



## LA MUTATION JAK2 V617F DANS LE DIAGNOSTIC DE LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ DANS UNE COHORTE DE PATIENTS BÉNINOIS

S. AZONBAKIN<sup>1</sup>, B AWEDE<sup>2</sup>, B HOUSSOU<sup>3</sup>, R. MASSI<sup>3</sup>, M ADJAGBA<sup>1</sup>, L. ANANI<sup>3</sup>, R. DARBOUX<sup>1</sup>, GANGBO F<sup>1</sup>, A. LALEYE<sup>1</sup>

- 1- Laboratoire d'Histologie-Biologie de la Reproduction-Cytogénétique et Génétique Médicale, Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou- Bénin
- 2- Unité de Physiologie, Faculté des Sciences de la Santé - Cotonou
- 3- Service des Maladies du Sang, Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoucou Maga de Cotonou

Correspondant : Dr AZONBAKIN Simon Médecin Biologiste Laboratoire d'Histologie Biologie de la Reproduction, Cytogénétique et Génétique Médicale Tel : 00229 97 13 00 61

E-mail : [simon.azonbakin@fss.uac.bj](mailto:simon.azonbakin@fss.uac.bj) / [azandeg@yahoo.fr](mailto:azandeg@yahoo.fr)

### RESUME

La découverte en 2005 de la mutation V617F du JAK2, responsable d'une hypersensibilité des pré-curseurs hématopoïétiques aux facteurs de croissance, est une avancée importante dans la compréhension des syndromes myéloprolifératifs. Elle a amené l'OMS à réviser en 2008 les critères de diagnostic de la polyglobulie de Vaquez (PV) en y incluant ce marqueur moléculaire comme critère majeur de diagnostic. Notre étude s'est intéressée aux mutations JAK2 V617F et à l'utilité du score de l'OMS dans le diagnostic de la PV au sein d'une cohorte de patients béninois.

L'étude a porté sur 43 patients. la mutation a été détectée par PCR ARMS. Les critères diagnostiques de la PV selon l'OMS ont été revus.

L'incidence de la mutation V617F JAK2 dans la PV est de 13%. Le score de l'OMS n'est pas applicable à l'ensemble de nos patients. La faible prévalence de la mutation dans notre cohorte nous amène à émettre l'hypothèse de la prédominance d'anomalies moléculaires autres que la mutation JAK2 V617F dans notre population.

**Mots clés:** JAK2 V617F, Polyglobulie de Vaquez, Syndromes myéloprolifératifs

### ABSTRAT

The discovery in 2005 of the JAK2 V617F mutation, responsible for hypersensitivity of hematopoietic precursors to growth factors, is an important advance in the understanding of myeloproliferative syndromes. In 2008, WHO revised the criteria for the diagnosis of Vaquez polyglobulia (PV) by including this molecular marker as a major diagnostic criterion. Our study looked at the JAK2 mutations V617F and the usefulness of the WHO score in the diagnosis of PV in a cohort of Beninese patients.

The study involved 43 patients. The mutation was detected by ARMS PCR. The diagnostic criteria for PV according to WHO were reviewed.

The incidence of the V617F JAK2 mutation in the PV is 13%. The WHO score is not applicable to all of our patients. The low prevalence of the mutation in our cohort leads us to hypothesize the predominance of molecular anomalies other than the JAK2 V617F mutation in our population.

**Key words:** JAK2 V617F, Vaquez polycythemia, Myeloproliferative syndrome

### INTRODUCTION

Les néoplasmes myéloprolifératifs chroniques (NMP), plus connus sous le terme de syndromes myéloprolifératifs (SMP), ont été décrits pour la première fois en 1951 par William Dameshek [1]. Ils 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 telles que la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocythémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive

(MFP) mais également la mastocytose systémique, la leucémie chronique à éosinophiles non caractérisée, la leucémie à polynucléaires et les néoplasmes myéloprolifératifs inclusibles [2].

