

Les complications thrombotiques dans les néoplasies myéloprolifératives : influence de la charge allélique JAK2 V617F

Paul Renevier

▶ **To cite this version:**

Paul Renevier. Les complications thrombotiques dans les néoplasies myéloprolifératives : influence de la charge allélique JAK2 V617F. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02167045

HAL Id: dumas-02167045

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02167045

Submitted on 27 Jun 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 21 juin 2019

Par M. Paul RENEVIER

Né le 17 avril 1992 à Lyon

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

Les complications thrombotiques dans les néoplasies myéloprolifératives: Influence de la charge allélique JAK2 V617F

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Professeur Laurence CAMOIN-JAU
Membres : M le Professeur Jean GABERT
M le Professeur Régis COSTELLO
Mme le Docteur Caroline REY
M le Docteur Philippe DEBOURDEAU

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS	
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES	
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.	
PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

A mon jury de thèse

Madame le Professeur Laurence Camoin-Jau

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Vos connaissances sur le sujet apporteront assurément un éclairage nouveau sur ce travail. En tant que professeur d'hématologie à la faculté de pharmacie de Marseille je vous adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean Gabert

Un grand merci pour votre accompagnement et votre gentillesse tout au long de ce travail. Je vous remercie également pour votre considération lors de mon passage dans votre stage et votre souci de formation qui m'ont permis d'élargir le cadre de ma formation de base en biologie. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur le Professeur Régis Costello

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Votre expérience clinique sur le sujet m'apportera sans conteste un regard éclairé sur mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Caroline Rey

Je vous adresse mes remerciements pour avoir accepté de faire partie de mon jury et d'apporter votre expérience clinique à la critique de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère considération.

Monsieur le Docteur Philippe Debourdeau

Je vous remercie pour votre disponibilité, votre travail de relecture et vos précieux commentaires sur ce sujet. Pour avoir partagé mon enthousiasme et me faire l'honneur de participer à ce jury, soyez assuré de toute ma gratitude.

Je tiens à remerciement particulièrement :

Toute l'équipe de biologie moléculaire de l'hôpital Nord dont **Nathalie Beaufils** et **Christelle Taillandier** pour leurs explications dans la technique de la PCR JAK2.

Guillaume Roux, pour m'avoir initier et donner goût aux statistiques avec le logiciel Rstudio. Merci également pour tes conseils critiques sur le sujet durant les 6 mois à Gap.

Les docteurs **Sarah Machergui-Hammami, Marie-Christine Cabasso, Philippe Delmas, Stéphane Guinard, Marion Semet**. Merci aussi à l'ensemble de l'équipe du laboratoire du CHICAS GAP pour votre bonne humeur et votre gentillesse.

A ma famille, à mes amis, à Ségolène.

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations 7

Liste des tableaux et figures 9

Introduction 13

Partie I : Généralités sur les néoplasies myéloprolifératives 15

A. Définition des néoplasies myéloprolifératives 15
B. Physiopathologie 15
1. Physiopathologie commune 15
a. Rappel physiologique : le gène JAK2 et le rôle de la voie JAK/STAT 16
b. La mutation JAK2 V617F 17
C. Evolution et pronostic 19
D. Tableau clinique et biologique 20
1. La polyglobulie de Vaquez 20
2. La thrombocytémie essentielle 21
3. La myélofibrose primitive 21
4. Critères diagnostiques 22

Partie II : Les événements thrombotiques dans les néoplasies myéloprolifératives 23

A. Epidémiologie des thromboses au diagnostic et au suivi des NMP 23
1. Prévalence et incidence des thromboses dans les NMP 23
2. Les thromboses artérielles 24
a. Les accidents vasculaires cérébraux et les accidents ischémiques transitoires 24
b. Les infarctus du myocarde 24
c. Les ischémies périphériques 25
3. Les thromboses veineuses de localisation fréquente 25
a. Les thromboses veineuses profondes des membres inférieurs et les embolies pulmonaires 25
4. Les thromboses veineuses de localisations plus rares 26
a. Les thromboses veineuses splanchniques 26
b. Les thromboses veineuses cérébrales 26
c. Les thromboses veineuses rétiniennes 27
5. Les thromboses récidivantes 27

B. Physiopathologie générale des thromboses au cours des NMP 28
1. Les leucocytes 28
2. La polyglobulie et l'augmentation de l'hématocrite 29
3. Thrombocytose et activation des plaquettes 29
4. Rôle des cellules endothéliales 29
5. Les microparticules plaquettaires 30
C. Facteurs de risques thrombotiques dans les NMP 30
1. Facteurs de risques liés aux patients 30
a. Le sexe 30
b. L'âge et les antécédents de thrombose 31
c. Les anomalies du bilan de thrombophilie 31
d. Risques cardiovasculaires 31
2. Facteurs de risques liés à la maladie 32
a. Les globules blancs et les plaquettes 32
b. La charge allélique JAK2 V617F 34
D. Thérapeutique 34
1. Stratification du risque 34
2. Stratégies thérapeutiques 35
3. Anti JAK2 35

Partie III : Etude rétrospective de 452 patients de l'APHM 36

A. Matériel et méthode 36
1. Objectifs de l'étude 36
a. Objectif principal 36
b. Objectifs secondaires : 36
2. Sélection des patients 37
3. Définition des événements thrombotiques artériels et veineux 38
4. Analyse statistique 41
5. Analyse moléculaire : 42
a. Extraction de l'ADN : 42
b. Quantification JAK2 V617F par PCR quantitative en temps réel 42
c. Interprétation de l'analyse sur le MX300P 43
B. Résultats 46
1. Description de la population 46
a. Caractéristiques des patients de l'étude 46
b. Répartition des patients en fonction de la charge allélique JAK2 V617F 49
c. Répartition des événements thrombotiques 53

2. Quelle est l'influence de la charge allélique sur les thromboses ? 56
a. Influence de la charge allélique JAK2 au diagnostic sur les thromboses initiales et études des facteurs de risques thrombotiques. 56
i. Analyse des événements thrombotiques totaux sur la population JAK2 positifs 56
ii. Analyse des événements thrombotiques totaux dans les TE et les PV 59
iii. Analyse des thromboses artérielles dans les TE et les PV 59
iv. Analyse des thromboses veineuses dans les TE et les PV 60
b. Influence de la charge allélique JAK2 sur les récidives d'événements thrombotiques des NMP. .. 61
c. Influence de la charge allélique JAK2 sur les récidives d'événements thrombotiques des PV. 65
3. Les thromboses veineuses cérébrales et les embolies pulmonaires 67
a. Fréquence de la mutation JAK2 pour les thromboses veineuses cérébrales, splanchniques et embolies pulmonaires à l'APHM entre 2017 et 2018 67
b. Comparaisons cliniques et biologiques entre les groupes JAK2+ et JAK2- pour les TVC et les EP… 68
4. Comparaison clinique et biologique entre les TE JAK2 et les TE doubles mutés JAK2 et CALR ou MPL 72

Partie IV : Discussion 73

A. Objectif principal : Risque thrombotique et charge allélique JAK2 V617F 73
B. Objectifs Secondaires: 80
1. Etude des facteurs de risque de thrombose 80
2. Etude des thromboses veineuses cérébrales et embolies pulmonaires 81
3. Etudes des patients TE doubles positifs 82
C. Limites de l'étude 84

Conclusion 85

Référence bibliographiques 86

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIC : Critère d'information d'Akaike

AIT : Accident ischémique transitoire

ATCD : Antécédent

AUC : Aire sous la courbe

AVC : Accident vasculaire cérébral

CALR : Calréticuline

CD : Cluster de différenciation

CI : Intervalle de confiance

EP : Embolie pulmonaire

EPO : Erythropoïétine

FDRCV : Facteur de risque cardiovasculaire

G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor

HTA : Hypertension artérielle

IDM : Infarctus du myocarde

IPSET : International Prognostic Score of Thrombosis for Essential Thrombocytemia

JAK2 : Janus kinase 2

JH1 : Jak homology domain 1

JH2 : Jak homology domain 2

HR : Hazard ratio

HTA : Hypertension artérielle

ISCH : Ischémie

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LMC : Leucémie myéloïde chronique

MAPK/ERK : Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase

MF : Myélofibrose

MFP : Myélofibrose primitive

MPL : « Myeloproliferative leukemia »

NFS : Numération formule sanguine

NGS : Next Generation Sequencing = séquençage nouvelle génération

NMP : Néoplasie myéloproliférative

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odds ratio

Ph1 : Chromosome philadelphie

PI3K/AKT : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase / protein kinase B

PV : Polyglobulie de Vaquez

ROC : « Receiver Operating Characteristic »

STAT : « Signal Transducer and Activator of Transcription »

SMD : Syndrome myélodysplasique

TAMI : Thrombose artérielle des membres inférieurs

TAMS : Thrombose artérielle des membres supérieurs

TE : Thrombocytémie essentielle

TPO : Thrombopoïétine

TVC : Thrombose veineuse cérébrale

TVP : Thrombose veineuse profonde

TVPMI : Thrombose veineuse profonde des membres inférieurs

TVRET : Thrombose veineuse rétinienne

TVSPLAN : Thrombose veineuse splanchnique

Liste des tableaux et figures

Figures :

Figure 1 : Répartition des principales mutations retrouvées dans les NMP Ph1- 16
Figure 2. Mutation JAK2 V617F 18
Figure 3 : Courbes de survie des patients atteints de TE (rouge), de PV(vert) et de MFP (bleu). Tefferi 2014 (16) 20
Figure 4a et 4b: Objectifs de l'étude et sélection des patients……..... 39
Figure 5 : Concentrations des amorces sens et anti-sens et de la sonde utilisées pour la quantification des allèles JAK2 V617F 43
Figure 6 : Représentation de la courbe standard pour quantifier le nombre de copies de séquence cibles connues (ici calibrant plasmide JAK2V617F) 44
Figure 7 : Représentation de la courbe d'un patient (en vert) positif pour la mutation JAK2 en fonction du contrôle négatif à 0% d'alléle muté (courbe rouge) et du contrôle à 0,1% d'alléles mutées (courbe bleu) 45
Figure n°8 : Répartition des patients JAK2 positifs à l'APHM entre 2011 et 2018. 46
Figure n°9 : Répartition des âges dans la population d'étude 47
Figure n°10a : Médiane et moyenne de la charge allélique JAK2 de la population de l'étude 49
Figure n°10b : Répartition des patients JAK2 V617F en fonction de la charge allélique par pathologie 50
Figure n°11 : Répartition des myélofibroses secondaires en fonction de la charge allélique JAK2 52
Figure n°12 : Répartition des polyglobulies de Vaquez et myélofibrose post PV en fonction de la charge allélique JAK2 53
Figure n°13 : Répartition des événements thrombotiques par territoire artériel et veineux sur les 397 patients 54
Figure n°14 : Répartition des événements thrombotiques par territoire par ordre décroissant de fréquence. 55
Figure 15 : Présence ou absence de thromboses au diagnostic en fonction de la charge allélique <25% ou >25% 57
Figure 16 : Survie sans événement thrombotique (mois) selon la charge allélique JAK2 V617F chez les 106 patients avec la mutation JAK2 V617F 64

Figure 17 : Modèle de Cox multivarié sur les 106 patients JAK2 positifs 65
Figure 18 : Survie sans événements thrombotiques (mois) chez les patients atteints de PV en fonction de la charge allélique JAK2 V617F. 66
Figure 19 : Modèle de COX multivarié appliqué au sous groupe PV 67

Tableaux :

Tableau 1 : Critères OMS diagnostiques 2016 des néoplasies myéloprolifératives 22
Tableau 2 : Fréquence de la mutation JAK2 dans les différents types de localisations thrombotiques 27
Tableau 3 : Facteurs de risques de thromboses artérielles et veineuses décrits dans la littérature pour la PV et la TE d'après Casini et al (19) 33
Tableau 4 : score IPSET : Estimation du risque de thromboses dans la TE 34
Tableau 5 : Caractéristiques des patients JAK2 positifs 48
Tableau 6 : Caractéristiques biologiques des 224 TE et des 149 PV en fonction de la charge allélique JAK2 V617F 51
Tableau 7 : Résultats de l'analyse par régression logistique des événements thrombotiques totaux au diagnostic de la mutation JAK2 ou dans les antécédents de moins de 3 ans en fonction des covariables : âge, sexe, charge allélique JAK2, hémoglobine, plaquettes, globules blancs, tabac, hypertension, diabète, dyslipidémie. 58
Tableau 8 : Résultats de l'analyse par régression logistique des thromboses artérielles au diagnostic de TE ou dans les antécédents de moins de 3 ans en fonction des covariables : Age, sexe, charge allélique JAK2, hémoglobine, plaquettes, globules blancs, tabac, hypertension, diabète, dyslipidémie. 60
Tableau 9: Caractéristiques cliniques des 112 patients ayant thrombosé au diagnostic ou dans les antécédents de moins de 3ans, divisés en deux groupes : < 25% et > 25% de charge allélique 62
Tableau 10 : Modèle de COX univarié sur les 106 patients JAK2 positifs 64
Tableau 11 : Modèle de COX univarié appliqué au sous groupe PV 66
Tableau 12 : Caractéristiques des patients TVC et JAK2 V617F 69
Tableau 13 : Caractéristiques cliniques et biologiques des thromboses veineuses cérébrales chez les patients avec mutation JAK2 V617F (sans critères hématologiques en faveur d'un NMP) et sans mutation JAK2 V617F 70
Tableau 14 : Caractéristiques cliniques et biologiques des embolies pulmonaires chez les patients avec mutation JAK2 V617F (sans critères hématologiques en faveur d'une NMP) et sans mutation JAK2 V617F 71
Tableau 15: Caractéristiques biologiques et cliniques des thrombocytémies essentielles en fonction du profil mutationnel 72

Tableau 16 : Synthèse des articles sur le risque thrombotique et la charge allélique JAK2 V617F pour la PV uniquement 74
Tableau 17: Synthèse des articles sur le risque thrombotique et la charge allélique pour la TE uniquement 75
Tableau 18 : Synthèse des articles sur le risque thrombotique et la charge allélique pour les NMP en général 76

Introduction

Depuis 2005 et la découverte de la mutation JAK2 V617F, le diagnostic et la stratification des néoplasies myéloprolifératives (NMP) ont été revus si bien que la génétique a une place à part entière dans la classification de ces maladies. Selon la classification des tumeurs hématologiques de l'organisation mondiale de la santé de 2016, les néoplasies myéloprolifératives sans chromosome Philadelphie ou BCR ABL négatives regroupent un ensemble de maladies hématopoïétiques clonales comprenant la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP) ; font partie de ce groupe d'autres entités plus rares que nous n'allons pas aborder.

Les confirmations biologiques de ces NMP, reposent parmi les critères OMS 2016 sur la détermination du statut mutationnel de trois gènes: JAK2 (Janus kinase 2), MPL (myeloproliferative leukemia) et CALR (calréticuline). La mutation somatique V617F de la tyrosine kinase JAK2 est retrouvée dans plus de 95% des patients atteints de polyglobulie de Vaquez et chez 50% à 65% des patients atteints de thrombocytémie essentielle et de myélofibroses primitives. Depuis peu, il a été mis en évidence des doubles mutations JAK2 V617F associées à CALR ou MPL.

De part ces anomalies mutationnelles, ces NMP sont caractérisées par la prolifération excessive et incontrôlée d'une ou plusieurs lignées myéloïdes ce qui provoque comme répercussions cliniques une augmentation du risque thrombotique artériel et veineux ainsi que du risque hémorragique. Les thromboses sont donc une complication courante des NMP qui entrainent une augmentation de la mortalité des patients atteints de ces maladies.

Nous voulons analyser s'il existe ou non une influence de la charge allélique mutationnelle JAK2 V617F sur l'apparition de thromboses veineuses et/ou artérielles au diagnostic de la maladie et au suivi des patients. Cette question, montre des résultats contradictoires dans les dernières publications. Notre étude rétrospective porte sur 452 patients JAK2 positifs de l'APHM répertoriés entre 2011 et 2018.

Après quelques généralités sur les NMP et un rappel physiopathologique, nous abordons l'épidémiologie et les caractéristiques des thromboses au cours des NMP, les bases physiopathologiques des thromboses et les facteurs de risques thrombotiques au cours de ces maladies. Nous présentons ensuite les résultats généraux de notre étude, l'étude des facteurs

de risques thrombotiques puis les résultats concernant l'influence de la charge allélique mutationnelle JAK2 V617F sur l'apparition de thromboses veineuses et/ou artérielles au diagnostic de la maladie et au suivi des patients.

En deuxième partie d'étude nous abordons les caractéristiques des thromboses veineuses cérébrales et embolies pulmonaires dans les NMP et leurs épidémiologies à l'APHM.

Partie I : Généralités sur les néoplasies myéloprolifératives

A. Définition des néoplasies myéloprolifératives

Tout d'abord nous devons distinguer la leucémie myéloïde chronique avec chromosome de Philadelphie des autres néoplasies sans chromosome Philadelphie. Parmi les NMP Phi - nous identifions par ordre de fréquence la TE, la PV, la MFP et d'autres entités plus rares comprenant la leucémie à polynucléaires neutrophiles, la leucémie chronique à éosinophiles et les NMP inclassables.

Le terme de NMP regroupe un ensemble de pathologies caractérisées par une prolifération excessive de précurseurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse et par une production excessive de cellules sanguines matures.

B. Physiopathologie

1. Physiopathologie commune

En 2005, l'identification de la mutation JAK2 a fourni une base moléculaire commune à ces différentes maladies. Elles sont toutes caractérisées par l'acquisition d'une mutation au sein d'une cellule souche multipotente hématopoïétique ce qui aboutit à une prolifération clonale anormalement élevée de cellules myéloïdes. Les mutations acquises confèrent alors aux cellules mutées une indépendance et une hypersensibilité des progéniteurs vis à vis des cytokines. Trois mutations principales sont impliquées dans la physiopathologie de ces NMP : il s'agit des mutations du gène de la Janus kinase 2 (JAK2), du gène de la calréticuline (CALR), et du gène de la « myeloproliferative leukemia » (MPL). La principale mutation retrouvée en terme de fréquence est la mutation JAK2 V617F. La mutation au niveau de l'exon 12 JAK2 est retrouvée dans 2% des PV. 10 à 15% des TE et 5 à 10% des MFP ne présentent aucune de ces anomalies moléculaires et sont dits triples négatifs. (Figure 1)

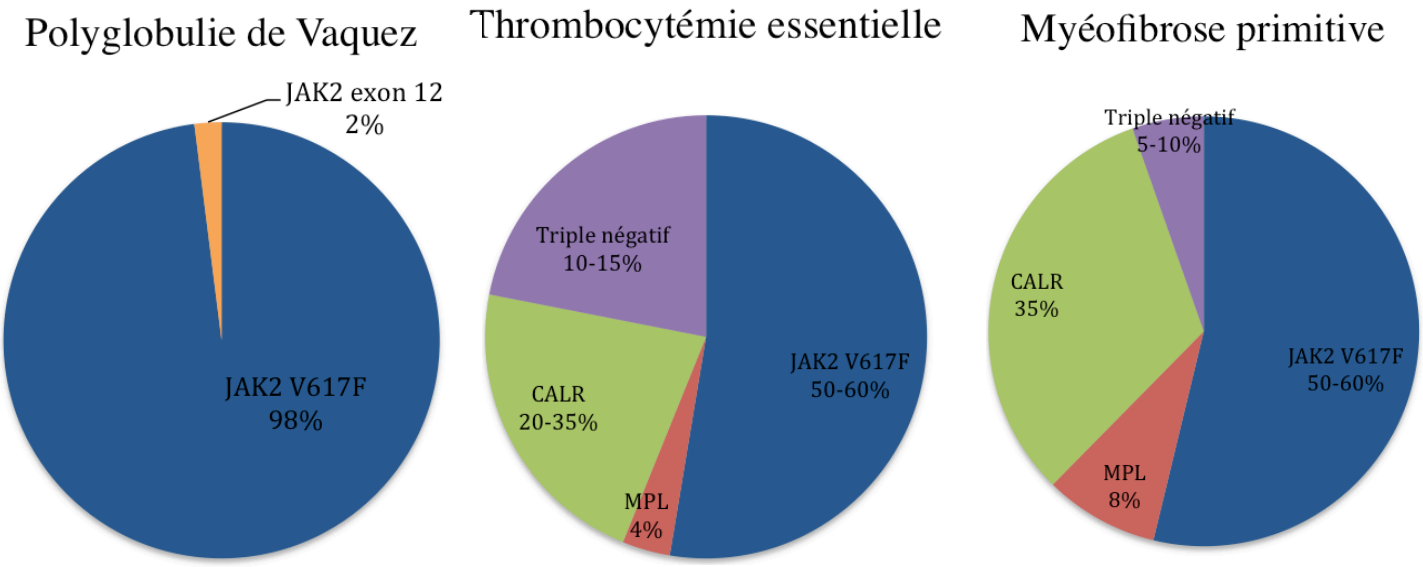


Figure 1 : Répartition des principales mutations retrouvées dans les NMP Ph1-

a. Rappel physiologique : le gène JAK2 et le rôle de la voie JAK/STAT

La myéloprolifération est contrôlée par l'axe cytokines/ récepteurs aux cytokines au niveau de la voie JAK/STAT. La protéine JAK2 est une protéine à activité tyrosine kinase de la famille JAK (Janus activated kinase) indispensable à la signalisation cellulaire des cytokines et aux facteurs de croissance comme l'EPO, responsable de la survie et de la prolifération cellulaire. Elle est constituée d'un domaine JH1 (JAK Homology domain 1) et d'un domaine JH2 (JAK Homology domain 2), JH2 étant le régulateur négatif de l'activité kinase de JH1. Le rôle de la protéine JAK2 est de permettre la stabilisation et l'ancrage à la surface cellulaire de trois récepteurs : EPO-R, MPL et G-CSF-R. La fixation des trois cytokines (EPO, TPO et G-CSF) à leurs récepteurs va entraîner l'activation de JAK2 par autophosphorylation et le recrutement de molécules de signalisation impliquées dans les voies STAT, MAPK et PI3K (1). Les voies STAT et MAPK sont impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La voie PI3K, quant à elle, joue un rôle dans la survie et le contrôle du stress cellulaire. La régulation négative du signal s'effectue par auto-

inhibition de JAK2 par le domaine appelé pseudo kinase, conduisant à la terminaison du signal et l'internalisation du récepteur. Ainsi toutes ces voies de signalisation sont susceptibles d'être impliquées dans la physiopathologie des NMP.

b. La mutation JAK2 V617F

Cette mutation acquise au niveau d'une cellule souche hématopoïétique résulte d'un changement d'une guanine en thymidine, entraînant la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 617 dans le domaine pseudokinase JH2 de la protéine JAK2. Il en résulte une activation constitutive de la protéine JAK2, indépendamment de la liaison du facteur de croissance au récepteur (2). La mutation JAK2 V617F induit en l'absence de cytokine une activation des voies de signalisation en aval STAT5/3/1, MAPK et PI3K (3) (Figure 2).

