

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERSCIENTIFIQUE



Université Mohamed KHIDER Biskra

Faculté des Sciences Exacte et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la Vie



## MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de magister en Biologie

Option : **Biologie Appliquée**

### *Thème*

*Analyse mutationnelle du gène JAK2  
V617F et son association potentielle à la  
translocation BCR-ABL dans la leucémie  
myéloïde chronique*

Présentée par: **BENGUERAICHI Fatiha**

Soutenu le : 07/01/2015

Devant le jury :

<b>M. BELHAMRA Mohamed, Président</b>	Professeur	Université Mohamed KHIDER de BISKRA
<b>Mme. SATTA Dalila, Examinatrice</b>	Professeur	Université de CONSTANTINE 1
<b>M. LAIADI Ziane, Examineur</b>	MC 'A'	Université Mohamed KHIDER de BISKRA
<b>M. BOURAS Mourad, Rapporteur</b>	MC 'A'	Université Hadj Lakhdar de BATNA

**Année Universitaire 2013-2014**

# Remerciements

Je tiens à exprimer ma reconnaissance, ma haute considération et mon profond respect à mon encadreur, **Monsieur le Docteur BOURAS Mourad**, qui m'a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude à **Monsieur le Professeur BELHAMRA Mohamed**, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire.

Il est pour moi un honneur de remercier **Madame le Professeur SATTI Dalila** d'avoir accepté de juger mon travail. Je lui en suis très reconnaissante de même que pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail.

**Monsieur le Docteur LAIADI Ziane**, qui a accepté d'évaluer ce travail et faire partie de ce jury de mémoire. Je le remercie de l'intérêt qu'il a bien voulu lui porter. Je lui témoigne ma reconnaissance.

J'exprime mes respectueux dévouements A **Madame le Professeur SAIDI Mahdia**, chef de service d'hématologie du CHU de Batna, qui nous a permis de collecter le matériel biologique nécessaire pour réaliser cette étude.

A **Madame le Docteur CHAIRA Safa**, qui a toujours manifesté une efficacité dans sa collaboration et a montré un intérêt soutenu tout au long de ce travail depuis le départ. Je voudrais lui témoigner ma reconnaissance et mes remerciements pour son aide et sa collaboration à ce travail.

Je tiens également à présenter mes plus vifs remerciements à **ma mère Zouina** et **Mlle BACHA Saliha**, chef du laboratoire de biologie, qui m'ont aidé au cours du magister.

J'adresse mes sincères remerciements à ceux qui ont permis à ce travail d'être réalisable, notamment, **Dr MOUSSI Abdelhamid**, le Chef de Département des Sciences de la Nature et de la Vie, **Mlle Ferroudj Sana**, Maître Assistante 'A'.

Enfin mes remerciements à toutes les personnes qui, de près ou loin, m'ont aidé dans ce travail.

## *Remerciement spécial*

*A Monsieur le Docteur BOUSSOUAR Fayçal de l'Université de Grenoble.*

*Nous avons eu le plaisir de travailler avec vous. Nous vous remercions infiniment pour votre précieuse collaboration et votre disponibilité. Ce mémoire est pour nous l'occasion de vous assurer de notre profonde reconnaissance et de notre amitié sincère.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail:*

*A mes très chers parents: Zouina et Tayeb rahimaho Allah.*

*A mon cher fils : Louai Abdelouadoud*

*A ma sœur: Fatima et son époux Mahfodh.*

*A mon frère: Youcef et sa famille, sa femme Hania et ses enfants Anass, Oussama, Mohamed,  
Mohaned et Hodheifa.*

*A toute ma grande famille: mes oncles et mes tantes.*

*A toutes mes amies et collègues.*

*A tout le groupe de ma promotion.*

*A tous ceux et celles qui m'ont encouragés, entourés de leur soutient durant les moments  
difficiles avec tant d'amour et de compréhension.*

## Résumé

LMC est une hémopathie clonale maligne de cellules souches pluripotente hématopoïétiques, caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire dans le sang périphérique et marqué l'hyperplasie myéloïde dans la moelle osseuse. Le chromosome Philadelphie est l'anomalie chromosomique la plus importante qui a été décrite dans la LMC. Cette translocation a été caractérisée, au niveau moléculaire, par les transcrits de fusion générés par les différents types de configurations du gène hybride BCR-ABL. Ces transcrits de fusion sont analysés par PCR à partir de l'ARNm après une étape de transcription inverse (RT-PCR).

Il y a un nombre croissant de cas de patients atteints de LMC, qui ont développés la mutation JAK2 V617F, une mutation ponctuelle acquise au sein du gène JAK2, au cours de l'évolution de la maladie.

Dans notre étude, nous avons entrepris l'optimisation et la validation des techniques de RT-PCR et PCR-RFLP, afin d'améliorer le diagnostic, faciliter ainsi le suivi de la maladie et, par conséquent, diriger la thérapeutique. Aussi, de rechercher d'éventuelle coexistence de la mutation JAK2 V617F et la translocation BCR- ABL chez ces patients.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence les différents types de transcrits BCR-ABL au sein d'une population Algérienne, atteints de LMC en phase chronique, qui sont les transcrits b3a2 et b2a2, et nous avons constaté que le transcrit b3a2 est plus fréquent que le transcrit b2a2 et l'absence du transcrit e1a2. Cependant, vu le nombre restreint d'échantillons de LMC considéré dans cette étude, les résultats obtenus n'ont pas permis d'en tirer des conclusions sur la concomitance des deux anomalies génétiques, JAK2 V617F et BCR- ABL, chez un patient atteint de LMC.

**Mots clés :** LMC, translocation BCR-ABL, mutation JAK2 V617F, RT-PCR, PCR-RFLP.

## **Abstract**

CML is a malignant clonal disorder of hematopoietic stem cells that results in increases in not only myeloid cells but also erythroid cells and platelets in peripheral blood and marked myeloid hyperplasia in the bone marrow. Philadelphia chromosome is the most important chromosomal abnormality has been described in CML. This translocation was characterized at the molecular level fusion transcripts generated by the different types of configuration of BCR-ABL hybrid gene. These fusion transcripts were analyzed by PCR from mRNA after the step of RT-PCR.

There are number of cases increasing of Ph-positive CML with concomitant JAK2 V617F mutation have been reported in the literature, their coexistence appearing during the evolution of the disease.

In our study, we undertook the optimization and validation techniques RT-PCR and PCR-RFLP to improve the diagnosis and to facilitate the monitoring of the disease and, therefore, direct therapeutic. Also, our study aimed to find a potential coexistence of the JAK2 V617F mutation and BCR-ABL translocation in a patient.

Our results allow identifying the different types of BCR-ABL in an Algerian population, CML in chronic phase, that are b3a2 and b2a2 transcripts which found b3a2 transcript is more frequent than b2a2 transcript, and the e1a2 transcript is absence. However, given the limited number of samples of CML considered in this study did not allow drawing conclusions about the concomitance of two genetic abnormalities, BCR-ABL and JAK2 V617F in a patient with CML.

**Keywords:** CML, BCR-ABL translocation, JAK2 V617F mutation, RT-PCR, PCR-RFLP.

## المخلص

سرطان الدم النخاعي المزمن هو مرض دموي خبيث ينتج عن التكاثر غير طبيعي لسلاسل الخلايا الحبيبية الناتجة عن خلية بادئة في نخاع العظام. في المستوى الجزيئي، يعتبر كروموسوم فيلادلفيا أهم ما يميز هذا المرض، وهو ينتج عن تبادل في المادة الوراثية بين الكروموسومين 9 و22 معطيا جينا مندمجا يسمى BCR-ABL. يمكن التشخيص المبكر لهذا المرض بواسطة الكشف عن وجود الحمض النووي الريبي الرسول الذي يتم نسخه من هذا الجين بتقنية البيولوجيا الجزيئية RT-PCR. هناك عدد متزايد من حالات المرضى الذين يعانون من سرطان الدم النخاعي المزمن يطورون طفرة JAK2 V617F خلال تطور المرض.

في هذا العمل، أجرينا تحسينا وضبطا لبعض تقنيات البيولوجيا الجزيئية، خاصة RT-PCR و PCR-RFLP التي تعد تقنيات حساسة جدا تساعد الأطباء على الكشف المبكر للمرض والتأكد من التشخيص، متابعة المرضى و تحديد العلاج المناسب. كما قمنا بالبحث عن المرضى الذين يمكن أن يحملوا هذين التشوهين معا. وقد أظهرت نتائج هذا العمل، بالنسبة لعينة المرضى المدروسة أن نوع الجين المندمج هي b2a2 و b3a2. ونظرا للعدد المحدود من العينات فقد تعذر علينا الوصول إلى خلاصة معتبرة بالنسبة للتواجد المحتمل للتشوهين JAK2 V617F و BCR-ABL عند نفس المريض الذي يعاني من LMC.

الكلمات المفتاحية: CML، BCR-ABL translocation، طفرة JAK2V617F، RT-PCR، PCR-RFLP.

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des photos

## Introduction

## I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les néoplasmes myéloprolifératifs classiques.....	2
<b>I.2. Présentation de la leucémie myéloïde chronique.....</b>	<b>3</b>
I.2.1. Historique et définition.....	3
I.2.2. Epidémiologie.....	4
I.2.3. Etiologie .....	5
I.2.4. Physiopathologie .....	5
I.2.4.1. Prolifération monoclonale. ....	5
I.2.4.2. Chromosome Philadelphie .....	5
I.2.5. Biologie moléculaire du chromosome Philadelphie .....	6
I.2.5.1. Gène ABL et sa protéine .....	6
I.2.5.2. Régulation de c-Abl .....	9
I.2.5.3. Fonction de la protéine c-Abl .....	11
I.2.5.4. Gène BCR et sa protéine .....	12
I.2.5.5. Fonction de la protéine Bcr .....	13
I.2.5.6. Gène BCR-ABL et protéine de fusion .....	13
I.2.6. Signalisation induite par les oncogènes Bcr-Abl .....	15
I.2.6.1. Altération des propriétés d'adhérence .....	17
I.2.6.2. Inhibition de l'apoptose .....	17
I.2.6.3. Activation des signaux mitotiques .....	17
I.2.6.4. Instabilité génomique et réparation de l'ADN .....	18
<b>I.3. La mutation JAK2V617F.....</b>	<b>19</b>
I.3.1. Gène JAK2 et sa protéine .....	19
I.3.2. Fonction de la protéine Jak2.....	20
I.3.3. Mutation JAK2 V617F .....	21

I.3.4. Mutation et phénotype .....	23
I.3.5. Effet de la mutation.....	24
I.3.6. Voie JAK/STAT .....	26
<b>II. PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
<b>II.1. Matériels</b> .....	27
II.1.1. Patients et témoins.....	27
<b>II.2. Méthodes</b> .....	27
II.2.1. Prélèvements sanguins .....	27
II.2.2. Extraction des acides nucléiques .....	27
II.2.3. Détection du transcrit de fusion BCR-ABL par RT-PCR.....	30
II.2.4. Détection de la mutation JAK2 V617F par PCR-RFLP .....	34
<b>II. 3. Résultats</b> .....	40
II.3.1. Caractéristiques des patients .....	40
II.3.2. Profils électrophorétiques des transcrits BCR-ABL : b2a2 et b3a2 .....	41
II.3.3. Profil électrophorétique de la séquence amplifiée .....	42
II.3.4. Profils des produits de PCR digérés par l'endonucléase de restriction <i>BsaXI</i> .....	43
<b>II.4. Discussion</b> .....	44
II.4.1. Discussion analytique.....	44
II.4.2. Discussion des résultats.....	47
<b>Conclusion</b> .....	49
<b>Références bibliographiques</b> .....	50
<b>Annexe</b> .....	56

## *Liste des abréviations*

ABL	Abelson (gène : ABL ; protéine : Abl)
Art	ATM and RAD3-related nuclear protein kinase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BCR	Breakpoint Cluster Region (gène : BCR ;protéine : Bcr)
Cbl	Casitas-B-lineage lymphoma
Crk	sarcoma virus CT10 oncogene homolog
Crkl	sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like
Epo-R	Erythropoietin receptor
FISH	Hybridation <i>In Situ</i> en Fluorescence
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanidine nucleotide Exchange Factors
Grb2	Growth-factor-receptor-bound 2
JAK	Janus kinases (gène: JAK; protéine : Jak)
JH	Jak Homology
Jnk	Jun N-terminus kinase
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MAP	Mitogen-Activated Protein
M-BCR	Major-Breakpoint Cluster Region
MEK	MAPKErkKinase
MFP	MyéloFibrose Primaire
MPD	MyeloProliferative Disorders
Myc	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
Nck	Non-catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NMP	Néoplasie MyéloProlifératif
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Chromosome Philadelphie
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3-kinase
PV	Polyglobulie Vraie

QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homolog
Rb	Retinoblastoma
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SH	Src Homologie
Rho	Ras homolog gene family
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Shc	Srchomology containing
SMP	Syndromes MyéloProlifératifs
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TE	Thrombocytémie Essentielle
TK	Tyrosine Kinase
TYK2	TYrosine Kinase 2

## *Liste des figures*

N°	Titre	Page
1.	Caryotype d'un patient avec une LMC Ph positive.	4
2.	Pathogenèse de la leucémie myéloïde chronique.	6
3.	Structure modulaire des Abl kinases.	8
4.	Représentation schématique du domaine kinase d'une protéine tyrosine kinase.	9
5.	Structure cristalline et modèle du <i>core</i> c-Abl régulé négativement.	10
6.	Structure de la protéine Bcr.	13
7.	Structure du gène ABL et du gène BCR, ainsi que les ARNm les plus fréquemment retrouvés dans les hémopathies malignes.	14
8.	Différents mécanismes participant à la leucémogénèse induite par Bcr-Abl.	15
9.	Voies de signalisation activées dans les cellules Bcr-Abl positives.	16
10.	Voies de signalisation avec un potentiel mitogénique dans les cellules Bcr-Abl transformées.	18
11.	Structure de Janus kinase (Jak).	20
12.	Activation de la transcription médiée par Jak2 dans les cellules hématopoïétiques.	21
13.	Mutation JAK2 V617F dans un échantillon de PV.	22
14.	Structure tridimensionnelle proposée pour Jak2.	23
15.	Mutation JAK2 V617F fait des modifications épigénétiques dans les MPN.	24
16.	Voies de signalisation de JAK2 V617F dans les néoplasmes myéloprolifératifs.	25
17.	Illustration schématique des étapes de la RT-PCR pour les différents transcrits BCR-ABL.	31
18.	Illustration schématique des étapes de la PCR-RFLP pour la mutation JAK2 V617F.	35
19.	Schématisation de l'action de l'enzyme de restriction <i>Bsa</i> XI et les fragments obtenus après la digestion.	37

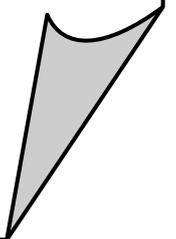
## *Liste des tableaux*

N°	Titre	Page
I.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène ABL (Carte ID).	7
II.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène BCR (Carte ID).	12
III.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène JAK2 (Carte ID).	21
IV.	Amorces sens et anti-sens utilisées pour l'amplification par RT-PCR des différents transcrits BCR-ABL.	32
V.	Programme de PCR pour le gène hybride BCR-ABL.	33
VI.	Programme de PCR pour le gène JAK2.	36
VII.	Caractéristiques des patients inclus dans notre étude.	40

## *Liste des photos*

N°	Titre	Page
1.	Profil électrophorétique montrant les différents transcrits : b2a2 (98 pb) et b3a2 (111 pb).	41
2.	Profil électrophorétique obtenu par PCR correspondant au fragment cible du gène JAK2.	42
3.	Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus après la digestion par l'enzyme <i>Bsa</i> XI (RFLP).	43
4.	Profil électrophorétique des ARN totaux extraits au TRIzol.	45
5.	Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN.	45
6.	Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus du gène JAK2 (345 pb) après optimisation de la température d'hybridation.	46
7.	Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus du gène JAK2 (345 pb) après l'optimisation du nombre de cycles.	46

# Introduction



## Introduction

Les leucémies sont des maladies cancéreuses graves, surtout si elles ne sont pas traitées, désignées aujourd'hui dans le langage courant de " cancer du sang " ; parmi ces leucémies, la leucémie myéloïde chronique (LMC), qui appartient à un groupe de maladies hématologiques malignes nommé néoplasmes myéloprolifératifs (MPN). Les MPN sont caractérisés par une prolifération clonale et dérégulée de cellules souches hématopoïétiques, sans blocage de maturation, ni dysplasie. D'après la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé publiée en 2008, les néoplasmes myéloprolifératifs chroniques regroupent plusieurs hémopathies avec la LMC, telles que la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP).

La LMC a bénéficié très tôt d'un marqueur biologique : le chromosome de Philadelphie issu de la translocation  $t(9;22)(q34;q11)$ . Ce remaniement chromosomique est à l'origine d'un gène chimérique codant pour la protéine tyrosine kinase Bcr-Abl dont la fonction enzymatique est constitutivement activée. Cette oncoprotéine est directement à l'origine de la maladie, en perturbant de nombreuses voies de signalisation cellulaire. La LMC bénéficie de techniques performantes pour le diagnostic et le suivi moléculaire et des thérapeutiques innovantes extrêmement efficaces (inhibiteurs de tyrosine kinase).

Tandis que, les MPN Philadelphie négatives sont caractérisées par la présence de la mutation JAK2 V617F, cette mutation ponctuelle acquise, se produit dans la grande majorité des patients atteints de PV et d'environ la moitié des patients atteints de MFP ou de TE. Cette mutation joue un rôle fondamental dans la pathogenèse et le développement de MPN et sa détection est très utile pour le diagnostic de ce groupe.

Selon la classification de l'OMS (2008), la mutation JAK2 V617F et la translocation BCR-ABL sont mutuellement exclusives. Néanmoins, un nombre croissant de cas a été signalé témoignant de la coexistence des deux anomalies génétiques chez les patients atteints la LMC Ph +.

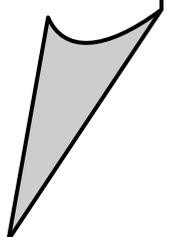
Le diagnostic de la phase chronique de la LMC est confirmé par la mise en évidence du Ph ou son équivalent moléculaire: le réarrangement BCR-ABL. Les outils de biologie moléculaire permettent de détecter l'apparition d'un clone malin et de suivre sa disparition et/ou sa réapparition après traitement. La RT-PCR permet de détecter avec une extrême sensibilité l'ARN de fusion BCR-ABL. Aussi, la présence de la mutation JAK2 V617F peut être effectuée par la technique de PCR-RFLP.

Notre travail de recherche vise à :

- optimiser et valider des protocoles à base de techniques de biologie moléculaire, potentiellement utilisables : RT, PCR et RFLP,
- screening de l'ensemble des anomalies affectant les gènes ciblés par notre étude,
- transfert de technologie vers l'analyse de routine dans un cadre d'amélioration du diagnostic précoce afin d'adapter le traitement et la prise en charge des patients atteints de MPN au niveau des centres hospitaliers.

# **Partie**

# **Bibliographique**



### I.1. Généralités sur les néoplasmes myéloprolifératifs classiques

Les syndromes myéloprolifératifs chroniques sont un groupe hétérogène d'hémopathies malignes clonales dérivant de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique (1). Ce sont des maladies acquises (2) et caractérisées par :

- ✓ la production excessive de cellules sanguines myéloïdes matures, fonctionnelles (3) et hypersensible ou indépendantes des cytokines (4).
- ✓ l'évolution chronique (5).
- ✓ le risque accru de développer une leucémie myéloïde aiguë (6,7).

L'expression Syndromes MyéloProlifératifs (SMP) ou *MyeloProliferative Disorders* (MPD), a été introduite par William Damesheken 1951 pour décrire 4 maladies différentes avec des similitudes cliniques et biologiques (8) et connue ainsi comme SMP classique :

1. La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire et par la présence d'un marqueur chromosomique : chromosome de Philadelphie (9).
2. la Polyglobulie Vraie (PV) (maladie de Vaquez ou polyglobulie primitive) est caractérisée par la prolifération de la lignée érythroïde qui aboutit à une production excessive de globules rouges et, à un moindre degré, des lignées granuleuses et mégacaryocytaires (10, 11).
3. la Thrombocytémie Essentielle (TE) est caractérisée par le nombre élevé de mégacaryocytes dans la moelle osseuse et par un nombre élevé de plaquettes sanguines (thrombocytose ou hyperplaquetose), dont la conséquence est l'apparition des complications thrombotiques et/ou hémorragiques (12).
4. la MyéloFibrose Primaire (MFP) (fibrose médullaire et hématopoïèse extramédullaire) est caractérisé par la prolifération d'une cellule souche hématopoïétique clonale, qui se diffère en cellules hématopoïétiques myéloïdes, notamment mégacaryocytaires (13), et ainsi une prolifération de cellules stromales non clonales à l'origine de l'apparition d'une fibrose médullaire. La fibrose réactionnelle altère l'environnement des cellules de la moelle et perturbe l'hématopoïèse médullaire. Les cytokines et les chimiokines libérées participent également à la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques des niches médullaires vers les niches spléniques, en les conduisant à l'hématopoïèse splénique (14).

En 2005, une avancée majeure dans la compréhension de la pathogenèse du MPD a été faite par la découverte de la mutation JAK2 V617F qui touche essentiellement PV, ET et MFP avec une fréquence différente ; ce qui a favorisé des amendements dans la classification des SMP en 2008 par l'OMS (4ème édition) et qui a recommandé de changer le terme « les syndromes

myéloprolifératifs » en «**les Néoplasies MyéloProlifératifs** » (NMP) ou « *MyeloProliferative Neoplasms* » (MPN) et y comprennent : LMC, PV, TE, MFP ou splénomégalie myéloïde, la leucémie chronique à polynucléaires neutrophiles, la leucémie chronique à polynucléaires éosinophiles et les syndromes d'hyper-éosinophilies, la mastocytose et les néoplasies myéloprolifératives hors classification (15).