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée la plupart du temps par la présence du chromosome Philadelphie, produit de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 [t (9 ; 22) (q34 ; q11)] [3]. Cette fusion des gènes, BCR et ABL aboutit à la synthèse d'une protéine chimère à activité tyrosine kinase constitutive. La LMC est une entité clinico-biologique homogène dont le pronostic a été radicalement amélioré grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase. Les

autres SMP représentent un ensemble hétérogène de syndromes, regroupés sous le terme de néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif. Si la LMC a pu bénéficier très tôt d'un marqueur cytogénétique, puis moléculaire, aucune anomalie cytogénétique récurrente n'avait été mise en évidence jusqu'au début des années 2000 dans la PV, la Thrombocy-témie Essentielle et la Myélofibrose Primitive.

En 2005, la découverte de la mutation JAK2 V617F par différents groupes indépendants a largement modifié le diagnostic et la stratification des NMP Ph- [4,5]. La découverte de la mutation JAK2 V617F a complètement modifié le diagnostic des PV et permet désormais, non seulement une meilleure compréhension des voies métaboliques conduisant à la pathologie, mais aussi le développement d'une thérapie moléculaire ciblée associée à un suivi moléculaire performant. Dans ce contexte, les critères de diagnostic des SMP Ph- ont été revus par l'OMS tenant compte de la prévalence de la mutation V617F de JAK2 et d'autres anomalies moléculaires (MPL, JAK2 exon12 [2]).

Le diagnostic de la PV se base sur des critères majeurs (élévation du taux d'Hémoglobine/ Hématocrite, Présence de la mutation JAK2 V617F ou d'autres mutations similaires) et des critères mineurs (hyperplasie érythroïde à la biopsie médullaire, pousse spontanée des précurseurs érythroïde lors de la culture et taux d'érythropoïétine bas ou normal).

Notre étude a pour buts de rechercher la fréquence de la mutation JAK2 V617F dans une cohorte de patients atteints de Polyglobulie de Vaquez et d'évaluer l'applicabilité des différents critères de l'OMS sur une population de patients béninois atteints de PV. Ce travail n'ayant pas encore été réalisé dans la popula-

tion béninoise, sa mise en œuvre permettra d'évaluer les scores clinico-biologiques des praticiens dans les syndromes myéloprolifératifs.

## PATIENTS ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective à visée descriptive qui s'est déroulée de Janvier à Juillet 2015. Tous les patients chez qui le diagnostic de Polyglobulie de Vaquez (PV) est posé au Service des Maladies du Sang du Centre National Hospitalier et Universitaire HKM de Cotonou ont été recrutés. Ont été inclus les patients porteurs de syndrome myéloprolifératif évocateur d'une PV ayant une échographie abdominale normale et n'ayant pas séjourné récemment en zone d'altitude.

Le diagnostic de polyglobulie de Vaquez a été établi sur la base des critères de l'OMS : le critère majeur de polyglobulie a été considéré comme respectant les critères de l'OMS 2008 si l'hémoglobine et/ou l'hématocrite était supérieure aux valeurs seuils imposées par cette classification en fonction du sexe (18,5g/dl chez l'homme et 16,5g/dl chez la femme). Cette augmentation de l'hémoglobine et/ou de l'hématocrite a été suivie par la réalisation d'un myélogramme.

L'ADN génomique a été extrait par la méthode phénol-chloroforme à partir de 5 ml de sang prélevé chez les patients. La recherche de mutations dans le gène JAK2V617F est basée sur une amplification des fragments par PCR de type ARMS (Amplification Refractory Mutation System) comme décrit par Jones et al pour la détection des mutations ponctuelles [6]. (La séquence des amorces utilisées est détaillée dans le tableau 1).

**Tableau 1** : séquence des amorces utilisées pour la PCR

(FO=forward outer RO=reverse outer, FWT= forward wild type (normal), RMT = reverse mutant).