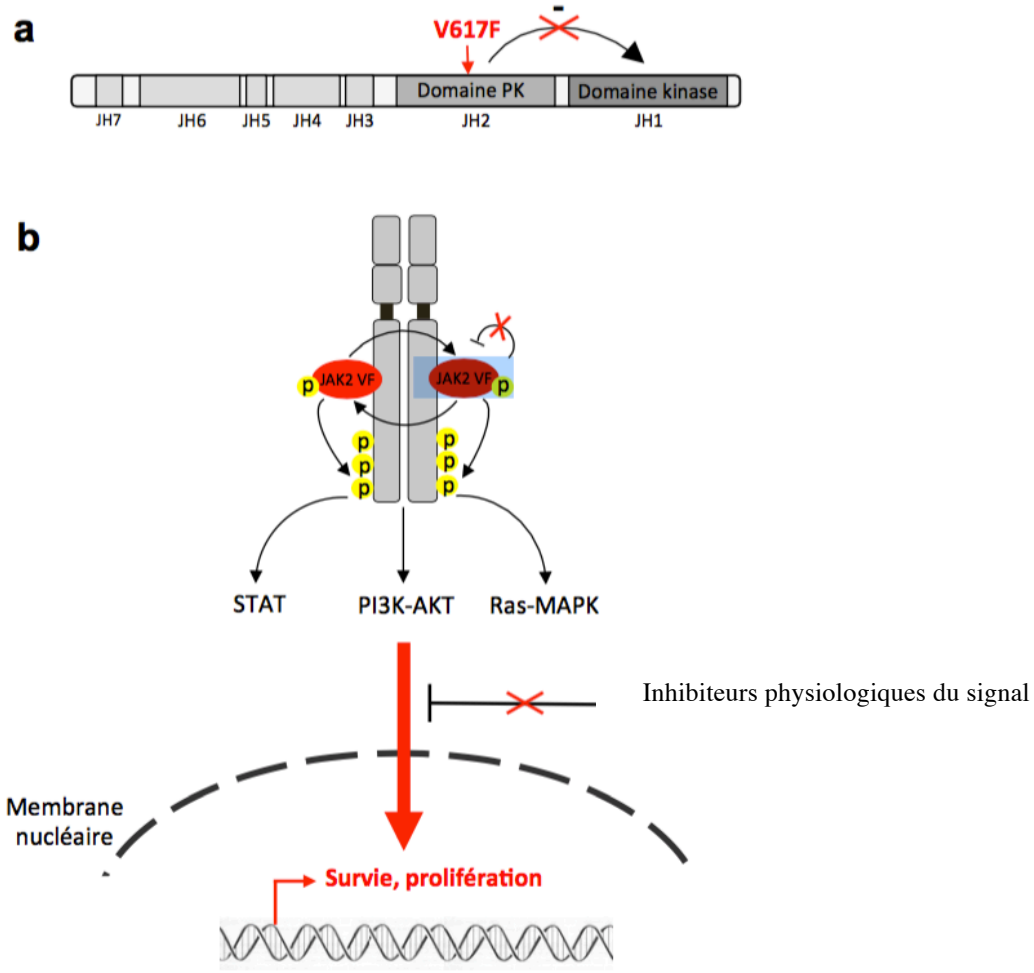


Figure 2. Mutation JAK2 V617F

a) Perte de l'auto-inhibition de l'activité kinase de JAK2 exercée par le domaine pseudo-kinase.
b) La mutation JAK2 V617F provoque une activation constitutive des voies STAT, PI3K, MAPK en l'absence de cytokine induisant une prolifération et une survie anormale.
Pasquier, 2015 (4).

L'expression de JAK2 V617F dans les modèles murins a permis de prouver que la mutation JAK2 est suffisante pour induire un syndrome myéloprolifératif chez la souris et qu'elle a un caractère oncogénique. Certains auteurs ont démontré chez la souris que lorsque JAK2 V617F est exprimé à l'état homozygote, il existe un phénotype de type PV et à l'état hétérozygote un phénotype de type TE (5).

C. Evolution et pronostic

Ce sont des cancers rares car leurs incidences sont inférieures à 6 pour 100 000 personnes par an. Une récente étude (6) fournit les estimations d'incidences suivantes : PV de 0,4 à 2,8, TE de 0,38 à 1,7 et MFP de 0,1 à 1,0 pour 100 000 personnes par an. L'âge médian au diagnostic de la PV est de 65 ans, de 68 ans pour la TE et de 70 ans pour la MFP.

Chez les patients non traités, la morbidité et la mortalité de la PV et de la TE sont principalement liées aux complications thrombotiques. Chez les patients traités, l'augmentation du risque de décès est liée au risque évolutif : transformation en myélofibrose secondaire, transformation en syndrome myélodysplasique (SMD) et leucémie aiguë myéloïde (LAM). Dans la PV, le risque de progression en MF secondaire a été reporté dans 9 à 21% des patients et la progression en LAM chez 3 à 10% des patients (7) (8). Les facteurs de risque de transformation inclus l'âge avancé et la leucocytose (9) (10). L'effet de la charge allélique JAK2 V617F sur l'évolution de la maladie n'est pas clairement établi (11).

Dans la TE, la transformation en MF secondaire est plus faible de l'ordre de 3 à 4% des patients (12).

La médiane de survie pour les PV et les TE non compliquées est estimée à 14 ans et 20 ans respectivement. Elle est plus faible pour la MFP, estimée à 6 ans (8) (Figure 3). Plusieurs scores pronostiques ont été développés afin de stratifier les patients atteints de MFP et d'adapter leurs prise en charge thérapeutique : l'IPSS (international scoring system) (13) puis le DIPPS (dynamic international prognostic scoring system) (14) et enfin le DIPPS-plus (15). Ce dernier prend en compte huit facteurs : l'âge supérieur à 65 ans, un taux d'hémoglobine < 100 g/L, une hyperleucocytose > 20 G/L, un taux de blastes supérieur à 1%, la présence de signes généraux, des anomalies de mauvais pronostic au caryotype, une dépendance transfusionnelle et un taux de plaquettes < 100 G/L. Récemment le GPSS (16) (genetic-based pronostic scoring system) associe aux facteurs cliniques, hématologiques et cytogénétiques, des critères moléculaires notamment la mutation CALR et ASXL1.

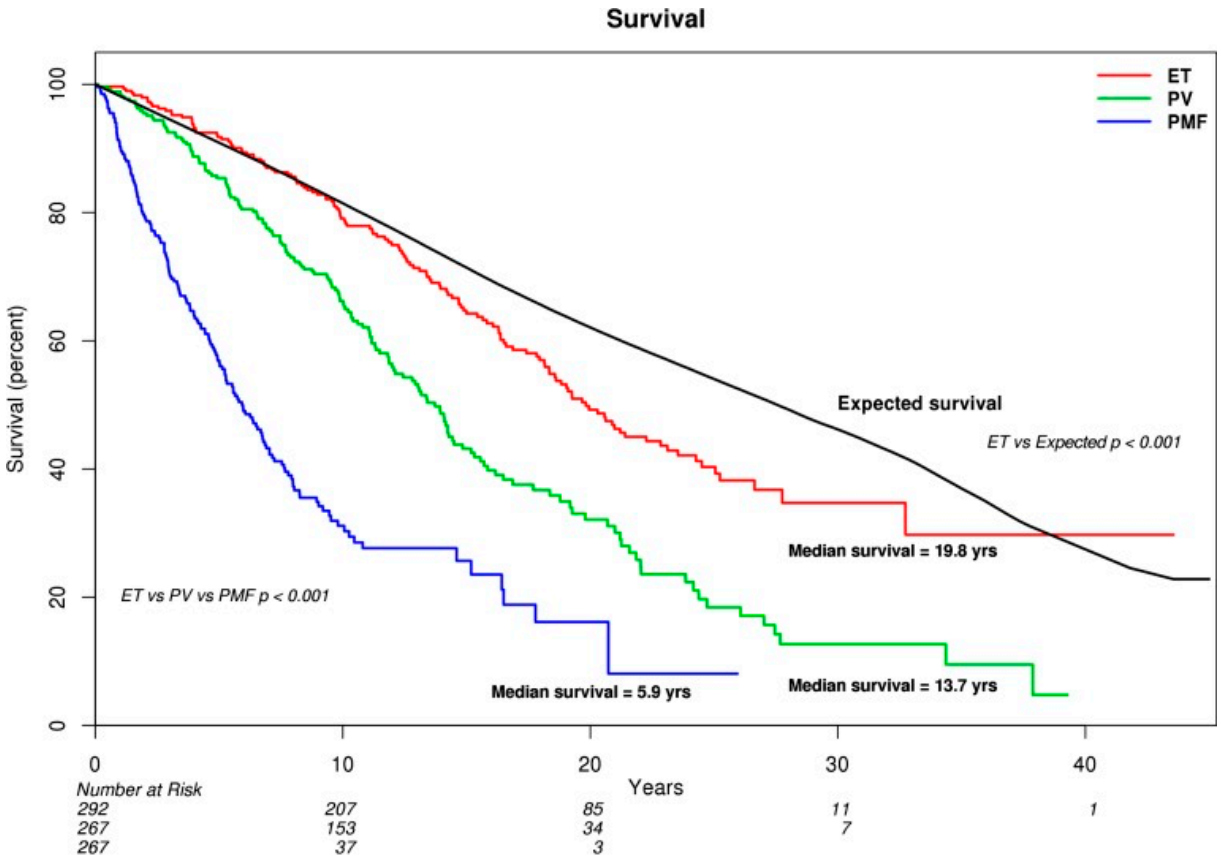


Figure 3 : Courbes de survie des patients atteints de TE (rouge), de PV(vert) et de MFP (bleu). Tefferi 2014 (16)

D. Tableau clinique et biologique

1. La polyglobulie de Vaquez

La PV touche essentiellement la lignée érythroïde. Les patients sont souvent diagnostiqués de manière fortuite sur des anomalies de l'hémogramme. L'examen clinique retrouve l'existence de signes généraux dans 80% des cas (17) (asthénie, impact sur la qualité de vie, insomnies), des signes d'hyperviscosité (céphalées, vertiges, troubles visuels, acouphènes), des signes microvasculaires (migraines, paresthésies, érythromélalgies), une érythrose cutanéo-muqueuse d'apparition progressive touchant principalement le visage et les mains, un prurit à l'eau (aquagénique), une splénomégalie. Dans certains cas le diagnostic est évoqué devant des complications majeures comprenant la thrombose et les signes d'évolution en myélofibrose.

La principale anomalie biologique retrouvée est la polyglobulie. L'augmentation de l'hémoglobine (>165 g/L chez l'homme et > 160 g/L chez la femme) et/ ou de l'hématocrite (>49% chez l'homme et > 48% chez la femme) doit faire évoquer le diagnostic après

élimination des autres causes de polyglobulies secondaires que nous ne détaillerons pas. Une hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles et une thrombocytose modérée peuvent être associées à la polyglobulie. Le taux d'érythropoiétine (EPO) circulant est normal ou bas en principe.

2. La thrombocytémie essentielle

La TE touche essentiellement la lignée mégacaryocytaire. Les patients sont en général asymptomatiques au diagnostic, l'examen clinique révèle une splénomégalie dans un tiers des cas. Le diagnostic peut également être évoqué devant des complications hémorragiques et des thromboses.

La principale anomalie biologique retrouvée est une thrombocytose. L'augmentation du taux de plaquettes > 450 G/L doit faire évoquer le diagnostic après élimination des autres causes de thrombocytoses secondaires que nous détaillerons pas. La mutation JAK2 est retrouvée dans 50 à 60% des cas de TE (18) (Figure 1).

3. La myélofibrose primitive

La MFP est la forme la plus sévère des trois maladies. Elle est caractérisée par une prolifération anormale de lignées myéloïdes et par des anomalies de différenciation des mégacaryocytes responsables de la fibrose médullaire. Les patients sont rarement asymptomatiques et présentent des signes généraux (fièvre, sueurs nocturnes, altération de la qualité de vie). Il existe une splénomégalie dans 90% des cas environ. La fibrose médullaire provoque en partie l'apparition de cytopénies se traduisant par un syndrome anémique, hémorragique ou infectieux.

Les anomalies biologiques retrouvées sont multiples : anémie normocytaire, normochrome, arégénérative, taux de leucocytes et de plaquettes variables. L'analyse du frottis peut mettre en évidence 5-15% de myélémie, quelques blastes circulants (2 à 3%), des érythroblastes circulants (2 à 20%), des dacryocytes et des anomalies de la lignée mégacaryocytaire (micromégacaryocytes, macrothrombocytes dégranulés).
La mutation JAK2 est retrouvée dans 50 à 60% des cas (18) (Figure 1).

4. Critères diagnostiques

La classification OMS des NMP a été revue en 2016 (Tableau 1). Les mutations JAK2, CALR et MPL font partie des critères diagnostiques majeurs des TE et des MFP. Le diagnostic de PV repose sur l'association des 3 critères majeurs ou des 2 critères majeurs et du critère mineur en l'absence de mutation JAK2. Le diagnostic de TE requiert les 4 critères majeurs ou les 3 premiers critères majeurs et le critère mineur. Pour la MFP, le diagnostic requiert 3 critères majeurs et au moins un critère mineur.

Type de NMP	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocytémie essentielle	Myélofibrose primitive
Critères majeurs	1) **Hémoglobine** > 165 g/L chez l'homme ou hématocrite > 49% Hémoglobine > 160 g/L chez la femme ou hématocrite > 48% 2) **Biopsie médullaire** : Hypercellularité touchant les 3 lignées 3) Présence de la **mutation JAK2 V617F** ou JAK2 exon 12	1) **Plaquettes** > 450 G/L 2) **Biopsie médullaire** avec prolifération de la lignée mégacaryocytaire avec une augmentation du nombre de formes matures de grande taille avec un noyau hyperlobé. Pas d'augmentation significative des lignées granuleuse et érythroblastique et très rarement augmentation minime de la fibrose réticulinique (grade 1). 3) **Absence** des **critères diagnostiques** de LMC, PV, MFP, SMD ou autre néoplasie myéloïde 4) **Mutation** de **JAK2**, **CALR** ou **MPL**	1) Présence d'une **prolifération mégacaryocytaire** avec atypies cellulaires, accompagnée d'une **fibrose réticulinique** et/ou collagène de **grade 2** ou **3** 2) **Pas** de **critères OMS** de PV, TE, LMC, SMD ou autre hémopathie myéloïde 3) Présence d'une **mutation** de **JAK2**, **CALR** or **MPL** ou si absence, présence d'un autre marqueur clonal*, ou absence de cause de fibrose médullaire secondaire**
Critères mineurs	Taux sanguin d'EPO subnormal	Présence d'un marqueur de clonalité ou absence d'étiologie de thrombocytose réactionnelle	Présence d'au moins un des trois critères suivants, confirmé par 2 déterminations : a. Anémie sans autre étiologie b. Leucocytose > 11 G/L c. Splénomégalie palpable d. LDH > normale e. Erythro-myélémie

Tableau 1 : Critères OMS diagnostiques 2016 des néoplasies myéloprolifératives

* En cas de MFP « triple négative », la recherche d'un autre marqueur clonal doit être réalisée (mutations les plus fréquentes: ASXL1, EZH2,TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1. ** Eliminer une fibrose médullaire secondaire (infection, maladie auto-immune, maladie inflammatoire chronique, une hémopathie lymphoïde, cancer avec métastases, toxicité)

Nous allons aborder en partie II l'épidémiologie et les caractéristiques des thromboses au cours de ces maladies.

Partie II : Les événements thrombotiques dans les néoplasies myéloprolifératives

A. Epidémiologie des thromboses au diagnostic et au suivi des NMP

1. Prévalence et incidence des thromboses dans les NMP

La prévalence des thromboses au diagnostic et leur incidence au cours des NMP ont été évaluées dans de nombreuses études rétrospectives. La prévalence des thromboses au diagnostic dans les PV varie de 20 à 39% alors qu'elles sont plus faibles dans les TE puisqu'elles varient de 7 à 26% (19). Globalement 2/3 de ces thromboses ont une localisation artérielle et 1/3 une localisation veineuse.

Au cours du suivi des NMP l'incidence annuelle des événements thrombotiques varie de 0,74 à 10 pour 100 patients années en fonction du type de maladie (19).
Pour la PV, les deux études les plus importantes comprenaient 1213 et 1638 patients. Dans la première étude rétrospective, après un suivi médian de 5,3 ans, 230 patients (19%) ont présenté une complication thrombotique (artérielle dans 57% des cas), avec un taux d'incidence global de 3,4 pour 100 patients-années (20). Dans la deuxième étude prospective, après un suivi moyen de 2,7 ans, l'incidence des événements cardiovasculaires (décès et événements thrombotiques non mortels) était de 5,5 pour 100 patients-années (7).

Pour la TE, dans une étude rétrospective multicentrique récente portant sur 891 patients atteints de TE défini par l'OMS, le taux annuel d'événements mortels et non mortels était de 1,9 pour 100 patients-années. L'incidence d'événements thrombotiques artériels non mortels (1,2 pour 100 patients-années) était supérieure à l'incidence de thrombose veineuse (0,6 pour 100 patients-années) (21).

En ce qui concerne la MFP, la fréquence des événements thrombotiques a été moins étudiée compte tenu de la rareté de la maladie ; une des études de Barbui et al de 2010 portant sur 707 patients atteints de myélofibrose rapporte une prévalence de thrombose au diagnostic de 9,5% et une incidence d'événements thrombotiques de 1,75 pour 100 patients-années ce qui est comparable aux événements observés dans la TE (22). La thrombose artérielle est plus fréquente que la thrombose veineuse, avec des taux d'incidence respectif de 1,7 et 0,6 pour 100 patients-années.

2. Les thromboses artérielles

Elles constituent la principale cause de mortalité associée à la PV et à la TE et touchent principalement les grosses artères cérébrales et cardiaques. Les stratégies thérapeutiques visent à prévenir ces thromboses artérielles.

a. Les accidents vasculaires cérébraux et les accidents ischémiques transitoires

Ils sont parmi les plus fréquents dans l'ensemble des accidents cérébraux-vasculaires des patients NMP. Cependant l'accident vasculaire cérébral révélant la NMP est rare. Selon E.Ong et al (23) les accidents cérébraux vasculaires révélant la NMP étaient présents dans 4,3% de la population d'étude avec une majorité (environ 63%) d'accidents vasculaires cérébraux suivi d'accidents ischémiques transitoires (23%) et des thromboses veineuses cérébrales (11%). Sur les 35 patients NMP inclus dans leur étude ayant été révélés par des accidents cérébraux-vasculaires, 34% avaient une PV, 60% avaient une TE.

b. Les infarctus du myocarde

L'occlusion des artères coronaires a rarement été décrite chez les patients atteints de TE ou de PV. Moins de 30 cas d'infarctus du myocarde survenus chez des patients TE ont été rapportés dans la littérature. Une étude de Rossi (24) sur 170 TE trouve une prévalence de 9,4%.