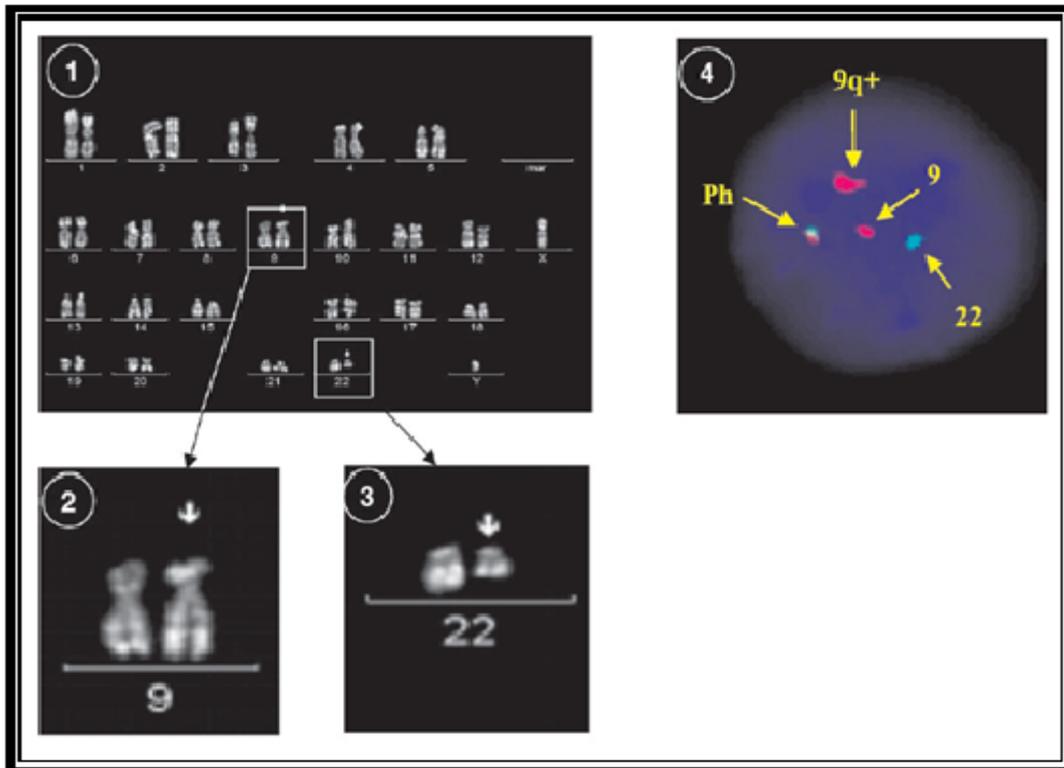
## **I.2. Présentation de la leucémie myéloïde chronique**

### **I.2.1 Historique et définition**

Les premières descriptions des manifestations cliniques de la LMC sont apparues en 1845 par Bennett et Virchow. En 1847, Virchow le premier, qui a utilisé le terme "leukämie" (leukemia) (le nom de leucémie est une combinaison des mots grecs "leukos" et "heima", qui signifie "sang blanc". Cela se réfère à l'abondance des globules blancs dans le corps. En 1852, Bennett a préconisé le terme «leucocythaemia», ce qui signifie une augmentation des globules blancs, qui est mieux accepté (16). Près de 100 ans plus tard, en 1960, la découverte par Nowell et Hungerford de chromosome Philadelphie (Ph), chromosome 22 tronqué, avec une perte apparente de matériel génétique de son bras long de spécimens de patients atteints de LMC (17) (Figure 1). En 1973, Rowley a démontré que le chromosome Ph a été formé par une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 (18) c'est-à-dire t(9, 22) (q34; q11.2). La base génétique de la LMC est devenue plus claire en 1983, les chercheurs ont démontré que les gènes essentiels impliqués dans la translocation étaient ABL1 (9q34) (19), qui a été transporté dans un gène spécifique, BCR, sur le chromosome 22 (20).

La LMC est une hémopathie maligne, et plus précisément un néoplasie myéloProlifératif, caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire dans le sang périphérique et l'hyperplasie myéloïde dans la moelle osseuse (21). La LMC a bénéficié très tôt d'un marqueur biologique au niveau des cellules hématopoïétiques : le chromosome de Philadelphie. Celui-ci est, en fait, le raccourcissement du bras long du chromosome 22, en conséquence de la translocation chromosomique t(9 ; 22) (q34.1, q11.2). Le produit du gène chimérique BCR-ABL est la protéine Bcr-Abl, qui a une forte activité tyrosine kinase et est responsable de la transformation leucémique (22). La LMC évolue, en l'absence de traitement, en trois phases : une phase chronique (phase myélocytaire) d'une durée de trois à quatre ans, une phase d'accélération d'une dizaine de mois et enfin une phase de transformation en leucémie aiguë (ou phase blastique) de survenue inéluctable et fatale (23). Le diagnostic de la LMC est généralement basé sur la détection de Ph (21) par les méthodes :

- ✓ cytogénétique : mise en évidence au niveau de la moelle osseuse du chromosome de Philadelphie ou de ses variants, par cytogénétique conventionnelle ou par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) dans près de 95 % des cas (22) (Figure 1).
- ✓ moléculaire : mise en évidence du transcrit BCR-ABL par RT-PCR (24) ou PCR quantitative (Q-PCR) dans le sang ou la moelle osseuse. Typage et quantification initiale du taux du transcrit (22).



**Figure 1. Caryotype d'un patient avec une LMC Ph positive.** (1) Caryotype [46XY, t(9;22)(q34;q11)] d'un patient avec une LMC Ph-positive; (2) le chromosome 9 dérivé (flèche); (3) chromosome Philadelphie (flèche). Comme résultat de la translocation, le bras long (q) du chromosome 22 apparaît réduit et ce chromosome a été initialement dénommés 22q-. (4) FISH ; Comme de la t(9, 22), les gènes BCR (signal vert) et ABL (signal rouge) sont juxta posés et forment un signal de fusion jaune (24).

### I.2.2. Epidémiologie

L'incidence annuelle de la LMC est d'environ 1,6 cas par 100 000 habitants. Environ 5000 cas de LMC sont diagnostiqués chaque année. Cette incidence n'a pas changé au cours de ces dernières décennies, et elle en augmente avec l'âge, avec un âge médian au moment du diagnostic de 53 ans (25). La LMC peut toucher toutes les tranches d'âges, y compris les enfants (21) (représentant 2 à 5 % des leucémies de l'enfant). La fréquence de LMC représente 15% des leucémies de l'adulte (25), inférieure à celle des leucémies aiguës (26). Il ya une légère prédominance masculine dont le ratio male-femelle qui est de 1,1:1 à 1,4:1. Avec le traitement par l'imatinib (Gleevec), la mortalité annuelle a été réduite de manière significative (moins de 2% à 3% par an) (25).

En Algérie, une étude réalisée en 2005 sur une période d'onze années (1994-2004) sur 1100 patients, a montré les résultats suivants :

- la prévalence absolue de la LMC en Algérie, en 2004, est de 472 cas, sa prévalence relative est de 1,8 cas /100000 habitants par ans.
- le taux d'incidence annuel est en progression puisqu'il passe de 0,19 en 1994 à 0,4 en 2004. La sex-ratio H/F est de 1,12 et l'âge moyen est de 44 ans avec des extrêmes de 15 à 76 ans (27).

### **I.2.3. Etiologie**

L'étiologie de la leucémie myéloïde chronique semble inconnue. Certaines associations avec des facteurs environnementaux ont été signalées, mais dans la plupart des cas, aucun des facteurs étiologiques n'a pu être identifié (28).

Les expositions nucléaires (25) et radiologiques, y compris les radiations thérapeutiques, ont été associées au développement de la LMC (29). En outre, il a été montré que de fortes doses de radiations ionisantes peuvent conduire à la formation *in vitro* d'un gène BCR-ABL (30).

L'exposition à des produits chimiques n'a pas toujours été associée à un risque accru de la LMC (25, 28).

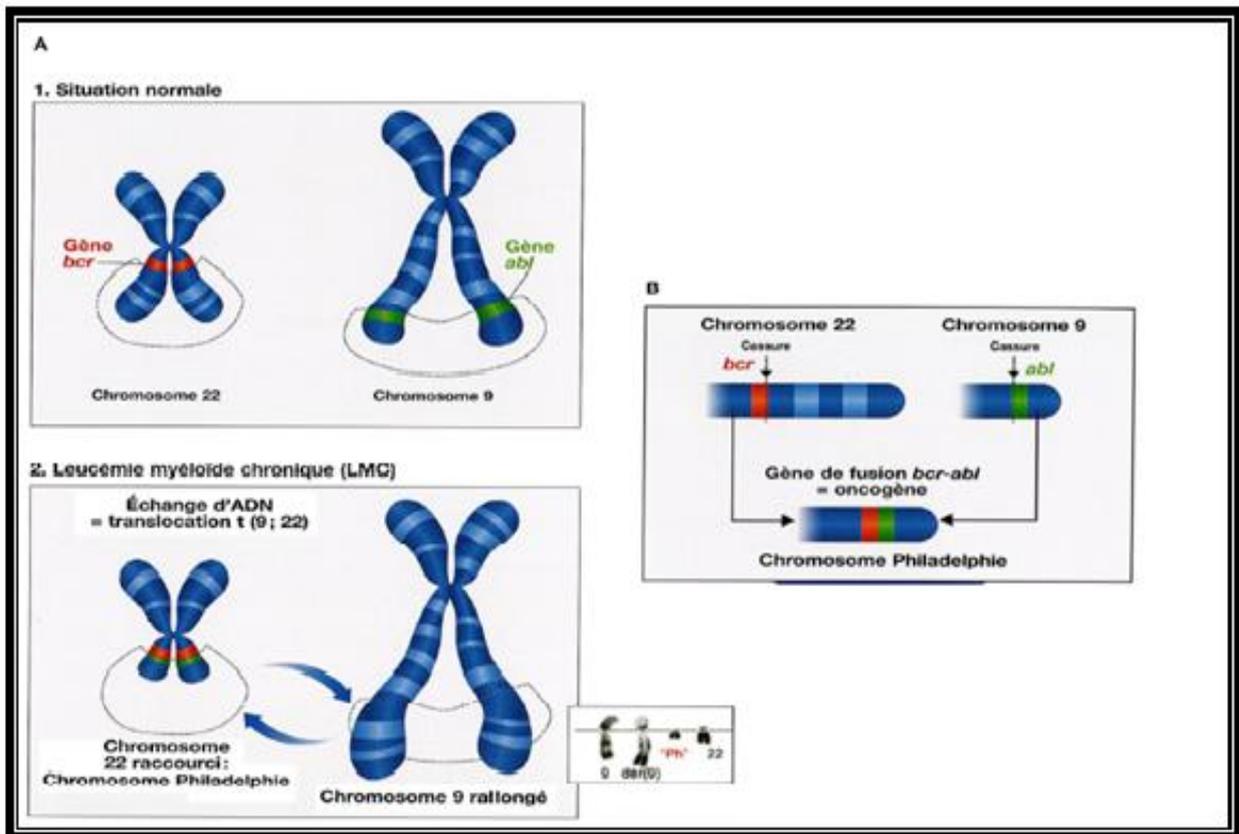
### **I.2.4. Physiopathologie**

#### **I.2.4.1. Prolifération monoclonale**

La LMC est due à une prolifération clonale provenant d'une mutation somatique d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Le Ph, marqueur de la maladie, est retrouvé dans toutes les mitoses des précurseurs granuleux, monocytaires, plaquettaires, érythrocytaires, mais aussi lymphocytaires B, NK et parfois T. Il est absent dans les fibroblastes et les cellules extra-hématopoïétiques (25, 26).

#### **I.2.4.2. Chromosome Philadelphie**

C'est une anomalie acquise et est présente dans environ 95 % des cas de LMC, ainsi que dans certaines formes de leucémies aiguës (31) (Figure 2).



**Figure 2. Pathogenèse de la leucémie myéloïde chronique.** A1 et A2 : situation normale et LMC : un échange d'ADN entre deux chromosomes dans les cellules souches de la moelle osseuse ; B : apparition du gène de fusion anormal (32).

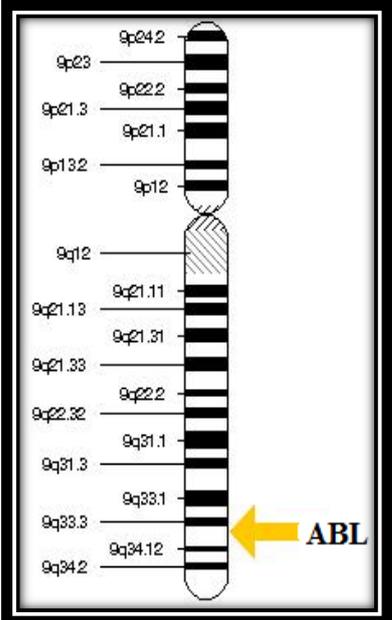
## I.2.5. Biologie moléculaire du chromosome Philadelphie

### I.2.5.1. Gène ABL et sa protéine

Le gène *c-ABL* est localisé sur le bras long du chromosome 9 en position 9q34 (33) (Tableau I). Il s'étend sur 250-300 kb et comporte 11 exons dont 2 exons alternatifs, 1a et 1b, séparés par un très long intron de 200 kb où se dispersent la majorité des points de cassure (26). Aussi, cet intron comprend un site alternatif d'initiation de la transcription (23) (Figure 7).

Le gène *c-ABL* est exprimé de manière ubiquitaire dans les cellules de différents tissus (34). Il est transcrit en ARNm de 6 ou 7 kb, qui donne naissance à deux isoformes protéiques d'environ 145 kDa (23, 26). Les deux isoformes protéiques sont synthétisées en fonction du premier exon, 1a ou 1b. La protéine contenant l'exon 1b est « myristoylée » (c'est-à-dire modifiée par un groupement lipide de type acide gras saturé lié par une liaison covalente à un résidu glycine), ce qui entraîne sa localisation à la membrane plasmique. L'absence de ce résidu glycine dans la forme 1a entraîne une localisation nucléaire prédominante de l'Abl (33).

Tableau I. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène ABL (Carte ID).

Identifiants (IDs) le gène ABL chez l'espèce humaine (Homo sapiens)		<b>Chromosome 9<sup>8</sup></b> 
Nom officiel <sup>1</sup>	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	
Symbole officiel <sup>1</sup>	ABL1	
Symboles synonymes <sup>1</sup>	c-ABL, JTK7, p150	
Localisation <sup>2</sup>	9q34.1	
Séquence <sup>2</sup>	Chromosome: 9; NC_000009.12 (130713881..130887675)	
RefSeqGene <sup>2</sup>	NG_012034.1	
RefSeq mRNA et Protéine de tyrosine-protein kinase ABL1 isoform a <sup>2</sup>	NM_005157.4 NP_005148.2	
RefSeq mRNA et Protéine de tyrosine-protein kinase ABL1 isoform b <sup>2</sup>	NM_007313.2 NP_009297.2	
IDs dans les différentes bases de données		
HGNC <sup>1</sup>	76	
NCBI <sup>2</sup>	25	
Ensembl <sup>3</sup>	ENSG00000097007	
HPRD <sup>4</sup>	01809	
MIM <sup>5</sup>	189980	
Vega <sup>6</sup>	OTTHUMG00000020813	
UniProt <sup>7</sup>	P00519	

<sup>1</sup> [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=76](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=76)

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25#reference-sequences>

<sup>3</sup> [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000097007;r=9:133589333-133763062](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000097007;r=9:133589333-133763062)

<sup>4</sup> [http://www.hprd.org/summary?hprd\\_id=01809&isoform\\_id=01809\\_1&isoform\\_name=Isoform\\_1](http://www.hprd.org/summary?hprd_id=01809&isoform_id=01809_1&isoform_name=Isoform_1)

<sup>5</sup> <http://omim.org/entry/189980>

<sup>6</sup> [http://vega.sanger.ac.uk/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=OTTHUMG00000020813;r=9:133589333-133763062](http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=OTTHUMG00000020813;r=9:133589333-133763062)

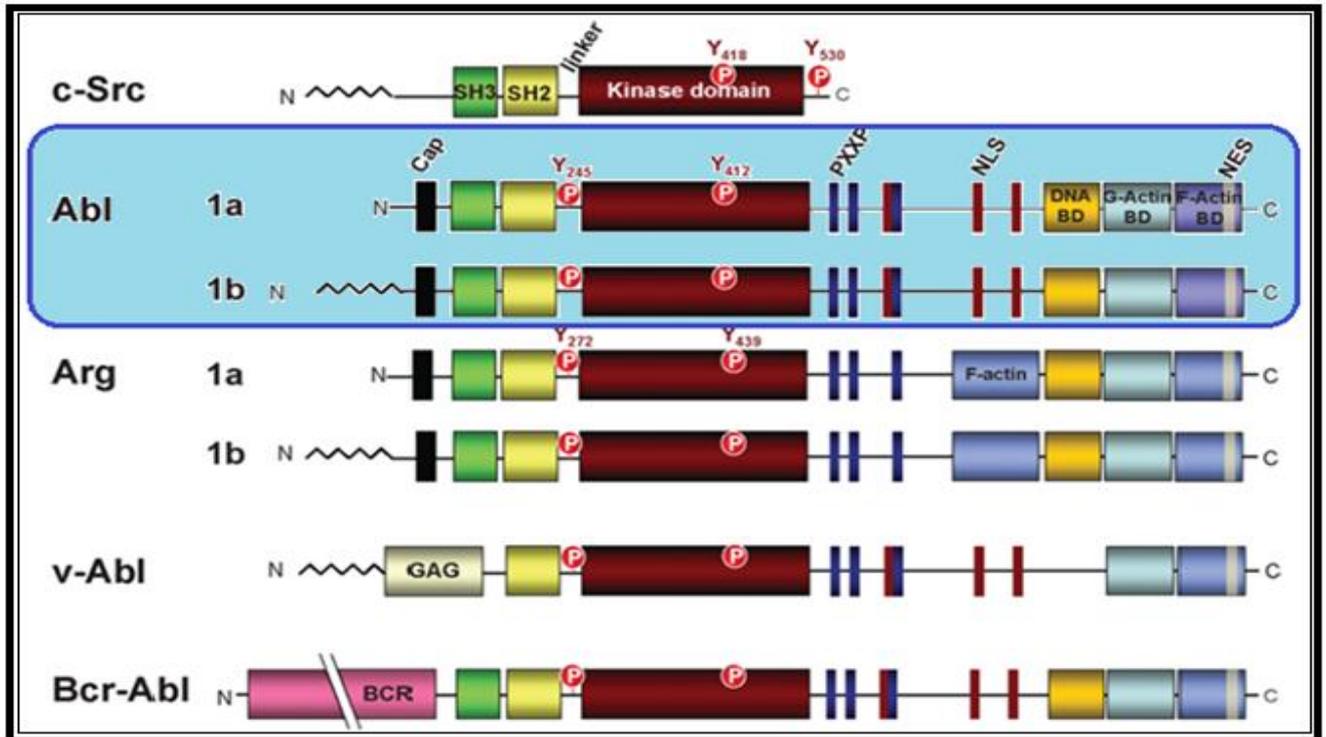
<sup>7</sup> <http://www.uniprot.org/uniprot/P00519>

<sup>8</sup> <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABL1>

Le proto-oncogène Abl appartient à la famille des tyrosine-kinases non réceptrice (35). Il est le prototype d'une sous-famille qui comprend deux membres, c-Abl et Arg (Abl-related gene) (34).

L'inactivation d'Abl induit des défauts pléiotropiques, qui causent la mortalité post-partum, ainsi que la lymphopénie, l'ostéoporose et le développement anormale de la tête et de l'œil chez

les animaux survivants (34,35). L'absence de défauts spécifiques plus prononcés peut également être due au fait que plusieurs des fonctions d'Abl peuvent être fournies par son homologue Arg (35). Fait intéressant que la perturbation à la fois d'Abl et Arg induit une létalité embryonnaire à E9 (journée embryonnaire 9), ce qui indique que, même les membres Src, c-Abl et Arg ont des fonctions redondantes importantes au cours de l'embryogenèse (34,35).

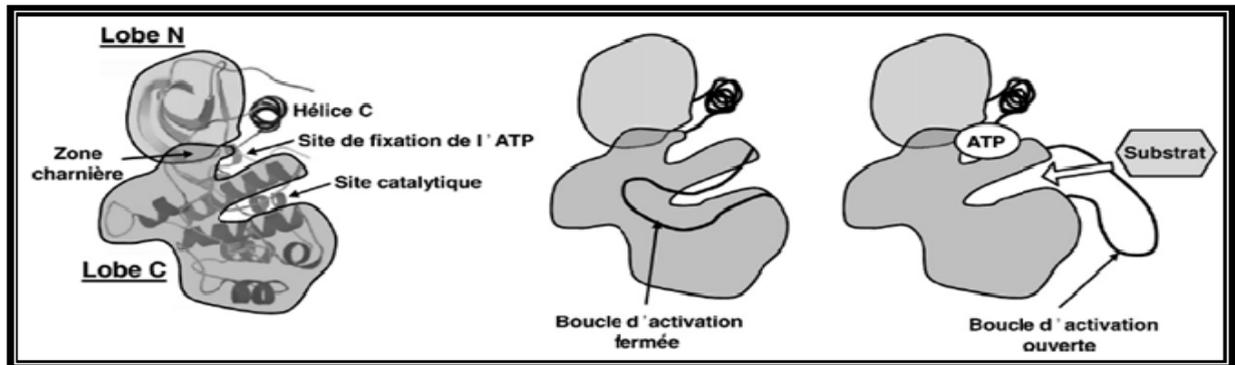


**Figure 3. Structure modulaire des Abl kinases.** Les Abl kinases sont composées : à l'extrémité N-terminale, d'une région conservée appelée Cap, suivie par un domaine SH3, un domaine SH2 et un domaine kinase SH1. Abl 1b contient un motif consensus de myristoylation (zig-zag). En outre, la queue C-terminale comprend une séquence riche en proline (PXXP), un domaine de liaison d'ADN (*DNA Binding Domain*), trois séquences de localisation nucléaire (NLS), une séquence d'export nucléaire (NES) et deux domaines de liaison avec G-(monomère) et F-actin binding motifs (*actin BD*) (34).

La structure de la protéine cellulaire Abl est hautement conservée (33, 36). Elle a montré une organisation modulaire similaire à celle des membres de la famille Src (Figure 3) et est caractérisée par une extrémité N-terminale unique (34) N- cap d'environ ~80 acides aminés, avec une séquence signal pour la myristoylation (le cas de isoforme 1b), qui a un double rôle dans la régulation de l'activité kinase et dans la localisation au niveau de la membrane (37). Suivie par les domaines :

- ✓ SH3 (Src homologie) qui est à l'origine d'interactions avec des séquences consensus riches en proline(35) ;
- ✓ SH2 permet l'interaction avec des protéines comportant des résidus tyrosines phosphorylés (23) ;
- ✓ un linker entre le domaine SH2 et le domaine kinase ;

- ✓ SH1, domaine bilobé kinase (37), il comporte classiquement le site de fixation de l'ATP, le site catalytique et la boucle d'activation avec le site majeur d'autophosphorylation (Y393) (23) (Figure 4).



**Figure 4. Représentation schématique du domaine kinase d'une protéine tyrosine kinase** (23).

Cependant, contrairement à Src, Abl possède une partie C-terminale longue (> 600 acides aminés) (37), contient d'autres domaines importants (34) et uniques codés par le dernier exon (38), où comprend des sites d'interaction protéine-protéine et est responsable de diverses localisations subcellulaires et des différentes fonctions de la protéine (39).

Cette extrémité C-terminale ou *last exon* comprend :

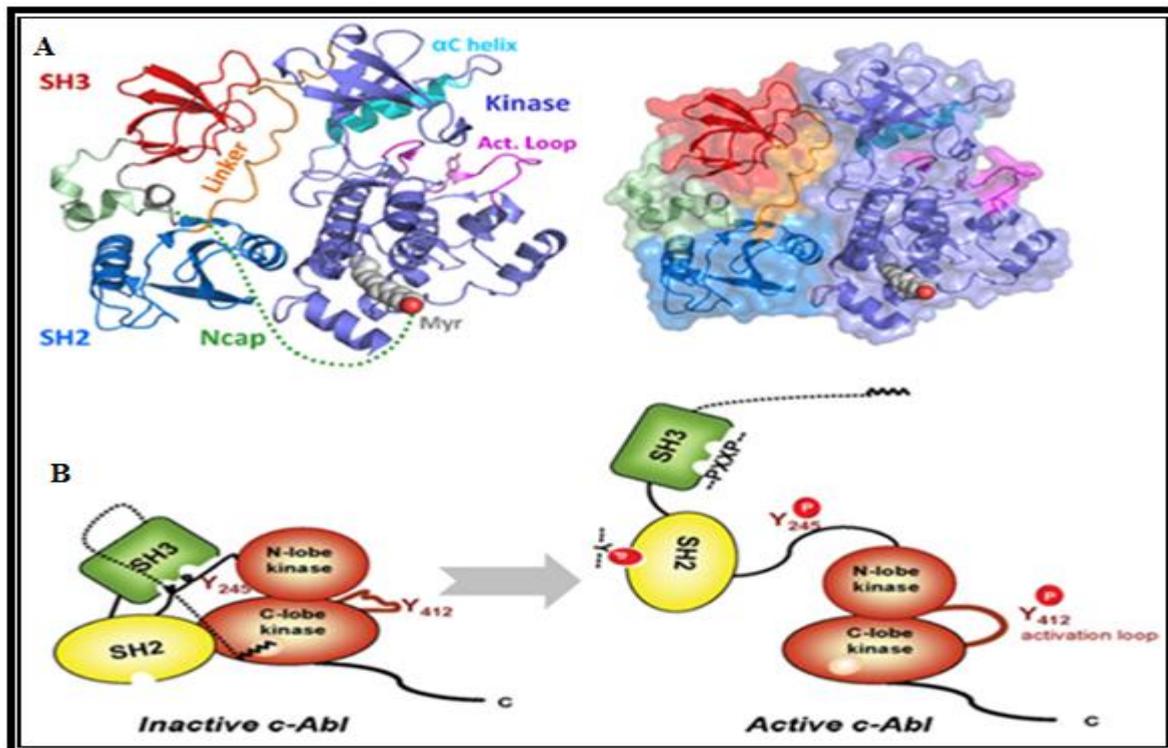
- ✓ trois séquences de localisation nucléaire (NLS pour *nuclear localization signal*) (35),
- ✓ une séquence d'export nucléaire NES (*nuclear export signal*),

La présence de séquences NLS et NES dans c-Abl permet la navette continue entre le cytoplasme et le noyau en réponse aux signaux de l'environnement tels que, l'adhérence de cellules aux protéines de la matrice extracellulaire (39).