FO JAK2	FAM-TCC TCA GAA CGT TGA TGG CAG	Amorce « externe »
FWT JAK2	FAM-GCA TTT GGT TTT AAA TTA TGG AGT ATa TG	Amorce spécifique normal
RO JAK2	ATT GCT TTC CTT TTT CAC AAG AT	Amorce « externe »
RMT JAK2	GTT TTA CTT ACT CTC GTC TCC ACA Aaa	Amorce spécifique muté

Le mélange réactionnel de 25 µl est reconstitué à partir de tampon Gold 10X (5 µl), de chlorure de magnésium 25 m M (2,5 µl), d'un mélange de désoxyribonucléotides (d NTP 2,5n M) 0,7 µl, de la Taq Gold polymérase 5UI (0,5µl), du primers Mix (0,8 µl) et de l'eau distillée (13 µl) et de 2,5 µl d'ADN ng/µL. Un thermocycleur (SimplAmp<sup>R</sup>, Lifes Sciences, USA, ) a été utilisé selon le pro-

gramme d'amplification suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, 29 cycles d'amplification (avec pour chaque cycle 94°C pendant 45 s, 62°C pendant 90 s, 65°C pendant 25 s, 65°C pendant 30 s) et 10° à l'infini. La lignée érythro-leucémique HEL est utilisée comme contrôle positif de la présence de la mutation JAK2V617F. L'ADN de sujets normaux connus sert de témoin d'absence de

mutation. Un blanc constitué d'eau atteste de l'absence de contamination croisée. La séparation des fragments d'ADN est obtenue après électrophorèse en gel d'agarose à 1.5% en tampon Tris/Acétate/EDTA (TAE) 1 X pendant 30 minutes et à 50V. Le gel est ensuite révélé au moyen d'un transilluminateur à lampe UV (Vulbert Loumart) muni d'une caméra et d'un écran LCD.

## RESULTATS

Au cours de la période allant de Janvier à Juillet 2015, nous avons colligé 43 cas de Polyglobulie de Vaquez cliniquement diagnostiqués. L'âge moyen des patients est de 47,38 ans avec des extrêmes de 30 et 73 ans. Il y a 10 femmes pour 33 hommes, donc le sexe ratio de 3.30 en faveur des hommes.

Le diagnostic de la PV est le plus souvent évoqué devant des manifestations cliniques; mais parfois il s'agit d'une découverte fortuite dans le cadre d'une numération formule sanguine effectuée dans la prise en charge d'un syndrome infectieux. Pour éliminer toute polyglobulie d'origine secondaire, l'échographie abdominale a été réalisée chez tous les patients confirmant d'une part la présence d'une splénomégalie souvent absente dans la polyglobulie secondaire et l'absence de lésions rénales pouvant expliquer une polyglobulie secondaire d'autre part.

La numération formule sanguine réalisée chez tous les patients a montré outre l'augmentation de l'hémoglobine et de l'hématocrite, une variation importante des paramètres sanguins. Le tableau 2 résume les variations des paramètres sanguins chez l'ensemble de nos patients.

**Tableau 2:** Caractéristiques biologiques des patients PV

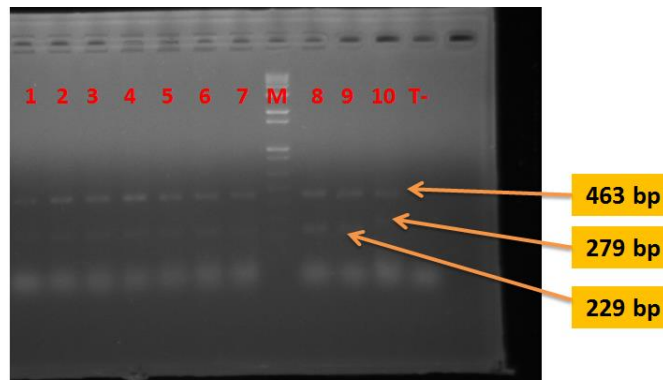
Paramètres biologiques	Moyenne (Ecart)	Valeurs normales (adulte)
Hémoglobine (g/dl)	20.07 (± 1,7)	Homme : 12-16 Femme : 11.5-15
Hématocrite (%)	61.16 (± 6,8)	Homme : 35-53 Femme : 35-45
Plaquettes 10 <sup>9</sup> /ml	594 (± 293)	150-450
Leucocytes 10 <sup>9</sup> /ml	12.2 (± 5.7)	4- 10

Par ailleurs, le myélogramme réalisé chez tous les patients a montré une hyperplasie des 3 lignées myéloïdes prédominant dans la lignée érythroïde.

