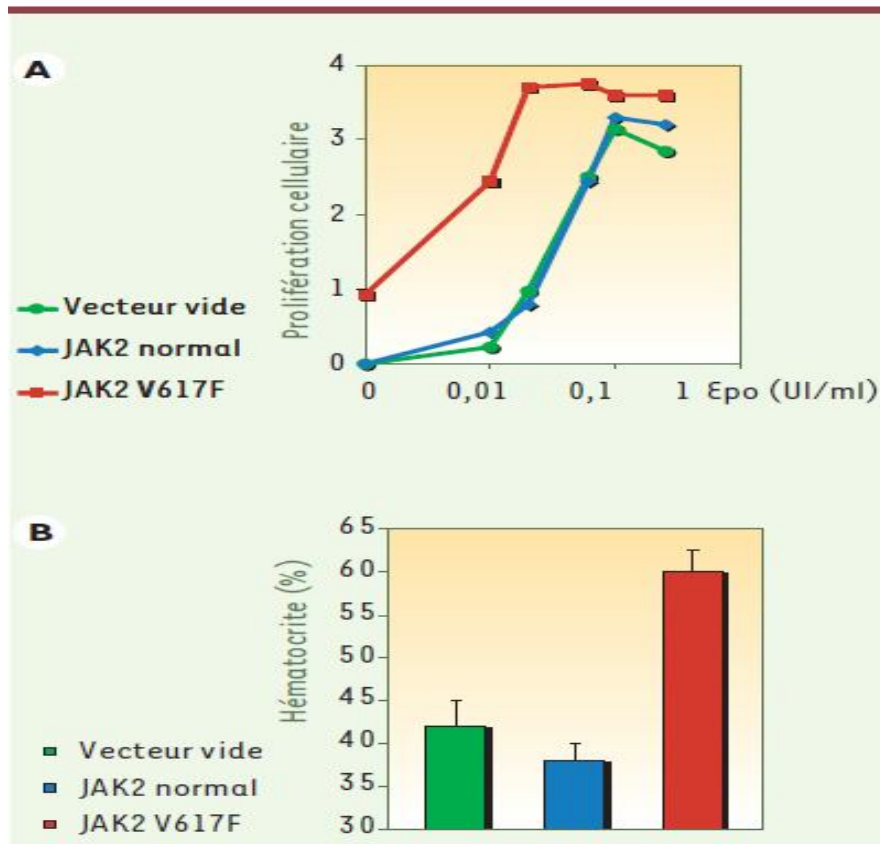


Figure 9 : La protéine JAK2 mutée entraîne une hypersensibilité à l'érythropoïétine in vitro et une polyglobulie in vivo [92].

A. Des lignées cellulaires dépendantes des cytokines ont été infectées par un rétrovirus codant pour JAK2 V617F : une partie de ces cellules devient indépendante des cytokines (Epo) alors que les cellules témoins meurent. De plus, les cellules exprimant JAK2 V617F deviennent hypersensibles aux cytokines, réalisant ainsi un « phénotype cellulaire » très proche de celui observé chez les patients.

B. Des souris irradiées ont été greffées avec de la moelle osseuse infectée par le rétrovirus codant pour JAK2 V617F : elles développent une polyglobulie et une splénomégalie quatre semaines après la greffe [92].

III.2.1.2 La dérégulation de la transcription et de la traduction protéique :

L'ensemble des voies activées en aval de la mutation JAK2 V617F entraîne la dérégulation transcriptionnelle de nombreux gènes. En effet, les protéines STATs étant des facteurs de transcription, leur activation en aval de l'oncogène entraîne une augmentation de la transcription de leurs gènes cibles. De plus, les voies des MAPKs et de la PI3K/Akt agissent sur des facteurs de transcription. On peut donc supposer que la dérégulation de ces deux voies de signalisation en aval de JAK2 V617F entraîne une augmentation de la transcription de gènes. En plus d'une dérégulation transcriptionnelle, l'oncogène favorise la traduction d'ARNm en protéines.

On constate une expression altérée de divers microARN, or le microARN joue sur la traduction des ARNm en se fixant sur leur 3' ou 5'UTR et en augmentant ou en diminuant leur stabilité ou directement leur traduction en protéine.

Une analyse de l'expression des microARN du sang dans la maladie de Vaquez (MV) révèle une expression aberrante de huit microARN (let-7a, miR-182, miR-143, miR-145, miR-223, miR26b, miR-30b, miR-30c and miR-150) à la fois dans les granulocytes, les cellules mononuclées, les plaquettes et les réticulocytes [92].

Des travaux récents montrent un autre mécanisme de dérégulation traductionnelle. Il s'agit d'une dérégulation via la protéine La qui se fixe sur les ARNm et qui favorise leur traduction. Elle est notamment responsable d'une surexpression de p53 en aval de la mutation [94].

Enfin, les voies PI3K/Akt et MAPK régulent la traduction, notamment par l'intermédiaire des protéines mTOR et RSK réciproquement. On peut par conséquent imaginer que l'oncogène JAK2 V617F puisse jouer sur la traduction via la dérégulation de ces voies de signalisation. Cette dérégulation des différents niveaux de synthèse protéique favorise la surexpression de proto-oncogènes (tels que c-myc, Bcl-2 ou les kinases pim) et la diminution du taux protéique des suppresseurs de tumeur (tels que p53, p27kip1 ou Bim) pouvant participer aux mécanismes oncogéniques de JAK2 V617F.

III.2.1.3 L'altération du rétrocontrôle négatif :

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

Cette hyper-phosphorylation l'empêche d'agir comme régulateur négatif de la signalisation en aval de JAK2 muté, et même, au contraire, il favorise la croissance cellulaire [95]. Aussi, la présence de la mutation JAK2 V617F entraîne une surexpression de Lnk, une protéine adaptatrice régulant négativement la transduction du signal de récepteurs aux cytokines. Cependant, JAK2 V617F interagit de manière plus forte avec la région N-terminale de Lnk que JAK2WT, ce qui pourrait créer un déséquilibre d'inhibition entre les deux formes de JAK2 [96]. Ces résultats sont néanmoins controversés. En effet,

certaines travaux suggèrent que Lnk est capable d'inhiber JAK2 V617F[97]. Ces études ne sont cependant pas forcément contradictoires, l'action de Lnk pourrait dépendre du ratio JAK2 V617F/Lnk [96].

Cette altération du rétro-contrôle 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, la mutation ne faisant qu'amplifier la signalisation activée en aval de la forme sauvage de JAK2; elle possède également des modes de régulation qui lui sont propres.

III.2.1.4 La régulation croisée du récepteur à l'IGF :

En plus de mimer une activation de récepteurs aux cytokines de type I et II en l'absence de ligand, JAK2V617F peut aussi activer le récepteur à l'IGF1 (Insuline Like Growth Factor 1) [77]. Notons que ce récepteur ne fait pas intervenir JAK2 lorsqu'il est sauvage. Des travaux antérieurs à cette découverte montraient une hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1 [98]. Or la présence de la mutation entraîne une prolifération cellulaire dépendante de l'IGF1 dans la lignée BA/F3 transduite afin d'exprimer l'oncogène. L'hypersensibilité des progéniteurs érythroïdes vis-à-vis de l'IGF1 pourrait par conséquent être liée à cette activation croisée du récepteur de l'IGF1 par JAK2V617F et pourrait participer au phénotype des **SMP**. Par contre, l'activation du récepteur à l'IGF par JAK2 V617F ne paraît pas être directe mais pourrait faire intervenir l'expression d'adaptateurs induits par la signalisation de l'oncogène précédemment décrite.

III.2.2 L'impact de JAK2 V617F dans la régulation épigénétique :

Dawson *et al.* ont montré que, tout comme JAK2 sauvage, JAK2 V617F est également capable de phosphoryler HP1 α et de lever ainsi sa répression sur l'expression des gènes cible. Cependant, dans les SMP où l'on retrouve une activation constitutive de JAK2, la dérégulation de l'interaction de HP1 α à la chromatine pourrait lever son effet suppresseur de tumeur par une augmentation de l'expression de certains gènes, constituant ainsi un autre mécanisme de dérégulation transcriptionnelle. De plus, cette dérégulation, qui touche la chromatine, pourrait favoriser les recombinaisons mitotiques et l'instabilité génomique (*figure 10*) [67]. Cette régulation est cependant sujette à certaines controverses en raison du doute émis par les observations de Girodon *et al.* sur la localisation nucléaire et cytoplasmique de JAK2 et JAK2 V617F [68].

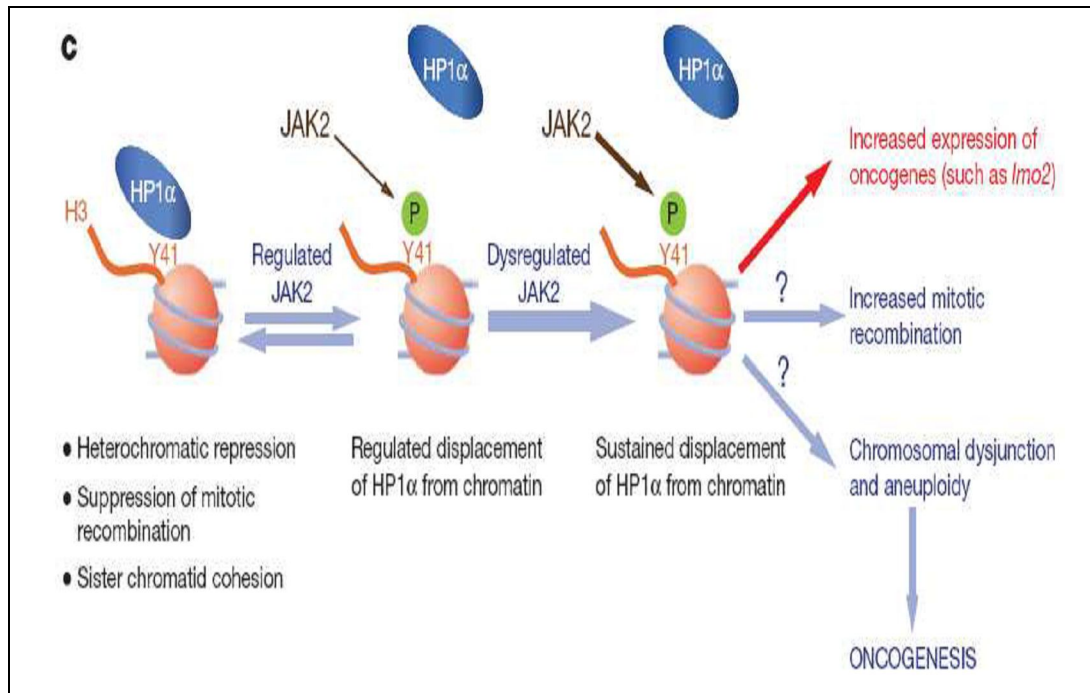


Figure 10 : Implication de JAK2V617F dans la régulation épigénétique [15].

La phosphorylation de l'histone H3 sur tyrosine 41 par JAK2 entraîne le décrochage de HP1 α de la chromatine. Lorsque JAK2 est dérégulé, la phosphorylation continue de l'histone H3 et le décrochage permanent de HP1 α conduit à l'augmentation de l'expression de certains oncogènes come *lmo2*. Ce phénomène pourrait également entraîner l'augmentation de recombinaison mitotiques et une instabilité chromosomique [67].

Cependant, ce n'est pas le seul mécanisme de dérégulation épigénétique entraînée par la mutation. En effet, JAK2 V617F phosphoryle également la méthyl-transférase PRMT5. Cette phosphorylation induit une inhibition de l'activité de PRMT5 et la diminution de la méthylation de l'histone H2A/H4 R3 [99]. Or cette histone est impliquée dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes, soit en la favorisant, soit en l'inhibant. On dénombre 90 gènes dont la transcription est altérée suite à la phosphorylation de PRMT5 par JAK2 muté. De plus, PRMT5 défavorise l'expansion des progéniteurs CD34+ et la différenciation érythroïde, suggérant que la phosphorylation inhibitrice de PRMT5 pourrait être impliquée dans l'expansion érythrocytaire en aval de JAK2 V617F. L'ensemble de ces résultats suggère que JAK2 V617F utilise, en plus des voies de signalisation canoniques, des mécanismes de méthylation afin d'influencer la transcription de ses cibles.

III.2.3 L'impact de la mutation sur la localisation de JAK2 :

Une étude de Rinaldi *et al.* suggère que la présence de la mutation a un impact sur la localisation de JAK2 dans les cellules immatures. JAK2 serait localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules immatures CD34+ de patients portant la mutation alors qu'elle est uniquement cytoplasmique dans les CD34+ issus de donneurs sains.

La localisation de JAK2 dans les granulocytes, les mégacaryocytes et les érythroblastes est majoritairement cytoplasmique dans tous les cas [100].

La localisation nucléaire de JAK2 étant controversée, ces données sont à confirmer. Cette différence de localisation pourrait entraîner des différences de fonctions et d'activité de JAK2 par des variations d'accessibilité vis-à-vis des cibles et des régulateurs.

III.2.4 L'impact cellulaire de la mutation :

La présence de la mutation JAK2 V617F entraîne une amplification de la myélopoïèse terminale [101-103]. Par contre, elle ne semble pas influencer la proportion de cellules souches ou progénitrices [102]. Ce phénomène d'amplification est la résultante d'une augmentation de survie et de prolifération cellulaire.

III.2.4.1 L'avantage de survie :

Bien que certaines études ne montrent pas de différence significative de taux d'apoptose en aval de JAK2 V617F [103], certaines données suggèrent fortement que la présence de l'oncogène confère aux cellules un avantage de survie. Ces contradictions sont probablement dues à des conditions différentes d'études.

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 [83].

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 [104]. 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. Ceci constitue un mécanisme de rétro-contrôle négatif visant à contrôler la production de globules rouges en fonction des changements de taux sériques d'EPO. 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 induite par l'activation du CD95 [105]. La conséquence est un défaut d'activation des caspases et de clivage de GATA-1 favorisant l'expansion érythrocytaire. La protéine c-FLIPshort, un homologue catalytiquement inactif de la caspase 8 rendant les cellules résistantes à la voie d'apoptose extrinsèque, pourrait contribuer à ce phénomène. En effet, les érythroblastes portant la mutation ne présentent pas d'inhibition protéique de c-FLIPshort en réponse à une diminution de la concentration en EPO alors qu'ils le devraient.

Enfin, divers travaux montrant une dérégulation d'autres protéines impliquées dans la survie cellulaire ont été reportés. Notamment, via la dérégulation de la signalisation précédemment décrite, JAK2 V617F entraîne la sur-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL [106-107] et d'autres protéines impliquées de manière indirecte sur l'apoptose comme JunB [108].

III.2.4.2 L'avantage prolifératif :

De nombreux travaux suggèrent que l'oncogène JAK2 V617F favorise la prolifération cellulaire et notamment la transition G1/S.

L'inhibition spécifique (shRNA) ou non spécifique (siRNA et inhibiteurs pharmacologiques) de JAK2 V617F entraîne un arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire [109-110]. Une étude de Balduini *et al.* sur la différenciation mégacaryocytaire dans les SMP montre que les mégacaryocytes ont un fort potentiel prolifératif dans ces pathologies [111].

Au niveau moléculaire, l'inhibition de p27kip1 semble jouer un rôle dans l'excès de prolifération entraînée par la mutation, même si les conséquences fonctionnelles de cette inhibition n'ont pas été clairement définies. La protéine p27kip1 est un régulateur négatif de la transition G1/S du cycle cellulaire qui agit négativement sur les kinases CDK (kinases majeures du cycle cellulaire). Cette protéine est 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 (pharmacologique ou par siRNA) de JAK2 V617F entraîne une augmentation de son expression suggérant qu'il s'agit d'une cible de l'oncogène [104, 110].

Sa dérégulation en aval de la mutation passe par deux mécanismes distincts : d'une part, JAK2 V617F phosphoryle p27kip1 [112] et cette phosphorylation entraîne sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome. D'autre part, elle serait plus fortement dégradée par l'E3 ubiquitine ligase Skp2 qui est sur-exprimée, via les STATs, en aval de l'oncogène [113].

Une dérégulation d'autres protéines intervenant dans la prolifération cellulaire a été observée en aval de JAK2 V617F, comme la dérégulation de c-myc, pim-1/2 [114], p53 [94], Aurora A [115], ou encore JunB [108].

III.2.4.3 JAK2 V617F et dommages de l'ADN :

La mutation de JAK2 est associée à une augmentation de la fréquence de recombinaisons homologues et d'instabilité génétique [116]. 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, d'autant plus que l'oncogène JAK2 V617F empêche l'accumulation de p53 et ainsi, affecte la réponse aux dommages de l'ADN [94].

III.2.4.4 JAK2 V617F et microenvironnement :

Des expériences de clonogénicité visant à évaluer l'action du TNF α sur les capacités clonales des progéniteurs possédant la mutation révèlent que la mutation confère aux cellules une résistance à cette cytokine pro-inflammatoire alors qu'elle réduit la capacité clonale des progéniteurs sains. Ces résultats suggèrent qu'un microenvironnement riche en TNF α pourrait favoriser une sélection du clone muté [117]. Or, le taux de cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF α , est élevé dans les SMP. Le micro-environnement agit également comme protecteur. En effet, les cellules stromales de moelle osseuse protègent les cellules portant la mutation contre des inhibiteurs de JAK2 par la sécrétion de cytokines [118].