L'équipe de Muendlein et al (25) a voulu déterminer la fréquence de la mutation JAK2 V617F dans une cohorte de 1589 patients subissant une angiographie coronarienne (afin d'évaluer leurs maladies coronariennes). Ils ont trouvé une prévalence de 1,32% de la mutation JAK2 V617F chez ces patients.

La thrombose d'une artère coronaire serait le mode de survenue le plus fréquent en cas de TE, et semble toucher préférentiellement l'artère interventriculaire antérieure. Une des

raisons serait liée à une pression systolique importante et à une contrainte de cisaillement élevée, ce qui la rend vulnérable aux dommages endothéliaux (26). D'autres théories sont évoquées comme l'augmentation de l'activité procoagulante des plaquettes et leur activation entraînant des lésions endothéliales irréversibles.

c. Les ischémies périphériques

Les troubles de la microcirculation responsables de manifestations ischémiques sont fréquentes dans les NMP et sont plus couramment observés dans la TE. Ils touchent la microcirculation artérielle périphérique : peau, cerveau, territoires coronariens et abdominaux (27). L'érythromélalgie est la manifestation la plus fréquente, favorisé par un hématocrite > 0,45 et des plaquettes > 400 G/L (28).

3. Les thromboses veineuses de localisation fréquente

a. Les thromboses veineuses profondes des membres inférieurs et les embolies pulmonaires

Contrairement aux thromboses veineuses splanchniques, la recherche de la mutation JAK2 n'est pas indiquée chez les patients ayant fait des thromboses veineuses profondes ou des embolies pulmonaires sans autres arguments cliniques pour une NMP.

Une étude française de 2017 s'est concentrée sur une revue de littérature concernant le dépistage des mutations de la NMP dans les cas de TVP et d'embolies pulmonaires. Les études n'ont pas toujours clairement séparés la TVP de l'EP. Au total 2,1% des patients atteints de TVP/EP ont été identifiés comme JAK2 positifs (29). La charge allélique a été quantifiée pour 21 cas avec une valeur médiane de 3,4%. La plupart des patients ne présentaient pas de caractéristiques de NMP et le taux de récurrence était un élément important puisque 68% des patients ont subi plus d'un événement thrombotique.

La TVP et l'EP sont des sites thrombotiques veineux fréquents dans la population générale et le dépistage des mutations JAK2 dans ces situations est improductif avec moins de 2% de positivité (30). Les auteurs concluent que le dépistage dans les TVP et EP doit être effectué au cas par cas et surtout en présence d'anomalies de l'hémogramme.

4. Les thromboses veineuses de localisations plus rares

a. Les thromboses veineuses splanchniques

Les thromboses veineuses splanchniques sont les plus fréquemment observées dans les NMP et comprennent le syndrome de Budd-Chiari, les thromboses veineuses portales, spléniques et mésentériques. Dans une méta-analyse (31) de 1062 patients atteints de syndrome de Budd-Chiari et de 855 patients avec thromboses veineuses portales, la prévalence estimée de la mutation JAK2 V617F est de 30 à 50% et de 15 à 30% respectivement. Au niveau du sous type de NMP, il faut noter que la polyglobulie de Vaquez était plus fréquente dans les syndrome de Budd-Chiari que dans les thromboses veineuses portales de manière significative. Le dépistage JAK2 V617F chez les patients atteints de SBC sans critères hématologiques de NMP a permis de diagnostiquer une NMP sous-jacent dans 17,1% des patients dépistés et 15,4% des patients dépistés pour la thrombose veineuse portale. Dans une autre étude, parmi 120 patients atteints de thromboses veineuses splanchniques sans NMP déclaré, la mutation était présente chez 21,5% des patients (32). Ces résultats confirment le fait que le bilan diagnostic d'une thrombose veineuse splanchnique doit inclure la recherche de la mutation JAK2 V617F indépendamment des signes biologiques en faveur d'une NMP telle qu'une polyglobulie ou une thrombocytose.

b. Les thromboses veineuses cérébrales

La prévalence de la mutation JAK2 V617F chez des patients atteints de thromboses veineuses cérébrales n'est pas complétement connue. Les quelques études qui ont étudié la relation entre la mutation JAK2 V617F et la TVC retrouve des prévalences de la mutation variant de 0% à 14%. Cependant, à l'exception de 2 études portant sur plus de 100 sujets, les séries de patients ont été relativement petites.

Une des études récentes a évalué la prévalence globale de la mutation JAK2 V617F chez des patients atteints de thrombose veineuse cérébrale sans NMP connus. Avec un nombre total de 1019 patients atteints de TVC, la prévalence globale est de 3,9%. Les auteurs ont également étudié la prévalence de la mutation JAK2 V617F dans un groupe de 125 patients atteints de TVC et rapporte une prévalence de la mutation JAK2 V617F de 5,6% sans NMP connue auparavant (33).

c. Les thromboses veineuses rétiniennes

L'occlusion de la veine rétinienne est une complication relativement rare des NMP. La plupart des études publiées sont essentiellement des cas rapportés dans la littérature. Une lettre à l'éditeur rapporte une fréquence de 0.2% de mutation JAK2 dans les thromboses rétiniennes (34).

Voici un tableau récapitulatif de la fréquence de la mutation JAK2 dans les différents types de localisations thrombotiques :

Thromboses	Prévalence de la mutation JAK2 au diagnostic de thrombose	Equipe et année
Syndrome de Budd-Chiari*	30 à 50%	Smalberg 2012
Thromboses veineuses portales	15 à 30%	
AVC	4.3%	E.Ong 2016
TVC	3.9%	Lamy 2017
TVP et EP	2.1%	Ianotto 2017
IDM	1.32%	Muendlein 2014
Thromboses veineuses rétiniennes	0.2%	Langabeer 2019

Tableau 2 : Fréquence de la mutation JAK2 dans les différents types de localisations thrombotiques

* Syndrome de Budd-Chiari :Obstruction d'au moins une des 3 veines sus-hépatiques par une thrombose.

5. Les thromboses récidivantes

Il existe peu de données dans la littérature sur les thromboses récidivantes après l'événement initial, qui ont souvent conduit au diagnostic de NMP. La survenue de thromboses récidivantes a été spécifiquement évaluée dans une étude rétrospective portant sur 494 patients (235 PV et 259 TE) ayant des antécédents de thromboses (35). 166 patients (33.6%) ont eu une récidive thrombotique, avec une incidence de 7,6 pour 100 patients-années, principalement au cours des deux premières années suivant le diagnostic. Les

thromboses récidivantes concernent dans 61% des cas des vaisseaux artériels et dans 39% des cas des vaisseaux veineux. En analyse multivariée, un âge supérieur à 60 ans était associé à une récidive (HR = 1.67, 95%CI = 1.19-2.32). Le sexe, le type de NMP (TE ou PV) et la présence de facteurs de risques cardiovasculaires n'ont pas impacté le risque de thromboses récidivantes. Le traitement par cytoréducteur est associé à une diminution du taux de récidive thrombotique (HR= 0.53, 95%CI = 0.38-0.73). L'utilisation d'un traitement cytoréducteur avec un agent antiplaquettaire a permis de réduire le risque de récidive par rapport à la cytoreduction seule (HR=0.56, 95%CI = 0.24-0.85) et aux antiagrégants plaquettaires seuls (HR=0.67, 95%CI=0.41-0.99). Il est à noter que près de 40% des récidives sont survenues chez des patients chez qui les objectifs du traitement cytoréducteur n'avaient pas été atteints ou qui ne suivaient pas de traitement antithrombotique approprié.

B. Physiopathologie générale des thromboses au cours des NMP

Divers mécanismes complexes sont impliqués dans la pathogénèse de la thrombose chez les patients atteints de NMP. La mutation JAK2 V617F, les anomalies quantitatives et qualitatives des cellules sanguines et le dysfonctionnement endothélial contribuent à la physiopathologie de la thrombose. A cela se rajoute des facteurs propres à chaque individu qui augmentent ce risque de thrombose comme l'âge, les antécédents de thromboses, les facteurs de risques cardiovasculaires.

L'explication la plus ancienne à ces phénomènes de thromboses dans les NMP est l'augmentation des cellules sanguines. Plusieurs mécanismes ont été proposés par lesquels la mutation JAK2 V617F contribue à la pathogénèse de la thrombose. L'activation des leucocytes et la formation d'agrégats leucocytes plaquettes représentent aujourd'hui les étapes importantes de la pathogénèse de la thrombose chez les patients atteints de NMP.

1. Les leucocytes

Le rôle exact de ces cellules n'est pas complétement élucidé mais elles ont été reconnues comme une partie intégrante dans la pathogénèse d'une thrombose. Les leucocytes présentent plusieurs anomalies qui contribuent à la génération d'un thrombus. Ils libèrent des enzymes protéolytiques et des substances réactives à l'oxygène qui endommagent les cellules

endothéliales et activent ensuite la cascade de la coagulation (36). La surexpression de CD11b à leur surface conduit à une formation accrue d'agrégats leucocytes-plaquettes, participant aux processus de thromboses (37). Un autre mécanisme implique directement les polynucléaires neutrophiles en formant des NETs (Neutrophils Extracellular Traps) qui provoquent in vivo des thromboses chez la souris mutée JAK2 V617F (38).

2. La polyglobulie et l'augmentation de l'hématocrite

L'augmentation de l'hématocrite contribue au développement de la thrombose chez les patients atteints de NMP. Le maintien d'un hématocrite inférieur à 45% sous traitement permet une réduction de l'incidence des thromboses dans la PV (39). L'érythrocytose provoque une stase du sang, des lésions endothéliales et une hypercoagulabilité. Un hématocrite élevé déplace les plaquettes vers les marges du vaisseau sanguin et facilite ainsi l'adhésion des plaquettes au vWF et au collagène (40).

3. Thrombocytose et activation des plaquettes

La thrombocytose n'est pas corrélée au risque de thrombose chez les patients atteints de NMP (41). En fait, la thrombocytose > 1500 G/L chez les patients atteints de NMP augmente le risque de saignement dû à une forme acquise de la maladie de Von Willebrand (42). Le fait qu'il n'y ait pas de preuve d'augmentation du risque de thrombose lié aux thrombocytoses réactionnelles en elles-mêmes montre que le chiffre de plaquettes ne peut expliquer à lui seul le risque de thrombose. Elles participent entre autre à l'agrégation des leucocytes, à l'activation de la coagulation et à la formation de microparticules (43).

4. Rôle des cellules endothéliales

Le nombre de cellules endothéliales circulantes est en corrélation avec le nombre d'épisodes thrombotiques chez les patients atteints de thromboses veineuses et ces cellules sont significativement plus élevées chez les patients atteints de NMP (44).

En identifiant la mutation JAK2 V617F dans les cellules endothéliales de patients atteints de NMP avec des thromboses associées, certains auteurs (45) indiquent le rôle

possible d'un dysfonctionnement endothélial dans la formation de thrombus en particulier dans les syndromes de Budd Chiari (46).

5. Les microparticules plaquettaires

Les patients atteints de NMP et de thromboses ont un nombre plus élevé de microparticules circulantes dans le sang, suggérant un rôle des microparticules dans la pathogenèse des événements thrombotiques (47). Par exemple les microparticules ont une activité pro coagulante dépendant des phospholipides plus élevé dans les TE JAK2 par rapport aux témoins JAK2 négatifs (48). Les microparticules pourraient contribuer à la thrombogénèse via plusieurs mécanismes comme l'activation de la voie extrinséque de la coagulation (49) ou par l'interaction des microparticules avec les plaquettes activées pour augmenter leur agrégation et la formation de thrombus (43).

C. Facteurs de risques thrombotiques dans les NMP

Les facteurs de risques de thromboses dans les NMP peuvent à la fois être liés au patient, au sous-type du NMP et au type de thromboses artérielles et veineuses. Leurs identifications précises sont limitées par les études disponibles qui sont principalement des études rétrospectives ou cas témoins. D'autre part les auteurs ne distinguent pas toujours la thrombose artérielle de la thrombose veineuse. Nous avons fait le point sur ces différents facteurs de risques.

1. Facteurs de risques liés aux patients
   a. Le sexe

Selon l'étude ECLAP (50) les hommes atteints de PV avaient connu plus d'événements thrombotiques artériels au diagnostic, en particulier d'infarctus du myocarde par rapport à leurs homologues féminins (11.3% vs. 5.8%, $p<0.0001$). La thrombose dans les sites veineux splanchniques ou cérébrals sont à l'inverse plus fréquente chez la femme au moment du diagnostic (11.4% vs. 7.9%, $p = 0.016$).

Les facteurs de risques spécifiques au sexe féminin tels que l'hormonothérapie ont été évalués dans une étude rétrospective portant sur 305 femmes atteintes de TE. Le traitement hormonal substitutif n'est pas associé à un risque accru de thromboses artérielle ou veineuse, alors que la contraception orale peut augmenter le risque de thrombose veineuse, en particulier dans les sites splanchniques (7% vs 2% , p= 0,03) (51).

b. L'âge et les antécédents de thrombose

L'âge et les antécédents de thrombose font parti actuellement de la stratification des PV et des TE pour estimer le risque de thromboses artérielles et adapter le traitement (52). Pour les personnes âgées de plus de 65 ans avec des antécédents de thromboses, l'incidence est de 10,9 pour 100 patients années contre 2,5 pour 100 patients-années pour les sujets âgés de moins de 65 ans sans antécédents de thromboses (7). Une autre étude a révélé que l'âge et les antécédents de thromboses sont des facteurs de risque indépendants d'événements thrombotiques artériels, mais la signification statistique n'a pas été atteinte pour les événements thrombotiques veineux (21). Le rôle de ces facteurs de risque dans la MFP est moins bien établi.

c. Les anomalies du bilan de thrombophilie

Des résultats contradictoires ont été rapportés concernant l'impact de plusieurs caractéristiques thrombophiliques, notamment la prothrombine G2021A, le facteur V Leiden et les anticorps antiphospholipides (53). Les patients âgés de moins de 60 ans avec des anomalies du bilan de thrombophilie (y compris l'hyperhomocystéinémie) présentaient un risque de récidive thrombotique plus élevé que ceux sans thrombophilie (35) ce qui suggère un effet synergique du NMP sur le risque de récurrence thrombotique.

d. Risques cardiovasculaires

Plusieurs équipes dont Landolfi et al (54) et Carobbio et al (21) ont évalué les facteurs de risques cardiovasculaires tels que l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le tabagisme et le diabète. Dans l'étude de Landolfi (54), un tiers des 169 PV avaient un ou plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires. Le tabagisme est associé de manière

significative à une augmentation du risque d'événements thrombotiques artériels dans les PV (54) et les TE (21). L'association rapportée concerne les événements artériels et non veineux.

2. Facteurs de risques liés à la maladie

a. Les globules blancs et les plaquettes

La leucocytose est apparue comme un facteur potentiel du risque thrombotique, contrairement à la thrombocytose. Chez les patients PV de l'étude ECLAP (54), un taux de leucocytes supérieur à 15 G/L est associé à un risque significativement plus important de thromboses majeures (surtout infarctus du myocarde) par rapport à un taux inférieur à 10 G/L (HR=2.84; 95% CI, 1.25-6.46, p= 0.017).
Dans une cohorte de 776 TE (55), le risque de thromboses artérielles et veineuses n'était pas significativement associé au taux de plaquettes ou au niveau d'hémoglobine alors qu'il existait une association significative entre les leucocytes et le risque de thrombose (p= 0.03). Dans une autre étude portant sur 891 patients atteints de TE, une leucocytose supérieure à 11 G / L était associée de manière significative à une thrombose artérielle (HR 1.7, 95% 1.01-2.72, p=0.044) (21). Nous pouvons noter que les seuils sont assez variables entre les études.

La thrombocytose extrême réduit le risque de thromboses artérielles dans la TE (HR 0.42 95%CI 0.22-0.78, p = 0.007) (21). Cet effet protecteur pourrait être secondaire à un déficit acquis du facteur Von Willebrand (56), également considéré comme un facteur de risque de saignement.

Voici un récapitulatif des facteurs de risques de thromboses artérielles et veineuses rencontrés dans la PV et la TE :

	Thromboses artérielles		Thromboses veineuses	
Facteurs de risques	PV	TE	PV	TE
Facteurs de risques cardiovasculaires	✔	✔	-	-
Age > 60 ans	✔	✔	✔	-
Antécédents de thromboses	✔	✔	✔	-
Sexe masculin	✔	-	-	✔
Leucocytose	✔ (>15 G/L)	✔ (>11 G/L)	-	-

Tableau 3 : Facteurs de risques de thromboses artérielles et veineuses décrits dans la littérature pour la PV et la TE d'après Casini et al (19).

b. La charge allélique JAK2 V617F

Après la découverte de la mutation JAK2 V617F en 2005 par l'équipe de Baxter et al (57), les chercheurs se sont rapidement intéressés à la corrélation génotype - phénotype. La charge allélique est en corrélation avec des phénotypes hématologiques distincts. Les patients TE et PV homozygotes JAK2V617F présentent un taux d'hématocrite et de leucocytes significativement plus élevé au moment du diagnostic, un taux de plaquettes plus bas et une incidence accrue de prurit et de splénomégalie (58) (59). Les patients avec une MFP homozygotes pour la mutation JAK2 sont également associés à une splénomégalie plus importante, une leucocytose plus élevée et un plus grand besoin en traitement cytoréducteur (60).

La corrélation entre la charge allélique et le risque thrombotique est discutée dans la littérature. Pour cette raison nous avons fait une étude monocentrique sur cette question.

D. Thérapeutique

1. Stratification du risque

Actuellement dans les NMP, les facteurs prédictifs de thromboses reconnus sont l'âge supérieur à 60 ans, les antécédents de thromboses veineuses et artérielles et la présence de la mutation JAK2 V617F (61) (62). Récemment, un groupe international d'experts a proposé un score pronostic « IPSET » pour la thrombose chez les patients atteints de TE (63) (Tableau 4). L'hyperleucocytose n'a pas été incluse car elle correspondait à un risque de thromboses artérielles uniquement.

Facteurs de risques	Score*
Age > 60	1
Facteurs de risques cardiovasculaires	1
Antécédents de thromboses	2
JAK2 V617F	2

*Score = 0-1 : Faible risque ; Score = 2 : Risque intermédiaire ; Score ≥3 : Risque élevé

Tableau 4 : score IPSET : Estimation du risque de thromboses dans la TE

2. Stratégies thérapeutiques

Dans la PV, le principal objectif est de maintenir l'hématocrite < 45% par des saignées, diminuant le risque de mortalités cardiovasculaires Marchioli (39). Pour les PV à bas risque (âge < 60 ans, pas d'antécédents de thromboses), les saignées sont associées systématiquement à l'aspirine faible dose alors que pour les PV à haut risque un traitement cytoréducteur (Hydrea®) est mis en place. Pour les TE le schéma thérapeutique est globalement le même allant d'un traitement par aspirine faible dose uniquement pour les TE à bas risque à l'association aspirine et hydrea® pour les TE à haut risque. L'objectif du traitement cytoréducteur par hydrea est de diminuer la morbi-mortalité et de prévenir les complications thrombotiques et hémorragiques.

3. Anti JAK2

Le ruxolitinib ou Jakavi® est un inhibiteur de la signalisation JAK/STAT et de la prolifération cellulaire. Il est indiqué dans la myélofibrose primitive et dans les myélofibroses secondaires à la PV et à la TE. Récemment le Jakavi® s'est montré efficace dans les PV intolérantes ou résistantes à l'hydroxyurée dans deux études cliniques de phase 3, en améliorant le contrôle de l'hématocrite et la réduction de la splénomégalie (RESPONSE 1 (64) et RESPONSE 2 (65)). Le ruxolitinib a également permis une réduction jusqu'à 40% de la charge allélique JAK2 chez les patients PV (66). Dans la TE, le ruxolitinib n'a pas montré de bénéfice par rapport au meilleur traitement disponible chez les patients intolérants à l'hydrea® (67).

L'efficacité révolutionnaire de la monothérapie par les inhibiteurs de tyrosine kinase dans la LMC n'a pas été reproduite par le JAKAVI® dans les NMP. De nouveaux traitements spécifiques anti JAK2 comme le gandotinib sont en cours d'essai (68).