La recherche de la mutation JAK2 V617 F par PCR ARMS utilisant 4 couples d'amorces a

permis de mettre en évidence la mutation chez 6 patients/43 soit un pourcentage de 13%.

La figure 1 illustre les résultats de quelques patients. (Profil électrophorétique du gel d'agarose après amplification par PCR ARMS)



**Figure 1:** Profil électrophorétique du gel d'agarose après amplification par PCR ARMS

L'analyse du gel révèle que : les patients 1 à 9 possèdent la bande à 463 paires de bases (pb) et une seule bande à 229 pb. Ils portent donc la forme normale non mutée du gène JAK2. Par contre le patient 10 porte une bande à 463 pb et une autre bande à 279 pb. Ce patient est donc porteur de la mutation JAK2 V617F. La bande à 463 bp est le témoin interne de l'amplification présent chez tous les patients. Les patients positifs pour la mutation sont homozygotes puisqu'ils ne portent que les bandes à 463 pb et à 279 pb. (Le tableau 3 résume les résultats de PCR pour l'ensemble de nos patients)

**Tableau 3 :** Récapitulatif des résultats de PCR pour l'ensemble des patients

Statut mutationnel	Effectif	Pourcentage (%)
Positif	6	13
Négatif	37	87
<b>Total</b>	<b>43</b>	<b>100</b>

En confrontant les données biologiques aux critères de l'OMS, un seul critère majeur (Hémoglobine/Hématocrite) a été retrouvé chez tous les patients de cette étude. La détection de la mutation JAK2 V617 F, 2<sup>ème</sup> critère majeur, n'est applicable qu'à 6 patients. S'agissant des critères mineurs, seul le médullogramme a permis de mettre en évidence une hyperplasie cellulaire de la lignée myéloïde (tableau 4).

**Tableau 4:** critères de l'OMS appliqués à l'ensemble des patients PV

<b>Critères OMS</b>	Hémoglobine/Hématocrite	HB $\geq$ 16.5 g/dl chez les femmes Et $\geq$ 18.5 g/dl chez les hommes
	Volume Globulaire	Non fait
<b>majeurs</b>	JAK2 V617F	Positif chez 6 patients/ 43
	Biopsie ostéoméduculaire	Hyperplasie de la lignée érythroïde
<b>mineurs</b>	Culture cellulaire	Non fait
	Dosage d'érythropoïétine	Non fait

## DISCUSSION

La maladie de Vaquez ou polyglobulie primitive ou « polycythemia vera » en anglais (PV) est un syndrome myéloprolifératif résultant de l'expansion clonale d'une cellule-souche hématopoïétique pluripotente, à l'origine d'une prolifération non régulée du tissu myéloïde prédominante sur la lignée érythrocytaire [2,7]. Son incidence est variable selon les auteurs et les années. Pour notre cohorte de patients, l'absence de registre sur la PV comme sur d'autres SMP ne permet pas de calculer la prévalence de la maladie. C'est seulement la LMC qui est bien enregistrée dans le cadre du programme GIPAP ( Glivec International Patient Assistance Programs ) [8].

Le sex ratio de 3.3 en faveur des hommes mériterait d'être confirmé sur des séries beaucoup plus larges avec un long suivi. Toutefois, globalement les facteurs ethniques et les pesanteurs socio-culturelles rendant particulièrement difficiles l'accès aux soins des femmes béninoises pourraient expliquer le sex ratio en faveur du sexe masculin observé dans beaucoup de pathologies.