III.2.4.5 La JAK2 V617F et les autres mutations du JAK2 :

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 [119]. 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. L'incidence des mutations de l'exon 12 de JAK2 dans les PV est de l'ordre de 3 à 5% (*figure 8*).

Certaines études semblent montrer que toutes les PV sont associées à une mutation de JAK2 (V617F ou exon 12).

Aussi la question se pose de savoir si le diagnostic de PV doit-il être remis en cause lorsqu'aucune mutation de JAK2 n'est pas retrouvée ? La recherche des mutations de l'exon 12 de JAK2 a peu de chance d'être positive devant un tableau d'érythrocytose idiopathique sans pousse autonome [120].

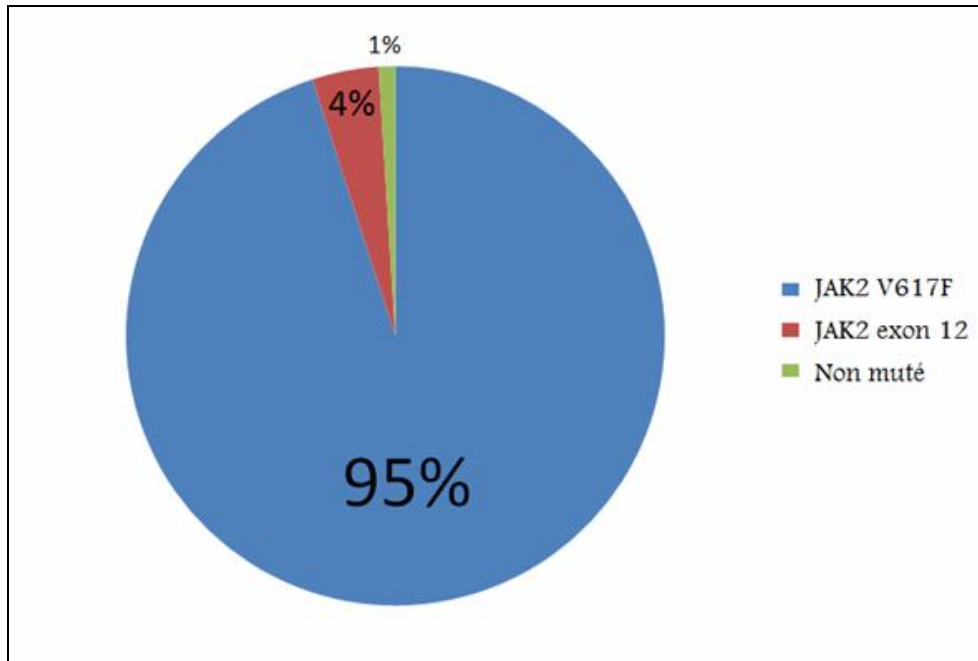


Figure 11 : Fréquence des anomalies moléculaires détectées au diagnostic dans la PV [121].

CHAPITRE IV :
LA RECHERCHE DE LA
MUTATION JAK2 V617F
AU LABORATOIRE

IV.1 LA PHASE PRE-ANALYTIQUE :

IV.1.1 Type de l'échantillon :

La recherche de la mutation JAK2 V617F peut se faire sur l'ADN extrait du sang périphérique ou de la moelle osseuse. Mais dans la plupart des cas, l'option préférée est le **sang périphérique** recueilli sur anticoagulant **EDTA**. L'utilisation d'autres anticoagulants est possible bien que des précautions doivent être prises dans les tubes contenant de héparine de lithium car il ya un risque d'inhibition de l'étape d'amplification de la PCR [122].

L'échantillon doit être de volume suffisant pour obtenir une quantité raisonnable d'acide nucléique (**20 à 30 ml** de sang périphérique), bien que les échantillons provenant de patients neutropéniques peuvent donner moins d'acide nucléique.

Il ne semble pas y avoir une grande différence dans la charge allèle JAK2 V617F entre le sang total et la moelle osseuse [123, 124]. Par conséquent, une aspiration de moelle osseuse peut être évaluée (Tube EDTA ou milieu de culture cytogénétique), mais n'est généralement pas nécessaire si le sang périphérique est disponible.

Les échantillons sont analysés le jour même de leur prélèvement [125]. Le transport se fait à température ambiante, sans centrifugation préalable. Si le délai d'acheminement ou d'analyse est supérieur à 24h, l'échantillon est conservé à 4°C. Enfin, la recherche de la mutation JAK2 nécessite la réalisation d'une NFS.

IV.1.2 Faut-il isoler les granulocytes du sang périphérique ?

Une question importante est de savoir si l'isolement des granulocytes du sang périphérique est nécessaire pour effectuer des tests de détection de la mutation JAK2 V617F.

La mutation JAK2 V617F survient dans la cellule souche hématopoïétique. Mais, chez la plupart des patients, elle est limitée à la lignée **myéloïde**. En outre, la proportion de cellules myéloïdes porteuses de la mutation JAK2 V617F peut varier considérablement d'un patient à un autre et d'un SMP à un autre. En général, les patients atteints de TE ont tendance à avoir un niveau inférieur de la mutation JAK2 V617F par rapport à ceux qui ont des PV ou la MP [126].

Un autre facteur de confusion est représenté par le fait que les patients qui ont été traités avec l'hydroxycarbamide peuvent présenter des niveaux inférieurs de JAK2 V617F [127] bien que d'autres études aient trouvé des changements minimes dans les niveaux de cette mutation sous hydroxycarbamide [128].

Dans l'ensemble, le niveau quantitatif de la mutation JAK2 V617F est d'environ 15% plus faible dans le sang périphérique par rapport aux granulocytes purifiés [129] en raison de la présence des lymphocytes JAK2 V617F négatives. Lorsque des tests ultrasensibles sont utilisés, il n'y a pas de différence du taux de détection entre le sang périphérique et les granulocytes [129 ,130 ,131]. Cependant, quand un test est modérément sensible, comme le gel d'agarose à base de PCR allèle spécifique (Pourcentage d'allèles mutés détecté d'environ 3% [3]), la purification des granulocytes augmente le taux de détection de 92% à 97% pour le PV et de 57% à 61% pour la TE [130]. Par conséquent, l'isolement des granulocytes ne devrait pas être nécessaire si un test de bonne sensibilité est utilisé (Seuil de détection d'allèles mutés de 1 à 3% ou plus). Si le test utilisé a une sensibilité plus faible (*Tableau I*), l'enrichissement des granulocytes peut être nécessaire [132].

Méthode	* Seuil de détection d'allèles mutés approximatif (%)	Référence (S)
ARMS/PCR allèle spécifique †	0,1–5	[3, 125, 133-135]
PCR en temps réel allèle spécifique	0,01–1	[131, 136-139]
Analyse de la courbe de fusion	1–5	[131, 134, 140-141]
Fonte à haute résolution	1–5	[142-143]
Digestion par des enzymes de restriction †	2–10	[131, 144]
Séquençage direct	10–20	[145]
Pyroséquençage	5	[146]
dHPLC	1–20	[147-149]

Tableau I : Approches diagnostiques pour la détection de la mutation JAK2 V617F.

ARMS : Système de Mutation Réfractaire par Amplification ; dHPLC : Chromatographie Liquide dénaturante à Haute Performance.

* Seuil de détection réel dépendra des protocoles exacts.

†Seuil de détection généralement plus grand lorsqu'il est mesuré par électrophorèse sur gel capillaire plutôt que sur gel d'agarose.

IV.1.3 Le choix de l'acide nucléique :

L'ADN génomique est le choix préféré d'acide nucléique en raison de sa stabilité, bien que des essais impliquant des ARN ou des ADNc (ADN complémentaire) soient également disponibles.

Les kits de purification d'ADN, manuelles ou automatiques, donnent généralement des ADN fiables de quantité et de qualité acceptables. Il est conseillé de traiter deux échantillons de contrôle et l'échantillon à tester en utilisant la même méthode pour réduire la variabilité.

La concentration d'ADN devrait également être calculée en utilisant la même méthode pour tous les échantillons, car les différents instruments peuvent produire des concentrations très variables. La quantité d'acide nucléique matrice requis dépendra de la technique particulière choisie, tels que la fonte à haute résolution (HRM) ou la chromatographie liquide dénaturante à haute performance (dHPLC) [150].

IV.2 LA PHASE ANALYTIQUE :

IV.2.1 Techniques :

Plusieurs techniques permettant de détecter, et souvent de quantifier la mutation JAK2 V617F ont été élaborées. Elles reposent, le plus souvent, sur des techniques de biologie moléculaire telles :

- Séquençage.
- PCR allèle spécifique (Amorce spécifique de l'allèle sauvage ou de l'allèle muté), quantitative ou non.
- FRET (étude des courbes de fusion après hybridation de deux sondes fluorescentes contiguës dont l'une recouvre le site de mutation).
- Hybridation et d'hydrolyse de sondes fluorescentes spécifiques de la mutation (Technique TaqMan™).

Les spécificités varient selon la technique utilisée, la calibration de la gamme de standards et l'expertise de chaque laboratoire [151-155].

Il faut retenir que ne sont désormais acceptables pour le diagnostic que les techniques permettant de détecter de faibles charges mutationnelles. La détection d'environ **1%** d'allèles mutés est considérée à ce jour comme un seuil raisonnable pour le diagnostic [156].

De nombreux tests de quantification de la charge JAK2 V617F mutant ont été développés. Ils diffèrent sensiblement dans leurs performances (spécificité et sensibilité) et ont fait l'objet d'une comparaison détaillée par le LeukemiaNet européen et MPN & MPNr-EuroNet étude groupes [157].

Les deux techniques de référence sont représentées actuellement par le **séquençage** et le **PCR en temps réel allèle spécifique** [157].

IV.2.2 Le choix du test :

Les techniques décrites pour la détection de la mutation JAK2 V617F sont généralement classées en deux catégories principales (*Tableau II*) :

- les tests conçus pour cibler spécifiquement la mutation c.1849G>T
- (PCR spécifique d'allèle par exemple) ;
- et les tests qui ciblent la région de l'exon 14 englobant la mutation
- c.1849G>T (Séquençage direct, Analyse HRM).

Pour les tests qui ciblent spécifiquement l'allèle mutant, la spécificité est généralement obtenue grâce à l'utilisation d'une amorce de mutation ou une sonde spécifique. Les kits commerciaux sont disponibles pour la détection de JAK2 V617F et ceux-ci sont basés sur des approches similaires.

Deux critères principaux sont importants dans le choix d'un test :

- il doit être spécifique (faux négatifs ou niveau de base clairement définie de telle sorte que les cas de JAK2 V617F positifs et négatifs peuvent être facilement distingués) ;
- et assez sensible pour être en mesure d'identifier un allèle JAK2

V617F mutant avec une charge aussi basse que 1-3% [158,159].

Les principaux kits disponibles et commercialisés sont : JAK2 Activating Mutation Assay (InVivoScribe, San Diego, CA), JAK2 MutaScreen™ pour la détection et JAK2 MutaQuant™ (Ipsogen, Luminy Biotech, Marseille, France), JAK2 V617F and JAK2 Exon 12 Mutation analysis (Bristol Genetics Laboratory, North Bristol, UK), JAK2 Exon 12 Mutation Screen (Canterbury Health Laboratories, New Zealand).

IV.2.3 Les caractéristiques des techniques et des tests de diagnostic :

IV.2.3.a. Le séquençage direct de l'ADN :

La plupart des études princeps de JAK2 V617F ont étudié la prévalence de la mutation par séquençage direct de matrice d'ADN génomique amplifié par PCR [5, 10, 71, 160] ou matrice d'ADN complémentaire amplifié par PCR à partir d'ARNm générés [7-8, 161] ou les deux à la fois en utilisant un colorant fluorescent comme le Big Dye dans la méthode de séquençage de Sanger.

Pour la technique de Sanger, une réaction d'extension d'amorce est effectuée avec une matrice d'ADN amplifié à l'aide d'un mélange de dNTP marqué par un colorant et le produit est détecté par un détecteur de fluorescence Multiwave (ABI Prism 3100 ; Applied Biosystems, Foster City, CA) après électrophorèse sur gel capillaire.

Bien que cette méthode donne des informations détaillées et est considérée comme une technique de "visualisation directe" des informations de séquence, elle a une sensibilité limitée à cause du bruit de fond dans le chromatogramme généré [162].

Les expériences de mélange d'ADN ont montré que, pour la plupart des mutations ponctuelles, le séquençage automatisé est sensible uniquement pour environ 20% d'ADN mutant [3].

Le séquençage direct ne peut pas offrir la sensibilité désirée ou nécessaire à des fins de diagnostic. James et *al.* [163] l'ont démontré en particulier à l'égard de JAK2 c.1849 G>T en effectuant une série d'expériences de mélange avec des

cellules HEL d'érythroleucémie, porteuse de la mutation JAK2, et des cellules TF-1 d'érythroleucémie, qui en sont dépourvues. Ils n'ont pas réussi à détecter l'allèle muté quand il était présent dans moins de 5% de l'ADN total. Avec l'ADN mutant de patient homozygote dilué dans l'ADN d'une personne en bonne santé, le séquençage a été encore moins sensible (10%) qu'il ne l'était avec les lignées cellulaires [163].

Divers groupes ont utilisé différentes amorces oligo-nucléotidiques et des protocoles d'amplification par PCR pour le séquençage de JAK2. Le protocole suivant, très robuste a été utilisé avec succès par plusieurs laboratoires [160, 164-165] : pour une réaction PCR de 50 µl, on utilise 25 ng de matrice d'ADN, 5µl de tampon 10X (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) avec une concentration finale en MgCl₂ de 1,5 mmol/L, 1,5 UI de Taq polymérase (Roche), 0,8 mmol/L dNTP (Roche), et 20 pmol/L de chacun des amorces sens : (5'- TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT-3') et antisens (5' TCCTACA GTGTTTTTCAGTTTCAA-3'.

Les paramètres du cycle PCR sont les suivants : un cycle de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 minutes, puis 35 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 52°C pendant 40 secondes, et 72°C pendant 40 secondes, et une extension finale de 72°C pendant 2 minutes. Les amplicons sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose et séquencés en utilisant les mêmes amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

Le séquençage direct d'ADN est précieux comme technique de recherche, sensible et avec l'avantage de pouvoir détecter d'autres mutations rares de l'exon 14 (L611V, D620E, ...). Cependant, il est délicat et fastidieux lorsqu'il est utilisé dans un laboratoire clinique. Il demande beaucoup de travail, beaucoup de temps, le coût est élevé et nécessite un équipement spécialisé.

IV.2.3.b. PCR Allèle-spécifique (Amplification Refractory Mutation système (ARMS)).

L'ARMS exploite le fait que des amorces oligo-nucléotidiques doivent être parfaitement hybridées à leur extrémité 3' par une ADN polymérase pour prolonger ces amorces par PCR. En concevant des amorces oligo-nucléotidiques qui correspondent seulement à un point spécifique de mutation d'ADN, comme celui codant pour JAK2 V617F (amorces qui ne lient pas les allèles de type sauvage), l'ARMS peut distinguer les allèles polymorphes.

Pour ces techniques encore connues sous les noms de : "PCR allèle spécifique" (AS-PCR) ou "Séquence-spécifique d'amorces de PCR", il est nécessaire d'inclure des contrôles positifs et négatifs pour s'assurer que l'absence de génération de produits à partir d'un échantillon donné n'est pas simplement due à l'échec de la réaction de PCR plutôt qu'à l'absence de la mutation.

Plusieurs auteurs ont généré des ensembles d'amorces ARMS/AS-PCR pour la détection de la mutation JAK2 c.1849 G>T [10,134]. Les oligonucléotides utilisés par Jones et *al.* [10] sont :

- l'amorce extérieure sens (5'-TCCTCAGAACGTTGATGGCAG-3') ;
- l'amorce extérieure anti-sens(5' ATTGCTTTCCTTTTTCAC AAGAT-3') ;
- l'amorce sens spécifique de l'allèle sauvage ;
- (5'-GCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATaTG-3') ;
- l'amorce anti-sens spécifique de l'allèle muté (5'GTTTTACTTACTCTC TCCACAaAA-3').

Lorsque les amplicons générés de cette manière sont révélés en gel d'agarose, les amorces de type sauvage peuvent être démontrées en ce qu'elles ont généré un produit de 229-pb, alors que les amorces spécifiques de mutant donnent un produit de 279-pb [10].

L'avantage de l'ARMS est représenté par sa sensibilité apparente élevée pour de petites quantités d'ADN mutant dans un fond de type sauvage. Baxter *et al.* [4] ont affirmé que leurs amorces ARMS pouvaient détecter une mutation V617F de mixte clonalité si elle était présente dans seulement 3% des cellules, tandis que Jones *et al.* [10] ont démontré qu'ils pouvaient détecter la mutation entre 1 à 2%. McClure *et al.* [134] ont rapporté 0,01% de sensibilité de détection de la mutation avec leurs amorces ARMS.

IV.2.3.c. PCR en temps réel et de l'ADN de fusion Curve :

La PCR temps réel a pour principal intérêt la détection semi-quantitative de la mutation JAK2 V617F [166].

La PCR en temps réel utilise, des molécules fluorescentes qui sont incorporées dans l'ADN pendant la phase exponentielle de la PCR et sont suivies à mesure qu'elles s'accumulent. L'hypothèse de base est que la quantité de fluorescence dans la chambre de réaction est directement proportionnelle à la quantité d'amplicon présent dans le tube, qui à son tour est fonction de la quantité de matrice cible au début de la réaction [167].

