

JAK2 (RECHERCHE DE LA MUTATION)

DEFINITION - BIOPATHOLOGIE

En 2005, la découverte de la mutation *JAK2*, *Janus Tyrosine Kinase 2*, a bouleversé la compréhension physiopathologique des syndromes myéloprolifératifs (SMP) hors leucémie myéloïde chronique (LMC).

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont caractérisés par une prolifération clonale des cellules souches hématopoïétiques myéloïdes pouvant se traduire cliniquement par une atteinte prédominante sur une ou plusieurs lignées myéloïdes (érythroblastique, granuleuse et/ou mégacaryocytaire).

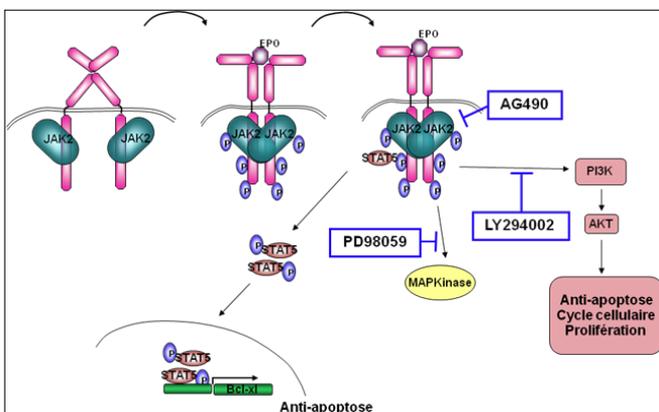
La classification de ces SMP a été révisée en 2008 par l'Organisation Mondiale de la Santé sur 2 critères :

- la caractérisation de marqueurs moléculaires de clonalité avec la détermination des transcrits *BCR-ABL* et de la mutation *JAK2 V617F*;
- l'introduction de nouveaux critères histologiques pour les SMP inclassables.

Si la présence du transcrit *BCR-ABL* est spécifique de la leucémie myéloïde chronique, la mutation *JAK2 V617F* semble être un marqueur déterminant pour plusieurs entités cliniques puisqu'elle est retrouvée dans la polyglobulie de Vaquez, la thrombocythémie essentielle et l'ostéomyélobiose.

- Mutation *JAK2* et SMP

Janus kinase 2 (JAK2) est une protéine de type tyrosine kinase impliquée dans plusieurs voies de signalisation (*JAK-STAT*), notamment celle de la prolifération cellulaire de l'hématopoïèse. *JAK2* est lié aux récepteurs de la famille des cytokines, ceux-ci pouvant être activés par des cytokines et des facteurs de croissance, tels que l'EPO-R, TPO-R, GM-CSF-R, GH-R, PRL-R.



D'après *Ann Biol Clin* 2006 ;64 ;1.

La présence d'une mutation ponctuelle dans l'exon 14 du gène *JAK2* est à l'origine de la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 617 (*V617F*). Cette mutation régule négativement l'activité kinase de la protéine *JAK2* et confère une hypersensibilité et une indépendance des progéniteurs hématopoïétiques aux cytokines.

Du point de vue clinique, cette mutation a une prévalence de 80 à 97 % dans les polyglobulies de Vaquez (PV) et est retrouvée dans plus de 50 % des cas de thrombocythémies essentielles (TE) et d'ostéomyélobioses (ou myélobioses primitives = *primitive myelofibrosis* ou PMF).

Bien que cette mutation ne soit pas spécifique du diagnostic des SMP, sa détermination reste un outil diagnostique important, comme le démontrent les nouveaux algorithmes décisionnels proposés récemment dans de la classification des pathologies myéloïdes par l'OMS.

- Mutations *JAK2* exon 12 dans les SMP et mutations *MPL*

Dans 5 % des PV *JAK2 V617F* négatives, de nouvelles mutations ont été décrites au niveau de l'exon 12 du gène *JAK2*. Des corrélations ont été établies entre la présence de ces mutations et le tableau clinique des PV démontrant une prolifération préférentielle de la lignée érythroblastique.

En 2006, une nouvelle mutation dans le domaine transmembranaire du gène *MPL* (codant le récepteur transmembranaire de la thrombopoïétine (TPO)) a été impliquée dans les SMP *JAK2 V617F* négatifs. Cette mutation est localisée dans codon 515 du domaine transmembranaire et aboutit à la substitution d'une leucine ou d'une lysine par le tryptophane (*MPLW515L/K*).

La conséquence de cette mutation est l'activation d'une voie de signalisation indépendante de la voie *JAK2*.

Ces mutations sont retrouvées dans 1 à 2 % des TE et dans 5 à 9 % des ostéomyélobioses avec une expansion préférentielle de la lignée plaquettaire et une myélobiose.