La découverte en 2005 de la mutation JAK2 V617F a permis une classification exhaustive des SMP. Si Jun Xu et al [9] en Chine ont rapporté la plus faible prévalence de mutation JAK2 V617F dans les SMP (50%), la plupart des travaux réalisés en populations caucasiennes et asiatiques font état d'une prévalence comprise entre 70 et 97% selon les auteurs et la technique utilisée [2, 6, 10].

L'étude de Benmoussa et al en 2011 au Maroc, a rapporté une prévalence de 89.47% de la mutation JAK 2 V617F [10]. A notre connaissance, des données de la littérature rapportant la prévalence de la mutation JAK2

V617 F en population mélanoderme africaine ne seraient pas disponibles à ce jour. Dans notre étude, 6 des 43 patients soit 13% avaient une mutation homozygote JAK2 V617F. Cette faible prévalence dans notre série de la mutation qui pourtant est un critère majeur de diagnostic de la PV selon l'OMS, pourrait être due à la prépondérance dans notre population d'anomalies moléculaires autres que JAK2 V617F. Les particularités phénotypo-génotypiques à cause des variations génétiques entre les individus et les ethnies sont également évoquées par certains auteurs. [11]

Nous avons utilisé une technique de PCR ARMS bien décrite pour la détection des mutations ponctuelles dans la recherche de mutations du gène JAK2V617F. Cette technique donne différentes bandes selon le type de mutation et présente l'intérêt d'inclure un témoin positif d'amplification (bande à 463 pb). En cas de mutation homozygote, les amorces extérieures et l'amorce anti-sens mutée se fixeront sur l'ADN. Cependant, l'amorce spécifique de l'allèle sauvage s'hybridera mal à l'extrémité 3', empêchant ainsi l'action de la Taq polymérase. L'amplification produira alors 2 types de fragments, l'un de 279 pb et le second de 463 pb correspondant aux amorces extérieures.

A l'inverse, en absence de la mutation JAK2V617F, le mésappariement entre la base à l'extrémité en 3'et l'amorce anti-sens muté gênera l'amplification. Seules les amorces extérieures et l'amorce sens sauvage se fixeront et seront répliquées. Deux types de fragments seront créés, l'un de 463 pb, l'autre correspondant à l'allèle sauvage de 229 pb. Lorsque seule une partie des cellules présente la mutation, on obtient les 3 bandes d'amplification (463, 279, 229) [6,12].

Bien qu'il existe plusieurs techniques de détection de la mutation JAK2V617F différentes quant à leur sensibilité (séquençage, ou PCR allèle spécifique...) l'OMS n'impose aucune recommandation préanalytique et ne donne aucune recommandation préanalytique s'agissant de leur réalisation sur sang total ou sur la population granuleuse [2]. Le séquençage moins sensible que la PCR allèle spécifique que nous avons utilisée, a l'avantage de pouvoir détecter d'autres mutations rares de l'exon 14 (L611V, D620E...) [13,14]. Nous postulons d'ailleurs qu'une prédominance éventuelle de ces mutations dites rares dans notre population pourrait être à la base de la faible prévalence de la mutation JAK2V617F chez nos patients.

Avec l'introduction de la recherche de la mutation JAK2V617F en pratique de routine, les critères de l'OMS 2008 ont simplifié le diagnostic de polyglobulie de Vaquez. Ainsi, le diagnostic positif de la maladie n'est plus avant tout un diagnostic d'exclusion d'une polyglobulie secondaire. Cependant, la présence de la mutation JAK2V617F n'est pas spécifique de la maladie de Vaquez puisqu'elle est retrouvée dans d'autres hémopathies notamment d'autres SMP Ph- [2, 7,15].

Selon l'OMS, trois critères doivent être présents pour affirmer le diagnostic de PV : soit deux critères majeurs associés à un critère mineur soit un critère majeur combiné à deux critères mineurs [2]. Du point de vue de l'applicabilité de ces critères OMS à nos 43 patients étiquetés PV, seuls 6 soit 13% répondent à deux critères majeurs et à un critère mineur. Mais pour les 37 patients restants, un seul critère majeur (Hémoglobine/hématocrite) et un seul critère mineur (médullogramme) sont retrouvés. Il faut noter que la majorité de nos patients présentait un taux d'hémoglobine/hématocrite légèrement supérieur aux valeurs seuils indiquées par l'OMS. La réalisation des autres items des critères mineurs à savoir le taux d'érythropoïétine, la pousse spontanée des progéniteurs érythrocytaires lors de la culture ainsi que la mesure de la masse globulaire érythrocytaire ne sont pas encore accessibles au Bénin.

