



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

MEMOIRE

Présenté par

Tebbal Hana

Fares Achwak

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Immunologie

THÈME

**Recherche de la mutation JAK2 V617F par la technique
de PCR en temps réel**

Soutenue publiquement le :26/06/2025

Encadré par : Dr RAHMANI Imène

Devant le jury :

Dr Nehaoua Manel

UFASétif1

Présidente

Dr BenchalalToumia

UFASétif1

Examinatrice

Dr Berkane Fatima

UFASétif1

Examinatrice

2024/2025

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu Tout-Puissant de nous avoir donné la force et la patience pour mener à bien ce travail. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles, pour leur soutien inconditionnel, leur amour et leurs encouragements constants tout au long de notre parcours. Nos sincères remerciements vont également à nos professeurs et encadrants, pour leur encadrement, leurs conseils précieux et leur disponibilité. On n'oublie pas nos amis et camarades, avec qui on a partagé de nombreux moments d'effort et de réussite. Merci pour votre aide et votre bonne humeur. À toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire, nous vous adressons notre reconnaissance la plus sincère.

Dédicaces :

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à notre encadrante, Dr Rahmani Imène, pour sa précieuse orientation, sa patience et son accompagnement bienveillant tout au long de ce travail. Ce mémoire est dédié à mon cher père Abdelmalek, qui a su jouer avec courage et amour le rôle d'un père et d'une mère à la fois. À ma douce maman, que Dieu lui accorde sa vaste miséricorde, toi qui rêvais d'assister à ce moment mais que le destin a rappelée trop tôt. À mes sœurs bien-aimées Rafika, Alima et Fouzia, qui ont été mon rempart dans les moments difficiles, ainsi qu'à mes frères Issam et Haïtham, et ma tante Wahiba, l'épouse de mon père, pour leur soutien indéfectible. Mes remerciements chaleureux vont également à Djahide et Habib, les époux de mes sœurs, qui ont été pour moi de véritables frères de cœur, à mon oncle Toufik et sa femme Samira, ainsi qu'à mon oncle maternel Abdelrahmane. Je n'oublie pas ma collègue de mémoire, qui souhaite exprimer sa reconnaissance à sa Maman Sana et Papa Karim, pour leur tendresse infinie et leur générosité de cœur. À ses sœurs Rihaab, Arij et Rinad, pour leur douceur, leur soutien discret mais précieux. À ses cousines Hiba et Nesima, dont la bienveillance et la chaleur humaine ont toujours été présentes. Et enfin, à son fiancé Oulaa, pour son amour sincère, son soutien constant et sa foi inébranlable en elle. À toutes les personnes qui ont cru en nous, qui nous ont tendu la main, qui ont prié en silence ou souri avec fierté, ce travail vous appartient autant qu'à nous.

Résumé :

La mutation JAK2 V617F est une mutation acquise qui entraîne une activation constitutive de la voie JAK-STAT, provoquant une prolifération anormale des cellules hématopoïétiques. Cette étude vise à évaluer la fréquence de cette mutation chez des patients suspectés d'avoir des syndromes myéloprolifératifs tels que la thrombocythémie essentielle (TE), la polyglobulie vraie (PV) et la myélofibrose primitive (MF).

Cette étude impliquait un total de 34 échantillons qui ont été testés par PCR en temps réel, au niveau du laboratoire central du CLCC de Sétif. Les résultats ont révélé un taux de positivité de 38 %, principalement chez les patients suspectés d'avoir la TE et la PV, et la majorité des cas positifs concernait des sujets de plus de 50 ans.

Ces résultats soulignent l'utilité du test JAK2 V617F pour le diagnostic des syndromes myéloprolifératifs, ainsi que le diagnostic différentiel, en démontrant la performance de la PCR comme méthode de détection sensible et rapide.

Mots clés : diagnostic, mutation, syndromes myéloprolifératifs, PCR, JAK2.

Abstract:

The JAK2 V617F mutation is an acquired mutation that results in constitutive activation of the JAK-STAT pathway, causing abnormal proliferation of hematopoietic cells. This study aims to assess the frequency of this mutation in patients with suspected of having myeloproliferative syndromes such as essential thrombocythemia (ET), polycythemia (PV), and primary myelofibrosis (PMF).