- ✓ un domaine de liaison avec l'actine F (filamenteux) (*F-actin-binding domains*) et autre pour l'actine G (globulaires) (*G-actin-binding domains*),
- ✓ un domaine de liaison avec l'DNA important pour les fonctions nucléaires,
- ✓ et trois motifs conservés Pro-XX-Pro qui peuvent servir de sites de liaison pour les protéines contenant le domaine SH3 (40), telles que les protéines adaptatrices Crk, Grb2, Nck et les protéines codantes pour le suppresseur de tumeur (le p53 et le rétinoblastome (Rb) (39).

### I.2.5.2. Régulation de c-Abl

La fonction de c-Abl est étroitement contrôlée afin d'éviter l'activité oncogénique. Similaire à Src, c-Abl est régulé par les interactions moléculaires qui maintiennent le domaine kinase dans une conformation fermée et inactive (34) (Figure 5).



**Figure 5. Structure cristalline et modèle du *core* c-Abl régulé négativement.** A. La structure cristalline aux rayons X de la protéine c-Abl-1b, dans l'état de régulation négative, est représenté comme un ruban (à gauche) et avec la surface ajoutée (à droite) pour mettre l'accent sur le conditionnement moléculaire étroit des régions régulatrices (N-cap/SH3/SH2/linker) contre le domaine kinase. La partie non structurée du N-cap myristoylée, qui engage avec le lobe-C du domaine kinase est indiquée par une ligne pointillée. Dans le domaine kinase, les positions de l'hélice  $\alpha$  C et la boucle d'activation (*Act. Loop*) sont rendues en *cyan* et *magenta*, respectivement. La chaîne latérale du site d'autophosphorylation de la boucle d'activation (Tyr 412) est également montrée (37). B. c-Abl Inactive est dans une conformation fermée qui comporte plusieurs interactions intramoléculaires : le domaine SH3 avec le motif PXXP dans le linker, le domaine SH2 avec le lobe C-terminal du domaine de kinase, la région de la myristoylation avec une poche hydrophobe présente dans le lobe C-terminal et le N-cap avec le connecteur SH3-SH2. L'ouverture de la conformation par différents moyens, y compris par interaction avec SH2 et /ou SH3-liants comme représenté, induit l'activation catalytique. La phosphorylation de Tyr 245 (Y245) dans le linker et de Tyr 412 (Y412) dans la boucle d'activation stabilise Abl dans une conformation ouverte et active. Le rôle de l'extrémité C-terminale n'a pas été pris en compte dans ce modèle (34).

- La première structure cristalline du *core* Abl (résidus 1 à 531) a montré que ce groupe d'acide myristique N-terminale se lie à une poche hydrophobe dans la profondeur du lobe C du domaine kinase (41). En plus, la liaison du groupe myristoylé dans cette poche permet au domaine SH2 d'interagir avec le lobe C (37).

En ce qui concerne l'isoforme I<sub>a</sub> de c-Abl, qui n'est pas myristoylé, il semble être régulée par un ensemble indifférenciable d'interactions de SH3, de SH2 et de linker (39).

- La région N-cap coopère avec le connecteur SH3-SH2 et renforce sa fonction de serrage pour maintenir le domaine kinase dans une conformation inactive (42).

- La conformation fermée de c-Abl implique l'interaction entre le domaine SH3 et la séquence riche en proline présente dans linker SH2-kinase (34, 37).
- En outre, la régulation de c-Abl engage des interactions uniques qui impliquent le domaine SH2, le site de myristoylation et N-Cap de la protéine (38, 41).

Toutes ces interactions sont essentielles afin de maintenir l'Abl à l'état d'auto-inhibition (37).

c-Abl est aussi régulée par phosphorylation. Une analyse phospho-protéomique a identifié au moins 11 sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine, tous regroupés à l'extrémité N-terminale (34). La phosphorylation des sites tyrosine dans la boucle d'activation, le domaine SH3 et le linker contribuent à l'activation kinase, probablement en affectant les interactions intramoléculaires et la dynamique de régulation de la protéine (37). Par exemple, les Tyr 245 et Tyr 412 ont été analysées en profondeur et ont confirmé que ces sites de phosphorylation sont nécessaires pour l'activation de c-Abl (34) plus le Tyr 89. (43).

Aussi, c-Abl est également phosphorylée sur des résidus de serine et de thréonine qui sont impliqués dans la régulation catalytique (38).

En outre, des régulateurs externes tels que Crk, Nck, Cbl, (40) Abi1, Abi2, pRb, et F-actine ont été également montrés se lier à différents domaines de la protéine Abl, donc régulant directement négativement son activité TK ou maintenant la protéine dans une conformation inactive (35).

### **I.2.5.3. Fonction de la protéine Abl**

On peut remarquer que la protéine Abl est dotée d'une dualité structurale et fonctionnelle, avec des domaines de régulation qui lui permettent de jouer un rôle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule et de transiter entre les deux compartiments. (39). L'Abl kinase normale peut être impliquée dans des fonctions cellulaires essentielles qui comportent le contrôle de la prolifération cellulaire, la transduction du signal, l'apoptose, et l'adhésion cellulaire (35).

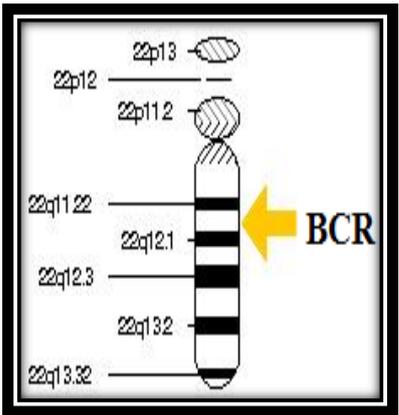
- La protéine Abl est une partie du mécanisme général de régulation de la transcription des gènes au cours du cycle cellulaire (35). Lors de la phase S, l'Abl peut activer les facteurs de transcription tels que C/EBP $\beta$  (CCAAT/*enhancer-binding protein beta*) (44), CREB (*cAMP Responsive Element Binding Protein*) et E2F1 ainsi que l'ARN polymérase II (35).
- En réponse aux dommages d'ADN, l'Abl est capable de translocation au noyau (45) où interagit avec plusieurs protéines, comme ATM, Art et DNA-PK, impliquées dans des aspects distincts de la réparation d'ADN (46). Et d'autre part, c-Abl joue un rôle central dans la modulation de l'interaction entre la réparation de l'ADN et de l'induction de l'apoptose (47).

- Quand l'Abl est localisée dans le cytoplasme, il joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire et participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance (33), comme : PDGF et EGF (34).
- L'adhérence des cellules individuelles à protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine provoque la réactivation de la kinase c-Abl (40).

#### I.2.5.4. Gène BCR et sa protéine

Le gène BCR, positionné sur le bras long du chromosome 22 (Tableau II). Il s'étend sur 135 kb, comprend 23 exons et code pour deux protéines de 160 et de 130 kDa, provenant de la traduction de deux ARNm de 6,7 et de 4,5 kb (33) (Figure 7). L'inactivation de BCR ne donne aucune explication sur le rôle éventuel de Bcr dans l'hématopoïèse (48).

**Tableau II. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène BCR (Carte ID).**

Identifiants (IDs) le gène BCR chez l'espèce humaine (Homo sapiens)		Chromosome 22 <sup>8</sup> 
Nom officiel <sup>1</sup>	breakpoint cluster region	
Symbole officiel <sup>1</sup>	BCR	
Symboles synonymes <sup>1</sup>	BCR1, D22S11ALL, CML, D22S662, PHL	
Localisation <sup>2</sup>	22q11.23	
Séquence <sup>2</sup>	Chromosome: 22; NC_000022.11 (23180365..23318037)	
RefSeqGene <sup>2</sup>	NG_009244.1	
RefSeq mRNA <sup>2</sup>	NM_004327.3	
RefSeq Protéine <sup>2</sup>	NP_004318.3	
IDs dans les différentes bases de données		
HGNC <sup>1</sup>	1014	
NCBI <sup>2</sup>	613	
Ensembl <sup>3</sup>	ENSG00000186716	
HPRD <sup>4</sup>	01044	
MIM <sup>5</sup>	151410	
Vega <sup>6</sup>	OTTHUMG00000150655	
UniProt <sup>7</sup>	P11274	

<sup>1</sup> [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?q=data/hgnc\\_data.php&hgnc\\_id=1014](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=1014)

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/613>

<sup>3</sup> [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000186716;r=22:23521891-23660224](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000186716;r=22:23521891-23660224)

<sup>4</sup> [http://www.hprd.org/summary?hprd\\_id=01044&isoform\\_id=01044\\_1&isoform\\_name=Isoform\\_1](http://www.hprd.org/summary?hprd_id=01044&isoform_id=01044_1&isoform_name=Isoform_1)

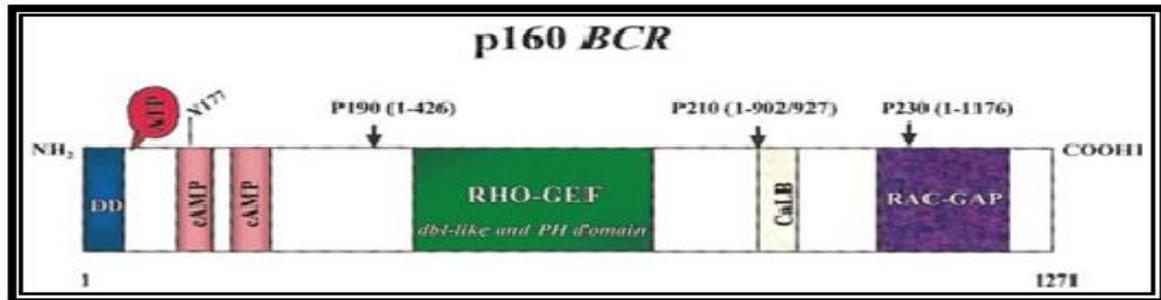
<sup>5</sup> <http://omim.org/entry/151410>

<sup>6</sup> [http://vega.sanger.ac.uk/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=OTTHUMG00000150655;r=22:23521891-23660224](http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=OTTHUMG00000150655;r=22:23521891-23660224)

<sup>7</sup> <http://www.uniprot.org/uniprot/P11274>

<sup>8</sup> <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR%22>

La protéine BCR a une expression ubiquitaire avec des quantités élevées au niveau des cellules hématopoïétiques et du cerveau (31). Elle est constituée de plusieurs domaines (Figure 6).



**Figure 6. Structure de la protéine Bcr.** Noter le domaine de dimérisation (DD) et les 2 domaines homologues d'adénosine monophosphate cyclique kinase à l'extrémité N-terminale. Y177 est le site d'autophosphorylation cruciale pour la liaison à Grb-2. Le centre de la molécule contient une région homologue à Rho-GEF (*guanine nucleotide exchange factors*), qui peut activer des facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, ainsi que les domaines dbf-like et pleckstrin homologie (PH). Du côté de l'extrémité C-terminale, un site putatif de liaison du calcium-dépendant des lipides (CaLB) et un domaine d'activation de la fonction Rac-GTPase (Rac-GAP) sont trouvés. Les flèches indiquent la position des points de cassures dans les protéines de fusion Bcr-Abl (49).

#### I.2.5.5. Fonction de la protéine Bcr

La fonction biologique précise de Bcr n'est pas connue. De part de sa séquence, il est vraisemblable qu'elle est impliquée dans les phénomènes de transduction du signal. Aussi, cette protéine, de localisation cytoplasmique lorsque la cellule n'est pas en cycle, est exprimée de manière périchromosomique lors de la mitose, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire (33).

#### I.2.5.6. Gène BCR-ABL et protéine de fusion

La translocation t(9 ; 22) aboutit à la constitution, sur le chromosome 22, d'un gène de fusion, hybride, comportant la partie 5' du BCR et la partie 3' d'ABL (26). Les points de cassure dans l'ABL1 sont, plus fréquemment, entre les exons 1b et 1a (50), tandis que BCR est rompu dans une région où les points de cassure sont variables :

- M-BCR qui correspond aux exons 12 à 16 du gène BCR (b1 à b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4 (Figure 7). Ainsi se forment, respectivement, les produits de fusion b2a2 et b3a2. Les ARN messagers ainsi produits codent, tous deux, pour une protéine chimérique de 210 kDa. Cependant, la protéine codée par le variant b3a2 est plus fréquente et comprend 25 acides aminés de plus que celle du variant b2a2 ; aucune étude n'a permis de démontrer une différence d'évolution clinique ou biologique entre ces deux variantes (33). Cette protéine, p210, est présente chez la plupart des patients atteints de LMC et chez un tiers

des personnes atteintes de leucémie aiguë lymphoblastique B Ph-positive (Ph+B-LAL) (50).

- m-BCR (*minor* BCR) le point de cassure se localise entre les exons 1 et 2 de BCR et génère un transcrit e1a2 qu'il se traduit en p190 Bcr-Abl1 (50). L'activité tyrosine kinase de la protéine p190 est plus intense que celle de la protéine 210 kDa (33). Ce variant moléculaire est majoritairement retrouvé chez les patients de la Ph+B-LAL (23, 33), et dans de rares cas de LMC (50).
- Un autre variant, qui comporte un gène BCR interrompu dans la  $\mu$ BCR (*micro*-BCR), entre les exons 19 et 20, permet la synthèse d'une protéine chimérique de 230 kDa. Cette dernière forme moléculaire correspondrait à des hémopathies d'évolution lente, marquées par une hyperleucocytose modérée à polynucléaires neutrophiles, associées ou non à une thrombocytose (33).

Partant du constat que :

- ✓ tous les points de rupture de l'ADN se produisent dans les introns et indépendamment de leur emplacement précis.
- ✓ la partie Abl, dans la protéine chimérique, est presque toujours constante tandis que la partie Bcr varie beaucoup, on peut en déduire que l'Abl est susceptible d'exercer le principe de la transformation (24), alors que les différentes dimensions de la séquence Bcr peuvent dicter le phénotype de la maladie (49).

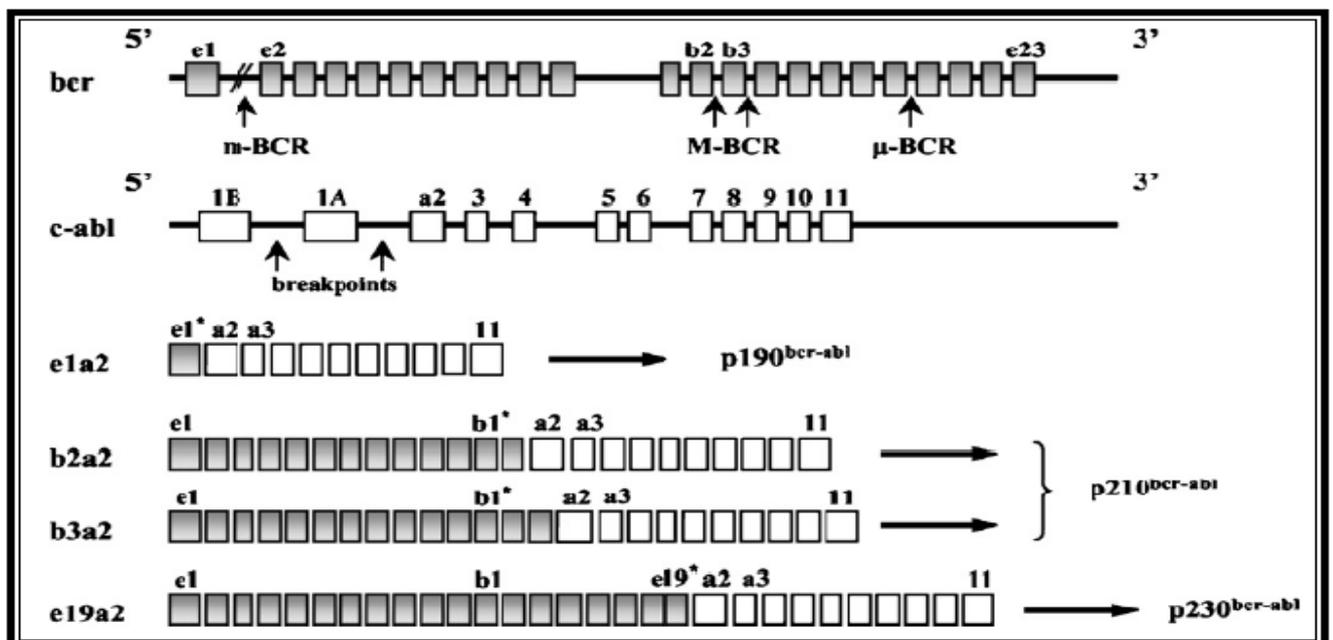


Figure 7. Structure du gène ABL et du gène BCR, ainsi que les ARNm les plus fréquemment retrouvés dans les hémopathies malignes. Les points de cassures (breakpoints) dans BCR et ABL sont figurés ainsi que les protéines obtenues à partir des différents ARNm (23).

Les mécanismes responsables de la translocation réciproque chromosomique t(9; 22)(q34; q11) qui génère le Ph sont peu connus (51), mais il y a des études qui peuvent expliquer partiellement ces mécanismes :

- la juxtaposition des gènes ABL et BCR a été démontrée dans les noyaux des cellules hématopoïétiques humaines par FISH et à la microscopie confocale pendant la transition S/G2 du cycle cellulaire (52). Un rapport ultérieur sur des blastes provenant d'un patient atteint de LAL a confirmé la proximité des gènes ABL et BCR pendant la phase S tardive (53). Ces données suggèrent que les gènes BCR et ABL sont juxtaposés à une période critique dans le cycle cellulaire. Pendant cet intervalle, les deux régions chromosomiques respectives peuvent être plus vulnérables à la recombinaison illégitime (51).
- une grande partie des séquences génomiques dupliquées, cependant, a été retrouvée cartographiée proche des gènes BCR et ABL sur les chromosomes 22 et 9, respectivement, et il a été estimé que cela peut faciliter la recombinaison homologe entre les deux chromosomes (54).

La protéine Bcr-Abl de 210 kDa comprend les trois domaines SH1, SH2, SH3 et tous les autres domaines d'Abl. Du côté Bcr, le motif de dimérisation est la partie la plus importante (33), dont l'analyse structurale cristalline aux rayons X du domaine d'oligomérisation de Bcr-Abl (résidus 1-72 ou Bcr 1-72), qui comprend le domaine de repliement (Bcr 30-65), a montré que les deux monomères associés, à un dimère antiparallèle qui empile pour former un tétramère et, donc, l'auto-activation par transphosphorylation (50). De plus, la perte de la partie N-terminale d'Abl supprime son auto-inhibition. Ces deux modifications protéiques expliquent l'activation permanente de la tyrosine kinase de Bcr-Abl (33). Cette activation permanente conduit à la perturbation de plusieurs voies de signalisation.

### I.2.6. Signalisation induite par les oncogènes bcr-abl

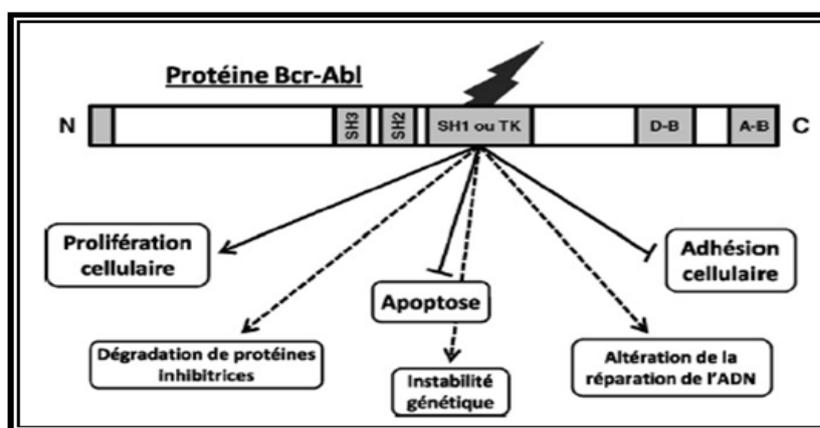
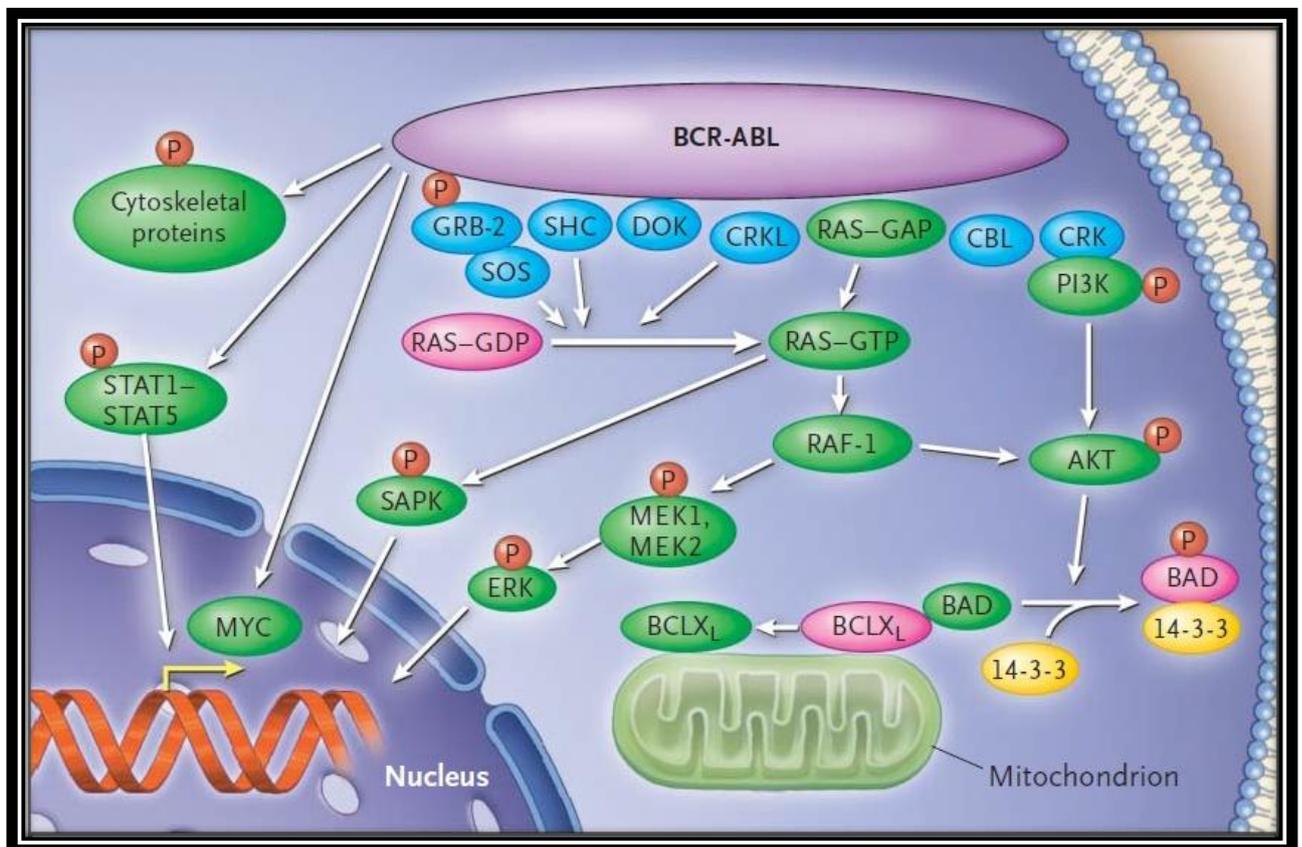


Figure 8. Différents mécanismes participant à la leucémogénèse induite par Bcr-Abl (23).