Le dosage de courbe de fusion d'ADN peut être utilisé en conjonction avec PCR en temps réel. Ces tests sont basés sur le principe que l'hybridation du brin d'ADN complémentaire est beaucoup plus forte en présence d'une amorce-matrice de parfaite correspondance, par rapport aux paires amorce-matrice ayant un degré de désadaptation de base. Pour exploiter cette propriété, un court fragment d'ADN génomique couvrant un site de mutation peut être amplifié par PCR en temps réel, et ensuite analysées par un gradient de température pour déterminer à quelle température les deux brins –interactions sont perturbés.

En plus des amorces sens non marquées et des amorces oligonucléotidiques anti-sens, deux sondes d'hybridation fluorescentes sont également incluses dans la réaction de PCR, une avec un fluorophore donneur (par exemple un 3'-fluorescéine Tag) et l'autre avec un fluorophore accepteur (par exemple, 5'- LC Red 640 Tag). Ces sondes se lient à l'intérieur de 1 pb de l'autre, et au cours de l'évaluation de courbe de fusion post-PCR, cette proximité permet le transfert à l'énergie de résonance de fluorescence [168] avec l'émission de lumière qui peut être détectée par l'instrument. Une sonde fluorescente est conçue pour s'étendre sur le site de la mutation, et la sonde elle-même contient une séquence qui est complémentaire de la séquence de type sauvage. Cette sonde se lie plus étroitement à la séquence de type sauvage plutôt que la séquence contenant la mutation ponctuelle.

La température du tube de réaction est élevée en continu lors de l'étape de fusion et les sondes se dissocient du produit accumulé PCR en fonction de leur avidité de liaison. Une diminution de fluorescence s'observe lors la dissociation du produit de PCR. Dans le test de détection de la mutation JAK2 conçu par

McClure et *al.*, la sonde qui se lie à l'ADN mutant se dissocie à 55° C, alors que la sonde fixée sur une séquence de type sauvage se dissocie à 65° C, permettant à l'ADN muté et sauvage amplifié d'être distingué (*figure 12*). Ce test à un seuil de détection d'environ **1 à 10%** d'ADN mutant [134].

James et *al.* ont comparé la chimie des colorants fluorescents de séquençage de deux différents systèmes PCR en temps réel, l'une utilisant un instrument Light Cycler et l'autre utilisant un prisme Taqman machine ABI 7500. Ces techniques PCR en temps réel sont chacune beaucoup plus sensible que le séquençage et détectent de 0,5 à 1% d'ADN de la lignée cellulaire HEL dilué dans l'ADN de la lignée cellulaire TF-1 et de **2 à 4%** d'ADN muté d'un patient homozygote dilué dans l'ADN d'une personne en bonne santé[163]. Les séquences d'amorces n'ont pas été rapportées par les auteurs, mais les courbes d'ADN de fusion sont différentes de ceux rapportés par McClure et *al.*, ce qui suggère que les amorces utilisées étaient différentes. James et *al.* ont constaté que si l'analyse de la mutation JAK2 V617F par PCR en temps réel a été utilisé comme première étape pour diagnostiquer une érythrocytose, 58 des 81 patients examinés auraient pu être épargnés d'autres explorations parce que la valeur prédictive positive de JAK2 V617F pour les maladies myéloïde clonale semble être à 100%.

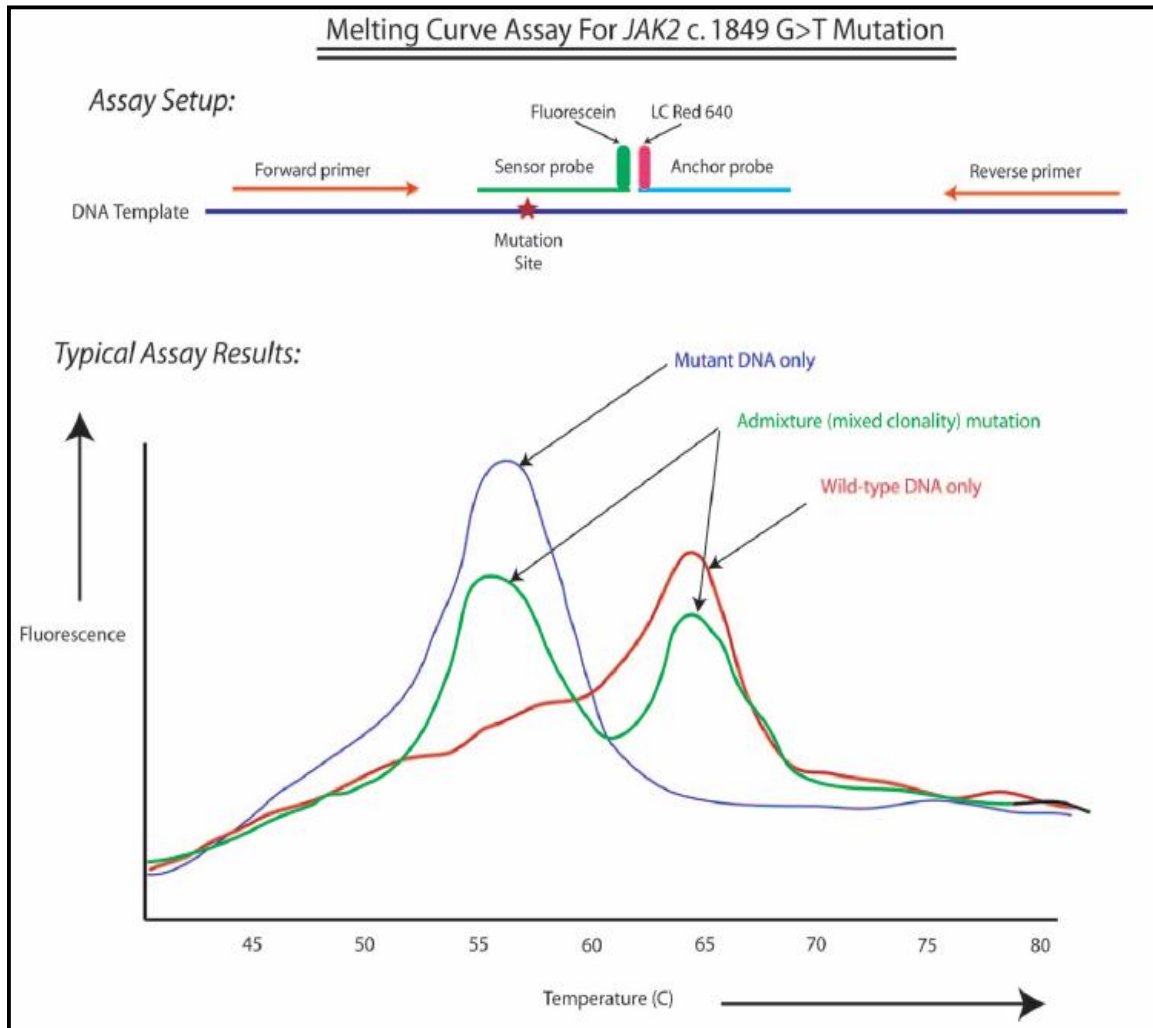


Figure 12 : L'analyse des courbes de fusion pour la détection de la mutation JAK2 c.1849 G>T [134].

La configuration de la sonde PCR primaire est montré en haut, et les résultats typiques de type sauvage, clonalité mixte, et les échantillons des patients exclusivement mutants sont au plus bas. Lorsque la fluorescéine et LC Red 640 balisées sondes sont liées de façon adjacente à la matrice d'ADN, cela permet le transfert d'électrons par résonance fluorescente, qui est ensuite perturbée par la fusion d'ADN, ce qui facilite la détection du produit. La méthode est celle décrite par McClure et coll. [134].

IV.2.4. Place de la quantification de JAK2 V617F au diagnostic :

La quantification qui est déterminée aussi par le rapport M/W entre le nombre d'allèles mutés [M] et sauvages [W] wild-type, non-mutés] au sein des cellules sanguines, permet d'identifier l'état homozygote/hétérozygote de la mutation. Par ailleurs, ce même rapport quantitatif constitue un paramètre du suivi thérapeutique des SMP positifs pour la mutation V617F :

- le suivi post-allogreffe médullaire, en particulier pour des SMP de type MP, est déjà validé [137]
- l'usage d'inhibiteurs spécifiques de la kinase JAK2 ouvre de nouvelles perspectives de suivi thérapeutique, sur la base d'une quantification de la mutation V617F, analogue à celle pratiquée pour les LMC traitées par imatinib (quantification du réarrangement BCR-ABL).

IV.2.5 Les Considérations relatives à la validation d'un test de détection de JAK2 V617 :

Dans le cadre d'un contrôle de qualité permanent, le test doit être validé d'une manière appropriée. Notamment avec les tests les plus sensibles, une grande série d'échantillons témoins (sujets en bonne santé) devra être évaluée afin de déterminer le taux des faux positifs [169]. Idéalement au moins 100 échantillons doivent être testés, ce qui donne un intervalle de confiance inférieure à 97.5% de spécificité en supposant que tous les résultats sont négatifs (300 échantillons sont nécessaires pour donner 99% de spécificité). Ces données doivent démontrer l'absence d'un résultat «positif» ou au minimum, identifier un

seuil en-dessous duquel le résultat est défini comme «non détecté». Si les faux positifs sont observés, il faut modifier le dosage pour réduire ou empêcher l'amplification inappropriée [150].

La validation doit également déterminer la sensibilité approximative du test. C'est plus simple pour les tests qui peuvent quantifier la valeur absolue de la charge du mutant V617F JAK2 grâce à l'utilisation de courbes standards des réactifs. En réalité, la comparaison entre les laboratoires est difficile étant donné l'absence de réactifs de référence certifiés qui pourraient être universellement appliqués. Cependant, une série de dilutions appropriées peut être préparée en utilisant les lignées cellulaires de JAK2 V617F positives, telles que l'UKE-1 ou HEL, utilisés pour déterminer la sensibilité du test. Parmi ceux-ci, l'UKE-1 est préférable. Comme décrit ci-dessus, l'atteinte d'une sensibilité de 1-3% est souhaitable et un tel test pourrait s'attendre à identifier la grande majorité des patients atteints avec un niveau pathogénique pertinent du clone mutant JAK2 V617F. Quelle que soit la sensibilité obtenue, il est important d'indiquer la sensibilité du test lors de la déclaration des résultats [150].

Le contrôle qualité interne doit être effectué ainsi que des contrôles appropriés devant être inclus dans chaque série. Ces contrôles inclurait un V617F JAK2 connu positif (> 5% V617F), un JAK2 V617F positif à un niveau de 1-3% (ou tout autre pourcentage <5% pour évaluer la sensibilité) et les contrôles normaux [150].

Enfin, la participation à un programme approprié pour l'évaluation externe de la qualité de détection du mutant V617F JAK2 (par exemple www.ukneqasli.Org.uk) fournit une évaluation indépendante de la qualité du test. La participation à un tel programme est nécessaire pour l'accréditation des laboratoires au Royaume-Uni. Il est à noter qu'une récente étude internationale au Royaume-Uni effectuée par le Service national d'évaluation externe de la qualité pour l'immunophénotypage leucocytaire a révélé que 20% des laboratoires d'essai n'ont pas réussi à détecter le mutant JAK2 dans un échantillon à 2% de V617F et 9% des laboratoires n'ont pas réussi à détecter la mutation à 5% V617F [170].

En conclusion, nous pouvons souligner que :

- Le séquençage direct n'est pas recommandé comme méthode de choix parce qu'il ne dispose que d'un seuil de détection de 10-20% (**Tableau II**).
- D'autres tests qui possèdent un seuil de détection de 3-5%, comme la digestion des enzymes de restriction, gel d'agarose à base d'allèle-spécifique PCR et pyroséquençage, peuvent aussi échouer à identifier un petit nombre de patients porteurs d'une mutation pathogénique importante de bas niveau de JAK2 V617F.
- L'utilisation des tests plus sensibles telle la **PCR allèle spécifique** augmente le taux de détection de JAK2 V617F chez les patients atteints de PV et de TE en particulier lorsque le sang périphérique non fractionné est utilisé [130-131, 144,158].

- Enfin, pour atteindre un seuil de détection de 1-3%, il est nécessaire d'analyser au moins **20 ng d'ADN génomique**, soit l'équivalent de 3030 génomes diploïdes.
- Il faut noter que l'OMS n'impose pas de techniques de détection de la mutation pourtant différentes quant à leur sensibilité (séquençage, ou PCR allèle spécifique, ni de recommandations préanalytiques (JAK2 V617F peut être réalisée sur sang total ou sur la population granuleuse).

	PV	TE	MFP
Par séquençage	422/557 (76%)	80/160 (50%)	114/391 (29%)
Par PCR allèle-spécifique	71/73 (97%)	8/16 (50%)	29/51 (57%)

Tableau II : Prévalence de la mutation JAK2 V617F dans les SMP [171].

IV-3 PHASE POST-ANALYTIQUE :

VI.3.1 Comment interpréter les résultats :

La présence de la mutation, quelle qu'en soit la charge, est un élément très en faveur de SMP même s'il ne suffit pas à le classer. Il faut et il suffit que le résultat soit supérieur au seuil de détection de la technique pour affirmer la présence de la mutation. Le seuil de détection doit être mentionné sur les résultats rendus.

L'absence de mutation JAK2 V617F ne permet en aucun cas de récuser le diagnostic de SMP. En effet, "seuls" 95% des PV, 50 à 70% des TE et environ 50% des MP présentent une mutation JAK2 V617F [156].

✓ **Concernant les PV**, les patients présentent dans leur grande majorité la mutation. Son absence dans un contexte évocateur de SMP (érythroïdémie basse, pousse 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, SMD si la cytologie est en faveur). Lorsqu'elle est pratiquée, la quantification (exprimée sous la forme de pourcentage d'allèles JAK2 V617F par rapport aux allèles JAK2 total) peut orienter le diagnostic. Lorsque cette charge est supérieure à 50%, on peut conclure à la présence d'au moins un clone homozygote, élément rarissime au cours des TE [156].

L'impact pronostique de la charge mutationnelle au diagnostic a été suggéré sans qu'un consensus clair soit dégagé à ce jour, peut-être en raison de la variabilité des techniques. L'étude de la charge mutationnelle peut s'envisager pour suivre l'évolution du clone muté. Dans ce cas, il faut utiliser du matériel homogène pour comparer les données. Ce suivi permet d'apprécier l'augmentation du clone ou la diminution de la charge mutationnelle sous traitement, en particulier en cas d'utilisation d'interféron ou d'allogreffe.

Les problématiques de suivi de faibles charges mutationnelles post-traitement restent le sujet d'une importante recherche [156].

IV.3.2 Interprétation des mutations V617F JAK2 bas niveau au moment du diagnostic :

Les résultats V617F JAK2 < 1-3% doivent être interprétés selon le contexte clinique, morphologique, hématologique et autres résultats de laboratoire. Il a été démontré que la mutation JAK2 V617F peut parfois être trouvée chez des individus normaux lors l'utilisation des tests très sensibles [172-174]. En supposant que le résultat ne représente pas un faux positif, la mutation V617F JAK2 faible niveau peut être retrouvée dans certain cas :

- (i) le traitement par une thérapie de réduction tumorale qui peut réduire le niveau du clone JAK2 V617F positif au sein de l'échantillon [127].
- (ii) la présence de deux clones MPN chez le patient, dont un seul est JAK2 V617F positif [175]. L'évaluation de la mutation JAK2 exon 12 ou la mutation MPL exon 10 peut révéler l'existence de ces clones. Chez un patient présentant une mutation V617F JAK2 faible niveau mais avec une numération formule sanguine normale, la signification clinique est moins claire. Il est évident que le dosage de la ferritine et/ou la mesure du volume globulaire isotopique doit être réalisé afin d'écarter d'éventuelles polyglobulies masquées.

Un clone JAK2 V617F bas niveau positif peut rester stable, voire parfois disparaître avec le temps, sans effets cliniques significatifs. Quelle que soit la cause et la situation clinique relative à une mutation V617F JAK2 bas niveau, il est prudent de répéter le dosage dans les 3-6 mois si possible [150].

IV.3.3 Les faux positifs :

Des résultats faussement positifs peuvent également se voir en raison de la réaction croisée des amorces ou des sondes [158]. Aussi, en cas de dosages très sensibles, il est extrêmement important d'évaluer le taux de faux positifs en utilisant une série d'échantillons témoins provenant de sujets en bonne santé.

Le test doit également donner une indication de la qualité et de la quantité d'ADN pour déterminer s'il est suffisamment sensible pour chaque patient. La qualité de l'échantillon peut être jugée en utilisant un nombre absolu de copies d'un gène de contrôle, la valeur CT pour un gène de contrôle, la résistance d'une bande sur un gel, la hauteur du pic de fragment, la hauteur de la séquence ou toute autre forme appropriée. Des critères spécifiques devraient être prévus pour identifier les échantillons qui sont de mauvaise qualité. Il est important de souligner que pour les hémopathies myéloïdes, JAK2 V617F n'est pas spécifique (*Tableau III*). D'autres données cliniques ou biologiques sont toujours nécessaires pour un diagnostic précis de l'affection. Une ponction-biopsie médullaire est indiquée pour exclure la fibrose, la dysplasie et la présence de blastes. De plus, elle permet d'effectuer un caryotype à la recherche d'éventuelles anomalies génétiques additionnelles [150].