The study involved a total of 34 samples, which were tested by real-time PCR, at the central laboratory of the CLCC of Setif. The results revealed a positivity rate of 38%, mainly in patients suspected of having TE and PV, and the majority of positive cases concerned subjects over 50 years of age.

These results underline the usefulness of the JAK2 V617F test for the diagnosis of myeloproliferative syndromes, as well as the differential diagnosis, demonstrating the performance of PCR as a sensitive and rapid detection method.

Key words: diagnosis, mutation, myeloproliferative syndromes, PCR, JAK2.

الملخص:

تُعد الطفرة JAK2 V617F طفرة مكتسبة تؤدي إلى تفعيل مستمر لمسار JAK-STAT، مما يتسبب في تكاثر غير طبيعي للخلايا المكونة للدم. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم تواتر هذه الطفرة لدى مرضى يُشتبه في إصابتهم بمتلازمات التكاثرية النخاعية مثل كثرة الصفيحات الأساسية، كثرة الكريات الحمر الحقيقية و التليف النقوي الأولي. شملت هذه الدراسة 34 عينة تم اختبارها باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل في الزمن الحقيقي PCR، على مستوى المخبر المركزي لمركز مكافحة السرطان بسطيف. كشفت النتائج عن نسبة إيجابية بلغت 38%، سُجلت بشكل رئيسي لدى المرضى المشتبه بإصابتهم بكثرة الصفيحات الأساسية وكثرة الكريات الحمر الحقيقية و كانت غالبية الحالات الإيجابية لدى أشخاص تزيد أعمارهم عن 50 سنة. تؤكد هذه النتائج على فائدة اختبار JAK2 V617F لتشخيص متلازمات التكاثر النخاعي، بالإضافة إلى التشخيص التفريقي، مما يدل على أداء تفاعل البوليميراز المتسلسل كطريقة حساسة وسريعة للكشف عن المرض.

الكلمات المفتاحية: تشخيص، طفرة، متلازمات التكاثر النقوي، تفاعل البوليميراز المتسلسل، JAK 2

Sommaire :

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La mutation jak2 V617F

1. Généralités sur la mutation JAK2 V617F	3
1.1. Présentation du gène JAK2.....	4
1.1.1. Gène JAK2 et sa protéine.....	4
1.2. Fonction de la protéine JAK2.....	5
1.3. La mutation V617F	6
2. Implications biologiques et physiopathologiques dans les troubles myéloprolifératifs.....	7
2.1. Effet de la mutation	7
2.1.1. Dans le noyau	7
2.1.2. Dans le cytoplasme.....	7
2.2. Les maladies associées à la mutation	8
2.2.1. Polyglobulie de Vaquez (PV).....	8
2.2.2 Thrombocytemie essentielle (TE).....	8
2.2.3. Myélofibrose primitive (MF).....	9
2.3. Les causes principales de la mutation	10
3. Intérêt de la recherche de la mutation JAK2 V617F	11
4. Méthodes d'étude et de détection des mutations de JAK2	12
4.1. La PCR en temps réel (PCR quantitative)	12
4.2. La PCR-RFLP	12
4.3. Le séquençage de sanger	13
4.4. Le séquençage de nouvelle génération (NGS- Next Generation Sequencing)	13

Chapitre 2 : Extraction de l'ADN

1. Principes généraux de l'extraction de l'ADN	15
1.1. Lyse des cellule.....	15
1.1.1. Lyse par voie mécanique.....	15
1.1.2. Lyse par voie chimique.....	16
1.1.3. Extraction d'ADN à partir de la cellule animale.....	16
1.2. Séparation et purification de l'ADN.....	17

1.2.1. Précipitation de l'ADN.....	17
1.2.2. Séparation par la chromatographie.....	17
2. Méthode d'extraction d'ADN.....	18
2.1. Méthode de phénol-chloroforme.....	18
2.1.1. L'extraction phénolique.....	19
2.1.2. L'extraction au chloroforme.....	19
2.1.3. Extraction proprement dite.....	19
2.2. La méthode saline « salting-out ».....	19
2.3 Extraction d'ADN automatisée.....	20
2.3.1 Exemple d'extraction automatisée des acides nucléiques	21
3. Conservation de l'ADN.....	21
3.1 Effet de température	22
3.2. Les enzymes (les nucléases)	22
3.3. Autre facteurs influents.....	22
4. Critères de qualité de l'ADN extrait	22