Dans l'optique de pouvoir mieux répondre à la question concernant le lien entre la charge allélique et la thrombose, nous avons entrepris de mener une étude rétrospective sur une population de patients JAK2 positifs entre 2011 et 2018.

Partie III : Etude rétrospective de 452 patients de l'APHM

A. Matériel et méthode

1. Objectifs de l'étude

Nous avons réalisé une étude rétrospective, monocentrique sur 452 patients entre 2011 et mai 2018 et une étude sur 583 recherches de la mutation JAK2 correspondant à 490 patients JAK2 négatifs et 93 patients JAK2 positifs entre mai 2017 et mai 2018. Les objectifs principaux sont présentés en figure 4a et 4b.

a. Objectif principal

L'objectif principal de l'étude est le suivant :

- Evaluer l'influence de la charge allélique de la mutation JAK2 V617F sur les événements thrombotiques au diagnostic et sur les événements thrombotiques récidivants au suivi des patients.

b. Objectifs secondaires :

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Evaluer à titre « exploratoire » la présence de facteurs de risques de thromboses au moment du diagnostic de la NMP.
- Déterminer la fréquence de la mutation JAK2 V617F sur un an entre mai 2017 et mai 2018 dans deux groupes de patients : l'un atteint de thromboses veineuses cérébrales et l'autre d'embolies pulmonaires.
- Comparer les caractéristiques cliniques et biologiques de 2 groupes de patients atteints de thromboses veineuses cérébrales (l'un JAK2 V617F positifs sans NMP déclarée et l'autre JAK2 V617F négatif) afin de rechercher un groupe à risque susceptible d'avoir la mutation JAK2 V617F.
- Comparer les caractéristiques cliniques et biologiques de 2 groupes de patients atteints d'embolies pulmonaires (l'un JAK2 V617F positifs sans NMP déclarée et l'autre JAK2 V617F négatif) afin de rechercher un groupe à risque susceptible d'avoir la mutation JAK2 V617F.
- Comparer les caractéristiques cliniques et biologiques entre les groupes TE JAK2 et TE doubles mutées JAK2 MPL ou CALR.

2. Sélection des patients

Tous les patients inclus dans l'étude ont été sélectionnés à partir de la base de donnée du service de Biochimie - Biologie moléculaire du Professeur Gabert à l'Hôpital Nord. Les principaux services cliniques concernés sont: hématologie clinique (Pr Costello), médecine interne (Pr Harle), laboratoire d'hémostase spécialisé (Pr Morange).

Les critères d'inclusions principales étaient la présence de la mutation JAK2 V617F et l'absence du chromosome de Philadelphie. Les patients doubles positifs JAK2 V617F et MPL W515L ou CALR ont également été inclus.

Les critères d'exclusions étaient les patients avec données cliniques non renseignées et les « doublons » c'est-à-dire la mutation JAK 2 redosée chez les mêmes patients durant la période d'étude.

Le nombre de patients JAK2 V617F positifs entre 2011 et mai 2018 est de 622 (soit 16%) sur un total de 3904 demandes. Après exclusion de 170 patients pour données manquantes, l'étude s'est portée sur 452 patients de l'APHM. Le diagnostic final de polyglobulie de Vaquez, thrombocytémie essentielle a été établi par les réunions de concertations pluridisciplinaires des médecins. Les mutations JAK2 retrouvées dans d'autres hémopathies comme les syndromes myélodysplasiques, la LMMC, lymphomes et leucémie aigues ont été classées dans une catégorie à part : « NMP inclassables ». Nous avons rajouté une autre entité: « thromboses isolées » c'est à dire, une mutation JAK2 V617F retrouvée isolément chez des patients avec des complications thrombotiques associées à une numération formule normale.

Pour déterminer la fréquence des thromboses sur 1 an au sein de ces NMP, nous avons sélectionné le nombre total de demandes JAK2 entre mai 2017 et mai 2018.

Les objectifs de l'étude sont représentés sur la figure n°1.

Les données propres aux patients tel que l'âge, le sexe, les données de la numération formule sanguine, l'évolution en myélofibrose et les facteurs de risques cardiovasculaires (tabac, hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie) ont été relevés au moment du dosage de la mutation JAK2 V617F.

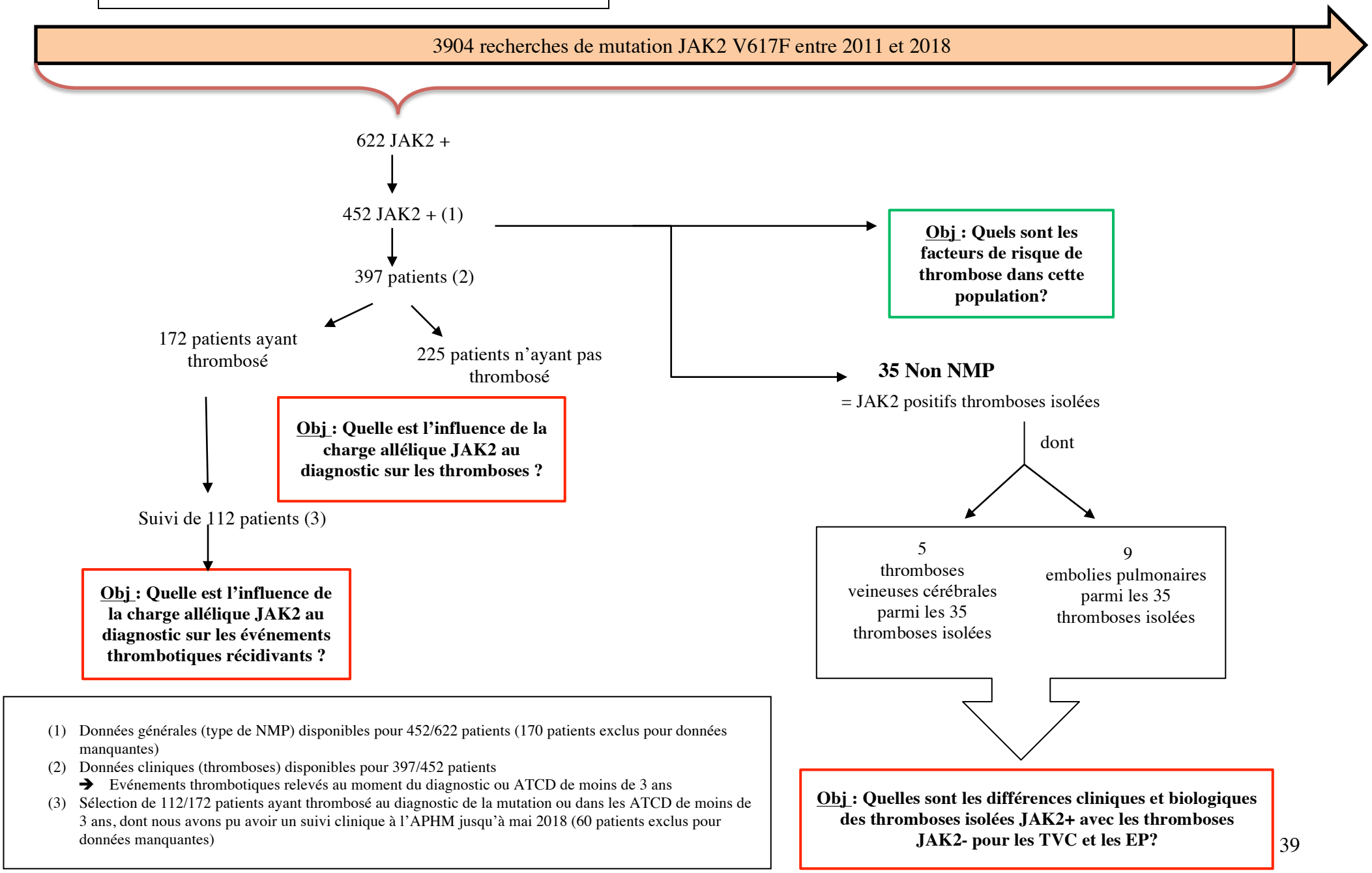
3. Définition des événements thrombotiques artériels et veineux

Les complications thrombotiques au diagnostic et dans les antécédents de moins de 3 ans ont été répertoriées en thromboses artérielles et veineuses à partir des conclusions médicales des cliniciens. Nous avons relevé :

- Les thromboses veineuses profondes des membres inférieurs (TVPMI)
- Les thromboses veineuses portales, mésentériques, hépatiques et syndrome de Budd Chiari regroupés sous le terme général de thromboses veineuses splanchniques (TVSPLAN)
- L'embolie pulmonaire (EP)
- Les thromboses veineuses cérébrales (TVC)
- Les thromboses veineuses rétiniennes (TVRET)
- L'infarctus du myocarde (IDM)
- L'accident vasculaire cérébrale (AVC)
- L'accident ischémique transitoire (AIT)
- Les thromboses artérielles des membres inférieurs et supérieurs (TAMI et TAMS)
- Les ischémies périphériques des membres inférieurs ou supérieurs (ISCH)

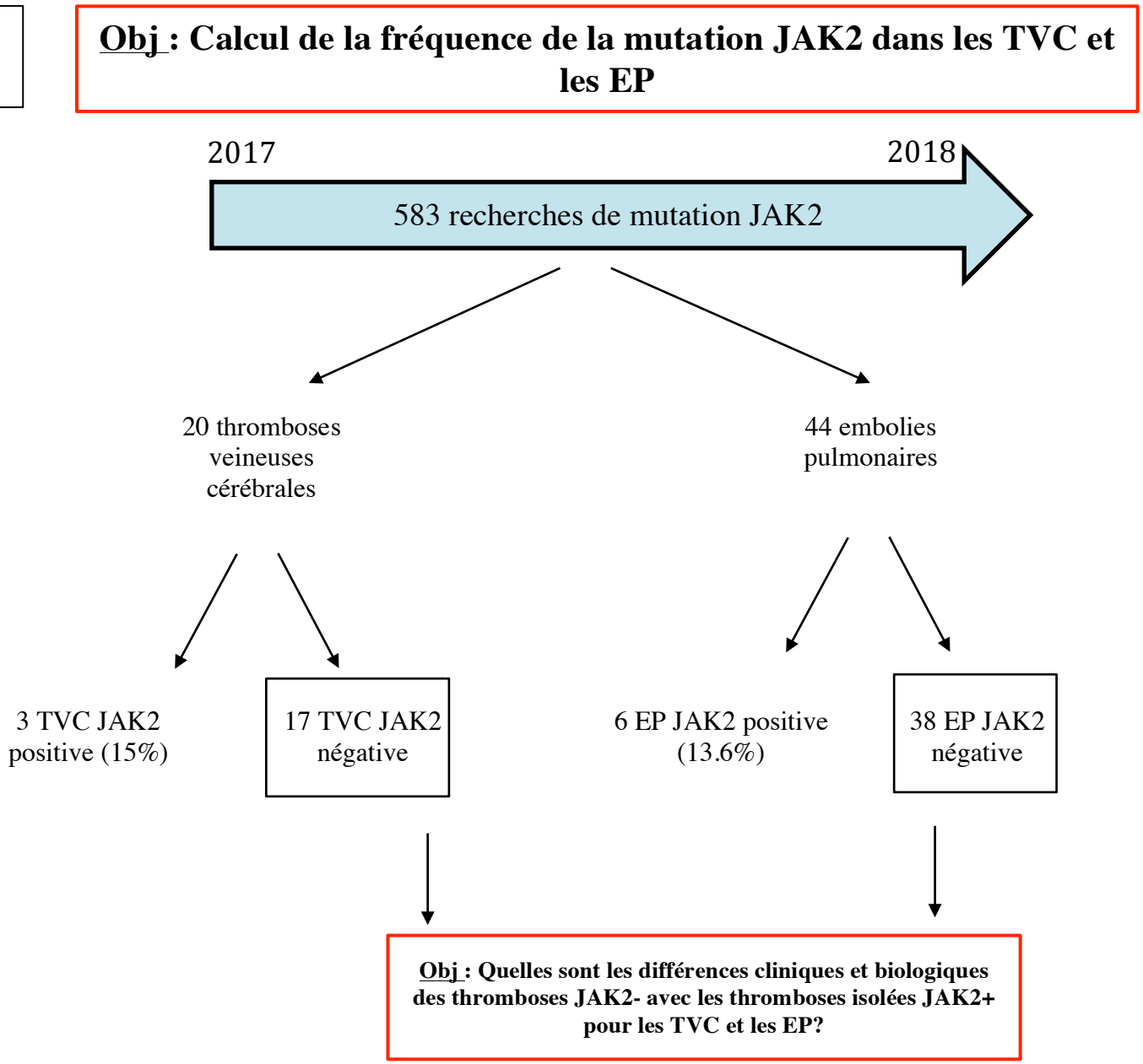
Les thromboses veineuses superficielles et les complications hémorragiques n'ont pas été recueillies au diagnostic et au suivi des patients.

Figure 4a : Objectifs de l'étude et sélection des patients



(1) Données générales (type de NMP) disponibles pour 452/622 patients (170 patients exclus pour données manquantes)
(2) Données cliniques (thromboses) disponibles pour 397/452 patients
➔ Evénements thrombotiques relevés au moment du diagnostic ou ATCD de moins de 3 ans
(3) Sélection de 112/172 patients ayant thrombosé au diagnostic de la mutation ou dans les ATCD de moins de 3 ans, dont nous avons pu avoir un suivi clinique à l'APHM jusqu'à mai 2018 (60 patients exclus pour données manquantes)

Figure 4b : Objectifs de l'étude et sélection des patients



4. Analyse statistique

Les variables continues ont été décrites par leur moyenne, écart-type ou par la médiane encadrée de la valeur minimum et maximum. Les variables catégorielles ont été décrites par leur effectif et pourcentage. Les variables continues ont été comparées par le test non paramétrique U de Mann Withney. Les variables catégorielles ont été comparées par le test du chi-deux ou par le test exact de Fisher, selon les conditions d'applications. L'analyse statistique descriptive des variables continues a été réalisée par le Service de Biostatistique (BIOSTIC) du Professeur Giorgi de l'APHM.

Pour évaluer l'influence de la charge allélique JAK2 sur les événements thrombotiques, plusieurs modèles statistiques multivariés ont été adoptés pour l'analyse des données.

Premièrement, nous avons réalisé plusieurs régressions logistiques multivariés et proposer deux modèles statistiques « exploratoires ». Le premier modèle a été réalisé sur les facteurs de risques de thromboses totales (artérielle et veineuse) sur l'ensemble des patients JAK2 et le deuxième sur les facteurs de risques de thromboses artérielles dans la TE. Nous avons inclus dans chacun des modèles en plus de la charge allélique JAK2, différents facteurs de confusion ou covariables telle que le sexe, l'âge, le taux de plaquettes, d'hémoglobine, de globules blancs et les facteurs de risques cardiovasculaires (HTA, diabète, dyslipidémie, tabac). Les paramètres jugés intéressants d'après les données de la littérature et/ou présentant un $p < 0,30$ en analyse univariée ont servi à la conception des modélisations par régression logistique pour mesurer la force des associations. La performance des modèles de régression logistiques a été évaluée par la réalisation de courbes ROC, le calcul de leur surface sous la courbe (AUC) ou un modèle est considéré comme ajusté aux données si l'AUC dépasse 0,7 ainsi que la minimisation du critère d'information d'Akaike (AIC). La validité du modèle a été évaluée par l'analyse graphique des résidus et leurs homogénéités.

Deuxièmement, pour évaluer l'influence de la charge allélique JAK2 sur les récidives d'événements thrombotiques, des courbes de Kaplan Meier ont été réalisées. Le test de logRank a été utilisé pour comparer les courbes de survie. Un modèle de Cox a été utilisé pour tester l'impact de différentes covariables (age, sexe, type de NMP, facteurs de risques cardiovasculaires, traitement antiagrégant et cytoréducteur) sur le risque de thrombotique. La

performance du modèle a été évaluée par la recherche du critère d'information d'Akaike minimal.

Tous les tests ont été considérés comme statistiquement significatifs pour $p \leq 0,05$. Nous avons réalisé les graphiques et l'ensemble des modèles statistiques (régressions logistiques et modèle de COX) avec le logiciel Rstudio (Version 1.1.463 2018, librairies utilisées : diplyr, ggplot2, gggally, finalfit, ROCR, survival, survminer).

5. Analyse moléculaire :

a. Extraction de l'ADN :

L'ADN génomique a été isolé à partir de 200 μL de sang total avec le kit « EZ1 DNA Blood 200 μL (Qiagen, Les Ulis, France) » en utilisant l'appareil EZ1 Advanced XL de Qiagen conformément aux recommandations du fabricant. L'ADN a été quantifié avec un spectrophotomètre NanoDrop 8000 (Thermo FISHER Scientific, Saint Herblain, France) et dilué à 10 ng/mL dans de l'eau stérile sans DNase et RNase.

b. Quantification JAK2 V617F par PCR quantitative en temps réel

Pour la quantification de la mutation JAK2 V617F, nous réalisons une PCR quantitative en temps réel par fluorescence utilisant un couple d'amorce spécifique du fragment d'ADN d'intérêt et une sonde d'hydrolyse TaqMan-MGB.

Tous les patients sont testés en double à l'aide du système de PCR en temps réel Mx3000P (Agilent Technologies, Les Ulis, France). La PCR quantitative a été réalisée avec 50 ng d'ADN génomique dans un master mix PCR TaqMan Universal (Life Technologies, Villebon Sur Yvette, France). Les concentrations des amorces sens et anti-sens et de la sonde utilisées pour la quantification des allèles JAK2 V617F étaient les suivantes (cf figure 5).

Pour vérifier l'absence d'inhibiteur au cours de la technique, une PCR quantitative du gène albumine est réalisée conjointement. L'amplification du gène de l'albumine en tant que contrôle interne a été réalisée avec 300 nmol/L de chaque amorce (amorce sens et amorce anti-sens) et 200 nmol/L de sonde (6VIC-AACAGGCGACCATGC-MGBBFNQ).

Les conditions du profil thermique étaient de 95 ° C pendant 10 minutes, de 45 cycles à 95°C pendant 30 secondes et à 60°C pendant 1 minute.