Au total, il se dégage chez tous nos patients une association constante d'une splénomégalie typique dans la polyglobulie primaire, d'un taux d'hémoglobine/hématocrite supérieur aux normes de l'OMS et d'une hyperplasie de la lignée érythroïde retrouvée au médullogramme. Nous postulons, à condition de leur réalisation par un biologiste agréé et expérimenté, l'association du taux d'hémoglobine/hématocrite au médullogramme dans un contexte clinique marqué par une splénomégalie devrait faire évoquer de diagnostic de polyglobulie de Vaquez.

## CONCLUSION

La mutation JAK2 V617F est de découverte récente et son implication dans la pathogénie des SMP est actuellement confirmée. Notre étude s'est intéressée au statut mutationnel JAK2V617F par PCR ARMS et à l'évaluation de l'utilité du score de l'OMS dans le diagnostic de la Polyglobulie de Vaquez chez 43 patients mélanodermes africains. L'incidence de la mutation JAK2V617F n'est que de 13% chez ces patients diagnostiqués PV. Le score de l'OMS n'est pas applicable, les patients positifs porteurs de la mutation JAK2 V617F présen-

tent quelques particularités cliniques qu'il est important de mieux étudier dans une cohorte plus importante.

## REFERENCES

- 1 Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951. 6:372-5
- 2- Tefferi A, and Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*.2008; 22:14-22.
- 3- Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-3
- 4- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434: 1144-8
- 5- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365: 1054-61
- 6- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005.sept15;106(6) :2162-8
- 7- Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood* 2008; 112: 2190-8
- 8- Glivec International Patient Assistance Programs (GIPAP) . [www.gipap.com](http://www.gipap.com)
- 9- Xia, Mi-ze Lu, Yuan-qiang Jiang, Guo-hua Yang, Yun Zhuang, Hong-li Sun, Yun-feng Shen. JAK2 V617F, MPL W515L and JAK2 Exon 12 Mutations in Chinese Patients with Primary Myelofibrosis *Chin J Cancer Res* 2012. 24(1):72-76.
- 10- Benmoussa A, Dehbi H, Fehri S, Quessar A, Nadifi S. La mutation V617F du gène JAK2 chez les malades de syndromes myéloprolifératifs au Maroc : contribution au diagnostic et perspectives thérapeutiques. *Pathologie Biologie* 2011. Aug ;59(4) :e89-92.doi10.1016/j.patbio.2009.06.005
- 11- Pardanani A, Fridley BL, Lasho TL, Gilliland DG, Tefferi A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111:2785—9.
- 12- Chen Q, Lu P, Jones AV, Cross NC, Silver RT, Wang YL. Amplification refractory mutation system, a highly sensitive and simple polymerase chain reaction assay, for the detection of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn* 2007;9:272—6
- 13- Cleyrat C, Jelinek J, Girodon F, Boissinot M, Ponge T, Harousseau JL, et al. JAK2 mutation and disease phenotype: a double L611V/V617F in cis mutation of JAK2 is associated with isolated erythrocytosis and increased activation of AKT and ERK1/2 rather than STAT5. *Leukemia*.2010. May;24(5):1069-73
- 14- Grunebach F, Bross-Bach U, Kanz L, Brossart P. Detection of a new JAK2 D620E mutation in addition to V617F in a patient with polycythemia vera. *Leukemia*. 2006 Dec;20(12):2210-1.
- 15- Chomel J.-C., Sorel N., Mayeur-Rousse C., Turhan A.G. Les syndromes myéloprolifératifs. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2009) 24, 69—85.