Mutations	Maladies	Fréquence [references]
JAK2 V617F	Polyglobulie vraie	~ 95 % [153, 176]
	Thrombocythémie essentielle	~ 50 % [153, 176]
	Myélofibrose primitive	~ 50 % [153, 176] ~
	Leucémie chronique à neutrophiles	20 % [153, 176]
	Syndromes myéloprolifératifs non classes	~ 11 à 20 % [153, 176]
	Leucémie myélomonocytaire chronique	~ 3 à 9 % [160, 177]
	Leucémie chronique a basophiles	~ 3 % [153, 176]
	Leucémie myéloïde aigue	Rare [153, 176]
	Myélodysplasie	Rare [153, 176] 0
	Néoplasmes lymphoïdes, autre cancers	% [153, 176]
JAK2 Exon 12	Polyglobulie vraie	< 5 % [160, 177]
MPL W515	Thrombocythémie essentielle	1 % [160, 177]
	Myélofibrose primitive	5 % [160, 177]

Tableau III : Fréquence des mutations de JAK2 et MPL dans les hémopathies malignes

La mutation JAK2V617F n'est pas spécifique des SMP Ph- classiques. La mutation peut être très rarement retrouvée dans les leucémies aiguës [178-179]. Elle a également été décrite dans 3 à 9% des LMMC [160, 177], dans 2% des leucémies à éosinophiles [10]. Elle est présente dans 4% des mastocytoses systémiques [180], dans 11% à 20% des néoplasmes myéloprolifératifs inclassables [10, 177]. Environ 5% des syndromes myélodysplasiques sont JAK2 mutés [160, 181]. Dans l'entité provisoire décrite par l'OMS 2008, appelée anémie réfractaire avec excès de sidéroblastes en couronne et thrombocytose marquée (RARS-T) [182] classé dans les SMP/SMD, la fréquence de la mutation JAK2 V617F est d'environ 60% des cas [177, 183-185].

IV.3.4 Les faux faibles niveaux :

Les Faux faibles niveaux peuvent se produire suite à la présence d'une mutation supplémentaire au niveau de l'exon 14 ou à des polymorphismes héréditaires. Si ces changements supplémentaires se trouvent dans l'une des amorces ou des sites de liaison de sonde, ils peuvent réduire l'efficacité de l'amplification spécifique du V617F par PCR. De rares cas de mutations supplémentaires acquises ou variantes constitutionnelles ont été rapportés (*Tableau IV*). L'évaluation de la mutation c.1849G>T (V617F) par une autre méthode qui utilise différentes amorces ou sondes peut être utile dans les situations où le niveau d'amplification est apparemment faible [150].

Mutation	acides aminés	Référence
1831T>G/1849G>T	L611V/V617F	[186]
1839T>C/1849G>T	Y613Y/V617F	T. Clench (observations non publiées)
1848T>C/1849G>T	C616C/V617F	[187]
1849G>T/1851C>T/1852T>C	V617F/C618R	[188]
1849G>T/1853G>T	V617F/C618F	[188]
1860C>A	D620E	[189]
G1849G>T/1860C>A	V617F/D620E	[190]
1849G>A	V617I	[191]

Tableau IV : Variantes Non-V617F de JAK2.

CHAPITRE V :
MUTATION JAK2 V617F
ET PATHOLOGIES

V.1 LA MUTATION JAK2 V617F ET SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS (SMP) :

V.1.1. Recherche à visée diagnostique :

La mutation JAK2 V617F est un élément diagnostique majeur des **syndromes myélo-prolifératifs (SMP)** hors leucémie myéloïde chronique

(LMC). La mutation JAK2 V617F est présente dans : [3, 176]

- 95% de polyglobulie de Vaquez
- 50% de thrombocytémie essentielle
- 50% de myélofibrose primitive

Une étude réalisée au Maroc [192] était la première à s'intéresser au statut de la mutation JAK2 V617F dans les SMP. Elle a intéressée 70 patients. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local de la Faculté de médecine de Casablanca. La mutation JAK2 a été détectée par PCR allèle spécifique (AS-PCR). Le *Tableau V* représente les résultats de l'étude.

Pathologies	Nombre des patients	Nombre des patients ayant la mutation
Polyglobulies de vaquez	19	17(89.47%)
Thrombocythémie essentielle	8	5(62.5%)
Myélofibrose primitive	12	4(33.33%)
leucémie myélomonocytaire chronique	1	1
Syndrome d'hyperéosinophilie	5	1
Polyglobulie ou thrombocytose secondaire	20	0
SMP inclassable	5	1

Tableau V : Fréquence de la mutation JAK2 V617F dans les SMP au Maroc [192].

La fréquence de la mutation JAK2 V617F dans la PV est de 89.47%, 62,5% dans la TE [13] et de 33,33% dans la MP. Pour la PV et la TE les données sont conformes à ceux de la littérature [3,4]. Par contre pour la MP la fréquence retrouvée est relativement relativement faible par rapport aux résultats publiés [2, 3,14]. Cette différence pourrait s'expliquer par le faible effectif de l'échantillon (12 cas de MP), ou par un éventuel diagnostic inexact. La mutation a été détectée dans un cas parmi cinq syndromes hyperéosinophile et dans un seul cas de la leucémie myélomonocytaire chronique [192].

a- Dans les polyglobulies : après exclusion des causes évidentes d'érythrocytose secondaire, la recherche est indispensable en première intention, associée au dosage d'EPO. La présence de la mutation signe l'existence d'une Polyglobulie de Vaquez. Cependant la mutation JAK2 V617F n'est pas détectée dans 5% environ des SMP avec polyglobulie. D'autres anomalies moléculaires telles les mutations de l'exon 12 de JAK2 peuvent être retrouvées dans ces rares cas [191,193]. Donc devant une suspicion de polyglobulie (augmentation de l'hématocrite supérieur à 47% chez la femme et à 54% chez l'homme, les explorations étant légitimes dès 45% et 51% respectivement), en dehors des contextes évidents (polyglobulie chez un patient hypoxémique ou hémococoncentration évidente), la recherche d'une mutation JAK2 V617F est justifiée. Il faut y adjoindre un dosage d'érythropoïétine circulante (EPO) avant tout traitement.

Si une saignée est indiquée en urgence, il faut au moins prélever et stocker le sérum avant traitement, car celui-ci modifiera l'érythropoïétinémie.

La recherche de la mutation JAK2 V617F **n'est pas affectée** par les saignées. En revanche, certains traitements cyto-réducteurs peuvent entraîner sa négativation (après plusieurs semaines) [191,193].

b- Dans les thrombocytoses : l'analyse est indispensable en première ligne devant une thrombocytose persistante depuis plus de 3 mois après exclusion des causes évidentes et réactionnelles de thrombocytose. La présence de l'anomalie signe le diagnostic de thrombocytémie essentielle (TE) dans la plupart des cas. Cependant la mutation JAK2 V617F n'est pas détectée dans **40%** des cas. D'autres anomalies moléculaires telles les mutations de MPL, récepteur de la thrombopoïétine, sont retrouvées dans moins de 5% des cas. Environ 35% des cas restent sans anomalie connue à ce jour [191,193].

L'évolution à long terme de certains cas de TE peut être marquée par le risque de transformation en une polyglobulie de Vaquez authentique dans 5 à 6,5 % des cas environ [8]. Une étude prospective récente a montré que ce type d'évolution n'a été observé à ce jour que dans les formes portant la mutation V617F sur JAK2 [9].

c- En cas de suspicion de myélofibrose primitive (MFP) ou secondaire à un autre SMP, cette analyse est également utile. La présence de l'anomalie confirme l'existence d'un SMP devant une myélofibrose en histologie. Cependant la mutation JAK2 V617F n'est pas détectée dans environ **50%** des MFP. Des mutations de MPL sont retrouvées dans environ 10% des cas [191,193].

En résumé, la démarche diagnostique actuellement validée est la suivante (*figure 12*) [200] :

- La recherche de la mutation JAK2 V617F fait partie du bilan initial de toute suspicion de syndrome myélo-prolifératif. L'apport diagnostique de la quantification de l'allèle muté est discuté.
- La recherche d'une mutation de l'exon 12 de JAK2 doit être réservée aux cas de polyglobulies JAK2 V617F négatives avec taux sérique d'EPO abaissé et/ou autre critère mineur positif.
- Lorsque JAK2 n'est pas muté, le bilan hématologique doit d'abord affirmer le diagnostic de SMP avant d'en préciser le type. La TE reste un diagnostic d'élimination et la réalisation d'une biopsie médullaire est fortement recommandée.
- Les mutations de MPL sont peu fréquentes mais leur recherche peut être utile au cours du bilan diagnostique d'une thrombocytose ou d'une myélofibrose JAK2 V617F négatives. La recherche des mutations de CBL, LNK, TET2, ASXL1, EZH2 n'est pas encore réalisée en routine.

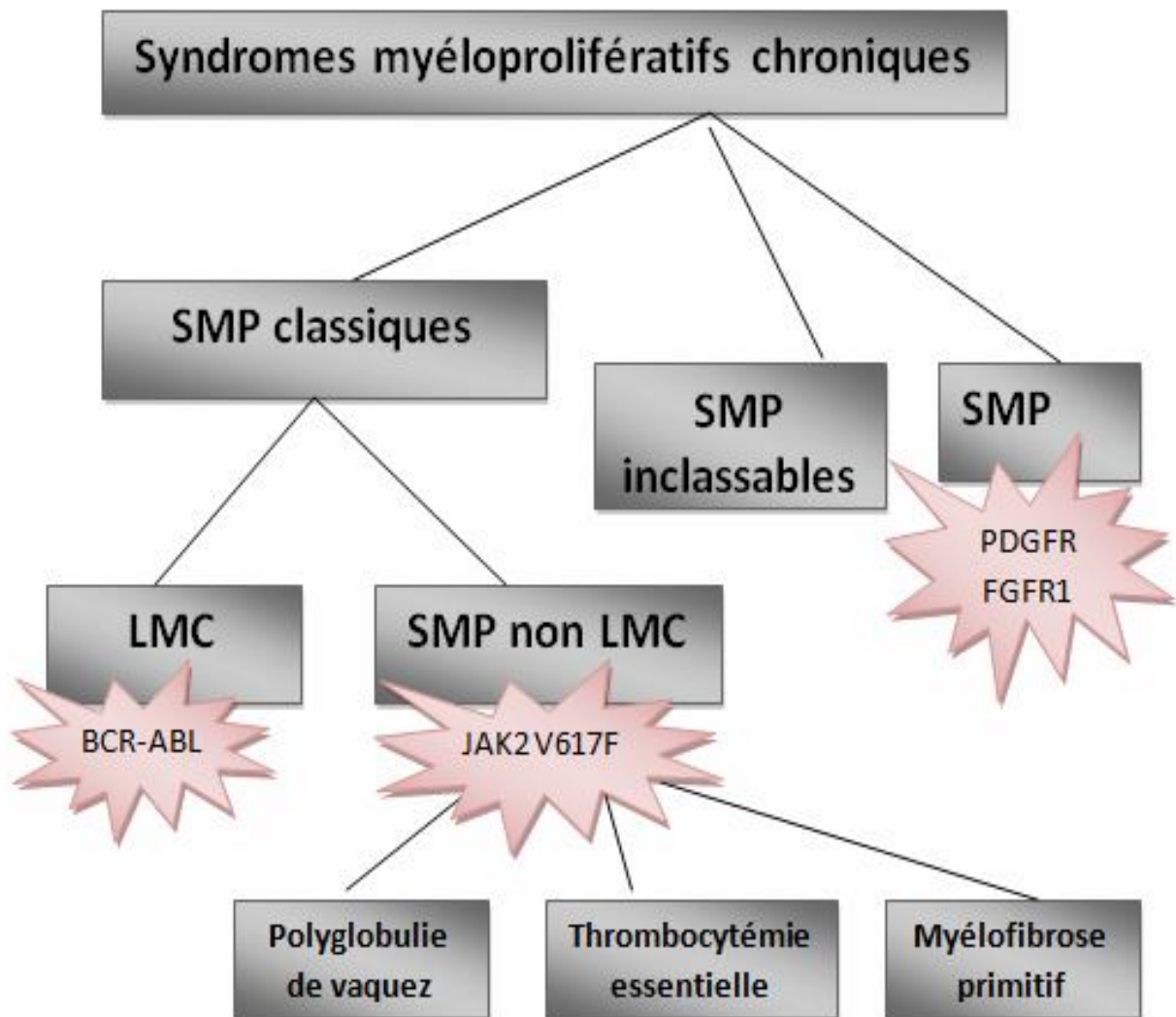


Figure 13 : la démarche diagnostique devant un syndrome myélo-prolifératif [200].

**V.1.2. Place de la mutation JAK2 V617F dans la classification
OMS 2008 des SMP en dehors de la LMC (tableau VI)**

	PV	TE	MFP
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 unemorphologie de grands 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"> • érythromyélemie • 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

Tableau VI : Critères diagnostiques OMS 2008 des SMP en dehors de LMC [198].

* L'augmentation de l'hémoglobine (Hb) et de l'hématocrite (Ht) sont aussi définis ainsi : Hb ou Ht > 99e percentile des valeurs théoriques pour l'âge, le sexe, et l'altitude de résidence. à défaut les seuils respectifs de 15 g/dL et 17 g/dL peuvent être utilisés s'il peut être démontré que le patient présentait antérieurement un taux basal d'Hb inférieur d'au moins 2 g/dL en l'absence de carence martiale. VGI : volume globulaire isotopique. BOM : biopsie ostéomédullaire. PNN : polynucléaires neutrophiles. LMC : Leucémie myéloïde chronique. SMD : syndrome myélodysplasique

a- Diagnostic de la polyglobulie de Vaquez (PV) :

Le diagnostic de PV exige la présence de deux critères majeurs et d'un critère mineur ou la présence du premier critère majeur associé à deux critères mineurs. On remarque qu'aucune hiérarchie de valeur entre l'hémoglobine, l'hématocrite ou le volume globulaire isotopique n'est indiquée et que seules les formations spontanées érythroïdes font partie des critères diagnostiques de la PV. De plus, les critères de l'OMS 2008 ne tiennent pas compte des circonstances de découvertes. Lorsque le tableau initial se manifeste par **exemple sous la forme d'une thrombose veineuse splanchnique ou d'une splénomégalie**, l'hémogramme peut ne pas révéler de polyglobulie du fait de la présence notamment d'une hémodilution [195-197].

La suspicion clinique est renforcée en présence d'une neutrophilie, d'une thrombocytose ou d'une splénomégalie. A noter que le dosage de l'EPO reste important pour identifier les érythrocythémies secondaires à EPO élevée (par exemple hypoxie chronique, polykystose ou tumeur rénale ...). D'autre part, la recherche d'un syndrome myélo-prolifératif débutant, notamment de type PV, est indiquée en cas de thrombose porte ou de syndrome de Budd-Chiari. Une étude récente montre que la mutation V617F est retrouvée dans environ **60%** des syndromes de Budd-Chiari n'ayant aucun signe hématologique [198].

b - Diagnostic de la myélofibrose primitive :

Le diagnostic de MFP exige la présence de trois critères majeurs et de deux critères mineurs. On remarque que la myélofibrose au stade pré-fibrotique a été intégrée à ces critères diagnostiques (1^{er} critère majeur). Elle correspond à une

phase cellulaire, identifiée par des anomalies morphologiques de la mégacaryopoïèse considérées comme spécifiques associées à une hyperplasie de la lignée granuleuse et à une diminution de l'érythropoïèse. Le diagnostic de MFP ne nécessite donc plus la présence caractéristique de fibrose collagène ou même de densification de la trame réticulinique pour être évoqué. Le 2^{ème} critère majeur nécessite la réalisation de nombreux examens afin d'exclure d'autres hémopathies, notamment la ferritinémie, la recherche d'un transcrite de fusion bcr-abl, un myélogramme. Il est précisé que les critères mineurs peuvent être justes au-dessus de la normale, nécessitant une bonne sensibilité des analyses biologiques.

c- Diagnostic de thrombocytémie essentielle :

Le diagnostic de TE exige la présence des quatre critères cités. Le diagnostic reste difficile en raison de l'absence d'anomalies moléculaires spécifiques. Ainsi, un large panel d'examens doit être effectué pour affirmer le caractère primitif et clonal de la pathologie et exclure les autres hémopathies. Il est précisé que l'existence d'une cause de thrombocytose réactionnelle n'exclut pas l'existence d'un TE associé si les trois premiers critères sont présents. La prévalence de la mutation de JAK2 dans la TE étant d'environ 50% ce qui rend ce test peu sensible, mais spécifique lors d'une clinique évocatrice. Une aspiration-biopsie médullaire permettra de confirmer l'abondance des mégacaryocytes matures en l'absence de dysplasie ou de fibrose. Enfin une translocation BCR-ABL devrait toujours être exclue [171].

V.1.3 Influence de la mutation JAK2 V617F sur le risque thrombotique :

Trois études de cohorte ont démontré que l'hématopoïèse monoclonale est un facteur de risque de thrombose dans la TE [201-203]. Dans l'étude de Harrison et al., l'incidence d'accidents thrombotiques est 4 fois plus importante dans le groupe thrombocytémie primitive monoclonale (60 %) que dans le groupe thrombocytémie primitive polyclonale (15 %) (odds ratio : 6,9) [201].

La mutation JAK2 V617F étant synonyme d'hématopoïèse clonale, il est légitime de postuler un lien entre cette mutation et le risque de thrombose.