La protéine Abl, physiologiquement, constitue une navette entre le noyau et le cytoplasme ; mais, lorsqu'elle est fusionnée à Bcr, l'oncoprotéine perd cette propriété et est, principalement, retenue dans le cytoplasme, où elle interagit avec la majorité des protéines impliquées dans la voie oncogénique. L'activité de tyrosine kinase d'Abl est constitutivement activée par la juxtaposition de Bcr, favorisant ainsi la dimérisation ou tétramérisation et autophosphorylation ultérieure. Cela augmente le nombre de résidus de phosphotyrosine sur Bcr-Abl et, par conséquence, les sites de liaison pour les domaines SH2 des autres protéines (55).

Les oncogènes Bcr-Abl activent différentes voies de signalisation cellulaire. Les conséquences sont être multiples au niveau hématologique : une augmentation de la prolifération cellulaire, une altération des propriétés d'adhésion cellulaire, une inhibition de l'apoptose, une dégradation des protéines de régulation et une altération de la réparation de l'ADN (32) (Figure 8).



**Figure 9. Voies de signalisation activées dans les cellules Bcr-Abl positives.** Les effets cellulaires de Bcr-Abl sont exercés par des interactions avec les diverses protéines qui peuvent transduire les signaux oncogéniques responsables de l'activation ou de la répression de la transcription du gène, du traitement mitochondriale des réponses apoptotiques, de l'organisation du cytosquelette et de la dégradation des protéines inhibitrices. Les principales voies impliquées sont : RAS, *mitogen-activated protein* (MAP) kinases, *signal transducers and activators of transcription* (STAT), *phosphatidyl inositol 3-kinase* (PI3K) et MYC. La plupart des interactions sont médiées par la phosphorylation de la tyrosine et exigent la liaison de Bcr-Abl aux protéines adaptatrices comme : *Growth-factor-receptor-bound 2* (Grb-2), *Dok*, *sarcoma virus CT10 oncogene homolog* (Crk), *sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like* (Crkl), *Src-homology-containing* (Shc) et *casitas-B-lineage lymphoma* (Cbl) (29).

### **I.2.6.1. Altération des propriétés d'adhérence**

L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha 5\beta 1$  qui jouent un rôle important dans la croissance des progéniteurs hématopoïétiques et le développement normal (56). L'expression et la structure de ces molécules ne sont pas modifiées mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés (57).

Il est probable que ces modifications soient liées à l'activation des voies de signalisation faisant intervenir directement les molécules de la plaque d'adhésion (31), p210 Bcr-Abl altère également les propriétés d'adhésion entre les progéniteurs leucémiques et le stroma médullaire ainsi que la matrice extracellulaire (23, 49) par la phosphorylation de protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette ou la membrane cellulaire, comme la paxilline, la vinculine, la taline, la tensin, la kinase focale d'adhérence (Fak), qui deviennent des substrats de p210 Bcr-Abl (51,56) ou par l'intermédiaire de l'action Crkl (31).

### **I.2.6.2. Inhibition de l'apoptose**

La protéine Bcr-Abl peut inhiber l'apoptose à plusieurs niveaux et plusieurs signaux initiés par Bcr-Abl ont des conséquences prolifératives et anti-apoptotiques simultanées ; Pour cela, il est difficile de mentionner chaque voie séparément de l'autre.

La protéine de liaison ayant la séquence consensus de l'interféron (ICSBP) est un régulateur négatif de la différenciation granulocytaire (50), et peut également représenter un moyen par le quel Bcr-Abl peut inhiber l'apoptose (35). Bcr-Abl réduit la liaison directe d'ICSBP à l'ADN, donc limitant sa capacité à réprimer la transcription du gène BCL-2, ce qui favorise la survie des cellules leucémiques (50).

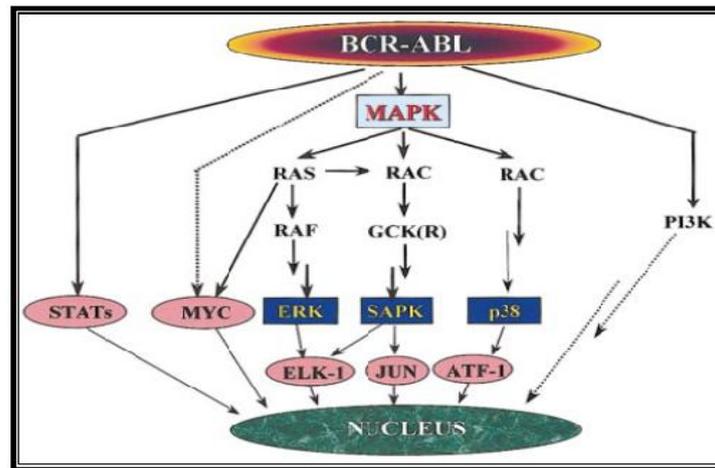
Un autre lien entre Bcr-Abl et l'inhibition de l'apoptose se résume dans la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad, qui, par conséquence, est piégée par les protéines 14-3-3 ce qui libère l'activité anti-apoptotique de Bcl-xL (31) (Figure 9).

Bcr-Abl bloque le relargage du cytochrome C par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases (33).

### **I.2.6.3. Activation de signaux mitotiques**

Plusieurs liens entre Bcr-Abl et Ras ont été définis (49). L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine Bcr-Abl permet la fixation de la protéine Grb-2 qui stabilise la forme activée de Ras et conduit à l'activation de la cascade des MAPK avec une voie de signalisation Raf/Mek/Erk (31, 49, 50). Cependant, autres protéines substrats de Bcr-Abl, peuvent aussi activer Ras: Shc, Crkl (33) et p62 Dok (31, 49) (Figure 9).

En outre, les deux piliers de la voie des MAP kinases : Jnk/Sapk et p38, sont également activées dans les cellules Bcr-Abl transformées (49, 50) (Figure 10).



**Figure 10. Voies de signalisation avec un potentiel mitogénique dans les cellules transformées Bcr-Abl.** L'activation des différentes voies dépend du type de cellule, mais le système MAP-kinase semble jouer un rôle central (49).

Une autre voie, celle de Jak Kinase, joue aussi un rôle important. En effet, Bcr-Abl peut activer, *via* Grb-2, les protéines STAT sans passer par la phosphorylation des Jak kinases (33). Aussi, cette voie inhibe l'apoptose par régulation positive de la transcription de la protéine Bcl-xL (51).

Bcr-Abl active apparemment la voie PI-3K par la formation des complexes multimérique avec PI-3 kinase, p120 Cbl, et les molécules adaptatrices Crk et CrkL (51) (Figure 9). De même, la voie des PI3 kinases peut, aussi, être activée *via* Grb2, induisant un signal prolifératif et antiapoptotique *via* Akt (33).

Une autre cible nucléaire supposée de l'activité de transformation de la p210 est le proto-oncogène Myc, qui est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules leucémiques. Cependant, l'activation de Myc semble être indépendante de l'activation de la voie Ras (35, 55).

Il a été montré que Jak2 est impliqué dans l'induction de Myc par Bcr-Abl, apparemment, au moyen d'induction de l'ARNm de Myc et par la stabilisation de sa protéine (51). Ceci est particulièrement pertinent à la lumière des rapports que l'activation Jak2 par une mutation ponctuelle spécifique est responsable d'un pourcentage très élevé de syndromes myéloprolifératifs classiques tels que : PV, TE et MFI. **Cette constatation semble établir un lien entre la pathogenèse moléculaire de différents syndromes myéloprolifératifs (35).**

#### **I.2.6.4. Instabilité génomique et réparation de l'ADN**

L'implication de Bcr-Abl dans la dégradation par le système ubiquitine-protéasome de certaines protéines comme : Abi-1, Abi-2 (*Abl-interactor protein*), p27-kip et DNA-PKcs a été démontrée. DNA-PKcs peut faciliter l'acquisition de lésions génétiques supplémentaires qui conduisent à la progression de la maladie vers la phase blastique (35). Bcr-Abl a été montré

induire des dérivés réactifs de l'oxygène endogènes, *reactive oxygen species* (ROS), qui entraînent des cassures double brin en phase S et G2/M du cycle cellulaire et de mutagénèse.

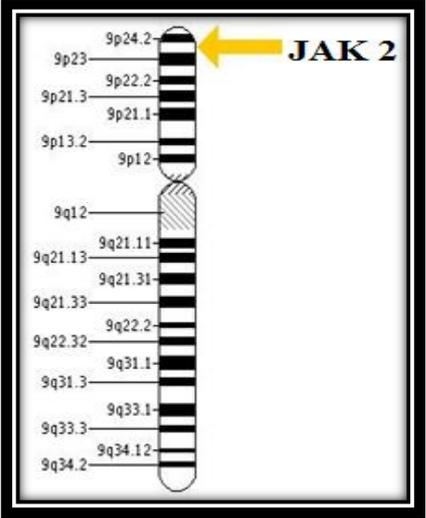
Ensemble, ces causes contribuent à un phénotype mutant en cellules leucémiques et entraîne une instabilité génomique, se traduit par des mutations ponctuelles et des anomalies cytogénétiques (50).

### I.3. La mutation JAK2 V617F

#### I.3.1. Gène JAK2 et sa protéine

Le gène JAK2 est localisé sur le bras court du chromosome 9 en position 9p24. Il s'étend sur environ 140 kb d'ADN génomique et comporte 25 exons (58).

**Tableau III. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène JAK2 (Carte ID).**

Identifiants (IDs) le gène JAK2 chez l'espèce humaine (Homo sapiens)		Chromosome 9 <sup>8</sup> 
Nom officiel <sup>1</sup>	Janus kinase 2	
Symbole officiel <sup>1</sup>	JAK2	
Symboles synonymes <sup>2</sup>	JTK10, THCYT3	
Localisation <sup>2</sup>	9p24	
Séquence <sup>2</sup>	Chromosome: 9; NC_000009.12 (4985245..5129948)	
RefSeqGene <sup>2</sup>	NG_009904.1	
RefSeq mRNA <sup>2</sup>	NM_004972.3	
RefSeq Protéine <sup>2</sup>	NP_004963.1	
IDs dans les différentes bases de données		
HGNC <sup>1</sup>	6192	
NCBI <sup>2</sup>	3717	
Ensembl <sup>3</sup>	ENSG00000096968	
HPRD <sup>4</sup>	00993	
MIM <sup>5</sup>	147796	
Vega <sup>6</sup>	OTTHUMG00000019490	
UniProt <sup>7</sup>	O60674	

<sup>1</sup> [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=6192](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=6192)

<sup>2</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3717>

<sup>3</sup> [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000096968;r=9:4985033-5128183](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000096968;r=9:4985033-5128183)

<sup>4</sup> [http://www.hprd.org/summary?hprd\\_id=00993&isoform\\_id=00993\\_1&isoform\\_name=Isoform\\_1](http://www.hprd.org/summary?hprd_id=00993&isoform_id=00993_1&isoform_name=Isoform_1)

<sup>5</sup> <http://omim.org/entry/147796>

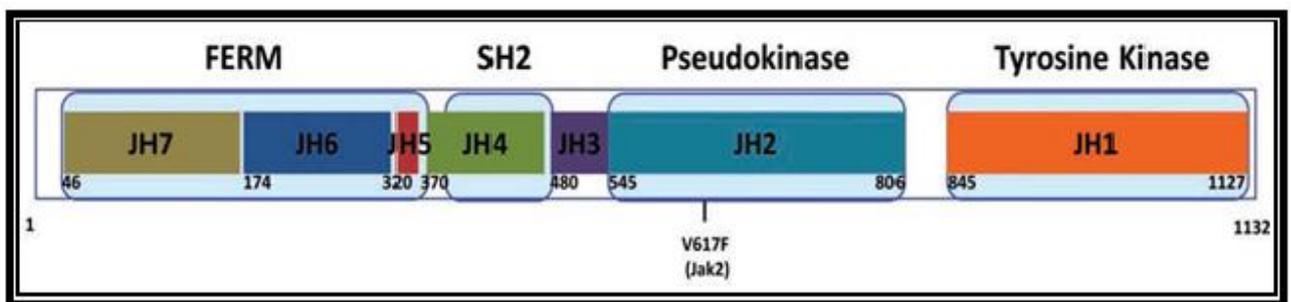
<sup>6</sup> [http://vega.sanger.ac.uk/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=OTTHUMG00000019490;r=9:4985033-5128183](http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=OTTHUMG00000019490;r=9:4985033-5128183)

<sup>7</sup> <http://www.uniprot.org/uniprot/O60674>

<sup>8</sup> <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/JAK2>

Chez les mammifères, la famille des Janus kinases est constituée de quatre protéines : Jak1, Jak2, Jak3 et tyrosine kinase 2 (TYK2). Ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire (59).

La Jak2 est une protéine tyrosine kinase non réceptrice qui est essentiel pour le développement et la physiologie correcte des animaux (60), particulièrement, les mammifères (61). De plus, Jak2 est indispensable à l'érythropoïèse. En effet, l'inactivation de son gène, orthologue chez la souris, conduit à un phénotype léthal embryonnaire causé par un blocage complet de l'érythropoïèse sans anomalie du développement des lymphocytes (62). Au niveau cellulaire, cette protéine se localise généralement à la membrane plasmique, avec leurs récepteurs apparentés (59). Elle est exprimée de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et est hautement conservée entre les espèces (60).



**Figure 11. Structure des Janus kinases (Jak).** (63). Jak possède quatre domaines fonctionnels : Le domaine JH1 est situé à l'intérieur de l'extrémité COOH-terminale de la protéine et contient le domaine tyrosine kinase. Le domaine adjacent, JH2, montre une forte homologie au domaine JH1, mais ce domaine manque de résidus critiques nécessaires à l'activité TK (64). JH2 a une fonction régulatrice importante permettant l'auto-inhibition de l'activité TK (65). L'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de Jak2 contient un domaine SH2-like (JH3-JH4) et un domaine d'homologie bande-4.1, ezrine, radixine, moésine (FERM) (JH5-JH7). Le domaine FERM joue un rôle dans la liaison au domaine cytosolique de récepteurs de cytokine apparentés (64). En outre, le domaine FERM lie le domaine kinase et régule positivement l'activité catalytique (59). Jak2 ont été proposées pour avoir une structure bipartite dont l'extrémité N-terminale est requise pour la liaison aux récepteurs, chaperonner et stabiliser à la surface, alors que le domaine kinase est absolument crucial pour la signalisation (66).

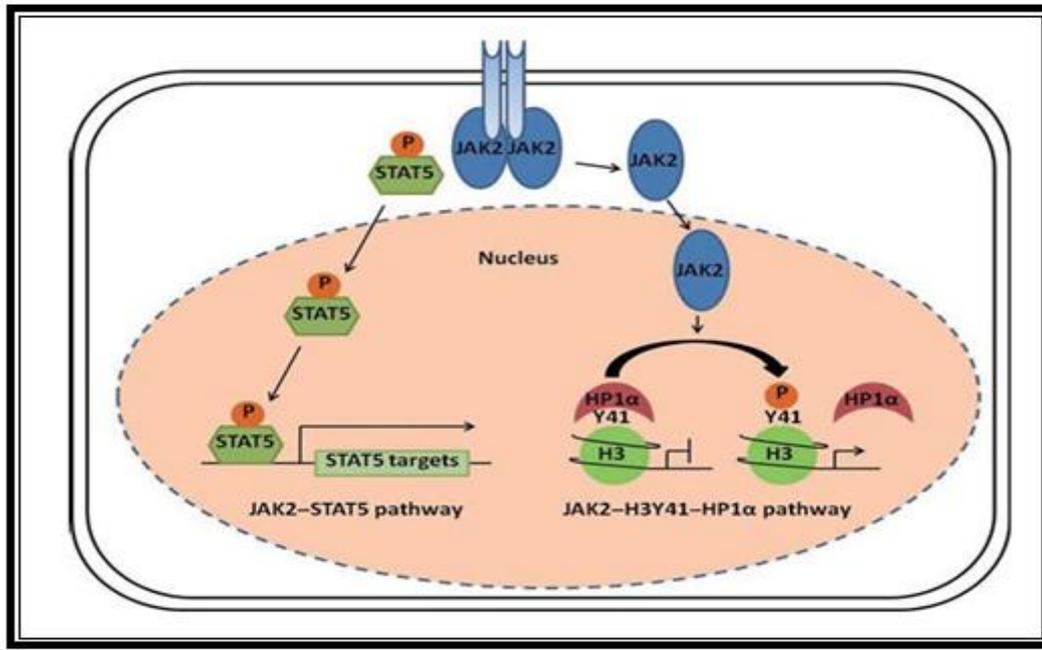
### I.3.2. Fonction de la protéine Jak2

Ces protéines Jak, ayant une activité tyrosine kinase, servent d'intermédiaire entre les récepteurs membranaires et les molécules signalétiques (67). Jak2 joue un rôle central dans la signalisation des récepteurs "myéloïdes" des cytokines telle que le récepteur de l'érythropoïétine, *myeloproliferative leukemia* [MPL; Tpo-R], le récepteur du G-CSF, GM-CSF-R, IL-3-R, et IL-5-R et les récepteurs de la prolactine et d'hormone de croissance. Jak2 est le seul Jak capable de médier la signalisation d'Epo-R et MPL (59, 64). Toutes ces molécules sont essentielles pour la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose (68).

En variante, cependant, Jak2 et d'autres tyrosines kinases peuvent avoir des fonctions cellulaires importantes, indépendantes de l'activité TK en soi, par exemple : l'expression d'EpoR

à la surface cellulaire (69), la maturation du TpoR et la stabilisation du récepteur à la surface cellulaire, en stimulant le recyclage et en le protégeant de la dégradation par la voie du protéasome, la même chose pour le G-CSF-R (64).

De plus, Jak2 a été montré influencer la structure de la chromatine (Figure 13).



**Figure 12. Activation de la transcription médiée par Jak2 dans les cellules hématopoïétiques.** Activation de la transcription médiée par Jak2 comportant deux voies séparées (70). Elle comporte deux voies séparées : dans la voie de JAK2-STAT5 canonique, Jak2 est activée par autophosphorylation lors de la liaison des récepteurs et de leurs ligands. Le Jak2 actif phosphoryle Stat5, qui est transloquée dans le noyau pour activer ses gènes cibles. Alternativement, Jak2 actif pénètre dans le noyau pour phosphoryler l'histone H3 sur la tyrosine 41 (H3Y41). La phosphorylation de H3Y41 perturbe l'association de HP1 $\alpha$  avec la chromatine, ce qui conduit à l'expression accrue de plusieurs gènes, y compris l'oncogène Lmo2 (LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)) (71).

### I.3.3. La mutation JAK2 V617F

En 2005, des groupes de recherche internationaux et indépendants ont fait une découverte fondamentale ; en effet, ils ont trouvé que des patients atteints de PV, ET et PMF étaient porteurs d'une mutation acquise somatique, intéressant le gène codant pour la protéine cytoplasmique Jak2 (72-76).

La mutation JAK2 V617F est une anomalie génétique clonale et acquise (67) et n'est pas un polymorphisme d'un nucléotide unique (77), où la substitution d'une guanine en position 1849 par une thymine, dans l'exon 12 du gène JAK2, qui se traduit par la substitution d'une valine par une phénylalanine au niveau du codon 617, au sein du domaine JH2 (72-76) (Figure 14). Mais, plus tard, plusieurs articles ont montré que la position du nucléotide 1849 est sur l'exon 14 (23, 64, 77, 78).

Cette mutation n'a pas été identifiée dans les autres tyrosines kinases analysées (73). Elle a fourni l'explication moléculaire du comportement anormal des cellules en culture et a permis d'avancer de manière décisive dans la compréhension physiopathologique de la maladie de Vaquez, principalement, et des autres syndromes myéloprolifératifs, en dehors de la LMC (10).

La mutation somatique unique et récurrente de la tyrosine kinase Jak2 a été identifiée comme un événement majeur dans la PV à 95 %, la TE à 50 % - 70 % et la MFP à 40 % - 50 %, (79), mais elle peut être aussi retrouvée dans d'autres troubles myéloïdes, avec une fréquence variable, comme la leucémie myélomonocytaire chronique et la LMC atypique (78).

De plus, cette mutation suffit, à elle seule, à induire un phénotype PV dans des modèles murins (2,77), laissant ainsi supposer que cette anomalie moléculaire est suffisante pour expliquer l'existence de ces pathologies (80).

Depuis la découverte de JAK2 V617F, elle est devenue une étape indispensable au diagnostic positif des SMPs à partir de 2008 (classification de l'OMS) (80).

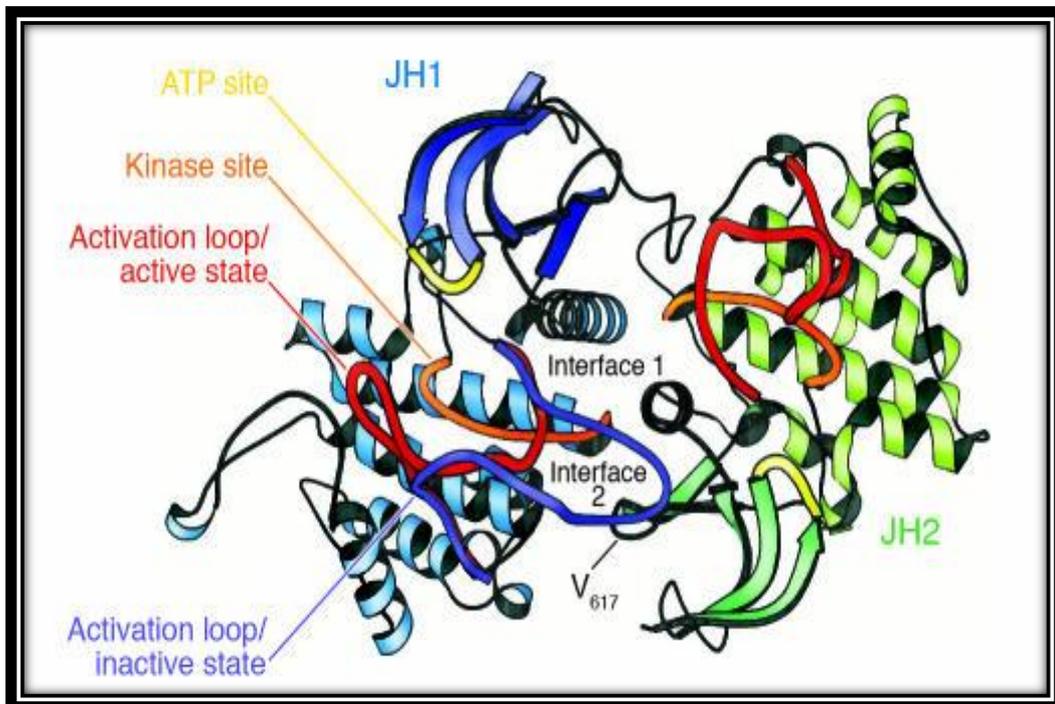
	JAK2 - Wildtype								JAK2 - Mutant							
DNA	tat	gga	gta	tgt	gtc	tgt	gga	gac	tat	gga	gta	tgt	ttc	tgt	gga	gac
Protein	Y	G	V	C	V	C	G	D	Y	G	V	C	F	C	G	D
					↑								↑			
					617								617			

**Figure 13. Mutation JAK2 V617F dans un échantillon de PV.** La séquence d'ADN et la traduction des protéines à la fois pour les allèles JAK2 de types sauvage et mutant. La substitution d'une guanine par une thymine qui se traduit par la substitution d'une valine par une phénylalanine au niveau du codon 617 (73).