ANALYSE	Mode opératoire de l'analyse	SEQUENCES			Concentration Finale	Nombre de bases / Marquage
Quantification du gène JAK2 V617F	22ANAP06M151	FW	JAK2V617F FW	AGCTTTCTCACAAGCATTTGGTT	600nM	23
		RV	JAK2V617F RV	GTTTTACTTACTCTCGTCTCCACAAAA	300nM	27
		Pr	JAK2V617F P	AATTATGGAGTATGTTTCTG	200nM	5'FAM – 3'MGB

FW: Amorce Forward (Sens) - RV: Amorce Reverse (Antisens) - Pr: Probe (Sonde)

Préparation du mélange d'amorces & sonde concentré 20X pour la PCR quantitative *jak2 V617F*

Réactifs	Concentration Initiale	Concentration Finale	Volume pour 100µL	Volume pour 500µL
JAK2V617F FW	100 µM	6 µM	12 µl	60 µl
JAK2V617F RV	100 µM	6 µM	6 µl	30 µl
JAK2V617F P	100 µM	4 µM	4 µl	20 µl
EAU			78 µL	390 µL

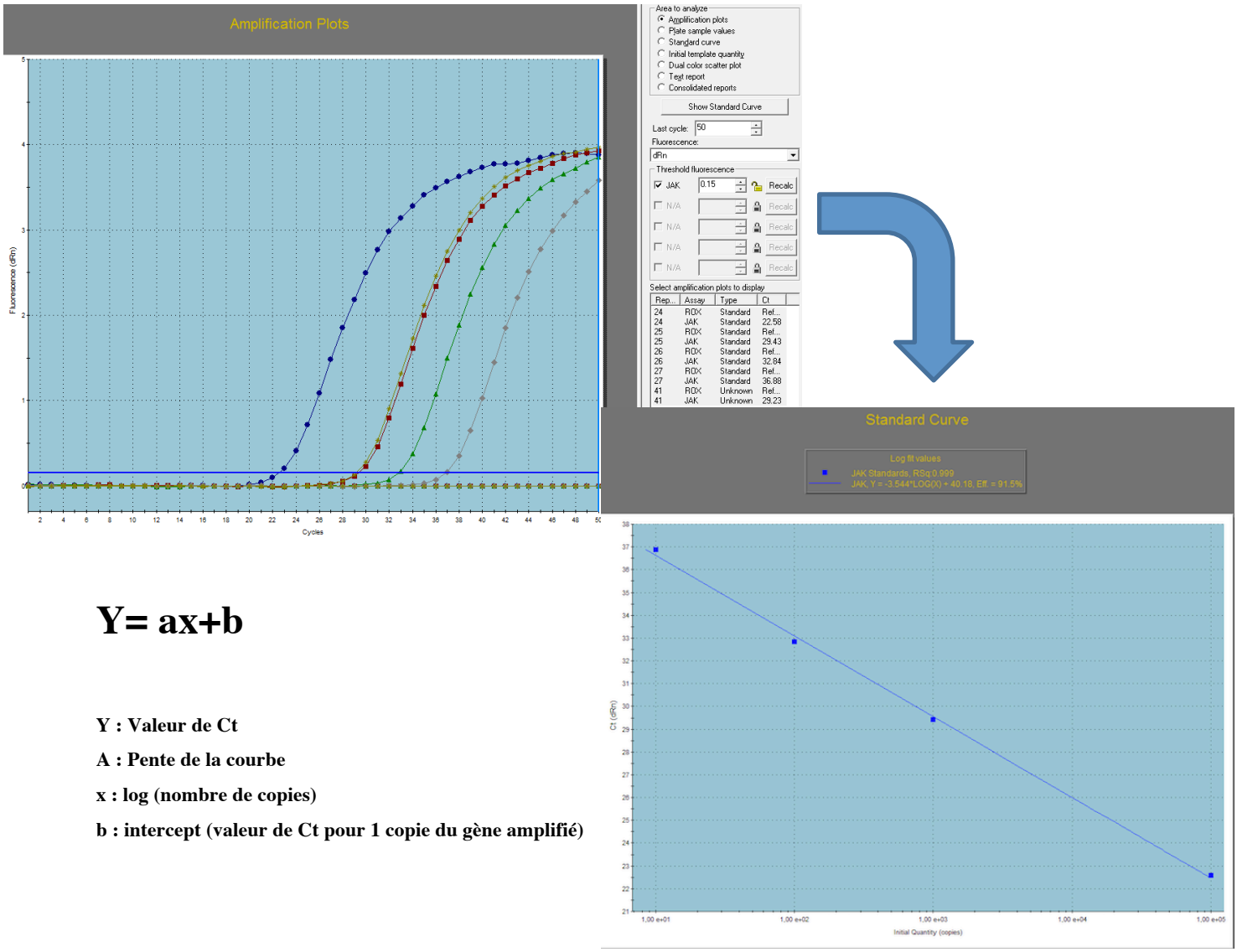
Figure 5 : Concentrations des amorces sens et anti-sens et de la sonde utilisées pour la quantification des allèles JAK2 V617F

c. Interprétation de l'analyse sur le MX300P

Les nombres de copies JAK2 V617F et Albumine ont été obtenus à partir d'une courbe standard de calibrateur de plasmide produit au sein du laboratoire. C'est le principe de la quantification absolue (mode « Standards multiples »). Elle utilise une courbe standard pour quantifier le nombre de cibles présentes dans un échantillon sanguin. Une série de dilutions d'échantillon standard (plasmide) dont le nombre de copies de la séquence cible est connue, est amplifiée pour générer une courbe standard.

- Calibrant plasmide ALBUMINE (10^5, 10^4 et 10^3 copies)
- Calibrant plasmide JAK2 V617F (10^5, 10^3, 10^2 et 10 copies)

Il existe une relation linéaire entre la quantité de molécule cibles à l'origine présente dans l'échantillon et le Ct obtenu pour cet échantillon (Figure 6)



Y= ax+b

Y : Valeur de Ct

A : Pente de la courbe

x : log (nombre de copies)

b : intercept (valeur de Ct pour 1 copie du gène amplifié)

Figure 6 : Représentation de la courbe standard pour quantifier le nombre de copies de séquence cibles connues (ici calibrant plasmide JAK2V617F)

Une courbe standard du log10 de la concentration de la cible en fonction du Ct est alors générée. A partir de cette courbe, la quantité de la séquence cible d'un échantillon inconnu peut être déterminée en fonction du Ct obtenu sur la machine.

Pour corriger les variations de qualité / quantité d'ADN, les résultats d'amplification de la PCRq ont été exprimés comme un ratio du nombre de copies d'ADN/ nombre de copie gène de contrôle. Le seuil de qualité pour la PCRq du gène albumine est de 10 000 copies.

Les courbes d'amplification ne doivent pas montrer la présence d'inhibiteurs de PCR caractérisée par une valeur de Ct tardive ou une diminution de fluorescence au plateau de la PCR d'au moins 3 fois par rapport à la valeur de la fluorescence au plateau maximal attendu.

Le rapport de charge mutationnelle de JAK2 V617F a été calculé en utilisant le nombre de copies d'ADN selon la formule **JAK2 V617F / Albumine.**

Les courbes des patients sont interprétées en comparant la courbe du contrôle négatif à 0% d'allèles mutés et le point le plus bas de la courbe standard du calibrant plasmide JAK2 V617F soit 10 copies ou 0,1% d'allèles mutées. Les patients au-dessus de 10 copies sont considérés comme positifs, ceux entre 10 et 40 copies sont considérés comme faiblement positifs et les patients entre 0 et 10 copies sont considérés comme douteux et à recontrôler en doublant la quantité d'ADN (Figure 7).

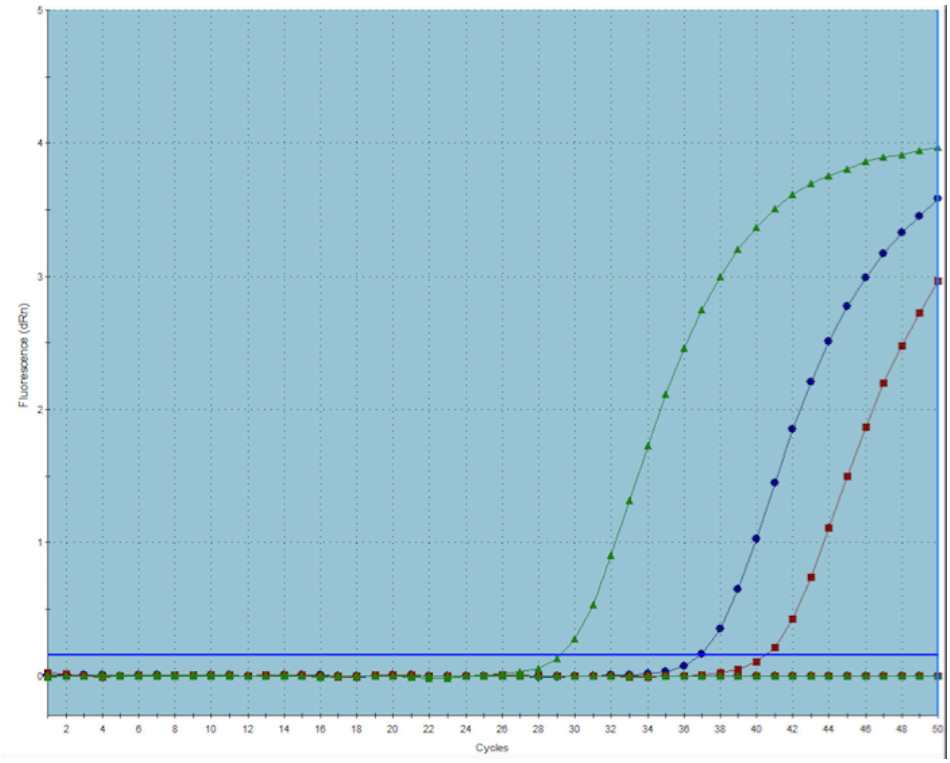


Figure 7 : Représentation de la courbe d'un patient (en vert) positif pour la mutation JAK2 en fonction du contrôle négatif à 0% d'alléle muté (courbe rouge) et du contrôle à 0,1% d'alléles mutées (courbe bleu)

B. Résultats

1. Description de la population

a. Caractéristiques des patients de l'étude.

A partir de 3904 demandes entre 2011 et 2018, le nombre de patients JAK2 positifs est de 622 ce qui correspond à 16%. Après avoir exclu 170 patients avec données cliniques incomplètes, nous avons pu répertorier 452 patients dont 224 atteints de TE (49,6%), 149 patients avec PV (33%), 30 avec MFP (6,6%), 35 thromboses isolées avec la mutation JAK2 V617F (7,7%) et 14 autres correspondant aux NMP inclassables (3,1%) et comprenant 6 syndromes myélodysplasiques, 6 leucémies myélomonocytaires chroniques et 2 leucémies aigues. La population est composée de 229 femmes et de 223 hommes.

La figure 8 représente la répartition des différents sous-types de population JAK2 positifs et le tableau 5, les caractéristiques des patients JAK2 positifs.

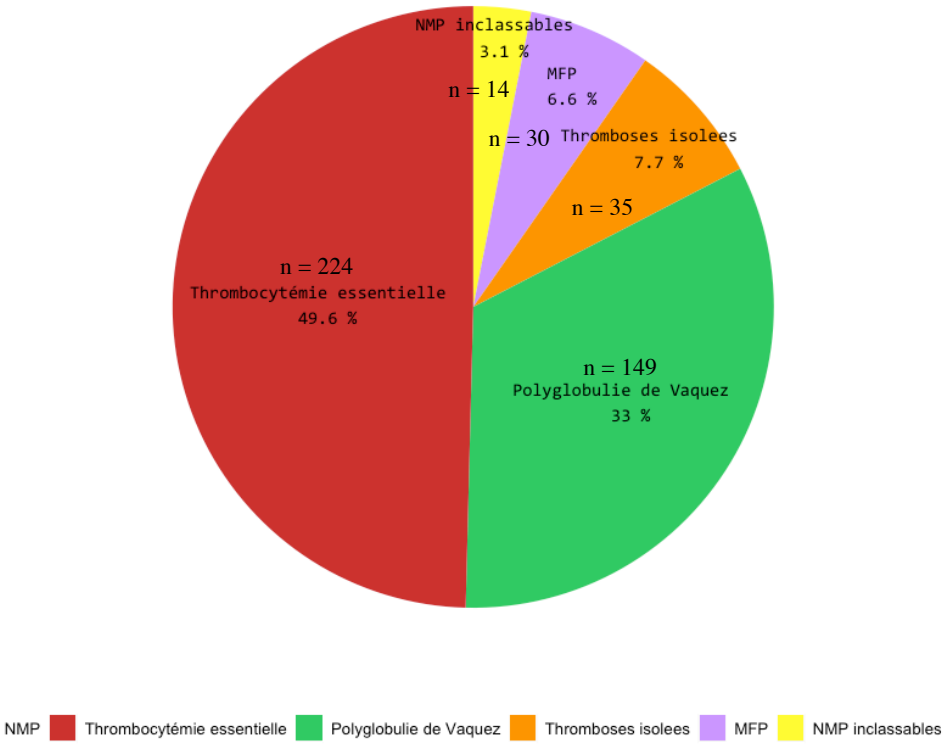


Figure n°8 : Répartition des patients JAK2 positifs à l'APHM entre 2011 et 2018.

L'âge moyen du diagnostic de la mutation JAK2 dans la population générale de l'étude est de 65 ans. Nous observons également sur la figure 9 que le pic de découverte se situe entre 60 et 80 ans avec un nombre non négligeable de patients découverts entre 40 et 60 ans. Le groupe le plus jeune correspond à celui des thromboses isolées et les 2 groupes les plus âgés sont les NMP inclassables et les myélofibroses primitives.

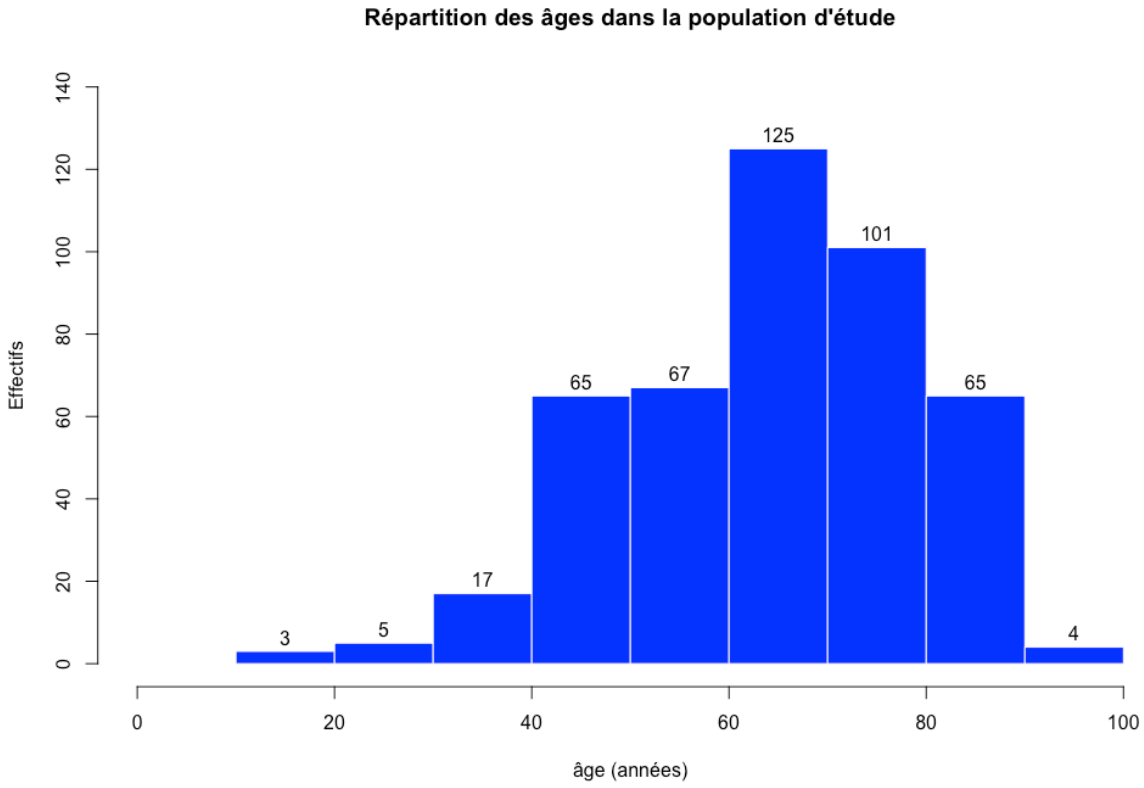


Figure n°9 : Répartition des âges dans la population d'étude

Dans le groupe des TE et des thromboses isolées, il y a une nette prédominance du sexe féminin alors que la majorité des patients sont de sexe masculin pour la PV, la MF et les NMP inclassables. Nous pouvons voir que la plupart des patients évoluant vers une myélofibrose secondaire étaient atteints de la PV au départ. A noter que les patients doubles mutés JAK2/MPL ou JAK2/CALR sont presque exclusivement des TE (8 patients sur 9).

Caractéristiques	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocytémie essentielle	Myélofibrose primitive	NMP inclassables	Thromboses isolées
Nombre n, (%) de patients	149 (33)	224 (49.6)	30 (6.6)	14 (3,1)	35 (7.7)
Sexe ratio M/F, n	94/55	91/133	17/13	10/4	11/24
Age, médiane, années					
Total	65 (10-93)	67 (27-93)	74 (37-89)	80 (55-90)	56 (14-85)
Homme	65 (10-93)	66 (27-89)	73 (56-86)	82 (55-88)	58 (14-80)
Femme	67 (36-92)	67 (34-93)	74 (37-89)	78 (74-90)	55 (17-85)
Hémoglobine médiane, g/L	172.5 (98-225)	140 (72-195)	106,5 (56-132)	108,5 (71-167)	135 (92-164)
Hématocrite médiane	0.52 (0.32-0.7)	0.42 (0.21-0.58)	0.33 (0.32-0.7)	0.34 (0.22-0.2)	0.41 (0.27-0.48)
Globules rouges médiane, T/L	6.115 (2.67-10.1)	4.8 (1.95-7.36)	4 (1.84-5.3)	3.745 (2.22-5.74)	4.72 (3.03-5.55)
Globules blancs médiane, G/L	11 (0.4-40)	9.9 (2.6-46)	10.75 (1.5-36)	8.4 (1.5-42.9)	7.3 (4-18.8)
Plaquettes médiane, G/L	398 (57-1303)	640 (30-2300)	285.5 (19-864)	205 (47-1359)	296 (180-424)
Charge allélique JAK2 V617F médiane, %	27.89 (0.05-82)	10.7 (0.05-89.29)	25.18 (1.57-99.32)	11 (0.11-65.90)	0.79 (0.06-20.84)
Type de Mutation, n, %	148 (99.3)	216 (96.4)	30 (100)	14 (100)	35 (100)
JAK2 V617F					
Double mutés JAK2 V617F et CALR exon9	1 (0.7)	2 (0.9)	0	0	0
Double mutés JAK2 V617F et MPL exon10	0	6 (2.7)	0	0	0
Evolution en Myelofibrose secondaire, n	9 (6)	3 (1.3)	0	1 (7)	0
Décès, n	0	9 (4)	5 (16.7)	1 (7)	1 (2.8)

Tableau 5 : Caractéristiques des patients JAK2 positifs

b. Répartition des patients en fonction de la charge allélique JAK2 V617F

Pour notre population de JAK2 positifs, la médiane et la moyenne de la charge allélique JAK2 est de 13,52% (0,05 – 99,32) et de 20.41% ± 20,22 respectivement. (Figure 10a)

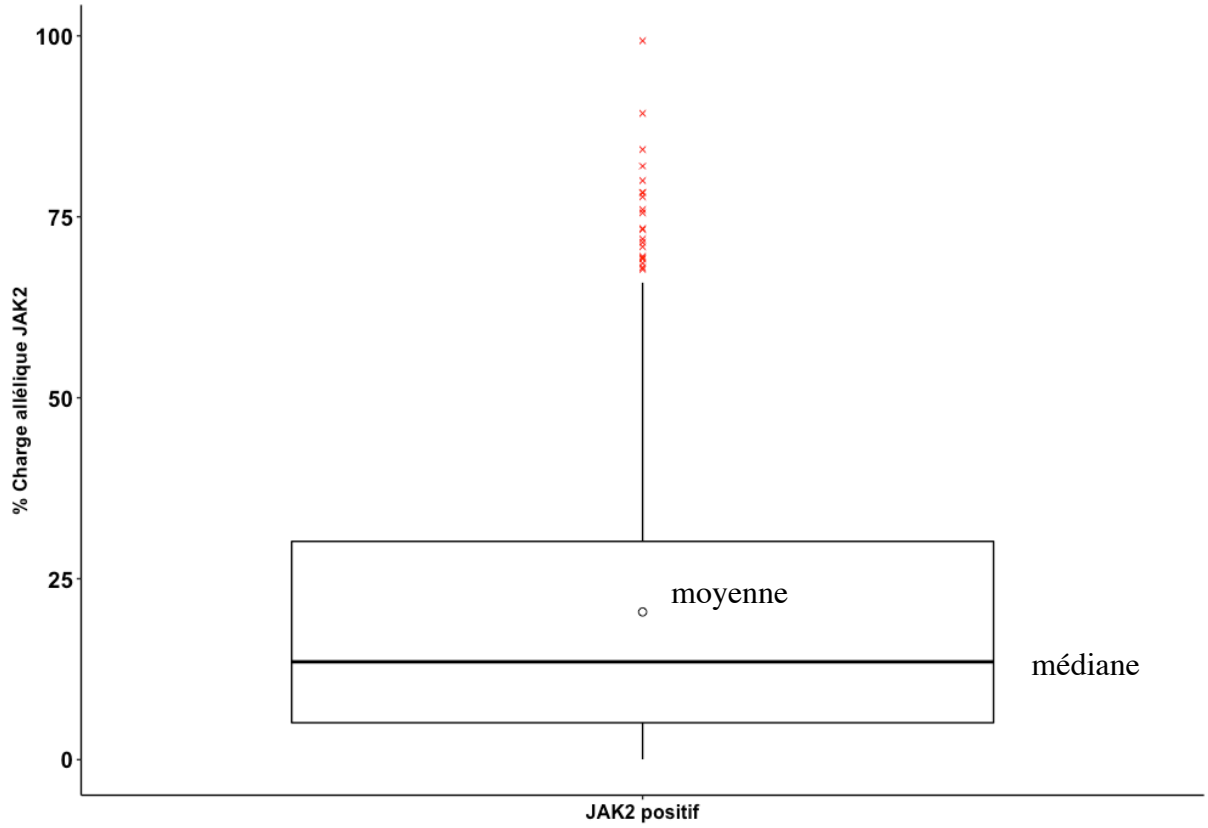


Figure n°10a : Médiane et moyenne de la charge allélique JAK2 de la population de l'étude

De manière générale, la présence d'une charge allélique > 25% oriente plutôt vers une PV et une MFP alors qu'une charge allélique < 25% oriente plus vers une TE (p< 0.001) (Figure 10b). Avec le faible nombre de cas pour les NMP inclassables, nous ne pouvons pas présager de les classer en fonction de la charge allélique. En revanche les 35 thromboses isolées correspondent presque exclusivement à des faibles charges alléliques JAK2 < 5%.