Du point de vue biologique, il est désormais démontré que les patients présentant une TE avec la mutation JAK2 V617F ont des taux d'Hb et de globules blancs significativement plus élevés que ceux qui n'en sont pas porteurs, ce qui augmente le risque de thrombose. Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté des modifications biologiques favorables à la survenue de thrombose chez les patients TE JAK2 V617F positifs. Ainsi, JAK2 V617F augmente l'adhésion des globules rouges à l'endothélium par une modification d'expression de certaines molécules d'adhésion [204]. 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 [205, 206]. Falanga et al. ont confirmé la plus forte présence d'agrégats plaquettes/leucocytes chez les patients porteurs de la mutation JAK2 V617F [207].

Il semble désormais évident que la mutation JAK2 V617F soit associée à un degré d'activation plaquettaire et leucocytaire significativement plus forts.

Sur le plan clinique, 14 études ont étudié l'interaction entre la présence de la mutation JAK2 V617F et le risque de thrombose, résumées dans une méta-analyse récente [208]. La seule qui soit prospective, et qui inclut 776 patients, attribue aux patients porteurs de la mutation JAK2 V617F un risque significativement plus élevé de thrombose veineuse dans l'année qui précède le diagnostic [209]. Il n'y a aucune différence quant au risque de thrombose artérielle. Au total, 9 études considèrent la mutation JAK2 V617F comme un facteur de risque thrombotique. Toutes sont cependant biaisées par la présence de facteurs de risque confondants (en particulier, les taux d'Hb et de leucocytes significativement plus élevés chez les malades porteurs de la mutation JAK2 V617F. Le lien entre le statut mutationnel de JAK2 et le taux de leucocytes est particulièrement fort. L'hyperleucocytose au diagnostic étant un facteur de risque thrombotique fort et indépendant dans de nombreuses études. Néanmoins, dans 3 études comportant des analyses multivariées, le lien persistait après ajustement de ces facteurs. Inversement, 4 études ne montrent pas de lien entre la mutation JAK2 V617F et le risque de survenue de thrombose, mais ces études incluent moins de patients et ne discernent pas les thromboses veineuses des thromboses artérielles, ce qui leur donne moins de puissance statistique.

Quelques études portant sur un nombre relativement restreint de patients ont pu montrer une liaison entre l'activation cellulaire et une fréquence plus grande de thromboses, qu'il s'agisse de l'activation plaquettaire [210, 211], ou de celle des polynucléaires neutrophiles [212]. Notons toutefois que la pratique

de ces tests, relativement spécialisés, peut difficilement être réalisée à grande échelle. C'est la raison pour laquelle, avec la découverte de la mutation V617F, des études ont porté sur la recherche d'une liaison entre cette mutation et la fréquence des thromboses. Les résultats sont encore controversés. Néanmoins, hormis deux études portant sur de faibles effectifs, les autres études ne montrent pas de liaison significative avec le risque thrombotique (*Tableau VII*).

Facteurs de risque	Risque [IC 95%]	Valeur statistique p
Sexe M/F	× 1,5 [0,8-2,9]	0.1
Age > 60 ans ou antécédents de thromboses	× 2,3 [1, 3-3, 9]	0.004
Leucocytes ≥ 8,7 × 10 ⁹ /L	× 2,3 [1, 4-3, 9]	0.001
Hémoglobine ≥ 14 g/100 ml	× 0,5 [0,2-1,1]	0.07
Plaquettes ≥ 784 × 10 ⁹ /L	0,7 [0,4-1,1]	0.1
Risque relatif		
Faible risque vasculaire + GB < 8,7 × 10 ⁹ /L		1
Faible risque vasculaire + GB > 8,7 × 10 ⁹ /L		3.1
Faible risque vasculaire + GB > 8,7 × 10 ⁹ /L		2.5
Fort risque vasculaire* + GB < 8,7 × 10 ⁹ /L		5.0

Tableau VII : Données initiales et thromboses [213].

* Age supérieur à 60 ans et/ou antécédent de thrombose ; n = 439 patient

V.1.4 Intérêt pronostique de la recherche de la mutation JAK2 V617F :

La présentation clinico-biologique et les modalités évolutives des SMP sont très hétérogènes. Il était donc légitime de se demander si la présence de la mutation JAK2 V617F dans un SMP en modifiait la présentation et/ou l'évolution. Afin de mieux caractériser les SMP, des corrélations entre la présence d'une mutation JAK2 et les caractéristiques clinico-biologiques ont d'abord été recherchées.

La première grande étude dans les TE a intéressé trois études épidémiologiques anglaises [214]. Dans ces 3 études, le statut mutationnel de JAK2 a été étudié par des techniques de bonne sensibilité chez 776 patients suivis de façon prospective. Les patients pour lesquels le diagnostic de TE a été retenu (selon les critères du PVSG) et qui présentent une mutation JAK2 V617F ont significativement un taux élevé d'Hb, de globules blancs et moins de plaquettes. La biopsie ostéo-médullaire est caractérisée par une plus grande cellularité, en particulier sur les lignées rouges et granuleuses. Leurs taux circulants d'érythropoïétine sont significativement plus bas. L'ensemble de ces caractéristiques rapprochent les TE « mutées » des formes de passage avec les polyglobulies, et posent la question d'une continuité entre ces pathologies.

En ce qui concerne les complications, les patients présentant une mutation du JAK2 ont significativement plus de thromboses veineuses. Cependant il n'y a pas de différence significative de survenue des autres complications évolutives propres à la TE dans les deux groupes muté et non muté.

Par ailleurs, il a été possible d'apprécier l'efficacité comparée des traitements en fonction du statut mutationnel. Ces corrélations entre la mutation JAK2 V617F et les paramètres d'hémogramme dans les TE ont été largement confirmées dans quasiment toutes les études publiées. Il n'en va pas de même pour l'appréciation du risque thrombotique chez les patients mutés qui est retrouvé accru dans certaines études mais pas dans d'autres [215]. Chez les femmes enceintes atteintes de TE, la présence de la mutation serait un facteur de risque supplémentaire de thrombose et de survenue de complications fœtales [216]. 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 [139]. 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 (14 patients), 22% pour les hétérozygotes (368 patients) et 11% pour les non mutés (257 patients) [215].

Les méthodes réellement quantitatives démontrent clairement que la charge JAK2 V617F [13] reflètent deux phénomènes :

- d'une part, l'homo- ou l'hétérozygotie d'une cellule
- d'autre part, les proportions dans la population cellulaire étudiée de cellules sauvages, hétérozygotes ou homozygotes mutées. Ainsi, une charge JAK2 V617F de 30% peut correspondre à 30% de cellules mutées à l'état homozygote, 60% de cellules mutées à l'état hétérozygote ou n'importe quelle autre combinaison intermédiaire de cellules sauvages et mutées (hétérozygotes et/ou homozygotes) (*figure 14*).

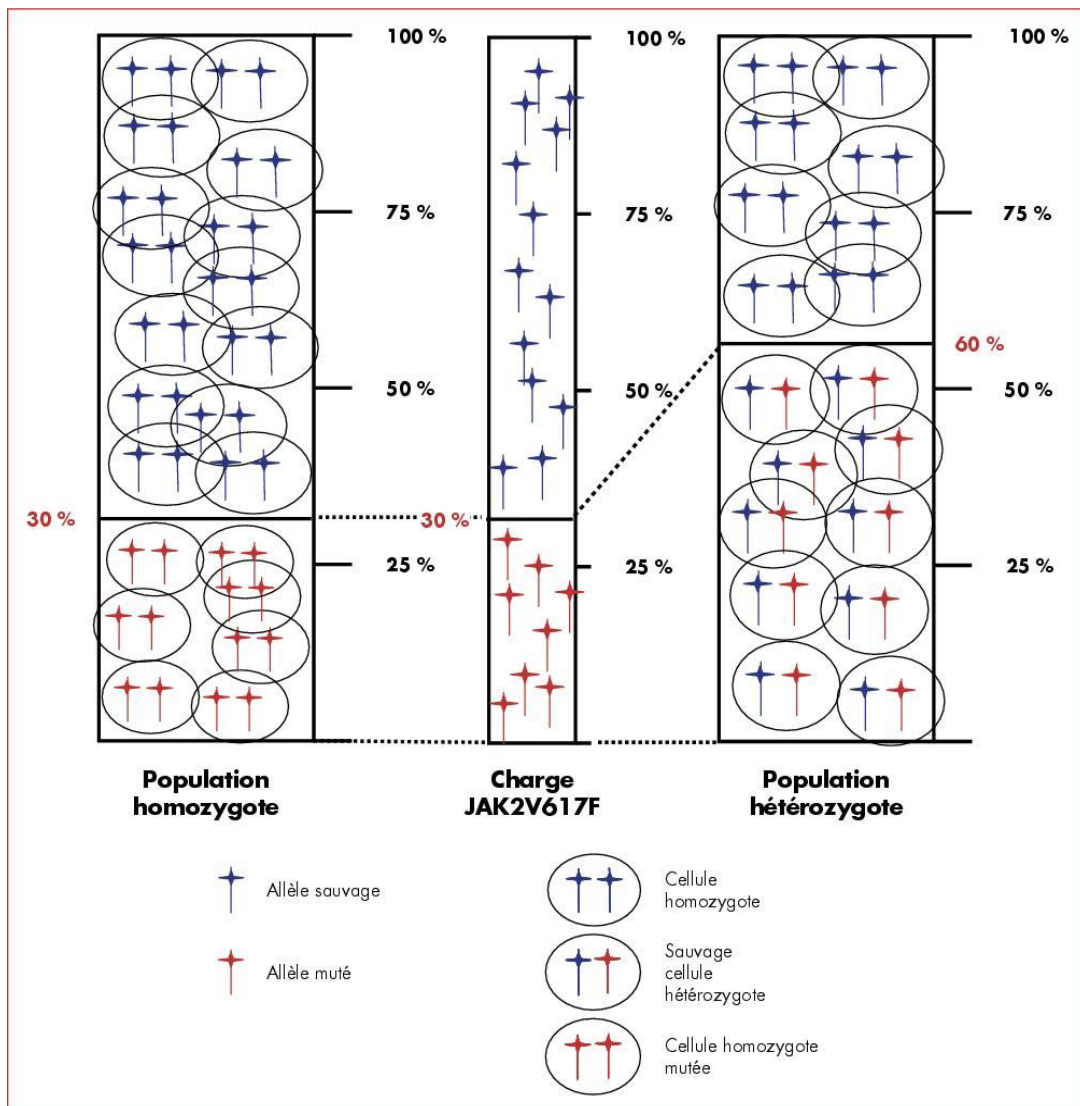


Figure 14 : Charge mutationnelle et homo- ou hétérozygotie [215].

Une charge équivalente (ici 30 %) en nombres de copies *JAK2V617F*/*JAK2* total peut correspondre à 30 % de cellules homozygotes (histogramme de gauche), à 60 % des cellules hétérozygotes (histogramme de droite) ou à une combinaison intermédiaire de cellules homo- et hétérozygotes.

Des travaux révèlent que la plupart des PV ont des clones homozygotes mutés, d'abord minoritaires (pouvant entraîner une charge JAK2 minime), puis s'accroissant et devenant majoritaires voire exclusifs. Au contraire, dans la majorité des TE les cellules sont hétérozygotes, moins de 10% des patients ayant des clones homozygotes, souvent en faible pourcentage. On voit ainsi que la notion d'homozygotie, si elle peut théoriquement être affirmée pour les patients présentant une charge mutationnelle > 50%, doit être interprétée avec prudence dans les autres cas, sauf à génotyper un nombre suffisant de colonies dérivant chacune d'un progéniteur unique.

La charge JAK2V617F, 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; la leucocytose, le taux d'Hb, l'évolution vers la PV et probablement le risque thrombotique dans les TE [215, 218].

Dans les myélofibroses idiopathiques, la présence de la mutation JAK2 V617F est associée à un pronostic défavorable [219]. L'étude du GIMEMA [220] sur 304 patients retrouve 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. Dans cette étude, la présence de la mutation n'est pas un facteur indépendant associé à une plus courte survie en analyse multivariée, mais elle est associée aux facteurs de mauvais pronostic. De la même façon, le groupe de Tefferi montre une corrélation entre la présence de la mutation JAK2 V617F et la présence d'anomalies cytogénétiques, elles-mêmes associées à une survie courte [218].

V.1.5 Pour le 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. Actuellement aucune recommandation quant au rythme du suivi ne peut être formulée [193].

Il semblerait donc qu'une quantification précise de la charge JAK2 puisse être utile dès le diagnostic et reflète mieux l'évolution de la maladie. Par ailleurs, une quantification précise peut-être utile au suivi de la maladie. Un suivi séquentiel de 19 patients présentant une TE avec mutation JAK2 V617F montre que le clone est stable chez 18 avec un suivi médian de 47 mois [221]. Il semble donc que l'histoire naturelle des clones de TE soit, le plus souvent, de rester stable sur de longues périodes. Si la charge JAK2 V617F augmente dans d'autres pathologies, ces observations restent sans conséquence pratique aujourd'hui. Le suivi de la charge peut, en revanche, 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) [222]. Ces derniers en agissant préférentiellement sur les cellules clonales sont vraisemblablement plus efficaces à long terme et peuvent faire espérer des guérisons. Le suivi de tels patients bénéficiera donc des études moléculaires précises et répétées.

Le suivi moléculaire est aussi utile pour la surveillance des patients allo-greffés pour une myélofibrose. Kröger et al. [223] montrent ainsi la disparition du clone muté chez 17 des 21 patients allo-greffés pour myélofibrose. Cette disparition persiste chez 15 patients avec un suivi de 20 mois. De façon intéressante, le clone muté résiduel a pu être éliminé chez un patient grâce à des réinjections de lymphocytes.

Ainsi, en dehors de l'intérêt scientifique (suivi de la sélectivité clonale d'un traitement), le suivi moléculaire de la charge JAK2 V617F, permet des ajustements thérapeutiques directement utiles au patient. Il faut cependant se méfier du risque de survenue de complications issues d'un clone non muté comme il a été décrit par Au et al. qui ont observé la survenue d'une LAM JAK2 sauvage au décours d'une allo-greffe pour MP JAK2 V617F+ [224].

V.2 LES AUTRES SITUATIONS IMPOSANT LA RECHERCHE DE LA MUTATION JAK2 :

V.2.1 Les thromboses du territoire veineux porte :

Elles imposent la recherche de la mutation JAK2 même si la numération-formule sanguine **est normale**. Dans ces cas l'hypersplénisme masque souvent la thrombocytose [3, 176].

V.2.2 Dans certains syndromes mixtes myéloprolifératifs-

Myélodysplasiques :

La mutation JAK2 V617F a été rapportée avec une fréquence notable dans ces syndromes. Cependant la présence de cette mutation n'a pas d'impact sur la prise en charge de ces patients.

Cas particulier de la découverte de la mutation JAK2 V617F chez des individus à priori sains :

Dans plusieurs études, la mutation JAK2 V617F a été détectée chez

0,2% à 10% des **individus à priori sains** sans anomalie de l'hémogramme ou d'événement thrombotique. Une première étude réalisée sur 52 patients sains a retrouvé la mutation JAK2 V617F chez 5 patients (9,6%) confirmé sur 2 prélèvements et par séquençage [159]. Dans une équipe danoise, la mutation a été retrouvée chez 18 sujets sains sur les 10 507 participants (soit 0,2%). Quatre n'ont pas développé de cancers hématologiques mais tous les sujets sont décédés durant le suivi [173]. Chez des patients chinois, une PCR qualitative a été positive chez 36 patients sur 3935 (0.9%) sans anomalie de l'hémogramme. Cependant les seuils plaquettaires acceptés n'étaient pas ceux de l'OMS et certains patients avaient présentés des manifestations thrombotiques [172]. Martinaud et al. [193] ont détecté par PCR quantitative chez 2,5% de volontaires sains un faible pourcentage de JAK2 V617F muté mais inférieur au cut-off défini à 1%. Cependant, dans toutes ces études, un dosage de la ferritine et/ou la mesure du volume globulaire isotopique devraient être réalisés afin d'écarter des éventuelles polyglobulies masquées. Ces données suggèrent cependant que, dans certains cas, la présence de la mutation peut précéder le diagnostic clinique.

CHAPITRE VI :

LES INHIBITEURS DES JAKS

VI.1. LES FAMILLES DES INHIBITEURS DU JAK2 :

Suite à la découverte de la mutation V617F de la tyrosine kinase JAK2 différents inhibiteurs de JAK2 ont été développés dans l'espoir de traiter spécifiquement les patients atteints de SMP BCR-ABL négatifs.

Il faut souligner qu'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 stricto-sensu comme une thérapie ciblée des cellules tumorales, contrairement aux inhibiteurs de BCR-ABL par exemple [225].

La MF 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 [225].

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**, mais leur spécificité varie ; certaines inhibent spécifiquement JAK2, alors que d'autres inhibent également JAK1 ou d'autres kinases (*Tableau VIII*) [226,227].