La mutation JAK2 V617F a été détectée dans les cellules de la lignée myéloïde (PNN, érythroblastes, plaquettes) (2), mais elle n'a pas été retrouvée dans lymphocytes (74) et les cellules non- hématopoïétiques (68).

Le domaine JH1 porte l'activité catalytique, qui repose sur trois boucles identifiées par modélisation tri-dimensionnelle à partir d'homologie de séquences d'autres domaines tyrosine kinase, dont la structure a été déterminée : la boucle catalytique, la boucle de fixation de l'ATP et la boucle d'activation (Figure 15). Cette boucle d'activation possède deux conformations. La première correspond à la protéine inactive en absence de fixation du ligand au récepteur membranaire. Dans ce cas, la conformation de la boucle permet une interaction stabilisatrice entre JH1 et JH2 par interaction entre L1001 et P1002 (JH1) et C618 (JH2). La seconde conformation correspond à Jak2 activée après fixation du ligand à son récepteur. Il se produit alors une ouverture des sites de JH1 intervenant dans la catalyse. La conformation « activée » fait apparaître des interactions défavorables entre V1010 et K1011 (JH1) et V617 (JH2).

JH2 joue donc un rôle modulateur de l'activité TK *via*, probablement, l'acide aminé V617 (62), qui est située à l'une des interfaces prévues entre le domaine JH1 et JH2, et le passage à une phénylalanine apparaît diminuer l'activité régulatrice de ce domaine sur le domaine JH1 de Jak2 (64, 80).



**Figure 14. Structure tridimensionnelle proposée pour Jak2.** Les diagrammes ruban des domaines JH1 (couleur bleu) et JH2 (couleur vert prédominante) de Jak2 sont représentés, modelés sur la structure dimérique du récepteur du facteur de croissance fibroblastique. La boucle d'activation de JH1 est montrée dans des conformations possibles, active (rouge) et inactive (bleu). Le site kinase est représenté en orange et le site de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) en jaune. Le site d'interaction de JH2 et le domaine d'activation de JH1 sont montrés encadrés, au même endroit que celui de Val 617 (81).

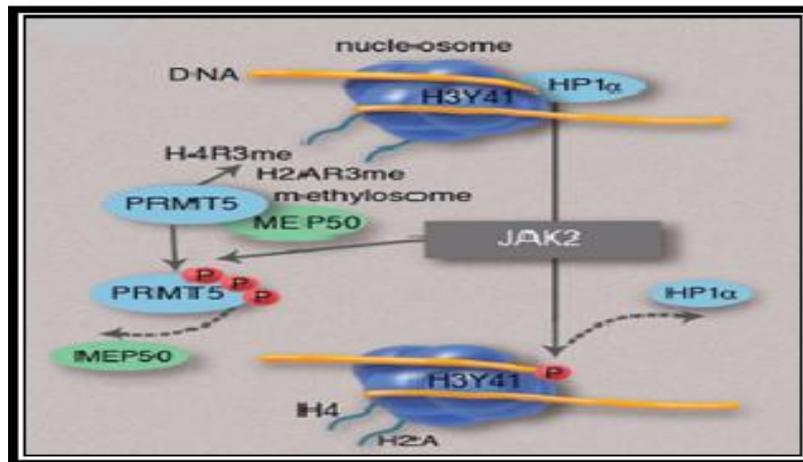
### I.3.4. Mutation et phénotype

Le phénotype pourrait varier selon le niveau d'expression de la mutation dont le rapport JAK2 V617F et JAK2 non muté est, en effet, variable selon les syndromes myéloprolifératifs : inférieur à 50 % dans les thrombocytémies essentielles, supérieur à 50 % dans beaucoup de maladies de Vaquez. Au niveau cellulaire, on trouve une homozygotie pour l'allèle muté chez 30 % des malades atteints de maladie de Vaquez, contre 2 % à 4 % au cours des thrombocytémies. L'insertion de gènes mutés chez la souris transgénique aboutit à un phénotype différent selon le rapport JAK2 muté/JAK2 sauvage : thrombocytémie pour une faible quantité de JAK2 muté, polyglobulie pour une quantité élevée (10). JAK2 V617F homozygote est le résultat de la recombinaison mitotique entre les chromatides des chromosomes homologues 9p (30 % des cas) (67, 73, 78).

### I.3.5. Effet de la mutation

#### Dans le noyau

JAK2 V617F a été décrit interagir et phosphoryler la protéine arginine méthyltransférase PRMT5, avec une affinité beaucoup plus grande que le Jak2 de type sauvage. Cette propriété est spécifique pour la protéine mutante et a été montrée perturber l'interaction entre PRMT5 et son cofacteur MEP50, conduisant à une diminution de l'activité méthyltransférase. Le knockdown de PRMT5 augmente la formation de colonies et la différenciation érythroïde de cellules primaires (64) (Figure 16).

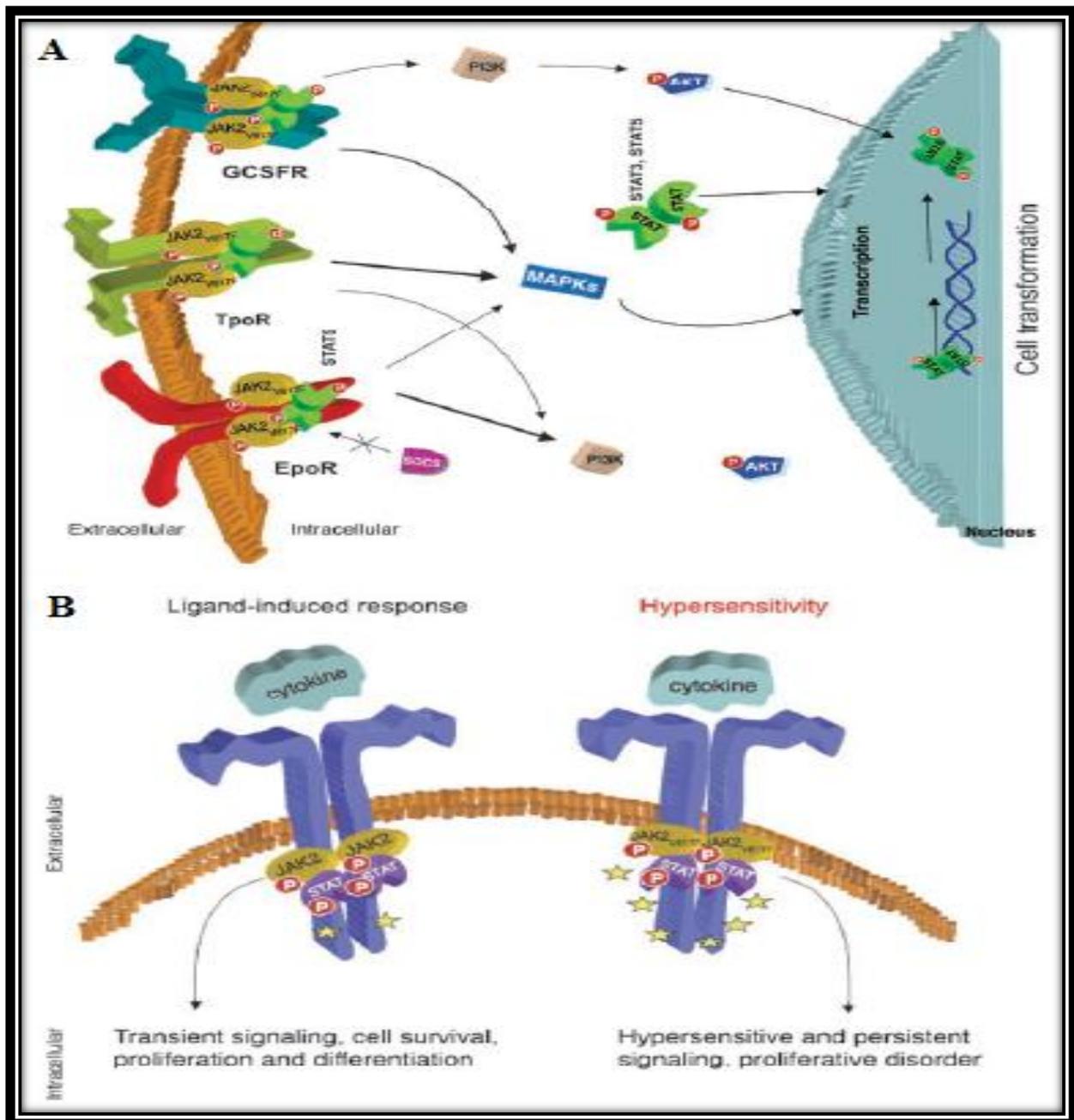


**Figure 15. Mutation JAK2 V617F fait des modifications épigénétiques dans les MPN.**

L'activation de Jak2 phosphoryle l'histone H3Y41, conduisant à l'exclusion de la protéine de l'hétérochromatine 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) à partir de la chromatine. En outre, Jak2 mutant phosphoryle PRMT5, portant ainsi atteinte à la méthylation des résidus Arginine de l'histone H4 et H2A. Les deux phosphorylations sont censées faciliter la transcription du gène ou réduire la répression génique (64).

#### Dans le cytoplasme

D'un point de vue physiopathologique, la découverte de la mutation JAK2 V617F renforçait alors l'idée que les MPNs étaient des pathologies de la signalisation cellulaire (80). Sur un plan fonctionnel, la protéine Jak2 mutée est spontanément active, elle peut phosphoryler les récepteurs apparentés, sur des résidus cibles de tyrosine, qui servent de sites d'ancrage qui permettent la liaison d'autres molécules de signalisation contenant le domaine SH2 tels que STATs, kinases Src, MAP kinase, protéines phosphatases et d'autres protéines adaptatrices tels que Shc, Grb2, et PI-3k, en l'absence de cytokines (68, 77). Il convient de mentionner que Jak2 muté nécessite toujours un récepteur de cytokine pour induire un signal prolifératif (64, 66) (Figure 17). Et plus précis, les anomalies touchant la voie de signalisation JAK/STAT jouaient un rôle de premier plan dans le développement de MPN.



**Figure 16. Voies de signalisation de JAK2 V617F dans les néoplasmes myéloprolifératifs.**

Modèle de signalisation constitutive (ligand-indépendante) induite par JAK2 V617F par le EpoR, le TpoR et le G-CSFR. **A.** Jak2 est le principal Jak utilisé par l'EpoR et le TpoR, tandis que le G-CSFR s'attend à être dans un complexe avec JAK2 V617F si JAK2 V617F à des niveaux élevés. L'association de JAK2 V617F sur la queue cytosolique des récepteurs de cytokines conduit à l'activation accrue de JAK2 V617F et la signalisation en aval par STAT, MAP kinase, PI-3-kinase (PI3K) et Akt. Protéines SOCS sont censées engager, à la fois, EpoR et Jak2 sauvage activé, conduisant et modulant négativement l'activité de Jak2 ; le complexe EpoR-JAK2 V617F semble échapper à l'activité modulation-négative de SOCS3. **B.** Les récepteurs des cytokines, les quels sont en complexe avec JAK2 V617F, sont hypersensibles à leurs ligands pour la signalisation. Les cytokines liées aux récepteurs couplés à Jak2 sauvage induisent des signaux physiologiques transitoires, ce qui conduit à la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs myéloïdes. En revanche, les récepteurs couplés à JAK2 V617F répondent aux niveaux plus bas du ligand, et sont de signalisation constitutive après retrait du ligand (66).

### I.3.6. Voie JAK/STAT

Depuis sa découverte initiale, il ya près de deux décennies, la voie de signalisation JAK/STAT a été impliquée dans divers processus biologiques, y compris l'hématopoïèse, la neurogenèse, la réponse immunitaire, l'oncogenèse et le contrôle de nombreuses populations de cellules souches (82).

Physiologiquement, après activation du récepteur par la fixation de son ligand, un changement conformationnel permet le déclenchement de l'activité tyrosine kinase de Jak2, permettant son autophosphorylation ou transphosphorylation, la phosphorylation du récepteur et enfin celle du facteur de transcription Stat5/3. Ce facteur, une fois phosphorylé, se dimérise, migre vers le noyau pour atteindre les zone promotrices spécifiques en amont de gènes dont il va activer la transcription (62, 68). Cependant dans des processus anormaux, la voie JAK/STAT a été impliquée dans une variété de tumeurs solides, ainsi que des troubles hématologiques (83).

Dans la lignée cellulaire HEL, exprimant la protéine mutant JAK2 V617F, il a été montré une expression augmentée de la cycline D2 et une expression diminuée de la p27Kip, cela permet la transition du cycle cellulaire à partir de la phase G1 à S. En outre, JAK2 V617F et Stat5, constitutivement actives, induisent également des niveaux élevés de dérivés réactifs de l'oxygène, qui sont suffisantes pour promouvoir la transition de la phase G1 à S (83).

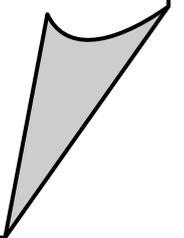
L'EpoR et le TpoR activent les voies JAK2/ STAT5 et PI3-kinase/Akt (66).

Une conséquence de l'activation de Stat5 est l'induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL qui est exprimée de façon constitutive dans les cellules érythroïdes de malade atteint de PV (66).

Il est intéressant de noter que la première conséquence de l'expression de la mutation JAK2 V617F est de promouvoir la formation de plaquettes (66).

Jak2 activée induit la transcription de régulateurs négatifs comme CIS (*cytokine-inductible SH2*) et protéines SOCS (tel que SOCS3), mais en général semblent être submergés et ne peuvent pas bloquer efficacement la signalisation constitutive de JAK2 V617F (64).

# **Partie Expérimentale**





## II.1. Matériels

### II.1.1 Patients et témoins

Notre étude a porté sur 21 malades atteints de LMC en phase chronique, leur âge moyen est 54 ans et intéressant les deux sexes, et trois témoins atteints de PV. Tous les prélèvements ont été effectués dans le service d'hématologie de C.H.U de Batna. Les quatre témoins, apparemment sains, sont de différentes tranches d'âge et des deux sexes.

Les patients présentent au diagnostic une LMC en phase chronique, le caryotype a été effectué avant le début du traitement et il a révélé la présence du chromosome Philadelphie chez l'ensemble des patients de notre série d'étude. Tous les patients ont reçu l'imatinib à une dose orale quotidienne de 400 mg/j.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ADN et l'ARN est recueilli stérilement dans un tube en présence d'EDTA, qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes nucléases, permettant ainsi de préserver l'intégrité de l'ADN et de l'ARN.

### II.2.2. Extraction des acides nucléiques

La plupart des études génétiques nécessitent la disponibilité des acides nucléiques et les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN et d'ARN. De très nombreux procédés d'extraction des acides nucléiques ont été décrits, et des kits sont actuellement proposés par un certain nombre d'industriels. Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à l'échantillon, à la nature du génome, au nombre de copies et des méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement.

#### ➤ Séparation des leucocytes par hémolyse

L'hémolyse du sang consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges.

Le sang prélevé est divisé en deux tubes : l'un pour l'extraction d'ADN et l'autre pour l'extraction d'ARN. Ils ensuite sont traités de la même façon selon les étapes suivantes :

- ajouter 1 volume de solution de lyse des globules rouges par 1 volume de sang (1:1), incubé de 20 à 30 min à 4°C ;
- centrifuger à 1500 g pendant 15 min à 4°C ;
- enlever le surnageant;



- ajouter 500 µl de tampon de lyse des globules rouges au culot, bien agiter par vortex et incubé 20 min à 4°C ;
- centrifuger dans les mêmes conditions, que précédemment ;
- éliminer le surnageant et recueillir le culot ;
- sur ce culot, la même opération est effectuée une autre fois ;
- à la fin, laisser les tubes sécher 5 min à température ambiante.

Au dernier lavage, le culot doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine. Le culot obtenu des leucocytes est utilisé aussi bien pour l'extraction de l'ADN que de l'ARN.

### ➤ **Extraction d'ARN au TRIzol**

#### - Homogénéisation.

L'échantillon contenant le culot, préalablement extrait, est repris dans 300 µl du TRIzol et homogénéiser par pipetage (1 ml de TRIzol pour 50 à 100 mg de culot cellulaires). Le contenu est transféré dans un nouveau tube Eppendorf 1.5 ml.

#### - Phase de séparation.

- Incuber les homogénats 5 min à température ambiante ;
- Ajouter 70 µl de chloroforme ;
- Agiter vigoureusement par inversion pendant 15 sec et incubé 2 à 3 min à température ambiante ;
- Centrifuger le tube à 12000 tr/min pendant 15 min à 4°C.

Après centrifugation, le mélange est séparé en 2 phases : une phase contenant le phénol-chloroforme et une phase aqueuse contenant l'ARN extrait. Le volume prélevé est d'environ 200 µl. Toutes les précautions sont prises quant au pipetage naïve et aseptique.

#### - Précipitation et purification de l'ARN.

- Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube avec beaucoup de précaution ;
- Précipiter l'ARN (phase aqueuse) avec 160 µl d'isopropanol. Incuber pendant 10 min à 4°C (dans la glace) ;
- Centrifuger à 12000 tr/min (max) pendant 15 min à 4°C.

Le précipité d'ARN, souvent invisible avant centrifugation, pourrait être visualisé à la fin de la centrifugation de la solution.

- Jeter le surnageant ;
- Laver le culot d'ARN une fois avec 300 µl d'éthanol à 70 % (en ajoutant 1 ml d'éthanol à 70 % pour 1 ml de TRIzol) ;



- Mélanger au vortex pendant quelques secondes ;
- Centrifuger à 12000 tr/min (max) pendant 15 min à température ambiante ;
- Jeter le surnageant et sécher, brièvement, le culot à température ambiante avec tubes renversés.

Ne pas sécher l'ARN par centrifugation sous vide, car complètement sec, le culot d'ARN se solubilisera difficilement.

- Dissoudre l'ARN.
- Dissoudre l'ARN dans 35 µl d'H<sub>2</sub>O bi-distillée et incubé 10 min à 55-60°C ;
- Aliquoter en 10 µl/tube et conserver à -20°C jusqu'à l'utilisation ou stoker à -80°C pour une longue conservation.
- Séparer un volume de 2 à 4 µl de la solution d'ARN pour le dosage par spectrophotométrie.

### ➤ **Extraction d'ADN**

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction d'ADN, celle adoptée dans notre étude est la technique du relargage des protéines à force ionique élevée : la technique de salting-out (Technique au chlorure de sodium saturé).

- Digestion par Protéinase K.
- Ajouter au culot 315 µl de solution de lyse de GB et vortexer ;
- Ajouter 5 µl de la protéinase K (20 mg/ml) (la protéinase K va dégrader les protéines cellulaire) ;
- Incuber à 55°C pendant 1 h 30 en vortexant les tubes chaque 5 min.
- Précipitation des protéines
- Ajouter 100 µl de Na Cl à 6M ;
- Vortexer chaque échantillon pendant 6 min ;
- Centrifuger le tube à 13000 tr/min pendant 10 min à température ambiante ;
- Transvaser 250 µl du surnageant (phase contenant l'ADN) dans un tube Eppendorf 1,5 ml propre.
- Précipitation de l'ADN
- Ajouter 250 µl d'isopropanol (pour précipiter l'ADN), mélanger délicatement la solution ;
- Centrifuger le tube à 13000 tr/min pendant 10 min à température ambiante ;
- Eliminer l'isopropanol.



- Laver l'échantillon avec 300 µl d'éthanol 70 % ;
  - Centrifuger pendant quelque sec, afin d'éliminer les traces d'éthanol ;
  - Laisser les tubes sécher 3-5 min à température ambiante.
- Dissolution de l'ADN.
- Solubiliser chaque échantillon dans 52 µl d'eau distillée stérile et aliquoter en 10µl/tube.
  - Séparer un volume de 2 à 4 µl de la solution d'ADN pour le dosage par spectrophotométrie.

L'ADN peut maintenant être congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour une courte période et transférer par la suite à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour longue conservation.

➤ **Estimation de la concentration de l'ADN et l'ARN et contrôle de leur qualité.**

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en UV à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration de l'ADN ou de l'ARN.

- Estimer la DO dans une cuve en quartz contre de l'eau distillée à 260 nm et 280 nm avec un spectrophotomètre.

Le rapport  $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$  doit être compris entre 1.8 et 2 pour évaluer le degré de pureté.

Les concentrations d'ADN et d'ARN ont été estimées à 260 nm, sachant que :

$$1 \text{ unité de } \text{DO}_{260 \text{ nm}} (\text{ADN}) = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$1 \text{ unité de } \text{DO}_{260 \text{ nm}} (\text{ARN}) = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- Mesurer donc à 260 nm la DO d'une dilution au 1/250ième de la solution à doser.
- calculer la concentration de l'ADN grâce à l'équation suivant :

$$[\text{C}] (\mu\text{g/ml}) = \text{Facteur de dilution} \times \text{DO}_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

et de l'ARN

$$[\text{C}] (\mu\text{g/ml}) = \text{Facteur de dilution} \times \text{DO}_{260 \text{ nm}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

### II.2.3. Détection du transcrit de fusion BCR-ABL par transcriptase inverse-PCR (RT-PCR)

La RT-PCR comporte deux étapes : une première étape de rétrotranscription où l'ARN est transformé en ADN complémentaire (ADNc), beaucoup plus stable, puis une étape de PCR où l'ADNc, correspondant au gène choisi, est amplifié grâce à des amorces spécifiques et la mise en évidence du type de réarrangement se fait, le plus fréquemment, par migration électrophorétique en gel d'agarose des fragments obtenus par RT-PCR (Figure 17).