- Critères diagnostiques selon l'OMS pour les SMP

L'OMS a défini une série de critères majeurs et/ou mineurs pour évoquer le diagnostic de la polyglobulie de Vaquez, de la thrombocythémie essentielle et de l'ostéomyélobiose.

La présence de la mutation *JAK2 V617F* est un critère majeur pour le diagnostic de ces trois entités.

- Diagnostic de la polyglobulie de Vaquez

Sont requis :

2 critères majeurs et 1 critère mineur ou 1 critère majeur et 2 critères mineurs.

Critères majeurs

- Hb \geq 18,5 g/dl chez l'homme ou \geq 16,5 g/dl chez la femme ou augmentation de la masse globulaire.
- Mutation *JAK2 V617F* ou mutation *JAK2* exon 12.

Critères mineurs

- Hyperplasie myéloïde sur la biopsie ostéomédullaire (BOM).
- Concentration sérique d'EPO basse.
- Pousse spontanée *in vitro* de progéniteurs érythroïdes.

- Diagnostic d'ostéomyélobiose

Les 3 critères majeurs et les 2 critères mineurs sont requis pour le diagnostic.

Critères majeurs

- Fibrose médullaire diffuse sur la BOM.
- Pas de critères en faveur d'un autre SMP ou d'un syndrome myélodysplasique (SMD).
- Présence de la mutation *JAK2V617F* ou d'un autre marqueur clonal tel que *MPLW515L/K*.

Critères mineurs

- Augmentation des leucocytes et/ou Hb élevée
- Concentration sérique en LDH élevée.
- Anémie.
- Splénomégalie.

- Diagnostic de thrombocytémie essentielle

Les 4 critères suivants seront retenus pour le diagnostic :

- Augmentation persistante des plaquettes \geq 450 x 10⁹/l.
- Prolifération mégacaryocytaire prédominante sur la BOM.
- Pas d'autres critères de SMP.
- Présence de la mutation *JAK2V617F* ou d'un autre marqueur clonal. En l'absence de marqueur de clonalité, absence d'argument en faveur d'une thrombocytose réactionnelle.

Par ailleurs, la mutation *JAK2 V617F* est également décrite dans environ 60 % des syndromes de Budd-Chiari (thrombose des veines sus-hépatiques). La recherche de cette anomalie génétique peut donc être proposée dans le cadre de bilan de thrombose.

médicale Biomnis en ligne pour les conditions de prélèvement et conservation-transport.

NB : joindre impérativement les résultats de la NFS.

METHODES DE DOSAGE

Le principe technologique est fondé sur la PCR en temps réel quantitative (RQ-PCR). Cette technique permet la discrimination allélique grâce à l'utilisation, d'une part de 2 amorces sens, dites de diagnostic, au niveau 5', correspondant respectivement aux allèles sauvage et muté V617F, et d'une amorce 3' commune. L'amplification PCR se produit uniquement lorsque les amorces et la cible sont complémentaires à 100 %. Dans le cas contraire, l'amplification PCR ne peut se réaliser. Cette technique utilise également une sonde fluorescente commune aux allèles sauvage et muté. L'utilisation d'une sonde d'hydrolyse commune pour les deux allèles (sauvage et muté) possédant respectivement un « reporter » en 5' et un « quencher » en 3' permet l'analyse RQ-PCR. L'hydrolyse de la sonde se fait grâce à l'activité 5'>3' exonucléase de la Taq polymérase. En absence de la séquence cible (pas d'amplification PCR), la sonde reste intacte, la proximité entre les deux molécules (le reporter et le quencher) empêchant l'émission de la fluorescence du reporter. En présence de la séquence cible d'intérêt, la sonde se fixe spécifiquement et est dégradée grâce à l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq Polymérase permettant l'émission de la fluorescence (Figure 1). L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle au nombre de copies cibles présentes dans l'échantillon au début de l'amplification. L'utilisation de standards avec un nombre de copies de l'ADNc recherché, permet d'établir une courbe standard et de déterminer la quantité des copies cibles présentes dans l'échantillon.

biomnis – biomnis

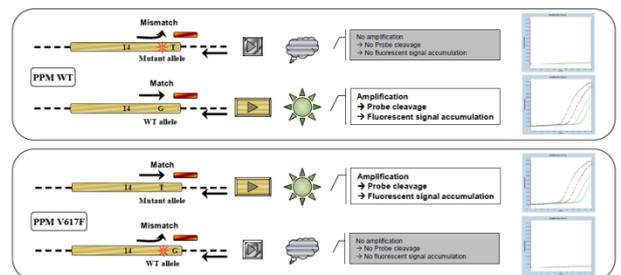


Figure 1 : Représentation schématique de la détection de la mutation V617F par PCR allèle spécifique

L'augmentation de fluorescence est directement proportionnelle au nombre de copies cibles présentes dans l'échantillon au début de l'amplification.