Agent	Cibles	Phase d'étude clinique	Effets cliniques	Effets secondaires principaux – Toxicité limitante
Ruxolitinib (INCB018424)	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

Tableau VIII : Liste des principales médications inhibant les JAKs en étude clinique pour le traitement des SMP. [225]

VI.2. LES EFFETS DES INHIBITEURS SUR LES SIGNES CLINIQUES :

VI.2.1. L'effet sur la splénomégalie dans la MF :

La diminution est rapide, maximale après quelques semaines, et sera durable. Cet effet bénéfique est clairement démontré par les études COMFORT-I et -II [228-229], qui comparaient l'effet du **Ruxolitinib** à un placebo ou au meilleur traitement disponible chez des patients avec une MP avancée. 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. Cet effet permet d'améliorer les symptômes liés à la splénomégalie, comme la satiété

précoce ou les douleurs abdominales. La réponse sur la splénomégalie semble durable et se poursuivre pendant plus d'un an. 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.

VI.2.2. L'effet sur les symptômes systémiques dans la MF :

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 inappétence avec 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 [228-229], et ne semble pas être dose-dépendant.

V.2.3. L'effet sur les paramètres sanguins dans la MP, la PV et la TE :

La MP peut être accompagnée d'une hyperleucocytose ou d'une thrombocytose importante. Par définition, la PV s'accompagne d'une polyglobulie et la TE d'une thrombocytose. En prescrivant un anti-JAK2, on note une correction des valeurs sanguines anormales. Cette diminution sera dose-dépendante et démontre l'effet anti-myéloprolifératif des anti-JAK2.

CONCLUSION

La mutation JAK2 V617F est de découverte assez récente. L'implication de cette mutation dans la pathogénie des syndromes myéloprolifératifs (SMP) est actuellement confirmée et constitue une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu dans les syndromes myéloprolifératifs. Elle a conduit les sociétés savantes, les experts et l'OMS en 2008 à revoir et à adopter de nouveaux critères diagnostiques de ce groupe d'affections. Aussi, la recherche de cette mutation constitue un nouvel outil diagnostique important dans les SMP non LMC, mais aussi dans le bilan de thrombose inexplicée, notamment celle des vaisseaux sus-hépatiques.

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. La recherche de la mutation V617F de JAK2 se fait sur un échantillon sanguin prélevé sur EDTA et est automatisable pour de grandes séries en utilisant des techniques spécifiques et sensibles (PCR en temps réel, PCR allèle spécifique) et surtout plus rapides que le séquençage. Devant un hémogramme suspect de SMP, la recherche de mutation JAK2 V617F est l'examen clé. Lorsque JAK2 V617F est positif, le diagnostic d'hémopathie maligne myéloïde chronique est certain, il reste ensuite à classer l'hémopathie. Si JAK2 V617F est négatif, la question est d'abord celle de l'existence ou pas d'une hémopathie, et le bilan recherchera selon la présentation initiale à la fois une cause secondaire et l'ensemble des critères de SMP.

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 (Inhibiteurs de JAKs par exemple).

Au terme de notre étude bibliographique sur (LA MUTATION JAK2 V617F : TECHNIQUES DE RECHERCHE ET APPLICATIONS) dont l'objectif premier est de mettre à la disposition des praticiens hospitaliers des données exhaustives sur le JAK2 et sa mutation V617F ainsi que les outils nécessaires au démarrage en routine de sa détection au sein des laboratoires de nos hôpitaux, nous pouvons formuler les recommandations suivantes :

- Sensibiliser les autorités à intégrer la détection de la mutation JAK2 V617F dans les algorithmes de diagnostic des SMP conformément aux critères de l'OMS.
- Implémenter la détection de la mutation JAK2 V617F dans la gamme des bilans réalisés au sein des laboratoires d'hématologie des CHU de Rabat.
- Mener des études de validation des kits de détection de la mutation JAK2 V617F.
- Mener des études épidémiologiques (prévalence, incidence) des SMP au sein des populations marocaines.

RÉSUMÉS

RÉSUMÉ

Titre : La mutation JAK2 V617F : techniques de recherche et applications

Auteur : LAABYECH Amal

Mots clés : JAK2V617F- protéine JAK2- Syndromes myélo-prolifératifs bcr/abl-négatifs - Inhibiteurs du JAK2.

En 2005, la découverte de la mutation JAK2 a largement bouleversé le diagnostic et la stratification des syndromes myélo-prolifératifs bcr-abl négatifs.

Les études fonctionnelles et les modèles animaux confirmaient l'importance de cette mutation dans la genèse des SMP. Cette découverte a rapidement eu des répercussions importantes sur la stratégie de prise en charge des SMP, en particulier pour l'exploration d'une polyglobulie ou d'une thrombocytose. La mutation JAK2 V617F est très fréquemment retrouvée chez les patients atteints de polyglobulie de Vaquez (95 %), mais moins souvent chez les patients atteints de thrombocytémie essentielle (50-70 %) ou de myélofibrose primitive (environ 50 %).

L'objectif de notre travail est de mettre à la disposition des praticiens hospitaliers des données exhaustives sur la protéine JAK2 et sa mutation V617F ainsi que les outils nécessaires au démarrage en routine de sa détection au sein des laboratoires de nos hôpitaux au MAROC. En soulignant l'apport de la classification OMS 2008 des syndromes myélo-prolifératifs bcr-abl négatifs.

ABSTRACT

Title: THE JAK2 V617F mutation: detection technics and applications

Author: LAABYECH amal

Keywords: JAK2V617F- JAK2 protein- Myeloproliferative Disorders - bcr /abl-negative - tyrosine kinase inhibitor.

In 2005, the discovery of the JAK2 V617F mutation by various independent groups has greatly changed the diagnosis and stratification of NMP bcr-abl negative.

Functional studies as well as animal models confirmed the importance of this mutation in the genesis of MPDs. This discovery promptly affected the management of MPD patients, particularly for diagnostic work up of polyglobulies and thrombocytoses. The JAK2V617F mutation is frequently found (95%) in patients with Polycythemia Vera , less often in patients suffering from essential thrombocythemia (50-70%) or Primary myelofibrosis (around 50%).

The objective of our work is to provide hospital practitioners comprehensive data on JAK2 V617F mutation and thereby the tools needed to start a routine of detection in the laboratories of our hospitals in MOROCCO, and highlight the contributions of the WHO classification 2008.

ملخص

العنوان: الطفرة JAK2 V617F: تقنيات البحث عنها وتطبيقاتها.

الكاتبة: لعبيش أمل

كلمات البحث JAK2V617F، البروتينين - JAK2 أورام التكاثرالنقيي-BCR - ABL سلبى - مثبت التيروسين كيناز

في العام 2005، تم اكتشاف الطفرة JAK2 V617F من طرف عدة مجموعات علمية مستقلة، الشيء الذي أحدث تغييرا كبيرا في طرق معاينة وتشخيص أمراض التكاثر النقيي BCR-ABL سلبى .

أكدت الدراسات الفنية والنماذج الحيوانية على أهمية هذه الطفرة في نشأة هذه الأمراض. هذا الاكتشاف كان له وبسرعة تأثير كبير على إستراتيجية دعم أمراض التكاثر النقيي BCR-ABL سلبى، خاصة التنقيب عن كثرة الحمر أو كثرة الصفيحات.

ثم العثور على طفرة JAK2V617F في أغلب المرضى الذين يعانون من كثرة الحمر فيرا بنسبة (95%) وبوشيرة أقل في المرضى الذين يعانون من كثرة الصفائح الأساسية بنسبة (50-70%) أو التليف النقي الأولي بحوالي (50%).

نهدف من خلال هذا العمل إلى تزويد الأطر الطبية ببيانات شاملة عن الطفرة JAK2 V617F، وبالتالي الأدوات اللازمة لبدأ الكشف الروتيني عنها في مختبرات مستشفياتنا بالمغرب، وكذا آليات التشخيص، وطرق علاج هذه الأمراض الدموية، مع التأكيد على جديد تصنيف المنظمة العالمية للصحة سنة 2008.

REFERECES

- [1] **Vardiman, JW., Harris, NL., Brunning, RD.** The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, (2002), 2292-302.
 - [2] **Cools, J., DeAngelo, DJ., Gotlib, J., Stover, EH., Legare, RD., Cortes, J., et al.** A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348, (2003), 1201-14.
 - [3] **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.
 - [4] **James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al.** A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* (2005), 434, 1144- 1148.
 - [5] **Levine, RL., Wadleigh, M., Cools, J., et al.** Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, (2005), 387-397.
 - [6] **Cristina A, S., Guang, F.** The saga of JAK2 mutations and translocations in hematologic disorders: pathogenesis, diagnostic and therapeutic prospects, and revised World Health Organization diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Human Pathology* 39, (2008), 795-810.
-

- [7] **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.
- [8] **Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, AS., Teo, SS., Tiedt, R., Passweg, JR, et al.** A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, (2005), 1779–90.
- [9] **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.
- [10] **Jones, A.V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L., Score, J., Sear, 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
- [11] **Staerk, J., Kallin, A., Royer, Y., Diaconu, CC., Dusa, A., Demoulin, JB., et al.** JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathol Biol (Paris)* 55, (2007), 88-91.
- [12] **Saharinen, P. and 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.* 277, (2002), 47954-47963.
-

- [13] **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.
- [14] **Lucet, IS., Fantino, E., Styles, M., Bamert, R., Patel, O., Broughton, SE., et al.** The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood* 107, (2006), 176-83.
- [15] **Emilie-Fleur, G.** Régulation et implication de la phosphatase CDC25A en aval de l'oncogène JAK2V617F dans les néoplasies myéloprolifératives. Thèse de doctorat en ligne. Université Toulouse III Paul Sabatier (2011), 141p <http://thesesups.ups-tlse.fr/1625/1/2011TOU30314.pdf>.
- [16] **Feener, E. P., Rosario, F., Dunn, S. L., Stancheva, Z., and Myers, M. G., Jr.** Tyrosine phosphorylation of Jak2 in the JH2 domain inhibits cytokine signaling. *Mol Cell Biol* 24, (2004), 4968-4978.
- [17] **Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., and Shuai, K.** PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, (2003), 21327-21330.
- [18] **Clevenger, C. V.** Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 165, (2004), 1449-1460.
-

- [19] **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.
- [20] **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.
- [21] **Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobl, B., Bates, P. A., Behrmann, I., and Kerr, I. M.** A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett* 505, (2001), 87-91.
- [22] **Machida, K., and Mayer, B. J.** The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* 1747, (2005), 1-25.
- [23] **Hebenstreit, D., Wirnsberger, G., Horejs-Hoeck, J., and Duschl, A.** Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17, (2006), 173-188.
- [24] **Aaronson, DS., Horvath, CM.** A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296, 5573, (2002), 1653-5.
- [25] **Nelson, ME., Steensma, DP.** JAK2 V617F in myeloid disorders: what do we know now, and where are we headed? *Leuk Lymphoma* 47 , (2006), 177-94.
-

- [26] **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.
- [27] **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.
- [28] **Li, W.X.** Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18, (2008), 545-551.
- [29] **Richmond, T.D., Chohan, M., and Barber, D.L.** Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends Cell Biol* 15,(2005) , 146-155.
- [30] **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.
- [31] **Rawlings, J. S., Rosler, K. M., and Harrison, D. A.** The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, (2004), 1281-1283.
- [32] **Murray, P. J.** The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178, (2007), 2623-2629.
- [33] **Stephanou, A., and Latchman, D.S.** Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* 23, (2005) , 177-182.
- [34] **Jacques, R.** Signalisation cellulaire et cancer : Un manuel pour les étudiants et les oncologues - *Oncologie pratique* , (2010), 75-80.
-

- [35] **Geest, C.R., and Coffey, P.J.** MAPK signaling pathways in the regulation of hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 86, (2009), 237-250.
- [36] **Lucile ESPERT .,Isabelle DUSANTER-FOURT . ,Mounira K. CHELBI-ALIX .** Les régulations négatives de la voie JAK/STAT : implication dans la tumorigenèse *Bull Cancer* 92, (2005) ,845-57
- [37] **Yetter, A., Uddin, S., Krolewski, JJ., Jiao, H., Yi, T., Platanias, LC.** Association of the interferon-dependent tyrosine kinase Tyk-2 with the hematopoietic cell phosphatase. *J Biol Chem* 270 , (1995), 18179-82.
- [38] **Banville, D., Stocco, R., Shen, SH.** Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure : alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* 27, (1995), 165-73.
- [39] **Shultz, LD., Rajan, TV.,Greiner, DL.** Severe defects in immunity and hematopoiesis caused by SHP-1 protein-tyrosine-phosphatase deficiency. *Trends Biotechnol* 15, (1997), 302-7.
- [40] **David, M., Chen, HE., Goetz, S., Larner, AC., Neel, BG.** Differential regulation of the alpha/beta interferon-stimulated Jak/Stat pathway by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1. *Mol Cell Biol* 15 , (1995), 7050-8.
- [41] **Klingmuller, U., Lorenz, U., Cantley, LC., Neel, BG., Lodish, HF.** Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* 80, (1995), 729-38.
-

- [42] **Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, RM., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., et al.** The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J* 378, (2004), 449-60.
- [43] **Ali, S., Nouhi, Z., Chughtai, N.** SHP-2 regulates SOCS-1-mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. *J Biol Chem* , 278 , (2003), 52021-31.
- [44] **Zhang, SQ., Yang,W., Kontaridis, MI., Bivona, TG., Wen, G., Araki, T., et al.** Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* 13, (2004), 341-55.
- [45] **Yamada, T., Zhu, D., Saxon, A., Zhang, K.** CD45 controls interleukin-4- mediated IgE class switch recombination in human B cells through its function as a Janus kinase phosphatase. *J Biol Chem* 277, (2002), 28830-5.
- [46] **Myers, MP., Andersen, JN., Cheng, A., Tremblay, ML., Horvath, CM., Parisien, JP., et al.** TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276, (2001), 47771-4.
- [47] **Simoncic, PD., Lee-Loy, A., Barber, DL. remblay ML,McGlade CJ.** The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12 , (2002), 446-53.
- [48] **Greenhalgh, CJ., Hilton, DJ.** Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol* 70, (2001), 348-56.
-

- [49] **De Sepulveda, P., Okkenhaug, K., Rose, JL., Hawley, RG., Dubreuil, P., Rottapel, R.** Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 18, (1999), 904-15.
- [50] **Kario, E., Marmor, MD., Adamsky, K., Citri, A., Amit, I., Amariglio, N., et al.** Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 8, (2004), 7038-48.
- [51] **Kile, BT., Alexander, WS.** The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58, (2001), 1627-35.
- [52] **Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin Jr, WG., Conaway, RC., et al.** The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 12, (1998), 3872-81.
- [53] **Vuong, BQ., Arenzana, TL., Showalter, BM., Losman, J., Chen, XP., Mostecky, J., et al.** SOCS-1 Localizes to the Microtubule Organizing Complex- Associated 20S Proteasome. *Mol Cell Biol* 24, (2004), 9092-101.
- [54] **Narazaki, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T., et al.** Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, (1998), 13130-4.
-

- [55] **Galm, O., Yoshikawa, H., Esteller, M., Osieka, R., Herman, JG.** SOCS-1, a negative regulator of cytokine signaling, is frequently silenced by methylation in multiple myeloma. *Blood* 101, (2003), 2784-8.
- [56] **Watanabe, D., Naka, T., Kishimoto, T.** Implication of SOCS-1 gene methylation in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 127, (2004), 608-9.
- [57] **Melzner, I., Bucur, AJ., Bruderlein, S., Dorsch, K., Hasel, C., Barth, TF., et al.** Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* 105, (2005), 2535-42.
- [58] **Kishimoto, T., Kikutani, H.** Knocking the SOCS off a tumor suppressor. *Nature Genet* 28, (2001), 4-5.
- [59] **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.
- [60] **Johnson, ES., Gupta, AA.** (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell* 106, 735-44.
- [61] **Wormald, S., Hilton, DJ.** Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279, (2004), 821-4.
-

- [62] **Arora, T., Liu, B., He, H., Kim, J., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Modlin, R. L., and Shuai, K.** PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4. *J Biol Chem* 278, (2003), 21327-21330.
- [63] **Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., Grosschedl, R.** PIASy. a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, (2001), 3088-103.
- [64] **Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., and Tong, W.** Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest* 118, (2008), 2832-2844.
- [65] **Shi, S., Larson, K., Guo, D., Lim, S.J., Dutta, P., Yan, S.J., and Li, W.X.** Drosophila STAT is required for directly maintaining HP1 localization and heterochromatin stability. *Nat Cell Biol* 10, (2008), 489-496.
- [66] **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.
- [67] **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.
-

- [68] **Girodon, F., Steinkamp, M.P., Cleyrat, C., Hermouet, S., and Wilson, B.S.** Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood* 118, (2011), 2633-2634.
- [69] **Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., Lodish, HF.** Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83 , (1995), 59-67.
- [70] **Kieran, MW., Perkins, AC., Orkin, SH., Zon, LI.** Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 , (1996), 9126-31.
- [71] **James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., et al.** A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, (2005), 1144- 1148.
- [72] **Pesu, M., O’Shea, J., Hennighausen, L., Silvennoinen, O.** Identification of an acquired mutation in JAK2 provides molecular insights into the pathogenesis of myeloproliferative disorders. *Mol Interv* 5, (2005) , 211–5.
- [73] **Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O.** Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol. Cell. Biol.* 20, (2000), 3387–3395.
-