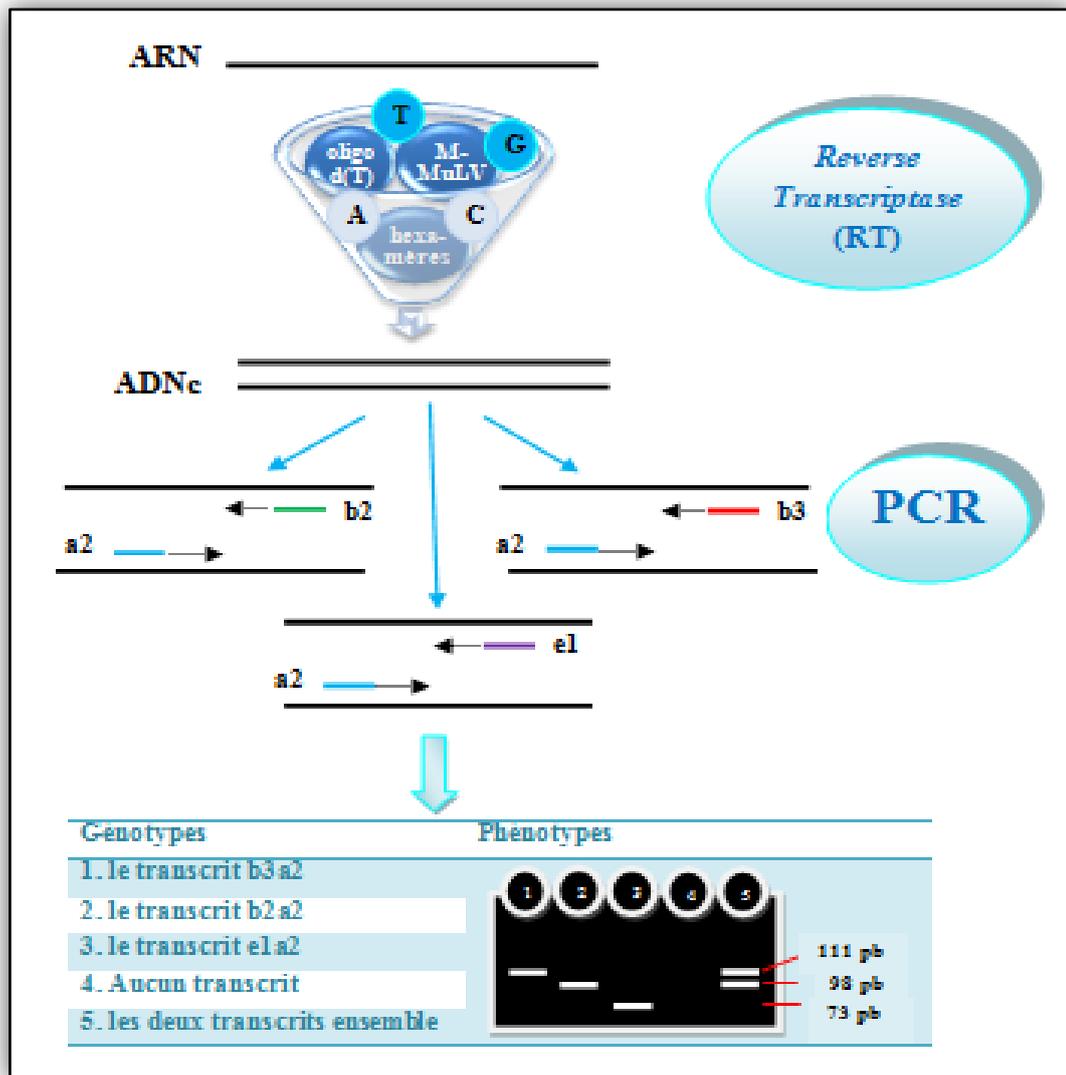


Figure 17. Illustration schématique des étapes de la RT-PCR pour les différents transcrits BCR-ABL.

➤ **Synthèse de l'ADN complémentaire**

Cette étape permet d'obtenir de l'ADNc à partir de l'ARN.

- Pour un volume final de 20 µl, mettre dans un tube Eppendorf 0,2 ml, le Mix1 qui comprend :

- ✓ 1µg d'ARN (calculer en fonction de la concentration de l'ARN)

Réactifs	quantité (en µl)
✓ mix de dNTPs (2 mM)	4
✓ amorce oligo d(T) (0,5 µg/µl)	1,5
✓ mix d'amorce aléatoire (hexamères)	1,5
✓ H <sub>2</sub> O distillée	QSP



- Incuber le mélange dans un bain-marie à 70°C pendant 3 à 5 min ;
- Centrifuger brièvement et placer rapidement dans la glace ;
- Ajouter, à chacun des tubes, 6 µl de Mix2 qui comprend :

Réactifs	quantité (en µl)
✓ RT-buffer 5X	4
✓ ARNase inhibitor	1
✓ M-MuLV RNase H- Reverse Transcriptase	1

- Incuber à 42°C pendant 1 h ;
- Inactiver l'enzyme à 90 °C pendant 10 min ;
- Diluer l'ADNc au 1/30 ;
- Aliquoter les produits et stocker à -20° C ou passer à l'étape suivante d'amplification.

### ➤ Amplification par PCR

L'ARN est maintenant transcrit sous forme d'ADNc. Les fragments d'ADNc peuvent être amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), afin d'obtenir des produits finaux en quantité suffisante pour détecter le transcrit de fusion BCR-ABL.

Pour la réaction de PCR, les conditions ont été choisies en prenant en considération la taille du fragment du gène à amplifier et la température d'hybridation des amorces. L'amplification du gène hybride BCR-ABL est effectuée par les couples d'amorce b2a2, b3a2 et e1a2 (tableau IV). La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par une étude antérieure (84).

**Tableau IV. Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de différents transcrits de BCR-ABL.**

	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce	Longueur du fragment à amplifier
<b>Sens</b>	b2	5'ATCCGTGGAGCTGCAGATG3'	b2a2 98 pb
<b>Sens</b>	b3	5'GAGTCTCCGGGGCTCTATGG3'	b3a2 111 pb
<b>Sens</b>	e1	5'AGATCTGGCCCAACGATGGCGA 3'	e1a2 73 pb
<b>Antisens</b>	a2	5'TCAGATGCTACTGGCCGCTGAA3'	



- Mettre 4  $\mu\text{l}$  d'ADNc dans un volume réactionnel final de 25  $\mu\text{l}$ /tube et par échantillon, contenant :

Réactif commun	Quantité (en $\mu\text{l}$ )
✓ amorce sens (10 mM)	1,5
✓ amorce antisens (10 mM)	1,5
✓ mix dNTPs (2 mM)	2,5
✓ tampon de PCR	3
✓ <i>Taq</i> polymérase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,2
✓ H <sub>2</sub> O	12,3

Un tube témoin négatif (contenant de l'H<sub>2</sub>O à la place de l'ADNc) est rajouté à chaque série de RT-PCR afin de détecter d'éventuelles contaminations de notre PCR.

Le mélange ainsi obtenu est mis dans un thermocycleur (Techne, Grande Bretagne), préalablement programmé pour la réalisation de l'ensemble des étapes d'une réaction de PCR, comprenant les étapes suivantes (tableau V):

**Tableau V. Programme de PCR pour le gène hybride BCR-ABL.**

Nombre de cycles	Etapes	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	95	10 min
30 x	Dénaturation	95	30 s
	Hybridation	62	1min
	Elongation	72	1min
	Elongation finale	72	10 min
	Conservation	4	indéfiniment

### ➤ Visualisation des fragments amplifiés

La migration électrophorétique est faite sur gel d'agarose à 3 % (100 ml de tampon TAE 1X + 3 g agarose), après refroidissement partiel du gel, ajouter 10  $\mu\text{l}$  de BET (bromure d'éthidium qui est un agent intercalant entre les bases des acides nucléiques et émet une fluorescence orange sous illumination par UV). Le gel est coulé sur support d'une cuve horizontale. Dans chaque puits du gel, il est déposé le mélange de : 10  $\mu\text{l}$  de produit d'amplification + 4  $\mu\text{l}$  de Bleu de Bromophéol, et un puits pour de 3  $\mu\text{l}$  de marqueur de poids moléculaire. Tout le système est soumis, par la suite, à un voltage initial de 30 V pendant 10 min puis évoluant à 100 V pendant 30 min.



La visualisation est réalisée sur transilluminateur UV muni d'un appareil Polaroid pour déterminer le profil et la taille des bandes obtenues.

### II.2.4. Détection de la mutation JAK2 V617F par PCR-RFLP

La mutation JAK2 V617F survient dans une cellule souche hématopoïétique. Dès lors, toutes les cellules myéloïdes dérivant de ce précurseur porteront la mutation, dont les granulocytes présents dans le sang périphérique. C'est pourquoi la recherche de la mutation peut s'effectuer sur de l'ADN extrait d'un prélèvement sanguin et ne nécessite pas de ponction médullaire.

L'ADN est soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction. Des mutations pourront, en modifiant la séquence primaire de l'ADN, entraîner une modification de son site de restriction (un site qui disparaît ou au contraire qui apparaît). Ces modifications de l'ADN sont détectées par des variations du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique.

La PCR-RFLP est une méthode fiable, sensible et facile à exécuter. Elle consiste à amplifier une partie de l'ADN contenant la séquence porteuse le site de la mutation JAK2 V617F du gène JAK2. Puis, la détection de cette mutation par une digestion en présence d'une enzyme de restriction spécifique *BsaXI*.

La détection de la mutation a été effectuée en plusieurs étapes successives :

- la PCR et contrôle de PCR sur gel d'agarose ;
- la digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction *BsaXI* ;
- la séparation des produits digérés par migration électrophorétique sur gel d'agarose et visualisation des différents fragments obtenus après une coloration au BET et exposition sur UV à l'aide d'un transilluminateur.

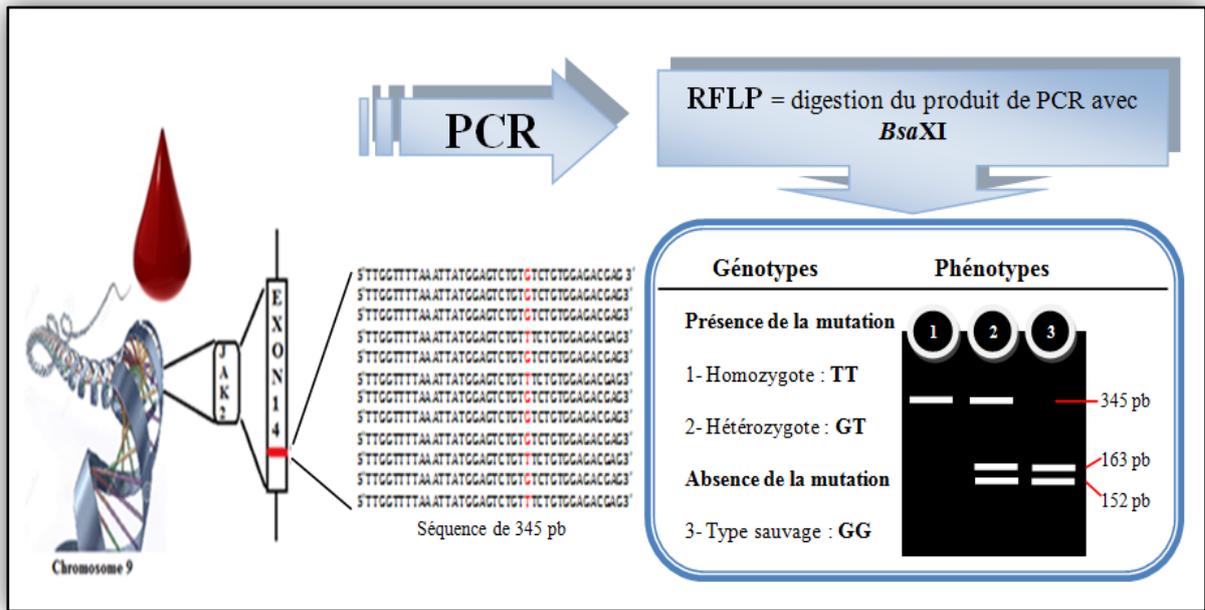


Figure 18. Illustration schématique des étapes de la PCR-RFLP pour la mutation JAK2 V617F.

➤ **Amplification par PCR**

La PCR permet d'amplifier la région d'intérêt de gène JAK2, afin d'obtenir cette séquence en quantité suffisante pour l'analyse par RFLP. Les amorces utilisées ont été choisies afin de délimiter et d'amplifier la région incluant le point chaud 1849. La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par des études antérieures (85, 86), et a été vérifiée par la PCR *in silico* (Annexe 1), c'est-à-dire que l'amplification donne une seule bande de taille attendue 345 pb pour chaque amplicon. Les amorces utilisées sont :

Sens 5'TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT3'  
 Anti-sens 5'TCCTACAGTGTTCAGTTTCAA3'

❖ **Préparation du mélange réactionnel pour PCR**

Mix de PCR	Quantité (en µl)
✓ ADN	100 µg (calculer en fonction de la concentration de l'ADN)
✓ Tampon de <i>Taq</i>	3
✓ <i>Taq</i> polymérase (5 U/ µl)	0,2
✓ Mix de dNTPs (2 mM)	2,5
✓ Amorces sens (10 mM)	1,5
✓ Amorces antisens (10 mM)	1,5
✓ H <sub>2</sub> O distillé	QSP

Le volume total est de 25 µl.

Dans le tube témoin, l'ADN est remplacé par de l'eau distillée.



❖ **Déroulement de la PCR**

Les tubes contenant le mélange à amplifier sont placés dans le thermocycleur, selon le programme indiqué dans le tableau ci-après.

**Tableau VI. Programme de PCR pour le gène JAK2.**

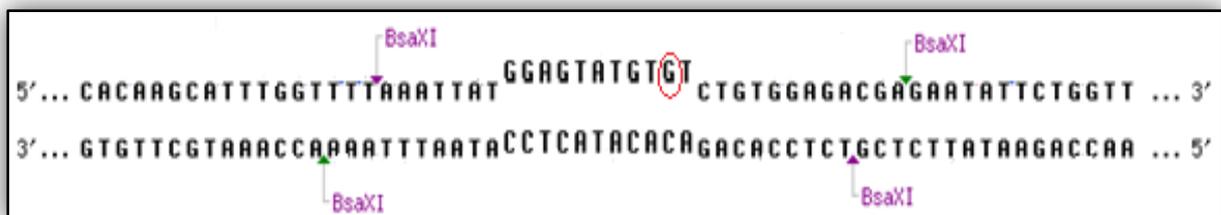
Nombre de cycles	Etape	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	95	10 min
30X	Dénaturation	95	30 s
	Hybridation	54	1min
	Elongation	72	1min
	Elongation finale	72	10 min
	Conservation	4	indéfiniment

➤ **Contrôle de la taille des fragments à amplifier**

Les paramètres de la réaction d'amplification par PCR ainsi que les différents artefacts affectant potentiellement cette réaction (exemple : contamination) ont été estimés en déposant 6 µl de produits de PCR sur un gel d'agarose 1% suivi d'une révélation sur UV après coloration au BET.

➤ **Digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction**

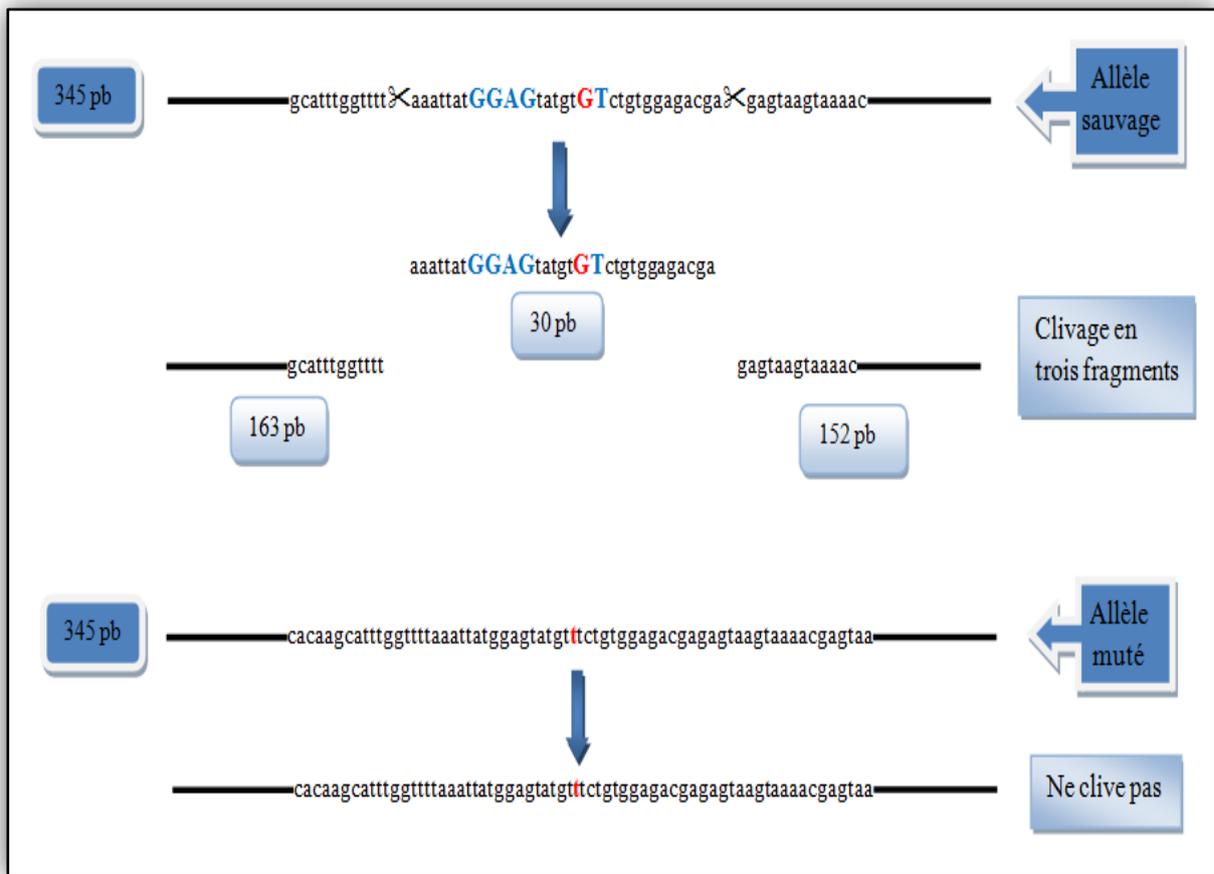
L'enzyme de restriction utilisé est *Bsa*XI, elle reconnaît et clive la séquence :



Condition thermique de l'endonucléase de restriction: 37 °C

3 cas de figure se présentent après digestion avec *Bsa*XI:

- en cas d'allèles normaux, 3 fragments sont obtenus : 163, 30, 152 pb ;
- en cas d'allèles mutés homozygotes, un seul fragment est obtenu : 345pb ;
- en cas d'allèles mutés hétérozygotes, 4 fragments sont obtenus: 163, 30, 152pb et le fragment non digéré de 345 pb.



**Figure 19. Schématisation de l'action de l'enzyme de restriction *BsaXI* et les fragments obtenus après la digestion.**

- Préparer le mix de digestion par l'enzyme *BsaXI* :

Mix de digestion	Quantité (en µl)
✓ Tampon de <i>BsaXI</i> (tampon 4, NEB)	6
✓ Enzyme <i>BsaXI</i> (2 U/µl)	3
✓ H <sub>2</sub> O distillé stérile	1

Mettre 10 µl de mix dans chaque tube ;

- Ajouter 10 µl de chaque produit de PCR ;
- Homogénéiser le contenu des tubes par pipetage va-et-vient ;
- Placer les tubes au bain marie à 37°C pendant une nuit.

#### ➤ **Electrophorèse des fragments digérés**

Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 4% contenant du BET et en présence de tampon de migration TAE 1X. La visualisation de ces fragments a été réalisée sur UV à l'aide d'un transilluminateur. La lecture des profils électrophorétiques ainsi que l'estimation des tailles des fragments obtenus nous ont renseignés sur la présence ou l'absence d'anomalies pour chaque patient analysé.



### II.3. Résultats

#### II.3.1. Caractéristiques des patients

Tableau VII. Caractéristiques des patients inclus dans notre étude

	Nombre	Age moyen	Sexe	
			Masculin	Féminin
Echantillon	21	54	12	9
T <sup>-</sup> négatif	4	24	2	2
T <sup>-</sup> positif	3	68	1	2

Notre étude a porté sur 21 échantillons de patients atteints de LMC en phase chronique, quatre témoins négatifs et trois témoins atteints de Polyglobulie Vraie. Sur les 21 patients atteints de LMC, 12 (57,14%) étaient des hommes et 9 (42,86%) étaient des femmes et l'âge moyen est de 54 ans (29- 74 ans). Durée de la maladie des patients allant de 8 mois à 6 ans et tous les patients ont été traité par l'imatinib mésylate.

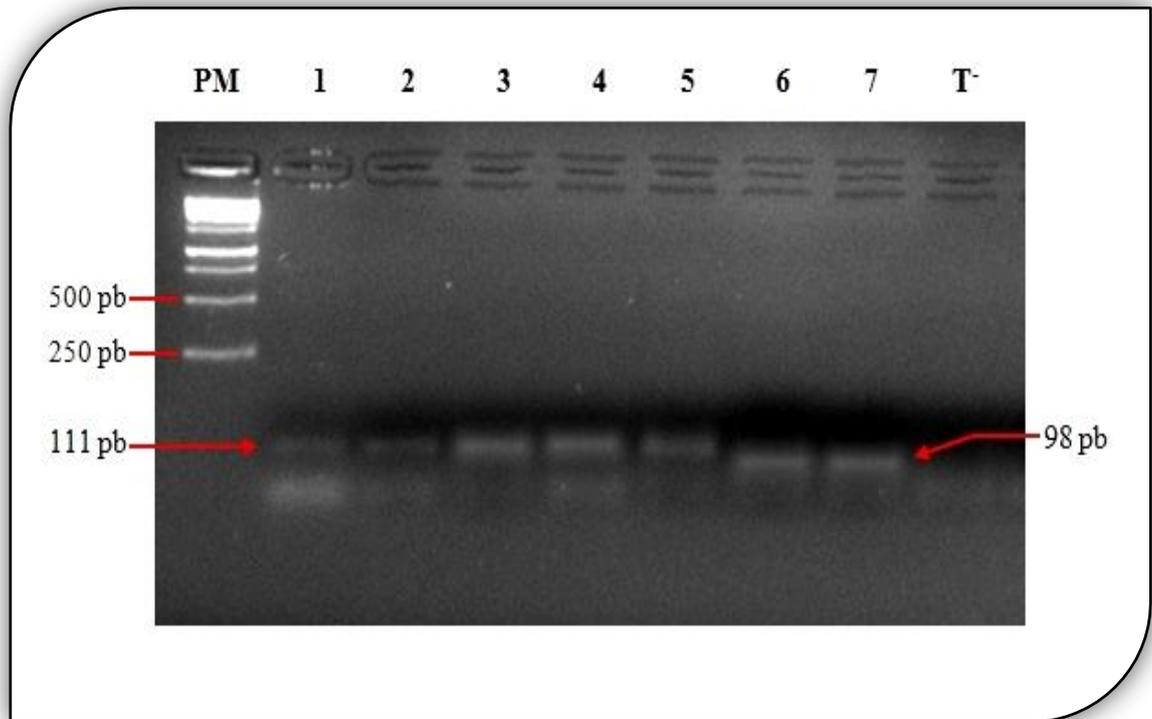
Le recueil des prélèvements sanguins a été réalisé au sein du service d'hématologie du CHU de Batna ainsi que la conservation des échantillons, qui a été scrupuleusement respectée (-80°C). Ensuite, ils ont été transférés au laboratoire à l'Université de Biskra pour extraire les acides nucléiques (ADN et ARN), et pour appliquer notre stratégie expérimentale, préalablement élaborée. La durée du recueil de l'échantillonnage a été étendue de 2013 à 2014.

Vu la fréquence faible de patients atteint de LMC, le nombre d'échantillons impliqué dans cette étude n'est pas significatif pour pouvoir en tirer des recommandations ou conclusions sur l'épidémiologie de la LMC dans la région de Batna.



### II.3.2. Profil électrophorétique des transcrits BCR-ABL : b2a2 et b3a2

L'obtention des bandes de taille 111pb et 98pb est en faveur de la présence du point de cassure au niveau du segment M-BCR (Photo 1), et les configurations moléculaires de ce réarrangement sont de types b3a2 et b2a2.