L'utilisation de standards avec un nombre connu de molécules permet d'établir une courbe standard et de déterminer la quantité de copies cibles présentes dans l'échantillon.

INDICATIONS

- Diagnostic des syndromes myéloprolifératifs.
- Bilan de thrombose (2^e intention).

RECOMMANDATIONS PREANALYTIQUES

■ PRELEVEMENT – CONSERVATION, TRANSPORT

Se reporter au référentiel des examens de biologie

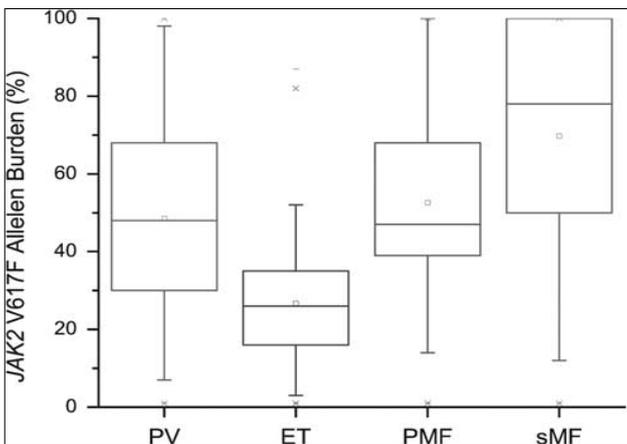
INTERPRÉTATION

La variation du % *JAK2 V617F* est liée à des différences du nombre d'allèles mutés dans la cellule.

La sensibilité du test utilisé est de 0,21 %.

- Charge mutationnelle et diagnostic

Dans les PV et les PMF, le pourcentage d'allèles mutés est souvent supérieur à 50 %, alors que dans les TE le pourcentage est inférieur à 50 % mais avec des chevauchements possibles entre les différentes pathologies comme l'a démontré cette étude de Vannuchi AM en 2008.



Etude de 893 patients atteints de SMP, PV (n=297), ET (n= 382), PMF (n = 168) et SMP transformés (sMF) (post PV et post ET = TE) (n = 46).

Les valeurs médianes sont très inférieures pour la TE (26 +/-15) par rapport aux autres pathologies telles que la PV (48 +/-26), la PMF (72 +/-24) et les sMF (46 +/- 30).

Le seuil de positivité a été fixé selon des recommandations internationales à 1% d'allèles mutés.

- Charge mutationnelle et pronostic

La quantification permet une évaluation de la masse tumorale, indirectement liée au pronostic du SMP, ce qui explique les % d'allèles mutés élevés dans la PV et la PMF par rapport à la TE.

Cependant, aucune étude n'a démontré une corrélation de cette masse tumorale avec le risque de transformation des PV en PMF ou en leucémie aiguë.

De même, des résultats contradictoires ont été retrouvés pour le risque de thrombose. Ces discordances sont en grande partie liées aux méthodologies souvent très différentes utilisées dans les études, généralement rétrospectives.

De nouvelles études prospectives sont en cours afin de mieux définir les facteurs pronostiques.

Au total, la découverte d'une mutation *JAK2 V617F* dans les SMP *BCR-ABL1* négatifs a complètement modifié les algorithmes décisionnels du diagnostic des SMP.

La présence de ce marqueur clonal a permis d'aboutir à la mise en place de thérapeutiques ciblées.

La présence d'authentiques tableaux cliniques de SMP mais sans mutation *JAK2* est en faveur d'une implication probable d'autres facteurs dans la physiopathologie de ces SMP, tels que le gène *TET2*.

POUR EN SAVOIR PLUS

■ James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk, Delhommeau, Lacout C, Garçon L, Raslona H, Berger R, Bennaceur grisell A, Villeval S N Constantinescu, Casadevall, Vainchenker W. A unique clonal Jak2 leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005 ;434:1144-1148.

■ JW Vardiman, J.Thiele, D A. Arber, RD. Brunning, MJ. Borowitz, A Porwit, NLee Harris, MM. Le Beau, EHellström-Lindberg, ATefferi C, D. Bloomfield. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes *Blood* 2009(114)(5)p937-951.

■ Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006; 355:2452-2466.

■ Tefferi A, Pardani A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Gangat N, Finke CM, Schwager, Mullaly A, Li CY, Hanson CA, Mesa R, Bernard O, Delhommeau F, Vainchenker W, Gililand DG, Levine RL. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythaemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009, 23(5):905-911.

■ Vannuchi AM, E Antonioli, P Guglielmelli, A Pardanani and A Tefferi. Clinical correlates of *JAK2V617F* presence or allele burden in myeloproliferative neoplasm: a critical reappraisal. *Leukemia* 2008;22:1299–1307.

■ Verstovsek S. Therapeutic potential of *JAK2* inhibitor. Communication orale, ASH 2010.