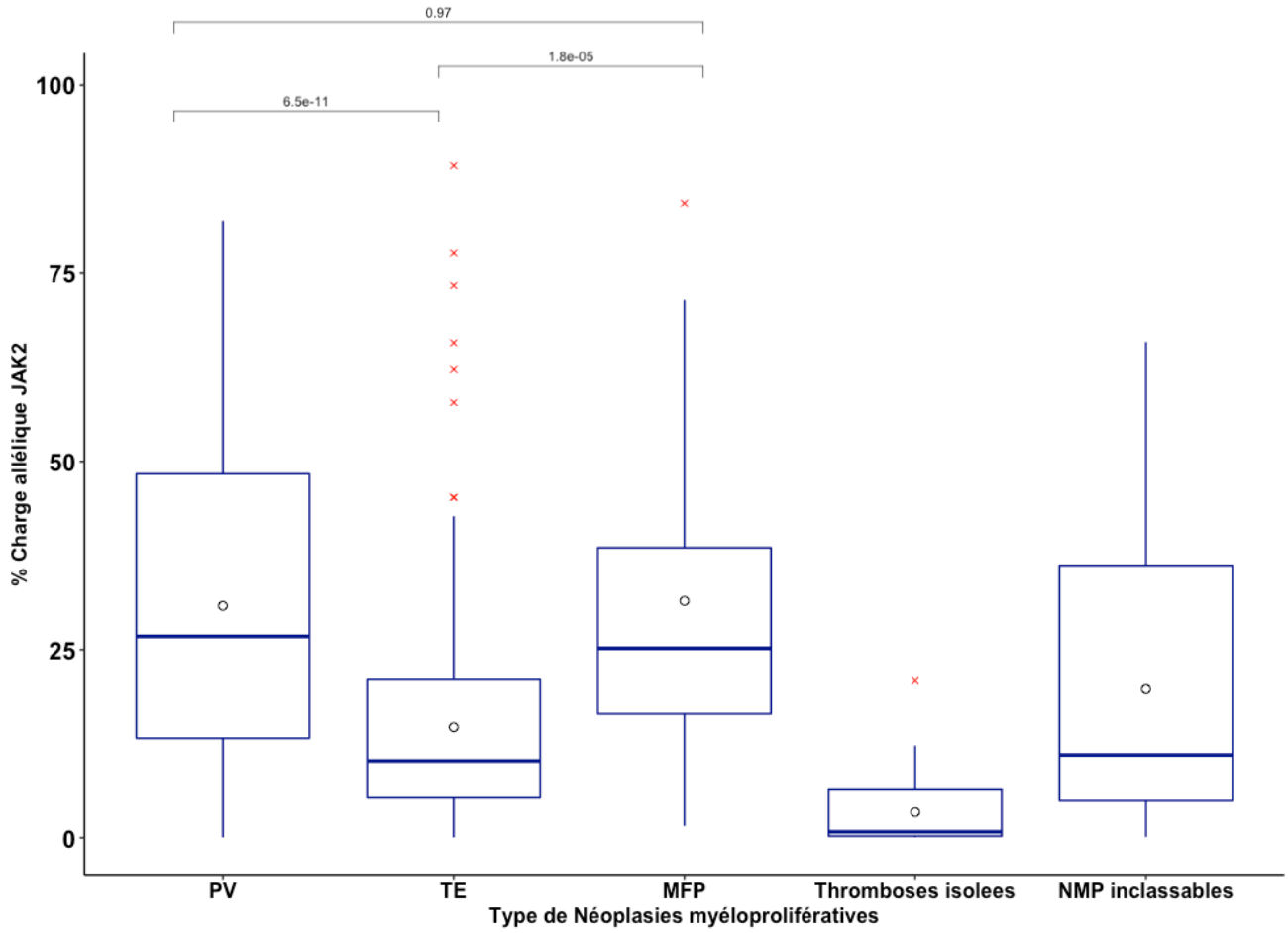


Figure n°10b : Répartition des patients JAK2 V617F en fonction de la charge allélique par pathologie.

Les patients PV avec une charge allélique > 50% ont un taux de leucocytes significativement plus haut que les patients avec une charge allélique < 50% (p =0.0007). Les patients TE avec une charge allélique > 50% ont un taux de leucocytes significativement plus haut que les TE avec une charge allélique < 50% (p = 0.004). (Tableau 6). Aucune différence

significative n'a été observé sur l'hématocrite et les plaquettes en fonction de la charge allélique pour les TE et les PV.

	Polyglobulie de Vaquez			Thrombocytémie essentielle		
	JAK2 < 50%	JAK2 > 50%	p value	JAK2 < 50%	JAK2 > 50%	p value
Patients, n (%)	113 (76.5)	36 (23.5)	-	218 (97.3)	6 (2.7)	-
Leucocytes médiane, G/L	9.8 (3.4-28.4)	16.3 (6.9-44)	**< 0.01**	9.65 (2.6-46)	14.9 (10-19)	**0.004**
Hématocrite, médiane	0.52 (0.32-0.7)	0.515 (0.32-0.66)	0.257	0.42 (0.24-0.58)	0.36 (0.24-0.49)	0.37
Plaquettes, médiane G/L	385 (129-1174)	460 (57-1303)	0.268	645 (179-2300)	827 (398-1981)	0.58

Tableau 6 : Caractéristiques biologiques des 224 TE et des 149 PV en fonction de la charge allélique JAK2 V617F

Au cours de notre étude rétrospective, 9 cas de PV ont évolué vers la myélofibrose secondaire. Les cas de MF post PV ont tous été définis avec une progression documentée vers une fibrose réticulinique et/ou collagène de grade 2-3 à la biopsie ostéo-médullaire. 7 patients sur 9 avec une charge allélique JAK2 > 50% au début de l'étude ont évolué vers la myélofibrose secondaire alors que 2/9 avec une charge allélique <50% ont évolué vers la MF secondaire. Ces myélofibroses post PV sont en moyenne survenues 3.4 ans après le dosage de la mutation JAK2 V617F initiale. (Figure 11 et 12)

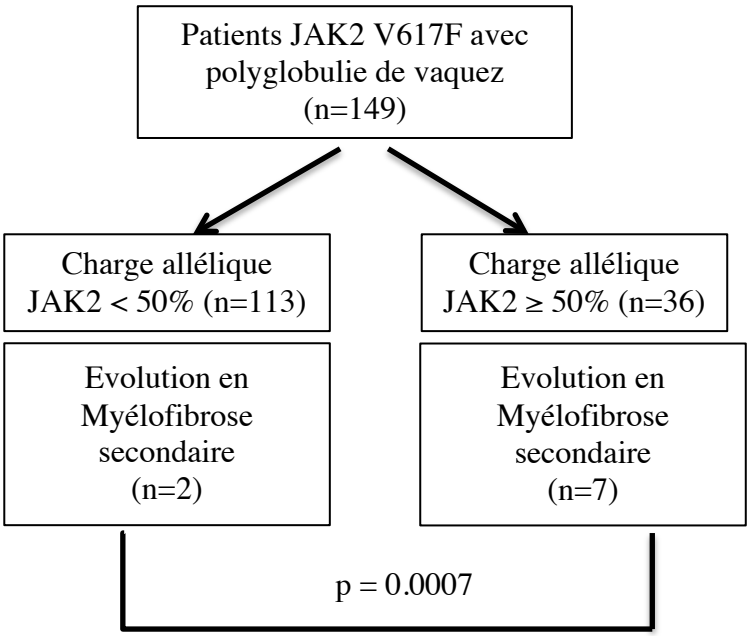


Figure n°11 : Répartition des myélofibroses secondaires en fonction de la charge allélique JAK2

Sur la figure 12, la charge allélique JAK2 des MF post PV est significativement plus élevée que la charge allélique des PV (p=0.00017).

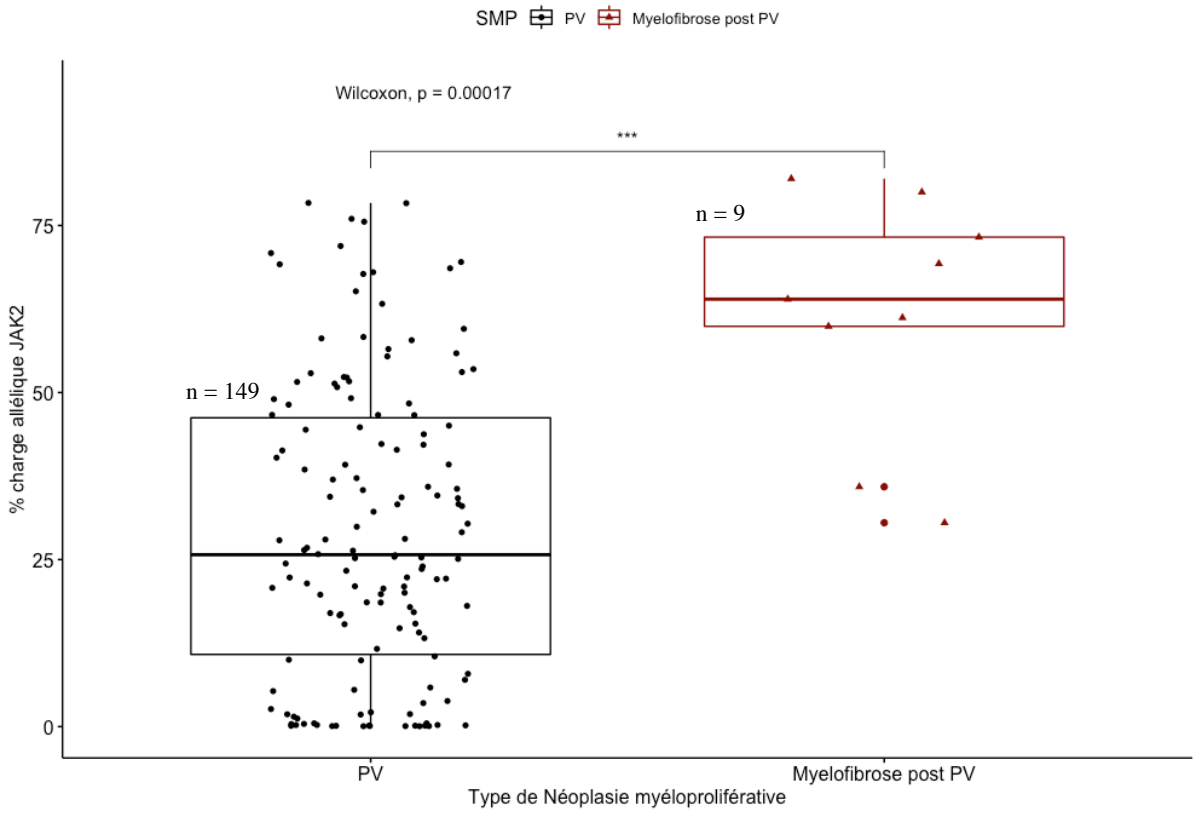


Figure n°12 : Répartition des polyglobulies de Vaquez et myélofibrose post PV en fonction de la charge allélique JAK2

c. Répartition des événements thrombotiques

Sur les 452 patients identifiés en tant que NMP (PV, TE, MF, inclassables) et non NMP (thromboses isolées), les renseignements cliniques d'événements thrombotiques au diagnostic ou dans les antécédents de moins de 3 ans étaient disponibles pour 397 patients.

Sur les 397 patients, la plupart (57,7%) n'ont pas présenté de thromboses au diagnostic ou dans les ATCD de moins de 3 ans. Sur les 42% de patients ayant thrombosé au diagnostic ou dans les ATCD de moins de 3 ans, la répartition des thromboses étaient globalement la même avec une légère prédominance de thromboses veineuses (21,3%) par rapport aux thromboses artérielles (16,7%). 17 patients soit 4,3% ont présenté une association de thromboses artérielles et de thromboses veineuses. (Figure 13)

Concernant les sous-types des maladies, il y a eu 100% de thromboses pour le groupe des thromboses isolées, 40% pour les TE, 36% pour les PV, 35% pour les MFP et 30,7% pour les NMP inclassables.

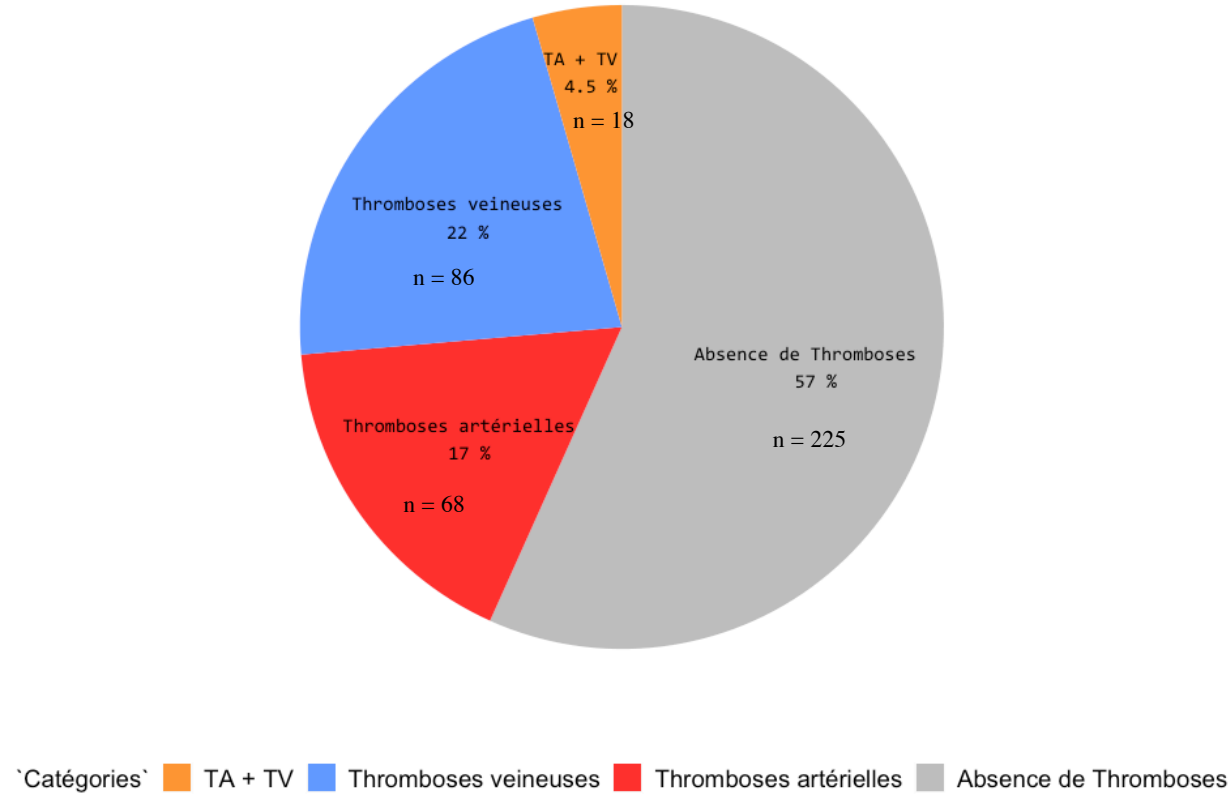


Figure n°13 : Répartition des événements thrombotiques par territoire artériel et veineux sur les 397 patients

TA = thrombose artérielle, TV= Thrombose veineuse

Les territoires les plus communément touchés sont les thromboses veineuses des membres inférieurs (22,3%), les AVC (19%), les thromboses veineuses splanchniques (13%) et les embolies pulmonaires (12%). Les thromboses veineuses cérébrales touchent 4.8% des patients (Figure14).

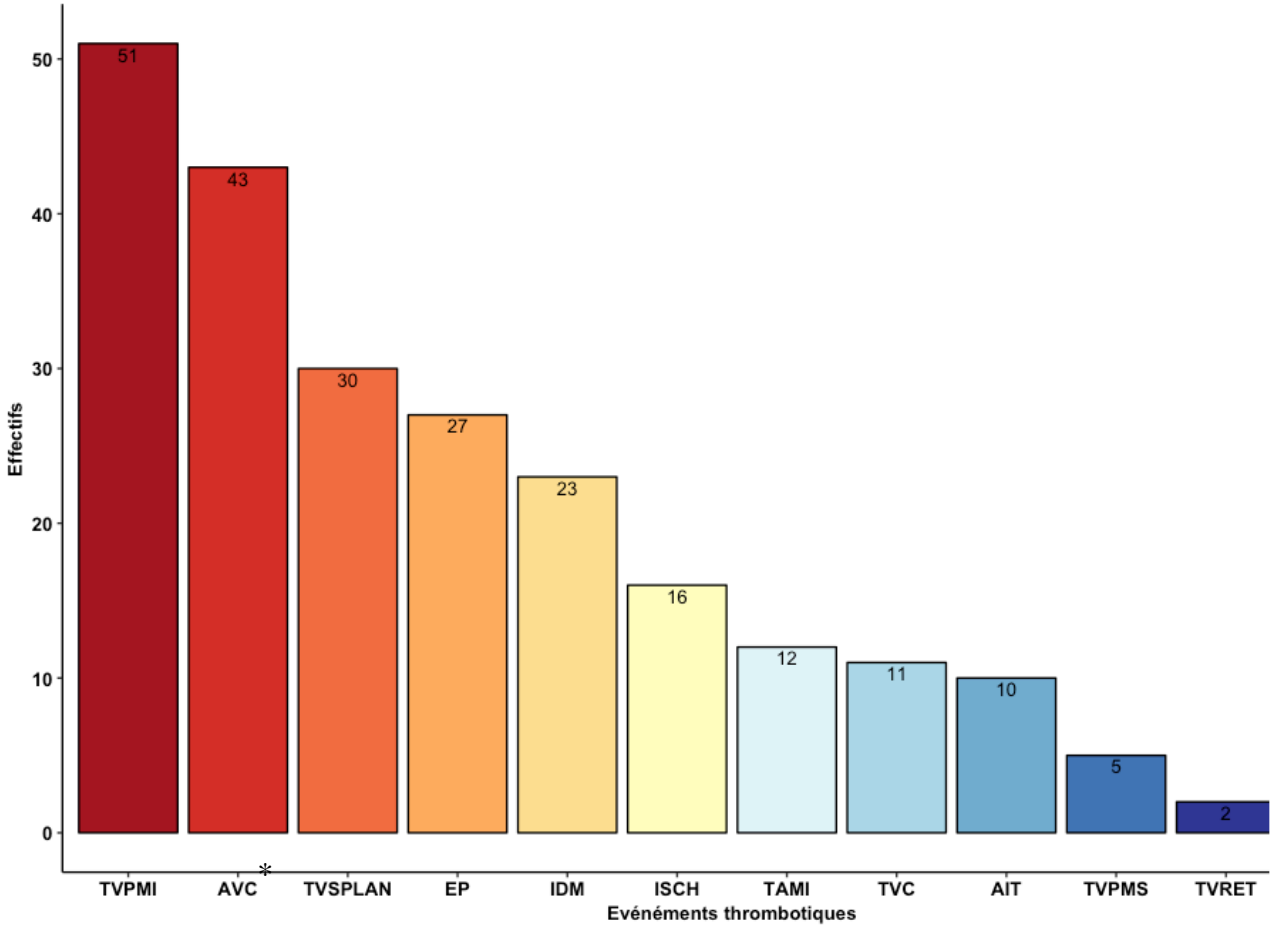


Figure n°14 : Répartition des événements thrombotiques par territoire par ordre décroissant de fréquence.

TVPMI = thrombose veineuse profonde des membres inférieurs, AVC= accident vasculaire cérébrale, TVSPLAN= thrombose veineuse splanchnique, EP= embolie pulmonaire, IDM= infarctus du myocarde, ISCH= ischémie, TAMI= thrombose artérielle membres inferieurs, TVC= thrombose veineuse cérébral, AIT= accident ischémique transitoire, TVRET= thrombose veineuse rétinienne, TAMS = thrombose artérielle des membres supérieurs.
*Les AVC retrouvé dans les conclusions médicales ont tous été classé comme thromboses artérielles. Les TVC ont toute été définis comme thromboses veineuses par les conclusions des IRM.

Si nous nous intéressons de plus près aux thromboses veineuses, la majorité d'entre elles soit 66% surviennent de manière isolée. Par exemple parmi les 30 thromboses veineuses splanchniques, 71% d'entre elles surviennent isolément contre 29% qui surviennent associées à d'autres localisations veineuses comme les TVPMI ou les EP.

Parmi les patients ayant eu des thromboses veineuses multiples, 19/28 patients soit 67% avaient eu au moins une TVPMI.