Chapitre 3 : PCR en temps réel

1. Principes fondamentaux de la PCR en temps réel.....	25
1.1. Principes et fonctionnement de la qPCR en temps réel	26
1.1.1. PCR en temps réel.....	26
1.1.2. Mécanisme de détection par fluorescence.....	27
1.1.3. Valeur de Ct et interprétation.....	27
1.2. Étapes du cycle de qPCR	29
1.2.1. Dénaturation.....	29
1.2.2. Hybridation	29
1.2.3. Elongation.....	29
1.3. Détection des produits de PCR : fluorescence et quantification	30
1.3.1 Agents qui se lient aux colorants de l'ADN a double brin	30
1.3.2. Hydrolyse des sondes	31
1.3.3. Hybridation de deux sondes (hybridation probes).....	33
2. PCR en temp réel VS PCR conventionnelle	34
3. Applications de la PCR en temps réel	34
4. Avantages et limites de la PCR en temp réel	35

Partie 2 : Partie pratique

1. Introduction.....	38
1.1. Objectifs du travail.....	38

1.2. L'importance de la recherche de la mutation JAK2 V617F par la PCR en temps réel....	38
1.3. Terrain du travail pratique	39
2. Matériel et méthodes.....	39
2.1. Matériel biologique :.....	39
2.1.1. Type d'échantillons utilisés (sang périphérique)	39
2.1.2. Conditions de prélèvement et de conservation.....	39
2.2. Réactifs et solutions.....	40
2.2.1. Kits d'extraction d'ADN génomique humain	40
2.2.2. Réactifs de la PCR	40
2.3. Équipements de laboratoire	40
2.4. Consommables	41
2.5. Extraction de l'ADN génomique.....	42
2.5.1. Méthode d'extraction utilisée (méthode commerciale / kit).....	42
2.5.2. Protocole opératoire	42
2.6. Technique de PCR en temps réel.....	45
2.6.1. Protocole opératoire de la PCR en temps réel.....	45
2.6.2. Type de sondes utilisées.....	46
2.6.3. Séquence des amorces et des sondes.....	47
2.6.4. Composition du mélange réactionnel.....	48
2.6.5. Paramètres du cyclage (programme thermique).. ..	49
3. Résultats	50
3.1. Description de la population.....	50
3.2. Renseignements cliniques.....	51
3.2.1. Les indications du test (pathologies suspectées)	51
3.2.2. Le risque thrombotique.....	52
3.2.3. La numération plaquettaire.....	52
3.3. Résultat du test JAK2 V617F.....	53
3.3.1. Prévalence de la mutation JAK2.....	53
3.3.2. Répartition selon le sexe.....	54
3.3.3. Répartition selon l'âge.....	54
3.3.4. Répartition selon les indications (diagnostics confirmés)	55
4. Discussion.....	55
5. Conclusion	57

Références bibliographiques

LISTE DES ABREVIATIONS

PV : polyglobulie de vaguez

ET : thrombocytémie essentielle

PMF: myélofibrose primitive

JAK2 V617F: Janus Kinase 2 valine to phenylalanine mutation at position 617

Domaine JH2 : janus homology 2 domain

LMC : Leucémie myéloïde chronique

JAK2 : janus kinase 2

SMP : syndromesmyéloprolifératifs

TYK 2: la tyrosine kinase 2

Domaine JH1: janus homology 1 domain

Domaine SH2-like: Src homology 2 like domain

Domaine FERM: Four-point-one, ezrin, radixin, moesin homology domain

TK: tyrosine kinase

Epo-R: erythropoietin receptor

MPL: myeloproliferative leukemia

TpoR: thrombopoietin receptor

GM-CSFR: granulocyte –macrophage colony-stimulating factor receptor

l'IL-3-R : interleukin- Receptor

l'IL-5-R: interleukin-5 Receptor

G-CSF-R : granulocyte colony-stimulating factor Receptor

ADN : acide désoxyribonucléique

PNN : polynucléaires neutrophiles

ATP: Adénosine triphosphate

K1011 : lysine

V1010 : valine

C618 : cystéine

P1002 : proline

L1001: leucine

MEP50 :Methylosome protien 50

PRMT5 :Protien argenine methyltransferase 5

PI-3k : phosphoinositide –3 kinas

Grb2 : Growth factor receptor –bound protein 2

Shc : Src homology and collagen protein