**Photo 1. Profil électrophorétique montrant les différents transcrits : b2a2 (98 pb) et b3a2 (111pb).** Une électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des produits amplifiés par PCR a pu montrer les différents transcrits obtenus, après coloration au BET et visualisation sur UV. Les puits 1, 2, 3, 4 et 5 représentent le transcrit b3a2 ; les puits 6 et 7 représentent le transcrit b2a2 ; PM : Poids Moléculaire ; T : témoin négatif (contenant de l'H<sub>2</sub>O à la place de l'ADNc).

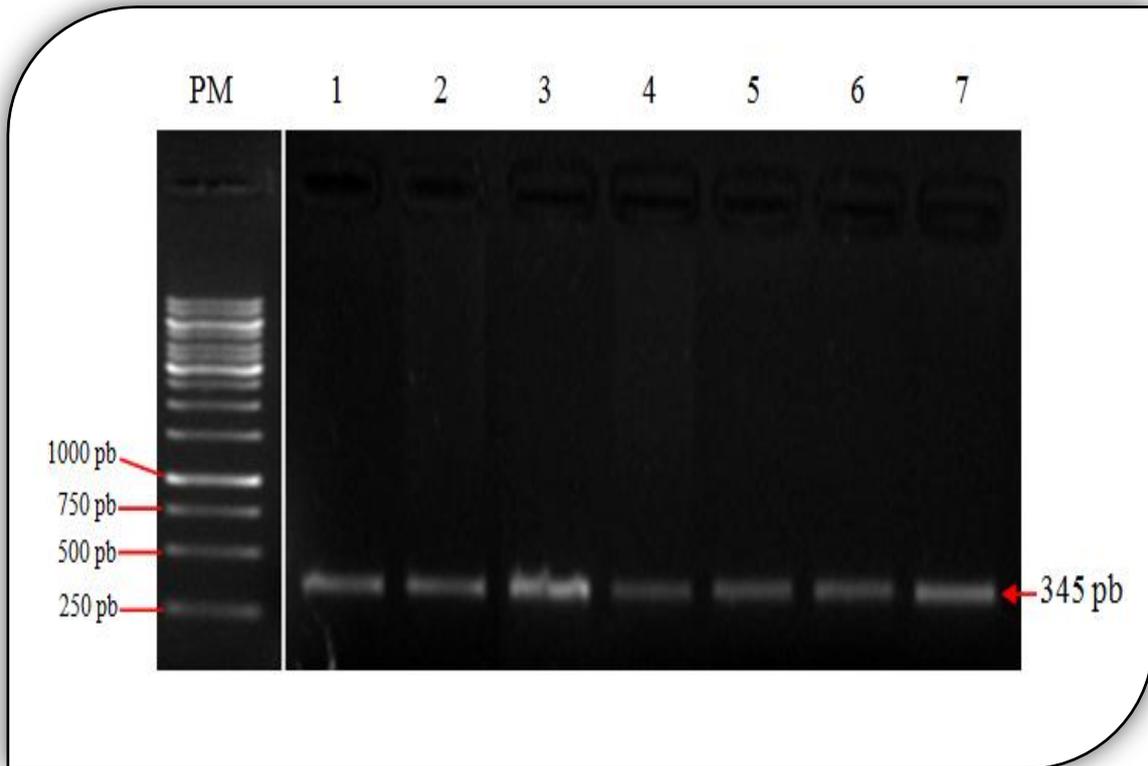
Les résultats de l'application de la technique de RT-PCR au niveau de notre groupe de patients Algériens, qui sont Ph (+) en cytogénétique, montrent :

- la présence de deux types de transcrits b3a2 et b2a2 avec une prédominance de type b3a2, dont dix patients portent le transcrit b3a2 et deux patients portent le transcrit b2a2 ;
- un patient porte les deux transcrits au même temps ;
- l'absence du transcrit e1a2 chez tous les patients ;
- et huit patients ne montrent aucun transcrit.



### II.3.3. Profil électrophorétique de la séquence amplifiée

L'ADN génomique a été amplifié par PCR, et a été utilisé des amorces couvrant le site de point chaud de mutation correspondant au nucléotide 1849 et génèrent un fragment de 345 pb. L'amplification réussie a été confirmée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (Photo 2).

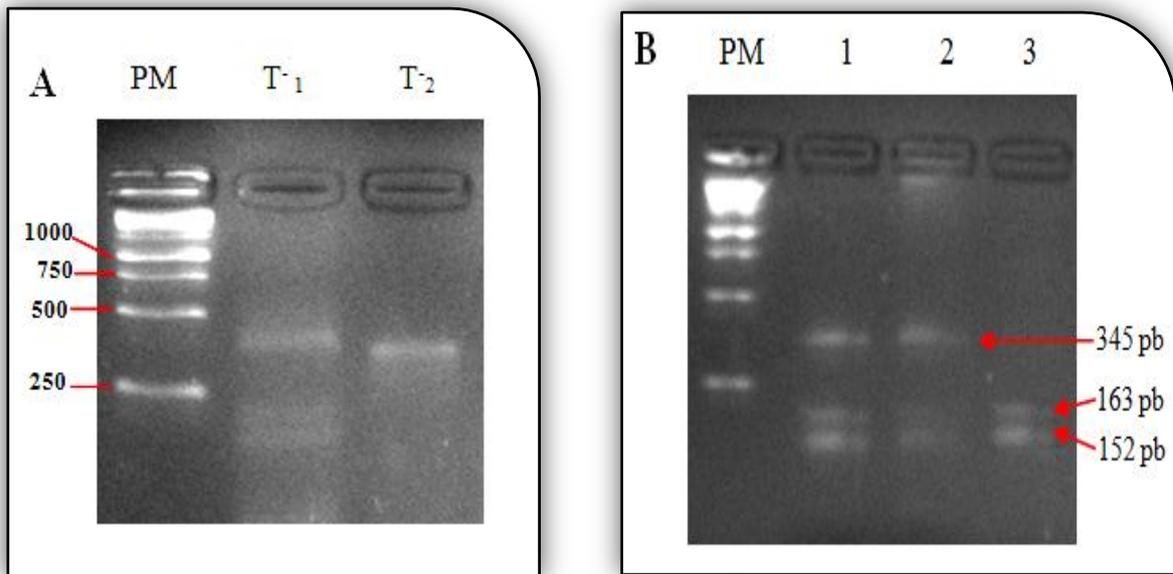


**Photo 2. Profil électrophorétique obtenu par PCR correspondant au fragment cible du gène JAK2.** Un fragment de 345 pb a été amplifié par PCR dans les conditions optimisées préalablement et qui correspond à une séquence ciblée de JAK2 qui pourrait être, potentiellement, affectée par la mutation correspondant à V617F. Cette séquence a été migrée sur gel d'agarose à 1% et visualisée sur UV après coloration au BET. PM : poids moléculaire, puits 1–7 : la séquence de 345 pb correspondant au fragment cible du gène JAK2 de sept patients.



### II.3.4. Profils des produits de PCR digérés par l'endonucléase de restrictions *Bsa*XI

Les fragments de JAK2 attendus après digestion complète sont de 163, 152 et 30 pb, ce dernier ne peut pas trouver sur le gel. Le seul point de mutation guanine → thymine à détruire le site de reconnaissance de l'enzyme *Bsa*XI et désactive la digestion. Après la digestion, le nombre des bandes est varié dans le groupe de patients porteurs de la mutation (Photo 3).



**Photo 3. Profil électrophorétique montrant les fragments obtenu après la digestion par l'enzyme *Bsa*XI (RFLP).** Une électrophorèse sur gel d'agarose (4%) des produits digérés par l'enzyme *Bsa*XI, après coloration au BET et visualisation sur UV. **A.** Le puits T<sub>1</sub>: témoin sain, représente trois bandes : 345 pb, 163 pb et 152 pb (cas de mutation hétérozygote); le puits T<sub>2</sub>: témoin de patient atteint le PV, représente une seule bande de 345 pb (cas de mutation homozygote). **B.** Produits digéré des patients atteints de LMC en phase chronique; les puits 1 et 2: représentent trois bandes : 345 pb, 163 pb et 152 pb (cas de mutation hétérozygote); le puits 3: représente deux bandes : 163 pb et 152 pb (cas d'absence de la mutation JAK2 V617F); PM: poids moléculaire.



### II.4. Discussion

Le but de notre étude était double : (i) détecter les différents transcrits du gène de fusion BCR-ABL, les plus fréquents b3a2 et b2a2 et plus rare e1a2, et (ii) détecter la mutation JAK2 V617F chez les mêmes patients atteints de la LMC en phase chronique. Pour cela, nous avons utilisé les techniques de RT-PCR et de PCR-RFLP et les avons appliquées sur 21 échantillons de patients atteints de LMC en phase chronique.

Ces tests, à base de biologie moléculaire, sont aujourd'hui indispensables et seront réalisés au en corrélation avec le caryotype. Ils sont effectués à partir du sang (32).

L'objectif a été d'optimiser et de valider des techniques de RT-PCR et PCR-RFLP potentiellement fiables, vers un usage de routine afin d'améliorer le diagnostic, le suivi du traitement et la prise en charge des patients atteints de MPN au niveau des services concernés.

#### II.4.1. Discussion analytique

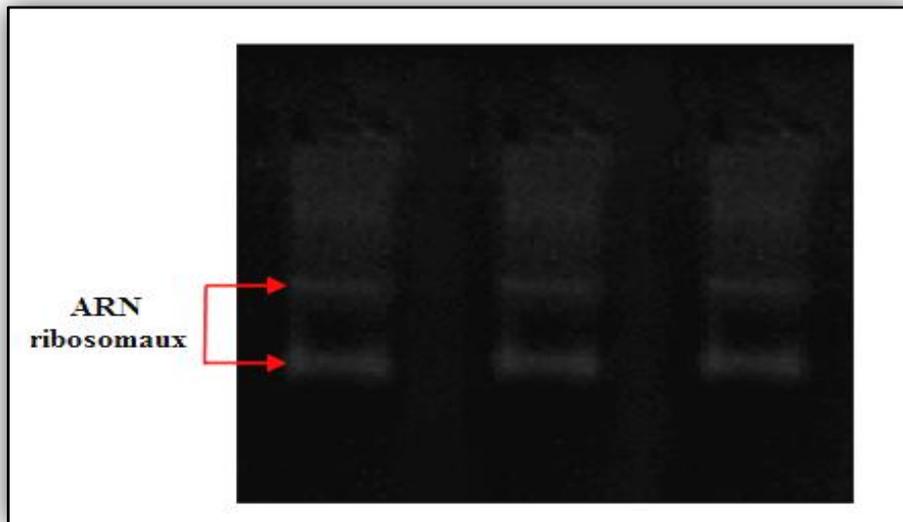
##### - Echantillons

Les échantillons ont été prélevés dans des conditions rigoureuses et toute contamination par de l'ADN ou l'ARN étrangers a été évitée. Chaque échantillon doit également renfermer un nombre suffisant de cellules permettant de disposer d'une quantité satisfaisante de matériel génétique.

##### - Extraction des acides nucléiques ADN et ARN

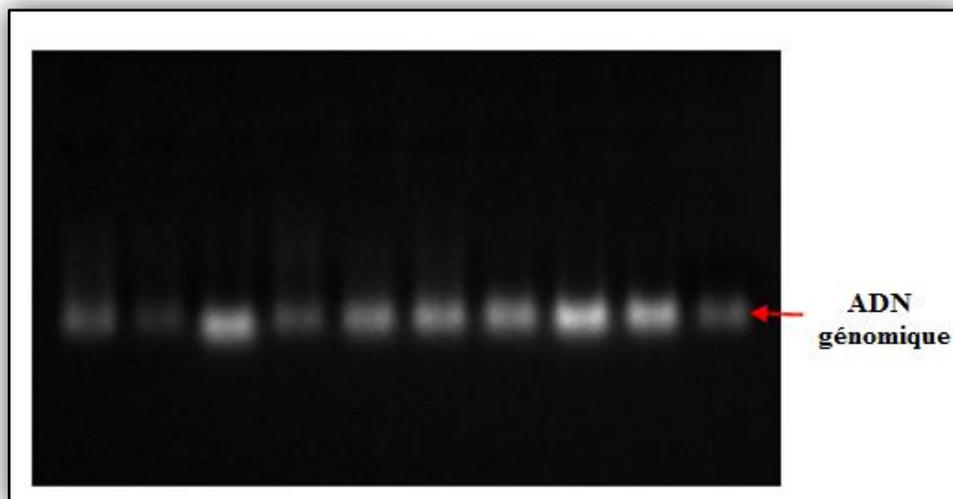
La méthode d'extraction de l'ARN au TRIzol (Chomczynski *et al.* (1987)) est la plus utilisable actuellement car a permis d'obtenir une quantité suffisante d'ARN de haute pureté (Photo 4).

Pour l'extraction d'ADN, la technique de salting-Out (Miller *et al.* (1988)) est une méthode rapide, sûre et peu coûteuse a été développée pour simplifier la procédure de déprotéinisation et pour éviter l'utilisation de solvants organiques toxiques (notamment le phénol). Ce procédé implique le relargage des protéines cellulaires par la déshydratation et la précipitation avec une solution saturée de Na Cl (Photo 5).



**Photo 4. Profil électrophorétique des ARN totaux extraits par la technique au TRIzol.**

Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des ARN totaux après coloration au BET et visualisation sur UV. Le profil a pu montrer l'intégrité des ARN totaux.



**Photo 5. Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN.** Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) d'ADN génomique qui extraire, après coloration au BET et visualisation sur UV.

#### - Optimisation de la PCR-RFLP

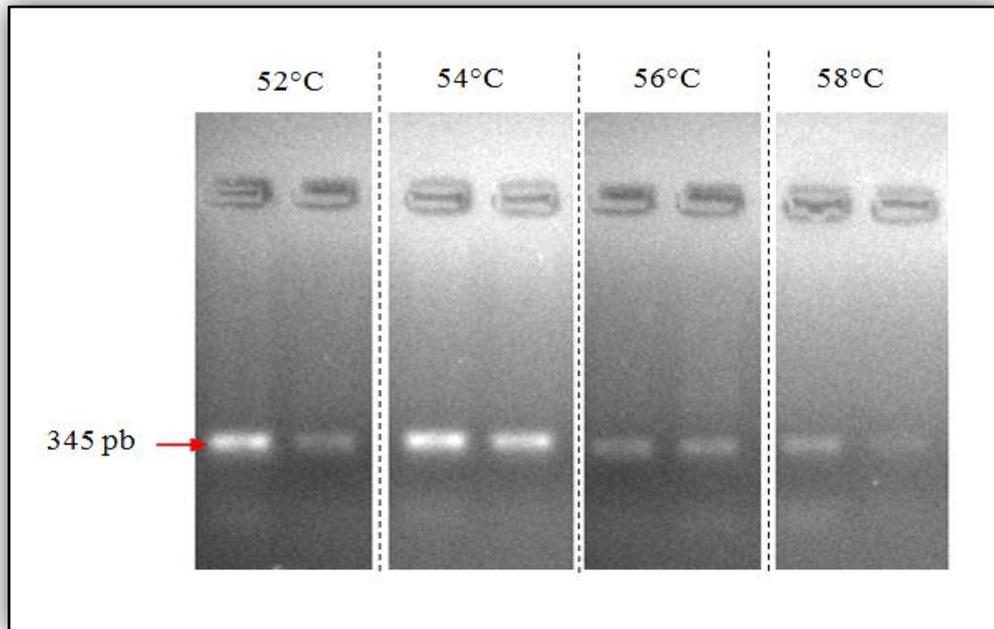
Une stratégie de notre analyse PCR-RFLP a été établie avant toute manipulation. Ceci a consisté à préparer des mélanges pré-réactionnels pour minimiser le nombre de manipulations et ainsi d'éviter les erreurs, la perte en matériel biologique et les contaminations potentielles.

L'optimisation de la technique de PCR au sein de notre laboratoire a nécessité la réalisation d'un certain nombre d'essais afin d'améliorer le rendement de l'amplification. Pour notre travail, les optimisations ont été menées afin améliorer la qualité du signal de l'ADN amplifié ainsi que la quantité de l'amplicon obtenu, pour cela, les paramètres ajustés étaient :

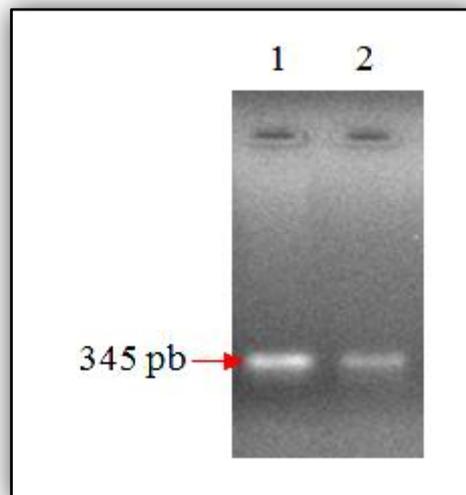


- la température d'hybridation : 52, 54, 56 et 58°C (Photo 6) ;
- le nombre de cycles : 25 et 30 (Photo 7).

Après plusieurs PCR dans différentes conditions expérimentales et électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les différentes visualisations, après coloration au BET sur UV, nous ont permis de conclure le choix des meilleures conditions d'amplification par PCR.



**Photo 6. Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus du gène JAK2 (345 pb) après l'optimisation de la température d'hybridation.** Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des amplicons obtenu par la PCR, après coloration au BET et visualisation sur UV.



**Photo 7. Profil électrophorétique montrant les fragments obtenus du gène JAK2 (345 pb) après l'optimisation du nombre de cycles.** Une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) des amplicons obtenu par la PCR, après coloration au BET et visualisation sur UV. Le puits 1: le nombre de cycles est 30 et le puits 2 : le nombre de cycles est 25.



### - Difficultés rencontrées

Au départ de notre travail expérimental, nous avons utilisé des protocoles qui ne nous ont pas donné les résultats escomptés. Nous avons dû optimiser les conditions expérimentales :

- pour la PCR, en modifiant les quantités d'ADN de départ ainsi que le déroulement du cycle thermique, tout en recherchant les conditions optimales de fonctionnement.
- la digestion enzymatique, les principaux problèmes étant liés à la *BsaXI*, qui pourrait être inefficace dans les conditions utilisées.
- pour la séparation électrophorétique des produits de digestion, une différence de taille très proche entre les principaux fragments (152 et 163 pb), sont difficiles à séparer et pour cela, nous avons dû concentrer le gel d'agarose jusqu'à 4 %.
- Il est à signaler que nous avons été confrontés à mauvaise estimation des concentrations de l'ADN et de l'ARN, dû à une défaillance affectant. Nous avons dû se référer à d'autres spectrophotomètres pour y remédier de cette anomalie.

### II.4.2. Discussion des résultats

- Les produits amplifiés par PCR, les bandes de 111 pb et 98 pb pour les transcrits BCR-ABL (Photo 1) et la bande de 345 pb pour JAK2 (Photo 2), nous ont donnés les bandes cibles individualisées et bien différenciées après détection en présences des UV lors de l'électrophorèse contrôle. Une absence d'amplification de bandes parasites était la règle.
- La détection du gène de fusion BCR-ABL dans les leucocytes d'un patient est suffisante pour établir un diagnostic de la LMC (51). La RT-PCR est une méthode plus sensible qui peut détecter une cellule leucémique unique parmi  $10^5$ - $10^6$  cellules normales (24). Les limites de la technique de RT-PCR sont, d'une part, la fragilité du matériel de départ (ARNm), d'autre part, leurs champs d'application restreints aux pathologies portant de tels marqueurs. Le choix de travailler sur l'ARNm et non sur l'ADN, est dû à l'hétérogénéité des points de cassures qui sont dispersés sur ce dernier (89).
- Le problème des faux négatifs, qui pouvait être dû à une dégradation de l'ARNm ou à une mauvaise transcription inverse, le problème a été résolu par le contrôle sur gel d'agarose de la qualité d'ARN après extraction et de la RT (Photo 4).
- Selon des études réalisées, le variant b3a2 est plus fréquent que le variant b2a2 (33, 89), Etienne *Get al.* 2001. ont démontré : 60 % des LMC présentent un transcrit b3a2, 30 % un



transcrit b2a2, et dans 5 à 10 % des cas un double transcrit b3a2/b2a2. En plus, le variant e1a2 est rare dans LMC (29,51).

Notre étude a été réalisée sur 21 patients, parmi eux, nous avons pu déterminer le type de variant pour 13 patients : 10/21 patients (47,62%) présentent le transcrit b3a2, 2/21 patients (9,52%) présentent le variant b2a2 et 1/21 (4,76%) patient présente les deux variant. Cependant, pour l'ensemble de patients étudiés aucun transcrit e1a2 n'a été observé. Les huit patients 8/21 (38,1%) qui n'ont pas un transcrit, présentent probablement une rémission moléculaire. Cette dernière implique qu'aucun transcrit du gène BCR-ABL n'est détectable par RT-PCR. Ce test est beaucoup moins standardisé que les autres tests, et sa sensibilité varie grandement entre les laboratoires (24).

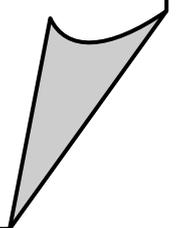
- La mutation au niveau du codon 617 (V617F) du gène janus kinase 2 (JAK2) a été découverte dans les syndromes myéloprolifératifs BCR-ABL négatifs.

D'après Jelinek *et al.* (2005) ont rapporté l'absence de la mutation JAK2 dans LMC Ph+ en phase chronique chez 99 patients. De même, Bock *et al.* (2006) et Xiao *et al.* (2008) n'ont pas détecté de mutation JAK2 V67F chez les patients LMC Ph+ en phase chronique, le premier chez 5 patients et le dernier chez 88 patients et 140 cas sains. On pensait que la mutation JAK2 et la translocation BCR-ABL sont mutuellement exclusives. En contraste avec ces rapports, un nombre croissant de cas de coexistence du gène de fusion BCR-ABL et de la mutation JAK2 V617F dans des échantillons de sang et de moelle osseuse ont été rapportés dans la littérature (86, 93-104). Le mutant JAK2 V617F peut être détecté à un niveau très faible, simultanément avec BCR-ABL au premier diagnostic de LMC ou au cours de l'évolution de la maladie (103).

Dans notre cas, nous avons rencontré certains problèmes au niveau de l'interprétation des résultats, ceci est peut être due à une digestion incomplète (Photo 3), malgré que toutes les conditions nécessaires pour une digestion fiable (une quantité suffisante d'enzyme : 3 µl -2000 U/ml et une incubation à 37°C pendant une nuit) sont réunies.

Le profil de digestion (Photo 3) a montré trois bandes (345 pb, 163 pb, 152 pb) chez tous les patients et aussi les témoins sains étudiés. Le résultat obtenu correspond au un cas de mutation hétérozygote de JAK2 V617F, qui, selon la littérature, est rare dans une population de patients atteints de LMC en phase chronique.

# Conclusion



## Conclusion

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'optimisation et à la validation, aussi bien, de la technique de RT-PCR, pour la recherche de principaux réarrangements BCR-ABL et de déterminer le profil de leur configuration moléculaire au sein d'une population Algérienne atteinte de LMC en phase chronique, qu'à la technique de PCR-RFLP, afin de détecter la mutation JAK2 V617F chez la même population ; afin de rechercher une éventuelle coexistence de ces anomalies chez le même patient.

L'intérêt de ce travail est :

- de donner au clinicien, des moyens de diagnostic très fiables, lui permettant de confirmer le diagnostic et le suivi de l'évolution des hémopathies malignes possédant des biomarqueurs connus ;
- d'adopter une prise en charge thérapeutique adéquate en fonction du diagnostic moléculaire obtenu ;
- d'élargir le champ d'application, de cette technique, aux autres types d'hémopathies malignes fréquentes à l'échelle de notre population.