2. Quelle est l'influence de la charge allélique sur les thromboses ?

    a. Influence de la charge allélique JAK2 au diagnostic sur les thromboses initiales et études des facteurs de risques thrombotiques.

        i. Analyse des événements thrombotiques totaux sur la population JAK2 positifs

Pour connaître le risque potentiel de la charge allélique sur les événements thrombotiques, l'événement présence ou absence de thromboses au diagnostic a été testé par un test d'indépendance du chi deux. Nous avons par la suite effectué un modèle de régression logistique « exploratoire » du risque de thromboses en fonction d'autres variables explicatives ou covariables telles que l'âge, le sexe, l'hémoglobine, les plaquettes, les globules blancs, la charge allélique JAK2 et les facteurs de risques cardiovasculaires (HTA, tabac, diabète, dyslipidémie).

Nous observons significativement moins de thromboses au diagnostic pour les patients avec charge allélique > 25% observé dans le test du Chi deux (OR=0.63, IC95% = 0.40-0.99, p = 0.04) (Figure 15), effet qui disparaît en régression logistique multivariée (OR=0.74, IC95%= 0.45-1.22, pvalue = 0.244) (Figure 16).

Seul le taux de plaquettes et le tabac sont restés statistiquement significatifs en analyse multivariée. Les patients JAK2 positifs avec un taux de plaquettes < 450 G/L ont présenté un risque beaucoup plus important de thromboses par rapport à la population avec un taux de plaquette > 450 G/L (OR=2.04, IC95%=1.28-3.27, p=0.003). Les patients fumeurs ont un risque plus élevé de faire une thrombose (OR= 1.73, IC95%=1.05-2.88, p=0.033). Les autres variables testées dans le modèle à savoir le sexe masculin, l'âge >60 ans, le taux d'hémoglobine >165g/L, le taux de globules blancs > 11G/L, l'hypertension artérielle, le diabète, la dyslipidémie ne sont pas statistiquement significatifs au risque de 0,05% et ne peuvent donc pas être considérés comme des facteurs prédictifs du risque de thrombose pour les NMP en général (Tableau 7). Il s'est avéré que notre modèle avait une AUC < 0.7 donc pas bien performant. Cela s'explique par le fait que nous avons confondu les thromboses artérielles et les thromboses veineuses sur tout NMP confondu. Nous avons donc par la suite effectué une régression logistique séparément sur les thromboses artérielles et les thromboses veineuses sur les PV et les TE.

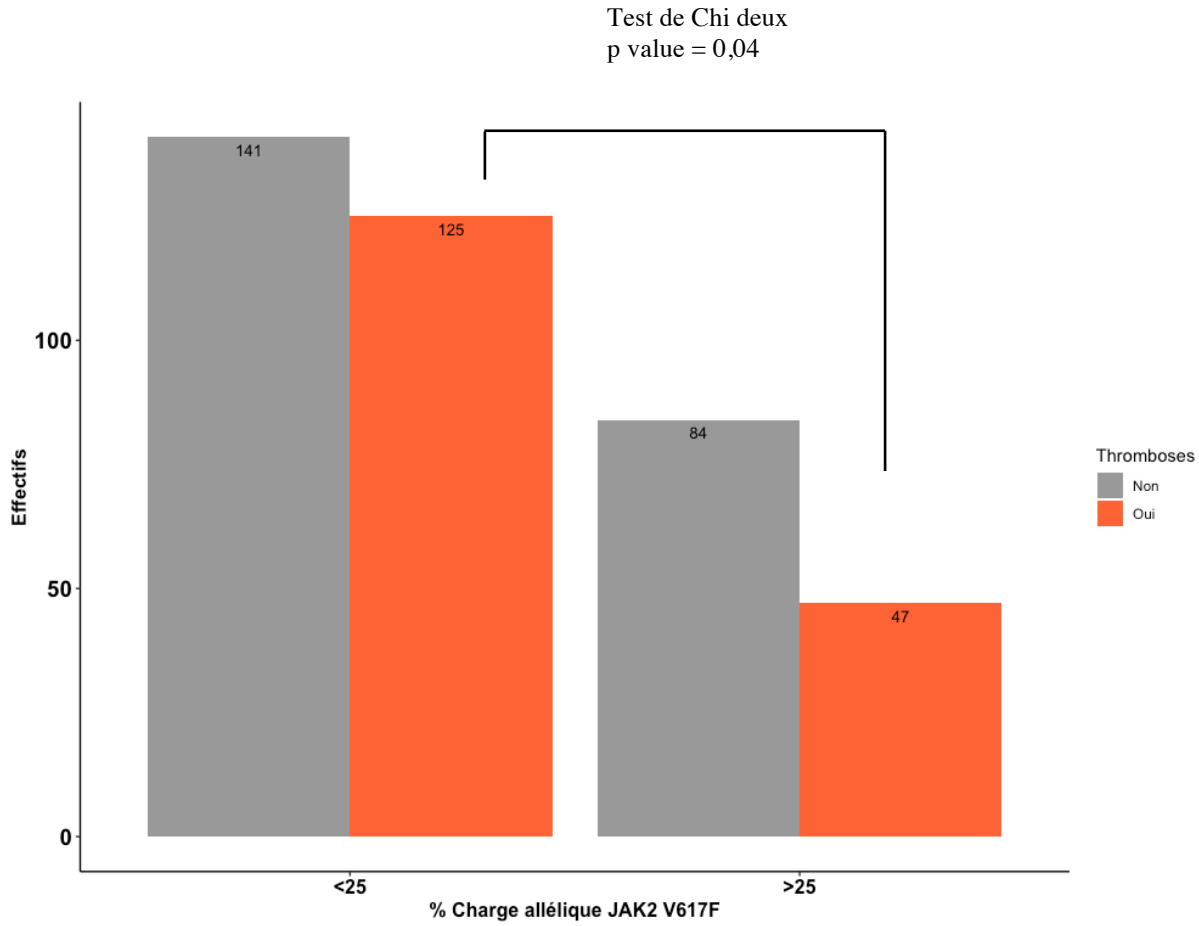


Figure 15 : Présence ou absence de thromboses au diagnostic en fonction de la charge allélique <25% ou >25%

Facteurs associées au risque de thromboses chez les patients JAK2 positifs	Régression logistique univariée			Régression logistique multivariée		
	OR	IC (95%)	p-value	OR	IC (95%)	p-value
Age > 60 ans	0.73	0.45-1.18	0.194	-	-	-
Sexe masculin	1.01	0.64-1.58	0.973	-	-	-
JAK2 >25%	0.72	0.44-1.17	0.185	0.74	0.45-1.22	0.244
Hémoglobine > 165 g/L	0.97	0.58-1.61	0.898	-	-	-
Plaquettes < 450 G/L	2.06	1.30-3.27	**0.002**	2.04	1.28-3.27	**0.003**
Leucocytes > 11 G/L	1.12	0.71-1.76	0.629	-	-	-
Tabac	1.85	1.13-3.04	**0.014**	1.73	1.05-2.88	**0.033**
Hypertension	1.12	0.71 -1.77	0.629	-	-	-
Diabète	1.03	0.51-2.06	0.931	-	-	-
Dyslipidémie	1.28	0.73-2.26	0.383	-	-	-

Tableau 7 : Résultats de l'analyse par régression logistique des événements thrombotiques totaux au diagnostic de la mutation JAK2 ou dans les antécédents de moins de 3 ans en fonction des covariables : Age, sexe, charge allélique JAK2, hémoglobine, plaquettes, globules blancs, tabac, hypertension, diabète, dyslipidémie.

ii. Analyse des événements thrombotiques totaux dans les TE et les PV

Nous avons effectué une régression logistique multivariée séparément sur les TE et les PV. En analyse multivariée, pour la TE, seul l'hypertension artérielle s'est révélée être un facteur de risque de thrombose (OR=2.39, IC 95%=1.09-5.43, p = 0.032) et nous observons une tendance pour le tabac (OR= 2.27, IC 95% = 0.99-5.35, p = 0.056). Aucune des autres variables (Age, Sexe, JAK2, hémoglobine, plaquette, globules blancs, diabète, dyslipidémie) n'est restée significative au seuil de 5%. Pour la PV, seul le taux de plaquettes < 450 G/L est resté statistiquement significatif au risque de 5% en analyse multivariée (OR= 3.04, IC95%=1.21-8.15, p = 0.021).

iii. Analyse des thromboses artérielles dans les TE et les PV

Nous avons ensuite séparé les thromboses artérielles et les thromboses veineuses pour la PV et la TE.

Les paramètres potentiellement corrélés en analyse univariée (p < 0.30), suspectés ou documentés dans la littérature comme pouvant être des facteurs de risques de thromboses artérielles dans la TE ont été intégrés dans un modèle de régression logistique. Un modèle final a été sélectionné en fonction de ses capacités prédictives (aire sous la courbe ROC > 0.7, AIC minimal).

Le sexe masculin s'est révélé être un facteur de risque de thromboses artérielles pour la TE (OR=3.43, IC95%=1.41-8.89, p = 0.008) en plus de l'HTA (OR= 3.32, IC95%= 1.25-9.35, p = 0.018). La leucocytose > 11 G/L s'est également révélée être un facteur de risque de thrombose artérielle dans la TE (OR=2.8, IC95%=1.12-7.27, p = 0.029) (Tableau 8).
Pour la PV, aucun facteur de risque de thromboses artérielles n'a été identifié.

Facteurs associées au risque de thromboses artérielles dans la TE	Régression logistique univariée			Régression logistique multivariée		
	OR	IC (95%)	p-value	OR	IC (95%)	p-value
Age > 60 ans	0.8	0.36-1.83	0.587	0.38	0.13-1.04	0.062
Sexe masculin	2.2	1.01-4.90	**0.048**	3.43	1.41-8.89	**0.008**
JAK2 >25%	1.32	0.5-3.22	0.551	-	-	-
Hémoglobine > 165 g/L	5.02	1.41-18.62	**0.012**	4.35	0.91-21.64	0.065
Plaquettes < 450 G/L	1.65	0.54-4.54	0.348	2.48	0.72-8.26	0.139
Leucocytes > 11 G/L	2.28	1.05-5.08	**0.039**	2.8	1.12-7.27	**0.029**
Tabac	2.56	1.14-5.73	**0.022**	1.32	0.49-3.45	0.573
Hypertension	2.37	1.09-5.28	**0.032**	3.32	1.25-9.35	**0.018**
Diabète	0.44	0.07-1.69	0.297	0.25	0.03-1.23	0.126
Dyslipidémie	0.87	0.32-2.12	0.762	-	-	-

OR = Odd Ratio ; 95% CI = Intervalle de confiance à 95% de l'OR

Tableau 8 : Résultats de l'analyse par régression logistique des thromboses artérielles au diagnostic de TE ou dans les antécédents de moins de 3 ans en fonction des covariables : Age, sexe, charge allélique JAK2, hémoglobine, plaquettes, globules blancs, tabac, hypertension, diabète, dyslipidémie.

iv. Analyse des thromboses veineuses dans les TE et les PV

Aucun facteur de risque n'a été identifié concernant les thromboses veineuses dans la TE. Pour la PV, seul le taux de plaquette < 450 G/L est resté statistiquement significatif au risque de 5% en analyse multivariée (OR= 5.52, IC95% = 1.58-26.35, p = 0.014) pour les thromboses veineuses.

b. Influence de la charge allélique JAK2 sur les récidives d'événements thrombotiques des NMP.

Pour évaluer l'influence de la charge allélique JAK2 V617F sur les événements thrombotiques récidivants, l'étude s'est portée sur 112 patients dont le suivi a été fait à l'APHM jusqu'en mai 2018, issus des 395 ayant eu un premier évènement thrombotique au diagnostic ou dans les antécédents de moins de 3 ans. Les deux groupes de patients ont été faits en fonction du seuil de charge allélique de 25% dont nous avions trouvé une tendance statistique plus haut avec les thromboses initiales au diagnostic. Le groupe 1 correspond à une charge allélique JAK2 < 25% et le groupe 2 à une charge allélique JAK2 > 25%. Les caractéristiques cliniques des deux groupes sont présentées dans le tableau 9. Le groupe 1 est constitué majoritairement de TE ($p<0.01$) et le groupe de 2, de PV ($p<0.01$).

Au cours du suivi des 112 patients, 27 « événements » ont été relevés correspondant à 6 décès et 21 événements thrombotiques récidivants dont 11 thromboses artérielles (4 IDM, 3 AVC et 4 AIT) et 10 thromboses veineuses (5 TVPMI, 2 EP, 1 TVSPLAN, 2 TVC).

En ce qui concerne les traitements par antiagrégants plaquettaires, dans le groupe 1 (charge allélique <25%), au moins 38/79 patients soit 48% sont traités par aspirine au long cours (kardegic®), et au moins 32/79 patients soit 40,5% patients sont traités par hydrea®. Pour le groupe 2 (charge allélique >25%), au moins 9/33 patients sont traités par aspirine (27,3%) et 17/33 patients (51,5%) sont traités par hydrea®. Au moins 23 patients soit 29.11% sont traités par l'association hydrea® et kardegic® dans le groupe 1 et au moins 5 patients soit 15.2% sont traités par l'association hydrea® et kardegic® dans le groupe 2. Les patients du groupe 2 ont présenté un nombre de thromboses récidivantes supérieur au groupe 1 ($p = 0.01$).

	Charge allélique < 25%	Charge allélique > 25%	p value
Nombre de patients, n (%)	79 (70.5)	33 (29.5)	-
Sexe masculin, n (%)	34 (43)	15 (45.4)	-
Type de NMP			
TE, n (%)	45 (57)	8 (24.2)	**< 0.01**
PV, n (%)	13 (17)	21 (63.6)	**< 0.01**
MFP, n (%)	2 (2.6)	4 (12)	-
Thromboses isolées, n (%)	17 (21.5)	0 (0)	-
Autres, n (%)	2 (2.6)	0 (0)	-
Age médian au diagnostic, années	63 (14-90)	68 (40-88)	-
Antiagrégants au long cours (kardegic®), n (%)	38 (48)	9 (27.3)	-
Cytoréducteurs au long cours (hydrea®), n (%)	32 (40.5)	17 (51.5)	-
Association kardegic® et hydrea® au long cours, n (%)	23 (29.11)	5 (15.2)	-
Patients avec au moins une thrombose récidivante, n (%)	10 (13)	11 (33.3)	**0.01**
Facteurs de risques cardiovasculaires, n (%)	54 (68)	23 (69)	**-**
Décès, n (%)	2 (2.5)	4 (12.1)	0.06

Tableau 9: Caractéristiques cliniques des 112 patients ayant thrombosé au diagnostic ou dans les antécédents de moins de 3 ans, divisés en deux groupes : < 25% et > 25% de charge allélique

La courbe de Kaplan-Meier a été réalisée en prenant comme événements les récidives d'événements thrombotiques, en fonction des 2 groupes et la différence est significative (p=0.022) (Figure 16).

Les suivis médians (min-max) étaient équivalents entre les groupes, 27.00 mois (1.3-92.00) pour le groupe 1 et 25.30 mois (0.30-78.50) dans le groupe 2 (p=0.430, test de Mann-Whitney). La médiane de survie sans événements dans le groupe 1 (JAK2 <25%) est de 73.8 mois alors que dans le groupe 2 (JAK2>25%) elle est de 57.4 mois.

Sur notre modèle de COX univarié, les patients avec une charge allélique > 25% ont un rapport de risque 2,45 fois plus élevé de faire un événement thrombotique au cours du temps (hazard ratio ou rapport des risques égales à 2.45, intervalle de confiance à 95% [IC] 1.1-5.43, p = 0,027) par rapport aux patients avec charge allélique < 25%. Les patients traités par cytoreducteur (Hydrea®) sont associés à un risque de récidive similaire que celui des patients non traités (HR univarié 0.79, IC 95% 0.35-1.8 p = 0.575) (Tableau 10). La présence d'un traitement par antiagrégant plaquettaire (Kardegic®) est associée à un risque de récidive similaire que chez les patients non traités (HR univarié 0.85, IC 95% 0.48-2.5 p = 0.85). De même les patients avec facteurs de risques cardiovasculaires sont associés à un risque de récidive similaire que celui des patients sans facteurs de risques cardiovasculaires (HR univarié 1.9, IC 95% 0.25-15 p = 0.53). Le type de NMP n'a pas d'influence sur la survenue de thromboses récidivantes (HR univarié 1.6, IC 95% 0.74-3.5, p = 0.232).

En analyse multivariée selon l'âge et le sexe, la charge allélique JAK2 >25% est associée de manière indépendante à la survenue d'événements thrombotiques (hazard ratio HR= 2.57 , intervalle de confiance à 95% [IC] 1.11-5.9, p = 0,027) par rapport aux patients avec charge allélique < 25%. Il n'y a pas d'effet de l'âge, du sexe sur la survenue d'événements thrombotiques en analyse multivariée. (Figure 17)

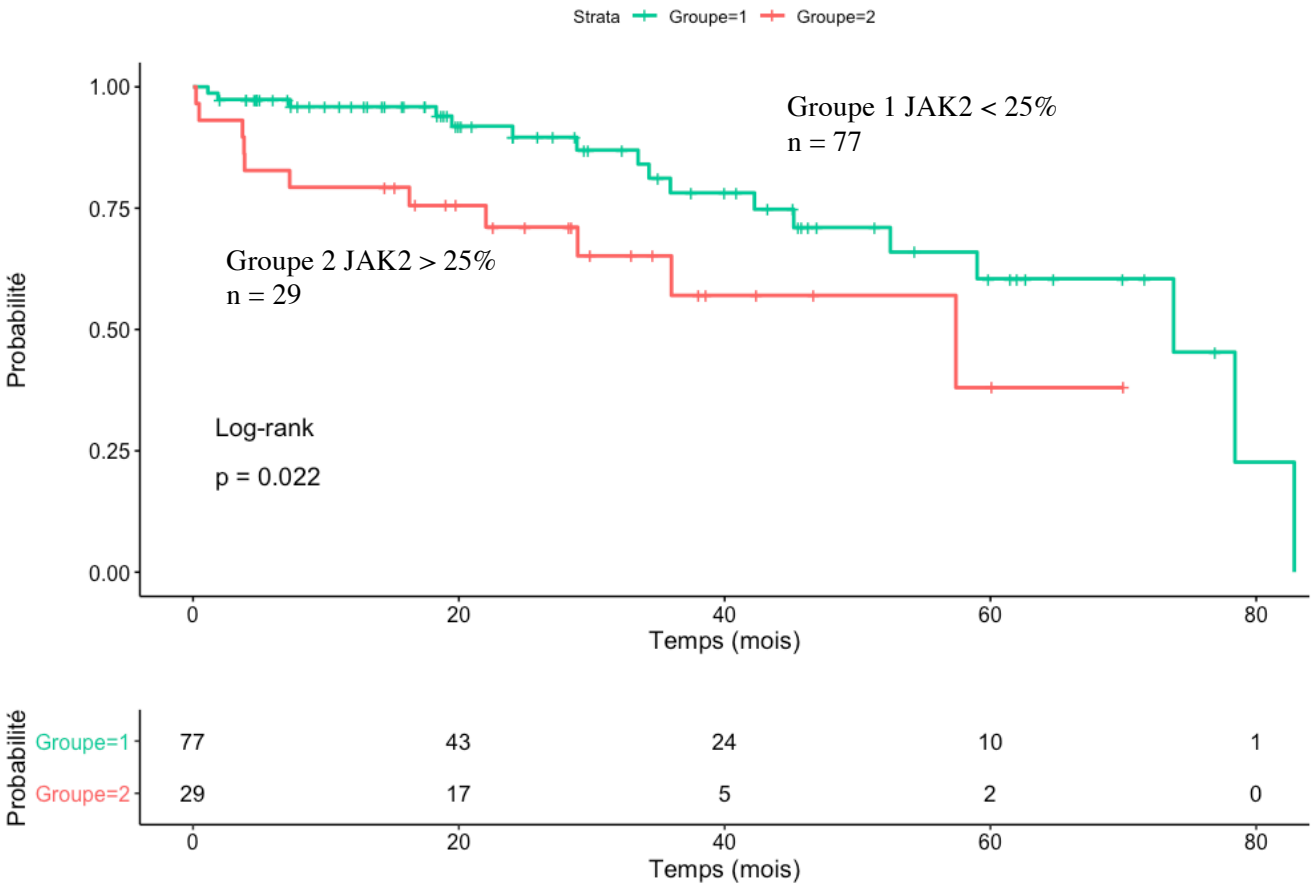


Figure 16 : Survie sans événement thrombotique (mois) selon la charge allélique JAK2 V617F chez les 106 patients avec la mutation JAK2 V617F