- [74] **Ugo, V., James, C., Vainchenker, W.** Une mutation unique de la protéine kinase JAK2 dans la polyglobulie de Vaquez et les syndromes myéloprolifératifs non-LMC / A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera M/S : médecine sciences 21, (2005) , 669-670.
- [75] **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 14, (2001), 27-37.
- [76] **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.
- [77] **Staerk ,J., Kallin, A., Demoulin, JB., Vainchenker, W., Constantinescu SN.** JAK1 and TYK2 activation by the homologous polycythemia vera JAK2 V617F mutation: cross talk with IGF1 receptor. J Biol Chem 280, (2005) , 41893–9.
- [78] **Tefferi, A., Spivak, JL.** Polycythemia vera: scientific advances and current practice. Semin Hematol 42, (2005) , 206–20.
- [79] **Tefferi, A., Gilliland, DG.** The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. Mayo Clin Proc 80, (2005) , 947–58.
-

- [80] **Grimwade, L.F., Happerfield, L., Tristram, C., McIntosh, G., Rees, M., Bench, A.J., Boyd, E.M., Hall, M., Quinn, A., Piggott, N., et al.** Phospho-STAT5 and phospho-Akt expression in chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 147, (2009), 495-506.
- [81] **Aboudola, S., Murugesan, G., Szpurka, H., Ramsingh, G., Zhao, X., Prescott, N., Tubbs, R.R., Maciejewski, J.P., and Hsi, E.D.** Bone marrow phospho-STAT5 expression in non-CML chronic myeloproliferative disorders correlates with JAK2 V617F mutation and provides evidence of in vivo JAK2 activation. *Am J Surg Pathol* 31, (2007), 233-9.
- [82] **Risum, M., Madelung, A., Bondo, H., Bzorek, M., Kristensen, M.H., Stamp, I.M., and Hasselbalch, H.C.** The JAK2V617F allele burden and STAT3- and STAT5 phosphorylation in myeloproliferative neoplasms: early prefibrotic myelofibrosis compared with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *APMIS* 119, (2011), 498-504.
- [83] **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.
-

- [84] **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.
- [85] **Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Abe, M., Sonoda, Y., and Kasahara, T.** STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *J Biol Chem* 285, (2010), 5296-5307.
- [86] **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.
- [87] **Chen, E., Beer, P.A., Godfrey, A.L., Ortmann, C.A., Li, J., Costa-Pereira, A.P., Ingle, C.E., Dermitzakis, E.T., Campbell, P.J., and Green, A.R.** Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell* 18, (2010), 524-535.
- [88] **Kamishimoto, J., Tago, K., Kasahara, T., and Funakoshi-Tago, M.** Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal* 23, (2011), 849-856.
-

- [89] **Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., Lecluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N.** Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 32, (2004), 179-187.
- [90] **Pradhan, A., Lambert, Q.T., and Reuther, G.W.** Transformation of hematopoietic cells and activation of JAK2-V617F by IL-27R, a component of a heterodimeric type I cytokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, (2007), 18502-18507.
- [91] **Chomel, J.C., Sorel, N., Mayeur-Rousse, C., Turhan, A.G.** Les syndromes myéloprolifératifs Myeloproliferative disorders *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 24, (2009), 69-85
- [92] **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.
- [93] **Bruchova, H., Merkerova, M., and Prchal, J.T.** Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. *Haematologica* 93, (2008), 1009-1016.
- [94] **Nakatake, M., Monte-Mor, B., Debili, N., Casadevall, N., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., and Plo, I.** JAK2 (V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene*. (2011).
-

- [95] **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.
- [96] **Baran-Marszak, F., Magdoud, H., Desterke, C., Alvarado, A., Roger, C., Harel, S., Mazoyer, E., Cassinat, B., Chevret, S., Tonetti, C., et al.** Expression level and differential JAK2- V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood* *116*, (2010), 5961-5971.
- [97] **Gery, S., Cao, Q., Gueller, S., Xing, H., Tefferi, A., and Koeffler, H.P.** Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol* *85*, (2009), 957- 965.
- [98] **Mirza, A.M., Correa, P.N., and Axelrad, A.A.** Increased basal and induced tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor I receptor beta subunit in circulating mononuclear cells of patients with polycythemia vera. *Blood* *86*, (1995), 877-882.
- [99] **Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M.W., Levine, R.L., Xu, H., Tefferi, A., et al.** JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* *19*, (2011), 283-294.
-

- [100] **Rinaldi, C.R., Rinaldi, P., Alagia, A., Gemei, M., Esposito, N., Formiggini, F., Martinelli, V., Senyuk, V., Nucifora, G., and Pane, F.** Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia. *Blood* *116*, (2010), 6023-6026.
- [101] **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.
- [102] **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.
- [103] **Bruchova, H., Yoon, D., Agarwal, A.M., Swierczek, S., and Prchal, J.T.** Erythropoiesis in polycythemia vera is hyper-proliferative and has accelerated maturation. *Blood Cells Mol Dis* *43*, (2009), 81-87.
- [104] **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.
-

- [105] **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.
- [106] **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.
- [107] **Rubert, J., Qian, Z., Andraos, R., Guthy, D.A., and Radimerski, T.** Bim and Mcl-1 exert key roles in regulating JAK2V617F cell survival. *BMC Cancer* (2011), *11*, 24.
- [108] **da Costa Reis Monte-Mor, B., Plo, I., da Cunha, A.F., Costa, G.G., de Albuquerque, D.M., Jedidi, A., Villeval, J.L., Badaoui, S., Lorand-Metze, I., Pagnano, K.B., et al.** Constitutive JunB expression, associated with the JAK2 V617F mutation, stimulates proliferation of the erythroid lineage. *Leukemia* *23*, (2009), 144-152.
- [109] **Jedidi, A., Marty, C., Oligo, C., Jeanson-Leh, L., Ribeil, J.A., Casadevall, N., Galy, A., Vainchenker, W., and Villeval, J.L.** Selective reduction of JAK2V617F-dependent cell growth by siRNA/shRNA and its reversal by cytokines. *Blood* *114*, (2009), 1842-1851.
-

- [110] **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.
- [111] **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.
- [112] **Jakel, H., Weinl, C., and Hengst, L.** Phosphorylation of p27Kip1 by JAK2 directly links cytokine receptor signaling to cell cycle control. *Oncogene* *30*, (2011), 3502-3512.
- [113] **Furuhata, A., Kimura, A., Shide, K., Shimoda, K., Murakami, M., Ito, H., Gao, S., Yoshida, K., Tagawa, Y., Hagiwara, K., et al.** p27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation. *Biochem Biophys Res Commun* *383*, (2009), 411-416.
- [114] **Wernig, G., Gonneville, J.R., Crowley, B.J., Rodrigues, M.S., Reddy, M.M., Hudon, H.E., Walz, C., Reiter, A., Podar, K., Royer, Y., et al.** The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* *111*, (2008), 3751-3759.
-

- [115] **Sumi, K., Tago, K., Kasahara, T., and Funakoshi-Tago, M.** Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells. *FEBS Lett* 585, (2011), 1884-1890.
- [116] **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.
- [117] **Fleischman, A.G., Aichberger, K.J., Luty, S.B., Bumm, T.G., Petersen, C.L., Doratotaj, S., Vasudevan, K.B., Latocha, D.H., Yang, F., Press, R.D., et al.** Tumor necrosis factor alpha facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. (2011).
- [118] **Manshouri, T., Estrov, Z., Quintas-Cardama, A., Burger, J., Zhang, Y., Livun, A., Knez, L., Harris, D., Creighton, C.J., Kantarjian, H.M., et al.** Bone marrow stroma-secreted cytokines protect JAK2(V617F)-mutated cells from the effects of a JAK2 inhibitor. *Cancer Res* 71, (2011), 3831-3840.
- [119] **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.
-

- [120] **Kouroupi, E., Zoi, K., Parquet, N., et al.** Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. *Br J Haematol* (2008).
- [121] **Ugo, V.** Stratégies diagnostiques dans les syndromes myéloprolifératifs en 2008 Correspondances en Onco-hématologie - Vol. III - n° 3(2008), 126-132
- [122] **. Yokota, M., Tatsumi, N., Nathalang, O., Yamada, T. & Tsuda, I.** Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13, (1999), 133–140.
- [123] **Larsen, T.S., Pallisgaard, N., Møller, M.B. & Hasselbalch, H.C.** Quantitative assessment of the JAK2 V617F allele burden: equivalent levels in peripheral blood and bone marrow. *Leukemia*, 22, (2008), 194–195.
- [124] **Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, X., Sun, W., Buller, A.M., Jilani, I., Schwartz, J.G., Giles, F. & Albitar, M.** Higher detection rate of JAK2 mutation using plasma. *Blood*, 111, (2008), 3906– 3907.
- [125] **Jones, A.V., Silver, R.T., Waghorn, K., Curtis, C., Kreil, S., Zoi, K., Hochhaus, A., Oscier, D., Metzgeroth, G., Lengfelder, E., Reiter, A., Chase, A. J. & Cross, N.C.** Minimal molecular response in polycythemia vera patients treated with imatinib or interferon alpha. *Blood*, 107, (2006), 3339–3341.
- [126] **Passamonti, F. & Rumi, E.** Clinical relevance of JAK2 (V617F) mutant allele burden. *Haematologica*, 94, (2009), 7–10.
-

- [127] **Girodon, F., Schaeffer, C., Cleyrat, C., Mounier, M., Lafont, I., Santos, F.D., Duval, A., Maynadie', M. & Hermouet, S.** Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2 V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy. *Haematologica*, 93, (2008), 1723–1727.
- [128] **Antonioli, E., Carobbio, A., Pieri, L., Pancrazzi, A., Guglielmelli, P., Delaini, F., Ponziani, V., Bartalucci, N., Tozzi, L., Bosi, A., Rambaldi, A., Barbui, T. & Vannucchi, A.M.** Hydroxyurea does not appreciably reduce JAK2 V617F allele burden in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Haematologica*, 95, (2010), 1435–1438.
- [129] **Hermouet, S., Dobo, I., Lippert, E., Boursier, M. C., Ergand, L., Perrault-Hu, F. & Pineau, D.** Comparison of whole blood vs purified blood granulocytes for the detection and quantitation of JAK2 V617F. *Leukemia*, 21, (2007), 1128–1130.
- [130] **Goday-Fernandez, A., Boyd, E., Bench, A. & Erber, W.** Real time detection of JAK2 V617F in the myeloproliferative disorders. *Haematologica*, 93(s1), 302. (2008), Abs.0754.
- [131] **Cankovic, M., Whiteley, L., Hawley, R.C., Zarbo, R.J. & Chitale, D.** Clinical performance of JAK2 V617F mutation detection assays in a molecular diagnostics laboratory. *American Journal of Clinical Pathology*, 132, (2009), 713–721.
-

- [132] **Asimakopoulos, F.A., Gilbert, J.G.R., Aldred, M.A., Pearson, T.C. & Green, A.R.** Interstitial deletion constitutes the major mechanism for loss of heterozygosity on chromosome 20q in polycythemia vera. *Blood*, 88, (1996), 2690–2698.
- [133] **Chen, Q., Lu, P., Jones, A.V., Silver, R.T. & Wang, Y.L.** Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 9, (2007), 272–276.
- [134] **McClure, R., Mai, M. & Lasho, T.** Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 20, (2006), 168–171.
- [135] **Tan, A.Y., Westerman, D.A. & Dobrovic, A.** A simple, rapid, and sensitive method for the detection of the JAK2 V617F mutation. *American Journal of Clinical Pathology*, 127, (2007), 977–981.
- [136] **Denys, B., El Housni, H., Nollet, F., Verhasselt, B. & Philippe', J.** A real-time polymerase chain reaction assay for rapid, sensitive, and specific quantification of the JAK2 V617F mutation using a locked nucleic acid-modified oligonucleotide. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12, (2010), 512–519.
-

- [137] **Kroger, N., Badbaran, A., Holler, E., Hahn, J., Kobbe, G., Bornhauser, M., Reiter, A., Zabelina, T., Zander, A.R. & Fehse, B.** Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood*, 109, (2007), 1316–1321.
- [138] **Larsen, T.S., Christensen, J.H., Hasselbalch, H.C. & Pallisgaard, N.** The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *British Journal of Haematology*, 136, (2007), 745–751.
- [139] **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.
- [140] **James, C., Delhommeau, F., Marzac, C., Teyssandier, I., Couédic, J.P., Giraudier, S., Roy, L., Saulnier, P., Lacroix, L., Maury, S., Tulliez, M., Vainchenker, W., Ugo, V. & Casadevall, N.** Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia*, 20, (2006), 350–353.
-

- [141] **Wu, Z., Yuan, H., Zhang, X., Liu, W., Xu, J., Zhang, W. & Guan, M.** Development and inter-laboratory validation of unlabeled probe melting curve analysis for detection of JAK2 V617F mutation in polycythemia vera. *PLoS ONE*, 6, e26534. (2011).
- [142] **Rapado, I., Grande, S., Albizua, E., Ayala, R., Hernáñez, J.A., Gallardo, M., Gilsanz, F. & Martínez- Lopez, J.** High resolution melting analysis for JAK2 exon 14 and exon 12 mutations – A diagnostic tool for myeloproliferative neoplasms. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 11, (2009), 155–161.
- [143] **Qian, J., Lin, J., Yao, D.M., Chen, Q., Xiao, G.F., Ji, R.B., Li, Y., Yang, J. & Qian, Z.** Rapid detection of JAK2 V617F mutation using highresolution melting analysis with LightScanner platform. *Clinica Chimica Acta*, 411, (2010), 2097–2100
- [144] **Campbell, P.J., Scott, L.M., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Marsden, J.T., Duffy, A., Boyd, E.M., Bench, A.J., Scott, M.A., Vassiliou, G.S., Milligan, D.W., Smith, S.R., Erber, W.N., Bareford, D., Wilkins, B.S., Reilly, J.T., Harrison, C.N. & Green, A.R.** Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 366, (2005), 1945–1953.
-

- [145] **Lippert, E., Girodon, F., Hammond, E., Jelinek, J., Reading, N.S., Fehse, B., Hanlon, K., Hermans, M., Richard, C., Swierczek, S., Ugo, V., Carillo, S., Harrivel, V., Marzac, C., Pietra, D., Sobas, M., Mounier, M., Migeon, M., Ellard, S., Kroger, N., Herrmann, R., Prchal, J.T., Skoda, R.C. & Hermouet, S.** Concordance of assays designed for the quantification of JAK2 V617F: a multicenter study. *Haematologica*, 94, (2009), 38–45.
- [146] **Jelinek, J., Oki, Y., Gharibyan, V., Bueso-Ramos, C., Prchal, J.T., Verstovsek, S., Beran, M., Estey, E., Kantarjian, H.M. & Issa, J.P.** JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome–negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*, 106, (2005), 3370–3373.
- [147] **Albiero, E., Bernardi, M., Madeo, D., Ruggeri, M. & Rodeghiero, F.** A new TMHA-DHPLC assay for the rapid mutation screening of JAK2 exon 14 in myeloproliferative disorders. *American Journal of Hematology*, 83, (2008), 603–604.
- [148] **Sattler, M., Walz, C., Crowley, B.J., Lengfelder, E., Janne, P.A., Rogers, A.M., Kuang, Y., Distel, R.J., Reiter, A. & Griffin, J.D.** A sensitive high-throughput method to detect activating mutations of Jak2 in peripheral-blood samples. *Blood*, 107, (2006), 1237–1238.
- [149] **Wang, Y.L., Vandris, K., Jones, A., Cross, N.C., Christos, P., Adriano, F. & Silver, R.T.** JAK2 mutations are present in all cases of polycythemia vera. *Leukemia*, (2008), 22, 1289.
-

- [150] **Anthony. J, Bench., Helen. E, White., Letizia, Foroni., et al.** Molecular diagnosis of the myeloproliferative neoplasms: UK guidelines for the detection of JAK2 V617F and other relevant mutations Blackwell Publishing Ltd, British Journal of Haematology. (2012).
- [151] **Chen, Q., Lu, P., Jones, A.V., Silver, R.T. & Wang, Y.L.** Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. The Journal of Molecular Diagnostics 9, (2007), 272–6.
- [152] **Murugesan, G., Aboudola, S., Szpurka, H., Verbic, MA., Maciejewski, JP., Tubbs, RR., et al.** Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. Am J Clin Pathol 125, (2006), 625-33.
- [153] **Lay, M., Mariappan, R., Gotlib, J., Dietz, L., Sebastian, S., Schrijver, I., et al.** Detection of the JAK2 V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. J Mol Diagn 8, (2006), 330-4.
- [154] **Poodt, J., Fijnheer, R., Walsh, IB., Hermans, MH.** A sensitive and reliable semi-quantitative real-time PCR assay to detect JAK2 V617F in blood. Hematol Oncol 24, (2006), 227-33.
-

- [155] **Hammond, E., Shaw, K., Carnley, B., P'ng, S., James, I., Herrmann, R.** Quantitative determination of JAK2 V617F by TaqMan: An absolute measure of averaged copies per cell that may be associated with the different types of myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 9, (2007), 242-8.
- [156] **Lippert, E.** La détection des mutations de JAK2 .Correspondances en Onco-hématologie - Vol. III - n° 3, (2008), 153-4
- [157] **Jovanovic, J.V., Vannucchi, A.M., Lippert, E., Oppliger Leibundgut, E., Maroc, N., Hermouet, S., Nickless, G., Cassinat, B., Guglielmelli, P., et al.** Systematic evaluation of DNA-based quantitative-polymerase chain reaction (Q-PCR) assays to track treatment response in patients with JAK2-V617F associated myeloproliferative neoplasms: a Joint European LeukemiaNet/ MPN&MPNr-EuroNet study. *Blood*, (2011), 118, 2812. (ASH Annual Meeting Abstracts).
- [158] **Mason, J., Akiki, S. & Griffiths, M.J.** (2011) Pitfalls in molecular diagnosis in haemato-oncology. *Journal of Clinical Pathology*, 64, 275–278.
- [159] **Sidon, P., El Housni, H., Dessars, B. & Heimann, P.** The JAK2 V617F mutation is detectable at very low level in peripheral blood of healthy donors. *Leukemia*, 20, (2006), 1622.
-