Nos résultats ont mis en évidence les différents types de transcrits BCR-ABL au sein d'une population de patients Algériens, atteints de LMC en phase chronique. Les transcrits détectés sont b3a2 et b2a2, et nous avons constaté que le transcrit b3a2 est plus fréquent que le transcrit b2a2 et l'absence du transcrit e1a2.

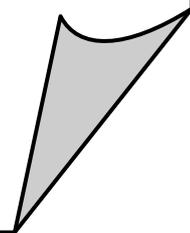
Cependant, vu le nombre restreint d'échantillons de LMC considéré dans cette étude, les résultats obtenus n'ont pas permis d'en tirer des conclusions sur la concomitance des deux anomalies génétiques, JAK2 V617F et BCR- ABL, chez un patient atteint de LMC.

Nous proposons pour la continuité du travail expérimental:

- d'augmenter le nombre des échantillons analysés pour en tirer des conclusions fiables.
- d'essayer d'autres techniques de détection de la mutation JAK2 V617F tel que l'ARMS-PCR.
- d'optimiser la technique quantitatif « real time-PCR », qui est considéré comme indispensable par les cliniciens pour quantifier les allèles aberrants et, de ce fait, déterminer, avec exactitude, la rémission moléculaire chez le malade.

# **Références**

# **Bibliographiques**



### Références bibliographiques

1. Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 : 100, 2292–302.
2. Ugo V., Chloé J., Vainchenker W. Une mutation unique de la protéine kinase JAK2 dans la polyglobulie de Vaquez et les syndromes myéloprolifératifs non-LMC. *Médecine Sciences*. 2005 : 21 (6-7), 669–70.
3. Campbell P.J., Green A.R. Mechanisms of Disease The Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med*. 2006 : 355, 2452–66.
4. Constantinescu S.N. JAK2 V617F : histoire et perspectives d'une nouvelle mutation. *Louvain médical*. 2008 : 127 (7), 243–246.
5. Knoops L. Reconnaître, classer et traiter les syndromes myéloprolifératifs BCR-ABL négatifs. *Louvain médical*. 2008 : 127 (7), 247–255.
6. Campregher P.V., Souza Santos F.P., Perini G. F., Hamerschlak N. Molecular biology of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012 : 34 (2), 150–5.
7. Lambert J.F., Duchosal M.A. Hématologie: Syndromes myéloprolifératifs – une kinase après l'autre. *Forum Med Suisse*. 2007 : 7, 11–13.
8. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 195 : 6 (4), 372–5.
9. Bories D., Devergie A., Gardembas-Pain M., Kuentz M., Legros L. *et al.* Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Hématologie*. 2003 : 9 (6), 497–512.
10. Najman A. Maladie de Vaquez. *EMC, Hématologie*. 2010 : 10, 1–14.
11. Roche-Lestienne C., Andrieux J. Cytogénétique et génétique moléculaire dans la myélofibrose avec métaplasie myéloïde et dans la polyglobulie de Vaquez. *Pathologie Biologie*. 2007 : 55, 49–55.
12. Papadakis E., Hoffman R., Brenner B. Thrombohemorrhagic complications of myeloproliferative disorders. *Blood*. 2010 : 24, 227–232.
13. Ciurea S.O., Merchant D., Mahmud N., Takefumi I., Yan Z. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007 : 110 (3), 986–93.
14. Marie-Caroline, Le Bousse-Kerdilès, Praloran V., Martyré M.C. La splénomégalie myéloïde : De données récentes à un modèle physiopathologique. *Hématologie*. 2002 : 8, 187–96.
15. Tefferi A., Thiele J., Vardiman J.W. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer*. 2009 : 115 (17), 3842–3847.

16. Xavier T. First contributors in the history of leukemia. *World Journal of Hematology*. 2013 : 2 (3), 62–70.
17. Nowell P., Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960 : 132, 1497–1498.
18. Rowley J.D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973 : 243, 290–293.
19. Bartram C.R., Klein A., Hagemeijer A., Agthoven T.V., Kessel G.V. *et al.* Translocation of c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelogenous leukemia. *Nature*. 1983 : 306, 277–280.
20. Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., Klein A., Bartram C.R., Grosveld G. Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, bcr, on Chromosome 22. *Cell*. 1984 : 36, 93–99.
21. Sawyers C.L. Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 1999 : 340 (17), 1330–1340.
22. Société Française d'Hématologie. Leucémie myéloïde chronique. *Hématologie*. 2007 : 13 (5), 328–30.
23. Chomel J.C., Sorel N., Mayeur-Rousse C., Turhan A.G. Les syndromes myéloprolifératifs : Immuno-analyse et biologie spécialisée. 2009 : 24, 69–85.
24. Deininger M.W.N., Druker B.J. Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib. *Pharmacol Rev*. 2003 : 55 (3), 401–23.
25. Cortes J.E., Silver R.T., Khoury H.J., Kantarjian H. Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Network*. 2013 : 1–15.
26. Sébahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. Arnette 2<sup>ème</sup> édition. 2005 : p 209– 210.
27. Djouadi-Lahlou K., Approche Epidémiologique Des Leucémies Aigues Myéloïdes En Algérie. *Revue d'hématologie*. 2009 : 18–20.
28. Lichtman M.A. Is There an Entity of Chemically Induced BCR-ABL–Positive Chronic Myelogenous Leukemia?. *The Oncologist*. 2008: 13, 645–654.
29. Goldman J.M., Melo J.V. Mechanisms of disease Chronic Myeloid Leukemia -Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med*. 2003 : 349, 1451–64.
30. Deininger M.W.N., Bose S., Gora-Tybor J. *et al.* Selective Induction of Leukemia-associated Fusion Genes by High-Dose Ionizing Radiation<sup>1</sup>. *Cancer Res*. 1998 : 58, 421–425.

31. Turhan A. Biologie de la protéine de fusion BCR-ABL : progrès récents. *Hématologie*. 2002 : 8 (1), 35–45.
32. Dine G., Rehn Y., Brahim S., Ammar N.A., Gaillard B., Bocq Y., Fumagalli G. Maladie résiduelle et leucémie myéloïde chronique : Immuno-analyse et biologie spécialisée. 2013 : 1, xxx–xxx.
33. Leguay T., Mahon F.X. Leucémie myéloïde chronique. *EMC-Hématologie*. 2005 : 2, 187–205.
34. Sirvent A., Benistant C., Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol. Cell*. 2008 : 100, 617–631.
35. Melo J.V., Goldman J.M. Hematologic Malignancies: Myeloproliferative Disorders. Springer. 2007 : p16–19, 23–27.
36. Hernández S. E., Krishnaswami M., Miller A.L., Koleske A.J. How do Abl family kinases regulate cell shape and movement?. *TRENDS in Cell Biology*. 2004 : 14 (1), 36–44.
37. Panjarian S., Jacob R.E., Chen S., Engen J.R., Smithgall T.E. Structure and Dynamic Regulation of Abl Kinases. *The journal of biological chemistry*. 2013 : 288 (8), 5443–5450.
38. Hantschel O., Nagar B., Guettler S., Kretschmar J., Dorey K., Kuriyan J., Superti-Furga G. A Myristoyl/Phosphotyrosine Switch Regulates c-Abl. *Cell*. 2003 : 112, 845–857.
39. Hantschel O., Superti-Furga G. Regulation of the c-ABL and BCR–ABL tyrosine kinases. *Nature*. 2004 : 5, 33–44.
40. Pendergast A.M. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Cancer Res*. 2002 : 85, 51–100.
41. Nagar B., Hantschel O., Young M.A., Scheffzek K., Veach D., Bornmann W., Clarkson B., Superti-Furga G. Structural Basis for the Autoinhibition of c-Abl Tyrosine Kinase. *Cell*. 2003 : 112, 859–871.
42. Nagar B., Hantschel O., Seeliger M., Davies J.M., Weis W.I., Superti-Furga G., Kuriyan J. Organization of the SH3-SH2 Unit in Active and Inactive Forms of the c-Abl Tyrosine Kinase. *Molecular Cell*. 2006 : 21, 787–798.
43. Chen S., O'Reilly L.P., Smithgall T.E., Engen J.R. Tyrosine Phosphorylation in the SH3 Domain Disrupts Negative Regulatory Interactions within the c-Abl Kinase Core. *JMB*. 2008 : 383, 414–423.
44. Xiaorong L., Xuan L., Guangfei W., Xiaohui Z., Xiuhua Q. *et al.* Non-receptor Tyrosine Kinases c-Abl and Arg Regulate the Activity of C/EBP $\beta$ . *JMB*. 2009 : 391, 729–743.
45. Yoshida K., Miki Y. Enabling death by the Abl tyrosine kinase: mechanisms for nuclear shuttling of c-Abl in response to DNA damage. *Cell Cycle*. 2005 : 4, 777–779.

46. Maiani M., Diederich M., Gonfloni S. DNA damage response: The emerging role of c-Abl as a regulatory switch? *Biochemical Pharmacology*. 2011 : 82, 1269–1276.
47. Gonfloni S. Modulating c-Abl nuclear activity as a strategy to preserve female fertility. *Cell Cycle*. 2010 : 9, 217–8.
48. Soussi T. Gène : BCR (breakpoint cluster region) - Catégorie : Oncogène. *Bulletin du Cancer*. 2000 : 87 (3), 22–930.
49. Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 : 96 (10), 3343–3356.
50. Quintá's-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of *bcr-abl1*-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 : 113 (8), 1619–1630.
51. Melo J.V., Deininger M.W.N. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *HematolOncolClin N Am*. 2004 : 18, 545– 568.
52. Neves H., Ramos C., da Silva M.G., Parreira A., Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation [comments]. *Blood*. 1999 : 93 (4),1197– 207.
53. Anastasi J., Moinuddin R., Daugherty C. The juxtaposition of ABL with BCR and risk for fusion may come at the time of BCR replication in late S-phase. *Blood*. 1999 : 94 (3), 1137– 8.
54. Saglio G., Storlazzi C.T., Giugliano E., Surace C., Anelli L., Rege-Cambrin G. *et al.* A 76-kb duplicon maps close to the BCR gene on chromosome 22 and the ABL gene on chromosome 9: possible involvement in the genesis of the Philadelphia chromosome translocation. *ProcNatlAcadSci USA*. 2002 : 99 (15), 9882 –7.
55. Cilloni D., Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res*. 2011 : 18(4), 1–8.
56. Bhatia R., Munthe H.A., VerfaillieC.M. Role of abnormal integrin-cytoskeletal interactions in impaired  $\beta 1$  integrin function in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Experimental Hematology*. 1999 : 27, 1384–1396.
57. Verfaillie C.M., Hurley R., Zhao R.C., Prosper F., Delforge M., Bhatia R. Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the BCR/ABL positive clone?. *J Lab Clin Med*.1997: 129 (6), 584–91.
58. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010 : 24, 1128–1138.
59. Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., ET Holt V., Silvennoinen O., O'Shea J. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biology*. 2004 : 5 (12), 1–6.

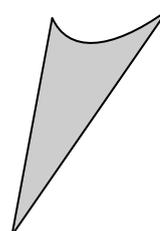
60. Wallace T.A., Sayeski P.P. Jak2 Tyrosine Kinase. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2006 : 44, 213–222.
61. Frenzel K., Wallace T.A., McDoom I., Xiao H. D., Capecchi M. R., Bernstein K. E., Sayeski P. P. A functional Jak2 tyrosine kinase domain is essential for mouse development. *Experimental Cell Research*. 2006 : 312, 2735–2744.
62. Pargade V., Darnige L., Gaussem P. Mutation acquise de la tyrosine kinase Jak2 et maladie de Vaquez. *Ann Biol Clin*. 2006 : 64 (1), 3–9.
63. Jatiani S.S., Baker S.J., Silverman L.R., Reddy E.P. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer*. 2011 : 1(10), 979–993.
64. Vainchenker W., Delhommeau F., Constantinescu S.N., Bernard O.A. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 : 118(7), 1723–1735.
65. Saharinen P., Vihinen M., Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 Tyrosine Kinase Is Dependent on Specific Regions in Its Pseudokinase Domain. *Molecular Biology of the Cell*. 2003 : 14, 1448–1459.
66. Kota J., Caceres N., Constantinescu S.N. Aberrant signal transduction pathways in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2008 : 22, 1828–1840.
67. Marie I., Hervé F. Mutation de la protéine kinase JAK2 au cours de la polyglobulie de Vaquez : nouvelles perspectives physiopathologiques et thérapeutiques. *La Revue de médecine interne*. 2006 : 27, 473–477.
68. Wadleigh M., Gilliland D.G. The JAK2 V617F Tyrosine Kinase Mutation in Myeloproliferative Disorders: Summary of Published Literature and a Perspective. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2006 : 1,75–80.
69. Huang L.J., Constantinescu S.N., Lodish H.F. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell*. 2001 : 8, 1327–1338.
70. He J., Zhang Y. Janus Kinase 2: An Epigenetic ‘Writer’ that Activates Leukemogenic Genes. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2010 : 2, 231–233.
71. Dawson M.A., Bannister A.J., Göttgens B., Foster S.D., Bartke T., Green A.R., Kouzarides T. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009 : 461 (7265), 819–22.
72. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C., Fourouclas N., Swantonet S. *et al*. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 : 365, 1054–61.
73. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., Ebert B.L., Wernig G., Huntly B.J.P. *et al*. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 : 7, 387–397.

74. James C., Ugo V., Le Couédic J.P., Staerk J., Delhommeau F. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 : 434, 1144–1148.
75. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 : 352(17), 1779–90.
76. Zhao R., Xing S., Li Z., Fu X., Li Q., Krantz S.B., Zhao Z.J. Identification of an Acquired JAK2 Mutation in Polycythemia Vera. *J Biol Chem*. 2005 : 280 (24), 22788–22792.
77. Scott L. M., Rebel V.I. JAK2 and genomic instability in the myeloproliferative neoplasms: A case of the chicken or the egg?. *American Journal of Hematology*. 2012 : 87,1028–1036.
78. Webersinke G., Rumpold H. Pathogenetic and clinical impact of JAK2 mutations in chronic myeloproliferative diseases. *Memo*. 2009 : 2, 89–93.
79. Staerk J., Kallin A., Royer Y., Diaconu C.C., Dusa A., Demoulin J.B., Vainchenker W., Constantinescu S.N. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors. *Pathologie Biologie*. 2007 : 55, 88–91.
80. Besancenot R., Pasquier F., Giraudier S. Actualités 2011 sur la physiopathologie des syndromes myéloprolifératifs classiques hors LMC (polyglobulie de Vaquez, thrombocytémie essentielle et myélofibrose primaire). *Revue Francophone Des Laboratoires*. 2011 : 433, 41–46.
81. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *JCI*. 2005 : 115(12), 3339–47.
82. Valentino L., Pierre J. JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical Pharmacology*. 2006 : 71, 713–721.
83. Walz C., Crowley B.J., Hudon H.E., Gramlich J.L., Neuberg D.S., Podar K., Griffin J.D., Sattler M. Activated Jak2 with the V617F Point Mutation Promotes G1/S Phase Transition. *The journal of biological chemistry*. 2006 : 281 (26), 18177–18183.
84. Bock O., Bu'sche G., Koop C., Schro'ter S., Buhr T., Kreipe H. Detection of the Single Hotspot Mutation in the JH2 Pseudokinase Domain of Janus Kinase 2 in Bone Marrow Trepine Biopsies Derived from Chronic Myeloproliferative Disorders. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2006 : 8 (2), 170–177.
85. Steensma D.P., Dewald G.W., Lasho T.L., Powell H.L., McClure R.F., Levine R.L., Gary Gilliland D., Tefferi A. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005 : 106 (4), 1207–1209.
86. Kramer A., Reiter A., Kruth J., Erben P., Hochhaus A. *et al.* JAK2-V617F mutation in a patient with Philadelphia chromosome- positive chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2007 : 8, 658–60.

87. Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 1987 : 162, 156-159.
88. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988 : 16 (3), 1215.
89. El andaloussi A., Hda N., Benslimane A. Le diagnostic moléculaire du chromosome Philadelphie par RT-PCR. *Biologie & Santé*. 2004 : 4(2), 1–10.
90. Etienne G., Mahon F.X. De la physiopathologie au développement de nouvelles thérapeutiques : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique. *John LibbeyEurotext - Bulletin du Cancer*. 2001 : 88(7).
91. Jelinek J., Oki Y., Gharibyan V., Bueso-Ramos C., Prchal JT. *et al.* JAK2 Mutation 1849G>T is Rare in Acute Leukemias but Can be Found in CMML, Philadelphia Chromosome-negative CML, and Megakaryocytic Leukemia. *Blood*. 2005 : 106, 3370–3.
92. Xiao Z., Zhang Y., Li L., Nie L., Yang L., Xu S. The Janus kinase 2 (*JAK2*) V617F mutation in Chinese patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2008 : 93(5), 787–788.
93. Hussein K., Bock O., Seegers A., Flasshove M., Henneke F. *et al.* Myelofibrosis evolving during imatinib treatment of a myeloproliferative disease with coexisting BCR-ABL translocation and JAK2V617F mutation. *Blood*. 2007 : 109, 4106–7.
94. Inami M., Inokuchi K., Okabe M., Kosaka F., Mitamura Y., Yamaguchi H. *et al.* Polycythemia associated with the JAK2V617F mutation emerged during treatment of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 2007 : 21,1103–4.
95. Mello Conchon M.R., Costa J.L., Novaes M.M.Y., Dorlhiac-Llacer P.E., Chamone D.A. F., Bendit I. Simultaneous detection of JAK2 V617F mutation and Bcr-Abl translocation in a patient with chronic myelogenous leukemia. *Int J Hematol*. 2008 : 88,243–245.
96. Nadali F., Ferdowsi S., Karimzadeh P., Chahardouli B., Einollahi N. *et al.* JAK2-V617F Mutation and Philadelphia Positive Chronic Myeloid Leukemia. *IJHOSCR*. 2009: 3(3), 43– 45.
97. Yokuş O., Kurnaz F., Balçık Ö. Ş., Uz B., Murat Albayrak. Coexistence of JAK2V617F mutation and BCR/ABL translocation in one patient. *J ClinExp Invest*. 2010 : 1(2), 138–140.
98. Tefferi A., Levitt R., Lasho T.L., Knudson R.A., Ketterling R.P. Postimatinib therapy emergence of a new JAK2V617F clone and subsequent development of overt polycythemia vera in a patient with chronic myelogenous leukaemia. *Eur J Haematol*. 2010 : 85, 86–87.
99. Pieri L., Spolverin A., Scappini B., Occhini U., Birtolo S. *et al.* Concomitant occurrence of BCR-ABL and JAK2V617F mutation. *Blood*. 2011 : 118, 3445–3446.

100. Payande M., Zare M.E., Haji Shure S.G., Zadeh F.S. JAK2-V617F Mutation Combined with Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myeloid Leukemia: a Case Report. *IJHOSCR*. 2011: 5 (2), 34–37.
101. Inokuchi K., Yamaguchi H., Tamai H., Dan K. Disappearance of both the BCR/ABL1 fusion gene and the JAK2V617F mutation with dasatinib therapy in a patient with imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia. *J ClinExpHematol*. 2012 : 52(2), 145–7.
102. Abd Ali AL- Kaabi M.H., Yaseen Al-Obaidy Y.G., Sabir S.F., Safi AL- Kadmy I.M. Incidence of JAK2 V617F mutation in Iraqi patients with Philadelphia positive CML. *Mintage journal of Pharmaceutical & Medical Sciences*. 2013 : 2 (4), 10–12.
103. Pastore F., Schneider S., Christ O., Hiddemann W., Spiekermann K. Impressive thrombocytosis evolving in a patient with a BCR/ABL positive CML in major molecular response during dasatinib treatment unmasks an additional JAK2V617F. *ExpHematolOncol*. 2013 : 2(24), 1–5.
104. Xu W., Chen B., Tong X. Chronic myeloid leukemia patient with co-occurrence of BCR-ABL junction and JAK2 V617F mutation. *Int J Hematol*. 2014 : 99(1), 87–90.

# Annexes





EDTA 10 mM (BIOCHEM Chemopharma, Quebec)

Ethanol à 70% (SIGMA-ALDRICH, Germany)

Isopropanol (BIOCHEM Chemopharma, Quebec)

Na Cl saturé à 6 M (BIOCHEM Chemopharma, Quebec)

Solution de lyse des globules rouges (GR) (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM ; NaHCO<sub>3</sub> 12 mM ; EDTA 0,1 mM)

Solution de lyse des globules blancs (GB) (Tris 10 mM à pH=7,4 ; EDTA 100 mM ; Na Cl 50 mM)

Tris 10 mM, pH=7,4 (BIOCHEM Chemopharma, Quebec)

TRIZol (Invitrogen, France)

Amorces 10 µM (Eurogentec, France)

dNTPs 10 mM et 2 mM (Fermentas, Spain)

Enzyme de restriction ***Bsa*XI** 2000 U/ml (New England Biolabs, UK)

Hexamères 0,2 µg/µl (Fermentas, Spain)

Marqueur de poids (1 Kb, 100 pb DNA Ladder, Euromedea)

Oligo (dT) primers 0,5 µg/µl (Fermentas, Spain)

Protéinase K 20 mg/ml (Invitrogen)

Reverse transcriptase 200 U/µl (Fermentas, Spain)

Ribonucléase inhibiteur 20 U/µl (Fermentas, Spain)

Reaction buffer 5X (Fermentas, Spain)

*Taq* polymerase 5 U/µl (New England Biolabs, UK)

Tampon de PCR (New England Biolabs, UK)

Tampon de restriction n°4 (New England Biolabs, UK)

Tampon TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA)

**Année Universitaire : 2013-2014**

**Présenté par : BENGUERAICHI Fatiha**

**Analyse mutationnelle du gène JAK2 V617F et son association potentielle à la translocation BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magistère en Biologie Appliquée**

**Résumé**

LMC est une hémopathie clonale maligne de cellules souches pluripotente hématopoïétiques, caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire dans le sang périphérique et marqué l'hyperplasie myéloïde dans la moelle osseuse. Le chromosome Philadelphie est l'anomalie chromosomique la plus importante qui a été décrite dans la LMC. Cette translocation a été caractérisée, au niveau moléculaire, par les transcrits de fusion générés par les différents types de configurations du gène hybride BCR-ABL. Ces transcrits de fusion sont analysés par PCR à partir de l'ARNm après une étape de transcription inverse (RT-PCR).

Il y a un nombre croissant de cas de patients atteints de LMC, qui ont développés la mutation JAK2 V617F, une mutation ponctuelle acquise au sein du gène JAK2, au cours de l'évolution de la maladie.

Dans notre étude, nous avons entrepris l'optimisation et la validation des techniques de RT-PCR et PCR-RFLP, afin d'améliorer le diagnostic, faciliter ainsi le suivi de la maladie et, par conséquent, diriger la thérapeutique. Aussi, de rechercher d'éventuelle coexistence de la mutation JAK2 V617F et la translocation BCR- ABL chez ces patients.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence les différents types de transcrits BCR-ABL au sein d'une population Algérienne, atteints de LMC en phase chronique, qui sont les transcrits b3a2 et b2a2, et nous avons constaté que le transcrit b3a2 est plus fréquent que le transcrit b2a2 et l'absence du transcrit e1a2. Cependant, vu le nombre restreint d'échantillons de LMC considéré dans cette étude, les résultats obtenus n'ont pas permis d'en tirer des conclusions sur la concomitance des deux anomalies génétiques, JAK2 V617F et BCR- ABL, chez un patient atteint de LMC.

**Mots clés :** LMC, mutation JAK2-V617F, translocation BCR-ABL, RT-PCR, PCR-RFLP.

**Encadré par : Dr BOURAS Mourad**