- [160] **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
- [161] **Goerttler, PS., Steimle, C., Marz, E., Johansson, PL., Andreasson, B., Griesshammer, M., Gisslinger, H., Heimpel, H., et Pahl, HL.** The Jak2V617F mutation, PRV-1 overexpression and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood* 106, (2005) , 2862-2864
- [162] **Izmailov, A., Goloubentzev, D., Jin, C., Sunay, S., Wisco, V., Yager, TD.** A general approach to the analysis of errors and failure modes in the base-calling function in automated fluorescent DNA sequencing. *Electrophoresis* 23, (2002), 2720-2728
- [163] **James, C., Delhommeau, F., Marzac, C., Teyssandier, I., Couedic, JP.,Giraudier, S., Roy, L., Saulnier, P., Lacroix, L., Maury, S., Tulliez, M., Vainchenker, W., Ugo, V., Casadevall, N.** Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis. *Leukemia* 20, (2006), 350–353
- [164] **Tefferi, A., Lasho, TL., Schwager, SM., Steensma, DP., Mesa, RA., Li, CY.,et al.** The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 131, (2005) , 320–328
-

- [165] **Steensma, DP.** Enough already of the word “robust”! *Blood* 103, (2004), 746-747.
- [166] **Kaltenboeck, B., Wang, C.** **Advances in real-time PCR:** application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem* 40, (2005) ,219-259.
- [167] **Frayling, IM., Monk, E., Butler, R.** PCR-based methods for mutation detection. *Molecular Diagnostics for the Clinical Laboratorian*. Edited by WB Coleman, GJ Tsongalis. Totowa, NJ, Humana Press , (2006), 65-74.
- [168] **Wabuyele, MB., Farquar, H., Stryjewski, W., Hammer, RP., Soper, SA., Cheng, YW., Barany, F.** Approaching real-time molecular diagnostics: single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) detection for the analysis of low abundant point mutations in K-ras oncogenes. *J Am Chem Soc* 125, (2003), 6937-6945.
- [169] **Mattocks, C.J., Morris, M.A., Matthijs, G., Swinnen, E., Corveleyn, A., Dequeker, E., Müller, C. R., Pratt, V. & Wallace, A.** A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *European Journal of Human Genetics*, 18, (2010), 1276–1288.
- [170] . **Clark, J.R., Jack, A.L., Barnett, D. & Reilly, J.T.** (2012) JAK2 V617F false negative rate in the UK NEQAS LI programme. *British Journal of Haematology*, 157(Suppl 1), 56.
- [171] **Skoda, R., Prchal, JT.** Chronic myeloproliferative disorders introduction. *Semin Hematol* 42, (2005) ,181-3.
-

- [172] **Xu, X., Zhang, Q., Luo, J., Xing, S., Li, Q., Krantz, S.B., Fu, X. & Zhao, Z.J.** JAK2 (V617F): prevalence in a large Chinese hospital population. *Blood*, 109, (2007), 339–342.
- [173] **Nielsen, C., Birgens, H.S., Nordestgaard, B.G., Kjaer, L. & Bojesen, S.E.** The JAK2 V617F somatic mutation, mortality and cancer risk in the general population. *Haematologica*, 96, (2011), 450–453.
- [174] **Beer, P.A., Jones, A.V., Bench, A.J., Goday-Fernandez, A., Boyd, E.M., Vaghela, K.J., Erber, W.N., Odeh, B., Wright, C., McMullin, M.F., Cullis, J., Huntly, B.J., Harrison, C.N., Cross, N.C. & Green, A.R.** Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones. *British Journal of Haematology*, 144, (2009), 904–908.
- [175] **Cleyrat, C., Jelinek, J., Girodon, F., Boissinot, M., Ponge, T., Harousseau, J.L., Issa, J.P. & Hermouet, S.** JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia*, 24, (2009), 1069–1073.
- [176] **Tefferi, A.** Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 24, (2010), 1128-38.
- [177] **Szpurka, H., Tiu, R., Murugesan, G., Aboudola, S., His, ED., Theil, KS., et al.** Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with
-

- marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* 108, (2006), 2173-81.
- [178] **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.
- [179] **Frohling, S., Lipka, DB., Kayser, S., Scholl, C., Schlenk, RF., Dohner, H., et al.** Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood* 107, (2006), 1242-1243.
- [180] **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.
- [181] **Hellstrom-Lindberg, E., Cazzola, M.** The role of JAK2 mutations in RARS and other MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, (2008), 52-9.
- [182] **Vardiman, JW., Thiele, J., Arber, DA., Brunning, RD., Borowitz, MJ., Porwit, A., et al.** The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, (2009), 937-51.
- [183] **Remacha, AF., Nomdedeu, JF., Puget, G., Estivill, C., Sarda, MP., Canals, C., et al.** Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease,
-

unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica* 91, (2006), 719-20.

- [184] **Ceesay, MM., Lea, NC., Ingram, W., Westwood, NB., Gaken, J., Mohamedali, A., et al.** The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia* 20, (2006), 2060-1.
- [185] **Schmitt-Graeff, AH., Teo, SS., Olschewski, M., Schaub, F., Haxelmans, S., Kirn, A., et al.** JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*. 93, (2008), 34-40.
- [186] **Wong, C.L., Ma, E.S., Wang, C.L., Lam, H.Y. & Ma, S.Y.** JAK2 V617F due to a novel TGCT mutation at nucleotides 1848–1849: diagnostic implication. *Leukemia*, 21, (2007), 1344–1346.
- [187] **Warshawsky, I., Mularo, F., Hren, C. & Jakubowski, M.** Failure of the Ipsogen Muta- Screen kit to detect the JAK2 617V>F mutation in samples with additional rare exon 14 mutations: implications for clinical testing and report of a novel 618C>F mutation in addition to 617V>F. *Blood*, 115, (2010), 3175–3176.
-

- [188] **Schnittger, S., Bacher, U., Kern, W., Schroöder, M., Haferlach, T. & Schoch, C.** Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. *Leukemia*, 20, (2006), 2195–2197.
- [189] **Grunebach, F., Bross-Bach, U., Kanz, L. & Brossart, P.** Detection of a new JAK2 D620E mutation in addition to V617F in a patient with polycythemia vera. *Leukemia*, 20, (2006), 2210–2211.
- [190] **Mead, A.J., Rugless, M.J., Jacobsen, S.E. & Schuh, A.** Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 366, (2012), 967–969.
- [191] **Tefferi, A.** Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2 V617F Era. *ASH educational book*, (2006), 240-5.
- [192] **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
- [193] **Cassinat, B., Giraudier, S.** FICHE MEDICALE Version V1.En ligne.« [https://www.google.com/#hl=ar&site=&source=hp&q=Cassinat%2C+B.%2C+Giraudier%2C+S.+\(2011\)+FICHE+MEDICAL+E+Version+V1+&oq=Cassinat%2C+B.%2C+Giraudier%2C+S.+\(2011\)+FICHE+MEDICALE+Version+V1+&gs_l=hp.12...2679.2679.0.3760.1.1.0.0.0.301.301.31.1.0...0.0...1c.2.6.hp.3zpHD5w9Zuc&bav=on.2,or.r_cp.&bvm=bv.43828540,d.d2k&fp=5b6518a3ec613155&biw=1366&bih=587](https://www.google.com/#hl=ar&site=&source=hp&q=Cassinat%2C+B.%2C+Giraudier%2C+S.+(2011)+FICHE+MEDICAL+E+Version+V1+&oq=Cassinat%2C+B.%2C+Giraudier%2C+S.+(2011)+FICHE+MEDICALE+Version+V1+&gs_l=hp.12...2679.2679.0.3760.1.1.0.0.0.301.301.31.1.0...0.0...1c.2.6.hp.3zpHD5w9Zuc&bav=on.2,or.r_cp.&bvm=bv.43828540,d.d2k&fp=5b6518a3ec613155&biw=1366&bih=587) » (2011).
-

- [194] **Martinaud, C., Brisou, P., Mozziconacci, MJ.** Is the JAK2(V617F) mutation detectable in healthy volunteers? *Am J Hematol* 85, (2010), 287-8.
- [195] **Lamy T, Devillers A, Bernard M, Moisan A, Grulois I, Drenou B, et al.** Inapparent polycythemia vera: an unrecognized diagnosis. *Am J Med* 102, (1997), 14-20.
- [196] **De Stefano, V., Fiorini, A., Rossi, E., Za, T., Farina, G., Chiusolo, P., et al.** Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost* 5, (2007), 708-714.
- [197] **Boissinot, M., Lippert, E., Girodon, F., Dobo, I., Fouassier, M., Masliah, C., et al.** Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis. *Blood* 108, (2006), 3223-4.
- [198] **Patel, RK., Lea, NC., Heneghan, MA., Westwood, NB., Milojkovic, D., Thanigaikumar, M., et al.** Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 130, (2006), 2031-8.
- [199] **Tefferi, A., and Vardiman, JW.** Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22, (2008), 14-22.
-

- [200] **MARZAC ,C.**, Diagnostic des syndromes myéloprolifératifs : critères et arbres diagnostiques ,Horizons Hémato 02 (03) , (**2012**) , 125-6]
- [201] **Harrison, CN., Gale, RE., Machin, SJ., Linch, DC.** A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications. *Blood* (**1999**), 93 , 417-24.
- [202] **Shih, LY., Lin, TL., Dunn, P., et al.** Clonality analysis using Xchromosome inactivation patterns by HUMARA-PCR assay in female controls and patients with idiopathic thrombocytosis in Taiwan. *Exp Hematol* (**2001**) ; 29 , 202-8.
- [203] **Chiusolo, P., La Barbera, EO., Laurenti, L., et al.** Clonal hemopoiesis and risk of thrombosis in young female patients with essential thrombocythemia. *Exp Hematol* (**2001**) ; 29 , 670-6
- [204] **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.
- [205] **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.
-

- [206] **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.
- [207] **Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., Balducci, D., Russo, L., Guerini, V., Barbui, T.** V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia : relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol* (2007) ; 35 , 702-11.
- [208] **Austin, SK., Lambert, JR.** The JAK2 V617F mutation and thrombosis. *Br J Haematol* (2008) ; 143 , 307-20.
- [209] **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.
- [210] **Jensen, MK., De Nully Brown, P., Lund, BY., Nielsen, OJ., Hasselbalch, HC.** Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* (2000) ; 100 , 116-24.
-

- [211] **Arellano-Rodrigo, E., Alvarez-Larran, 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.
- [212] **Jensen, MK., De Nully Brown, P., Lund, BY., Nielsen, OJ., Hasselbalch, HC.** Increased circulating platelet-leukocyte aggregates in myeloproliferative disorders is correlated to previous thrombosis, platelet activation and platelet count. *Eur J Haematol* (2001) ; 66 , 143-51.
- [213] **Carobbio, A., Finazzi, G., Guerini, V., et al.** Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* (2007) ; 109 , 2310-3
- [214] **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.
- [215] **Vannucchi, AM., Barbui, T.** Thrombocytosis and thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2007) ; 363-70.
-

- [216] **Passamonti, F., Randi, ML., Rumi, E, et al.** Increased risk of pregnancy complications in patients with essential thrombocythemia carrying the JAK2 (617V>F) mutation. *Blood* (2007) ;110 , 485-9 ; (Epub 2007 Apr 10).
- [217] **Scott, LM., Scott, MA., Campbell, PJ., Green, AR.** Homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* (2006) ; 108 , 2435-7 ; (Epub 006 Jun 13).
- [218] **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.
- [219] **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).
- [220] **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).
-

- [221] **Gale, RE., Allen, AJ., Nash, MJ., Linch, DC.** Long-term serial analysis of X-chromosome inactivation patterns and JAK2 V617F mutant levels in patients with essential thrombocythemia show that minor mutant-positive clones can remain stable for many years. *Blood* (2007) ; 109 , 1241-3 ; (Epub 2006 Oct 5).
- [222] **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).
- [223] **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).
- [224] **Au, WY., Fung, A., Lam, KY., Lie, AK., Liang, R., Kwong, YL.** Transformed essential thrombocytosis with a JAK2 V617F mutation relapsing as JAK2 mutation-negative leukaemia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2006) ; 38 , 573-4 ; (Epub 2006 Sep 4).
- [225] **Knoops ,L.** Que peut-on attendre des inhibiteurs des JAKs? *Horizons Hémato // Juillet / Août / Septembre* (2012) ; 02 (03) 151-152.
- [226] **Harrison, C., Verstovsek, S., McMullin, M F & Mesa R.** Janus kinase inhibition and its effect upon the therapeutic landscape for myelofibrosis: from palliation to cure? *Br J Haematol.* 2012; 157: 426-437. doi:10.1111/j.1365-2141.(2012). 09108.x.
-

- [227] **Pardanani, A.** JAK2 inhibitor therapy in myeloproliferative disorders: rationale, preclinical studies and ongoing clinical trials. *Leukemia*. (2008); 22: 23-30. doi:10.1038/sj.leu.2404948.
- [228] **Verstovsek S et al.** A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med*. (2012); 366: 799-807. doi:10.1056/NEJMoa1110557.
- [229] **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.
-

Serment de Galien

« Je jure, en présence des maîtres de cette faculté :

-D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

-D'exercer, ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

-D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

-De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession., de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

-Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes confrères si je manquais engagements . »



جامعة محمد الخامس - السويسي

كلية الطب و الصيدلة

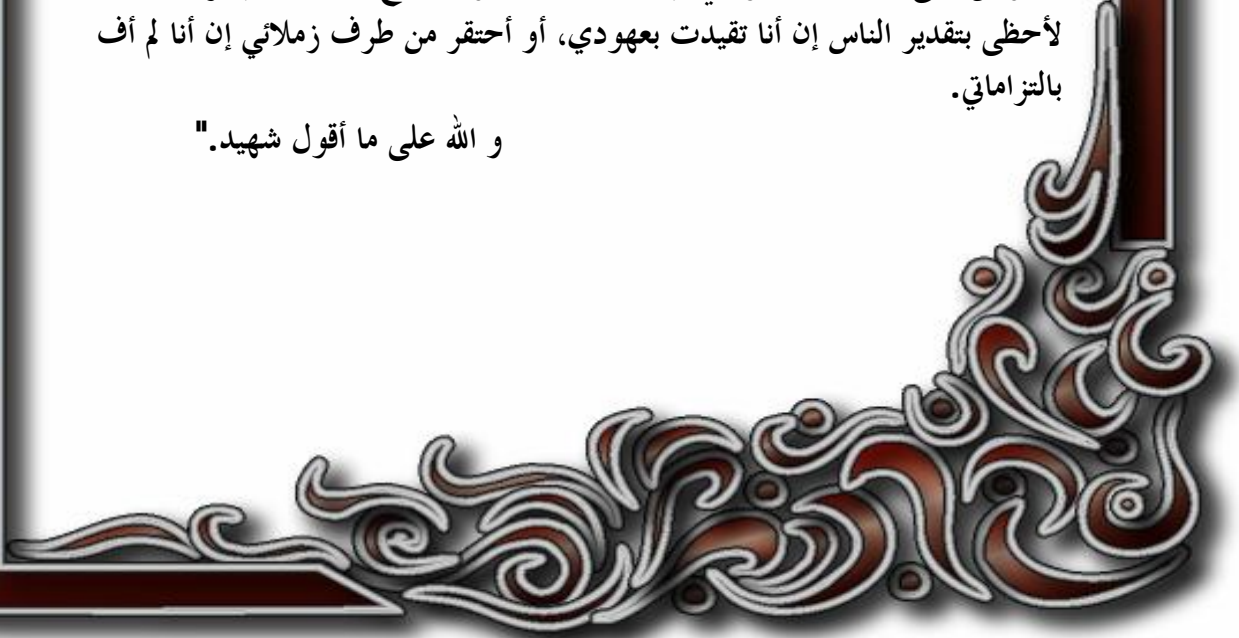
-الرباط-

قسم الصيدلي

"بسم الله الرحمن الرحيم
أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي.
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي و أعتزف لهم بالجميل و أبقى دوما و فية لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، و أن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي و واجباتي تجاه المريض و كرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء مزاولتي للصيدلة بالقوانين المعمول بها و بأدب السلوك و الشرف، و كذا بالاستقامة و الترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، و أن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

و الله على ما أقول شهيد."



الطفرة JAK2 V617F:

تقنيات البحث عنها و تطبيقاتها

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم:

من طرفه

الآنسة: أمل لعبيش

المزادة في: 13 أكتوبر 1986 بسلا

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: JAK2V617F – البروتين JAK2 – أورام التكاثر النقوي –
مثبط التيروسين كيناز – BCR-ABL – سلبي.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيسا

السيد: عبد القادر بلمكي

أستاذ في علم الدم

مشرفا

السيدة: نزهة مسعودي

أستاذة مبرزة في علم الدم البيولوجي

السيدة: سعيدة طلال

أعضاء

أستاذة في الكيمياء الإحيائية

السيد: عز العرب مسرار

أستاذ في علم الدم البيولوجي

السيدة: سكيينة الحمزاوي

أستاذة في علم الأحياء الدقيقة