			Analyse univarié		
Variable	Reference	Modalitées	HR	95% CI	p-value
Groupe	JAK2 < 25%	JAK2 > 25%	2.45	[1.1-5.43]	**0.027**
Type de NMP	TE	Autres (PV+MFP+ Tisolées)	1.6	[0.74-3.5]	0.332
Age	Age < 60	Age >60	1	[0.97-1.03]	0.98
Sexe	F	M	1.97	[0.89-4.31]	**0.092**
Antiagrégants	Non	Kardegic®	0.85	[0.48-2.5]	0.85
Cytoréducteurs	Non	Hydrea®	0.79	[0.35-1.8]	0.575
FDRCV	Non	Oui	1.9	[0.25-15]	0.53

Tableau 10 : Modèle de COX univarié sur les 106 patients JAK2 positifs

HR : hazard ratio, 95% IC : intervalle de confiance à 95%, FDRCV : Facteurs de risques cardiovasculaires

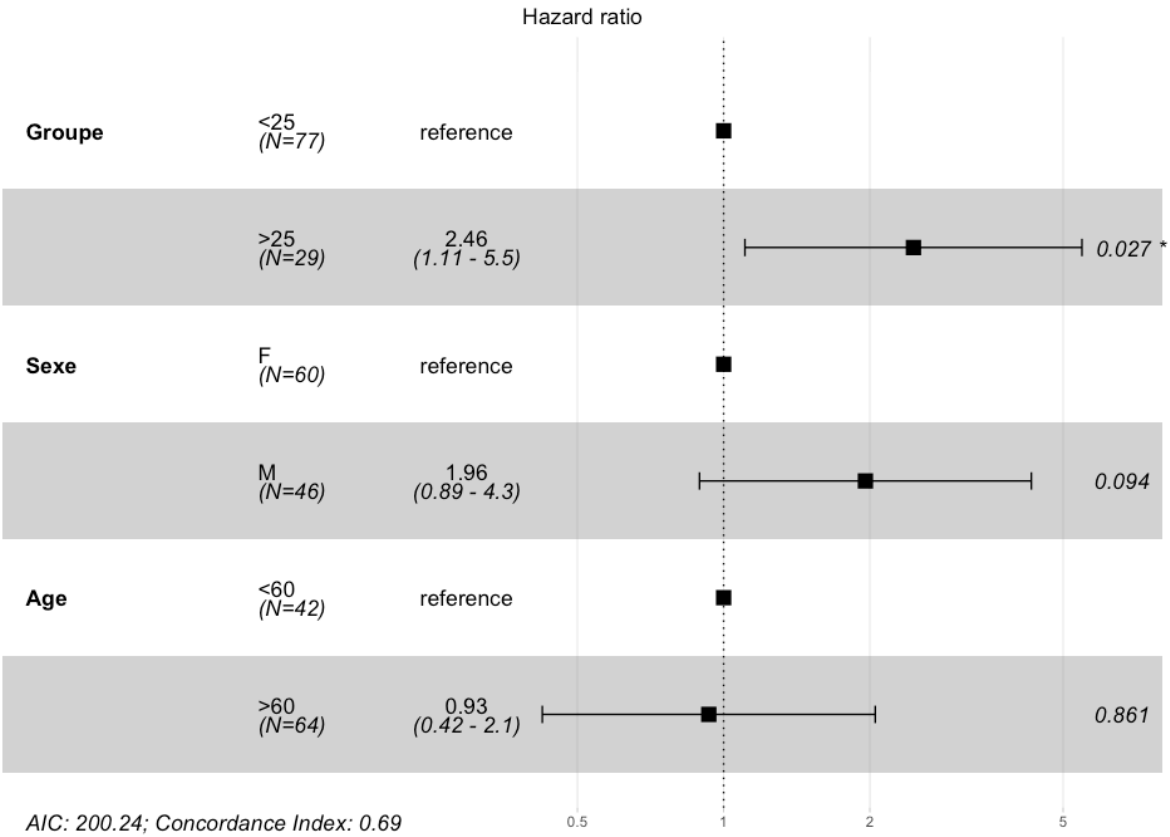


Figure 17 : Modèle de Cox multivarié sur les 106 patients JAK2 positifs

c. Influence de la charge allélique JAK2 sur les récidives d'événements thrombotiques des PV.

Nous avons poursuivi l'analyse en fonction des sous-types de NMP et avons étudiés les PV < 25% et les PV > 25%.

La différence est aussi significative dans les deux groupes de PV (p = 0.047) au niveau du test de Log Rank du Kaplan Meier. La médiane de survie sans événement thrombotique dans le groupe 1 (JAK2 <25%) est de 73.8 mois alors que dans le groupe 2 (JAK2>25%) elle est de 57.4 mois. (Figure 18)

En revanche en appliquant notre modèle de COX, il y a une perte de la significativité en analyse univariée et multivariée (HR=6.6, 95%IC =0.8-54.1, p value =0.079) (Tableau 11 et figure 19). Vu notre effectif faible (13 pour le groupe 1 et 21 pour le groupe 2), nous pouvons difficilement conclure, si ce n'est une tendance à faire plus d'événements thrombotiques au cours du temps chez les PV avec plus de 25% de charge allélique.

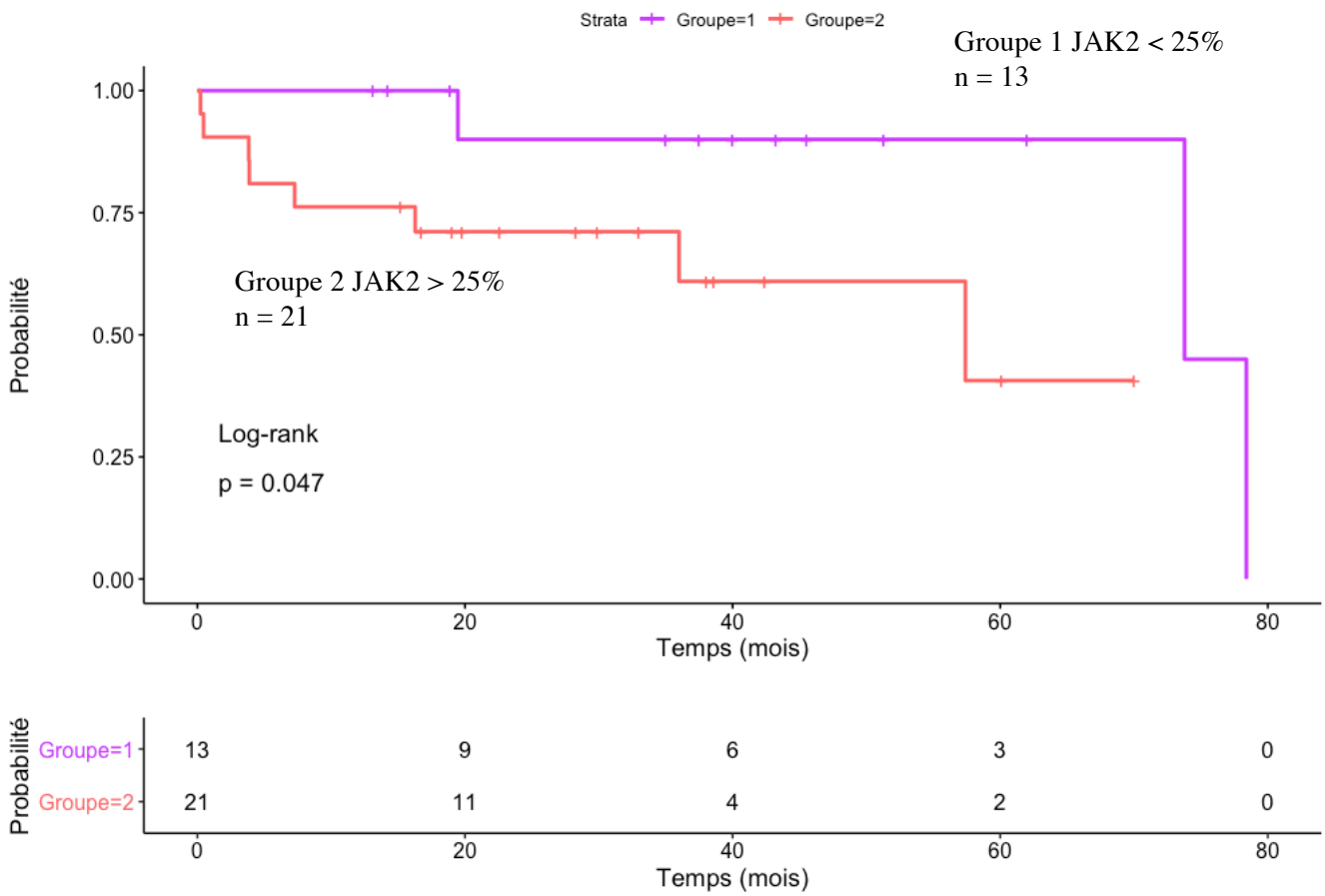


Figure 18 : Survie sans événements thrombotiques (mois) chez les patients atteints de PV en fonction de la charge allélique JAK2 V617F.

			Analyse univarié		
Variable	Reference	Modalitées	HR	95% CI	p-value
Groupe	JAK2 < 25%	JAK2 > 25%	6.36	[0.78-50.8]	**0.083**
Age	Age < 60	Age >60	5.64	[0.71-45]	0.102
Sexe	F	M	1.47	[0.37-5.7]	0.58

Tableau 11 : Modèle de COX univarié appliqué au sous groupe PV

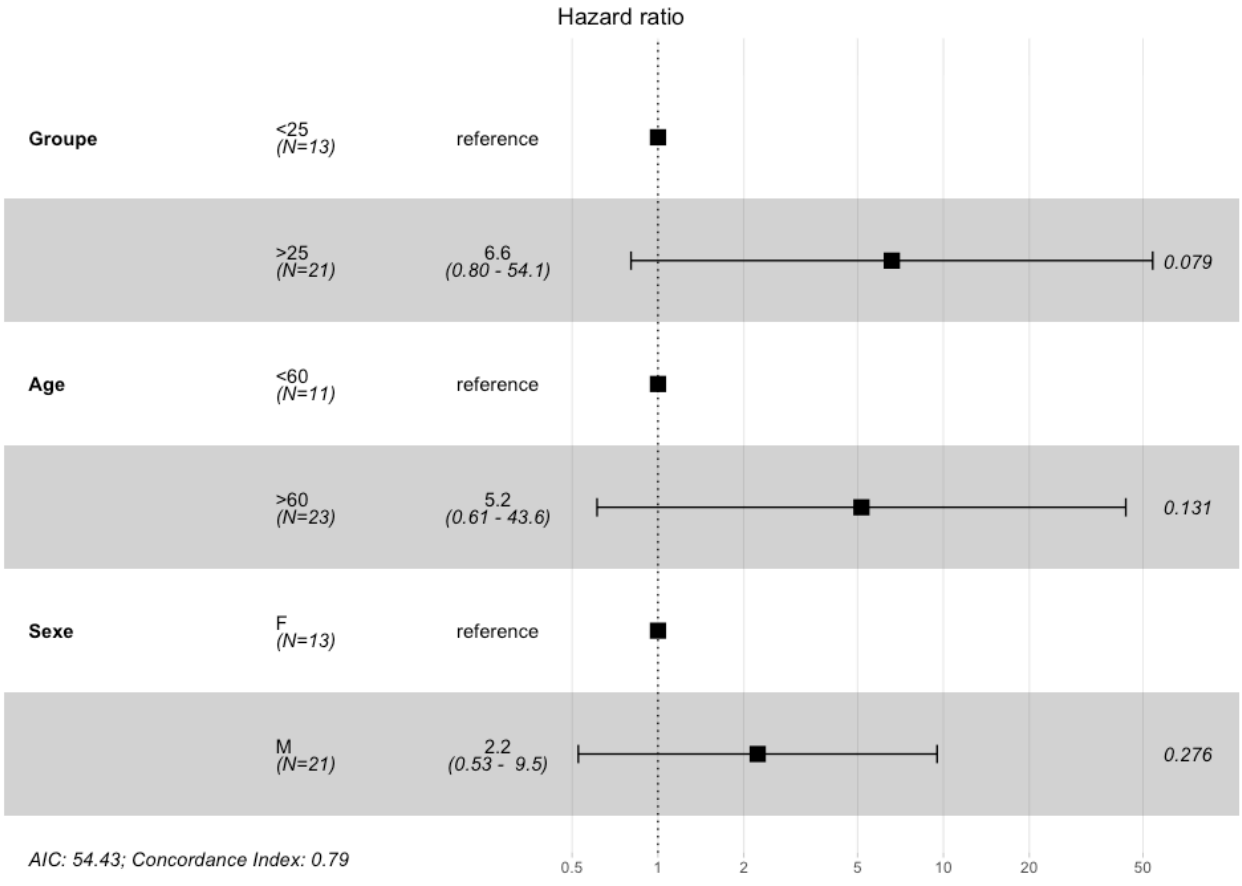


Figure 19 : Modèle de COX multivarié appliqué au sous groupe PV

En raison du nombre de décès important dans le groupe des TE >25% (4 décès), et du nombre insuffisant de patients suivi pour les myélofibroses et les NMP inclassables, les courbes de survies sans événements n'ont pas pu être réalisées pour ces sous-groupes.

3. Les thromboses veineuses cérébrales et les embolies pulmonaires

   a. Fréquence de la mutation JAK2 pour les thromboses veineuses cérébrales, splanchniques et embolies pulmonaires à l'APHM entre 2017 et 2018

Entre mai 2017 et mai 2018, nous avons répertorié au laboratoire de Biologie moléculaire de l'hôpital Nord 583 demandes pour la recherche de la mutation JAK2 qui

correspond à 93 patients JAK2 positifs et 490 patients JAK2 négatifs. Au cours de cette période récente les données cliniques étaient disponibles pour l'ensemble des patients JAK2 négatifs et positifs.

Sur les 31 thromboses veineuses splanchniques adressées au laboratoire pour une recherche de mutation JAK2 entre 2017 et 2018, 6 se sont avérées positives pour la mutation JAK2 soit une fréquence de 19%.

Sur 20 thromboses veineuses cérébrales adressées au laboratoire pour une recherche de mutation JAK2 entre 2017 et 2018, 3 se sont avérées positives pour la mutation JAK2 soit une fréquence de 15%.

Sur les 44 embolies pulmonaires adressées au laboratoire pour une recherche de mutation JAK2 entre 2017 et 2018, 6 se sont avérées positives pour la mutation JAK2 soit une fréquence de 13,6%.

b. Comparaisons cliniques et biologiques entre les groupes JAK2+ et JAK2- pour les TVC et les EP

Les caractéristiques cliniques et biologiques des 11 cas de thromboses veineuses cérébrales JAK2 positifs durant la période d'étude sont présentées dans le tableau 12. Sur les 11 découvertes de NMP sur des thromboses veineuses cérébrales, 6/11 soit 54 % des patients avaient une numération formule sanguine normale au moment du diagnostic et 6/11 patients avaient une charge allélique < 3%.

Quant aux 30 thromboses veineuses splanchniques, 11/30 soit 37 % des patients avaient une numération formule sanguine normale au moment du diagnostic et 7/30 soit 23% avaient une charge allélique < 3%.

Id	Sexe	Age	NMP	Hb (g/L)	Plaquettes (G/L)	Globules blancs (G/L)	Charge allélique JAK2 %	Facteurs de risques thrombotiques	Autres thromboses veineuses associées	Traitement du NMP	Traitement prophylactique thrombose
1	F	46	TE	134	574	7.6	5.3	Mutation facteur II hétérozygote	EP et TVPMI	Hydrea®	Previscan®
2	F	67	PV	166	685	15	29.91	-	-	Hydrea®	Xarelto® Kardegic®
3	M	36	T isolées	151	224	4.8	0.13	Déficit en AT III, Déficit type IIRS hétérozygote AT	TVPMI, Récidive de TVC	-	Xarelto® Previscan® après récidive
4	F	80	T isolées	139	189	5.6	1.42	-	EP	-	Xarelto® Switch par Eliquis®
5	F	62	T isolées	138	331	18.8	0.1	Hyperhomocystéinémie	-	-	Previscan®
6	F	30	T isolées	130	297	8.4	0.79	OP, Mutation c.677C>T gène MTHFR	TVPMI multiples et EP	-	Xarelto®
7	M	28	TE	148	466	5.4	2.92	Hyperhomocystéi-némie	-	Interferon retard	Previscan®
8	M	64	TE	161	457	9.8	5.93	Mutation facteur II hétérozygote	-	Hydrea®	Kardegic®
9	M	14	TE	130	331	18	6.55	-	-	JAKAVI®	Previscan®
10	M	59	TE	145	500	4.3	2.13	Déficit en facteur V hétérozygote	-	Hydrea®	Aspirine®
11	M	80	T isolées	156	411	11	5.01	-	EP et TVPMI	-	Previscan®

TVC, Thromboses veineuses cérébrales ; T isolées, Thromboses isolées ;OP, Oestroprogestatifs ;EP, embolie pulmonaire ; AT , antithrombine ; TVPMI , Thromboses veineuses profondes des membres inférieurs

Tableau 12 : Caractéristiques des patients TVC et JAK2 V617F

Afin de détecter un sous-groupe à risque d'avoir la mutation JAK2 V617F, nous avons comparé les caractéristiques cliniques et biologiques de deux groupes de patients (l'un JAK2 positif sans critères hématologiques pour une NMP issu du groupe « thrombose isolées », l'autre JAK2 négatif) pour les thromboses veineuses cérébrales et les embolies pulmonaires.

En analyse univariée, il n'a pas été observé de différence significative concernant le sexe, les constantes de la numération formule sanguine et le bilan de thrombophilie entre les deux groupes (Tableau 13).

Seul la présence de thromboses veineuses associées à la TVC est significativement associée à la mutation JAK2 V617F (p=0.02).

Paramètres	Patients JAK2 V617F positifs (n=5)	Patients JAK2 V617F négatif (n=17)	Univariate p value
Age, années, moyenne (SD)	57.6 (23.7)	43.47 (14.2)	0.24
Médiane, %JAK2V617F	0.79 (0.06-5.01)	0	-
Sexe, Femme, n (%)	3 (60)	10 (59)	1
Patient avec thromboses veineuses associées, n (%)	4 (80)	3 (17)	**0.02**
Hémoglobine, g/L, mean (SD)	142.8 (10.52)	131.5 (24.21)	0.28
Globules rouges, T/L, mean (SD)	4.9 (0.4)	4.6 (0.7)	0.58
Hématocrite, %, mean (SD)	0.4 (0.03)	0.4 (0.06)	0.53
Globules blancs, G/L, mean (SD)	9.7 (5.6)	9.6 (8.4)	0.91
Plaquettes, G/L (SD)	296 (83)	284 (88)	0.81
Bilan de thrombophilie perturbé, n (%)	3 (60)	4 (23.5)	0.27
Oestroprogestatif chez la Femme, n (%)	1 (33)	7 (70)	0.24

Tableau 13 : Caractéristiques cliniques et biologiques des thromboses veineuses cérébrales chez les patients avec mutation JAK2 V617F (sans critères hématologiques en faveur d'un NMP) et sans mutation JAK2 V617F

Pour les embolies pulmonaires la comparaison entre un groupe de patients JAK V617F positif sans critère hématologique et un groupe de patient JAK2 négatif a été faite.

Il n'a pas été observé de différence significative concernant l'âge, les constantes de la numération formule sanguine et le bilan de thrombophilie entre les deux groupes.

La présence du sexe féminin (p=0.0026) et de thromboses veineuses associées à l'embolie pulmonaire sont significativement associée à la mutation JAK2 V617F (p=0.0088). (Tableau 14)

Paramètres	Patients JAK2 V617F positifs (n=9)	Patients JAK2 V617F négatifs (n=38)	p value
Age, années, moyenne (SD)	63 (16)	57.5 (19)	0.51
Médiane, %JAK2V617F	1.42 (0.24-8.13)	0	NA
Sexe, Femme, n (%)	8 (89)	12 (32)	**0.0026**
Patients avec thromboses veineuses associées, n (%)	8 (89)	18 (47)	**0.0088**
Hémoglobine, g/L, mean (SD)	136 (11)	140 (20)	0.7
Globules rouges, T/L, mean (SD)	4.7 (0.42)	4.6 (0.7)	0.8
Hématocrite, %, mean (SD)	0.40 (0.03)	0.41 (0.05)	0.9
Globules blancs, G/L, mean (SD)	8.2 (2.7)	7.6 (3.1)	0.6
Plaquettes, G/L (SD)	276 (78)	285 (131)	0.7
Bilan de thrombophilie perturbé, n (%)	1/5 (20)	14/23 (60)	0.15

Tableau 14 : Caractéristiques cliniques et biologiques des embolies pulmonaires chez les patients avec mutation JAK2 V617F (sans critères hématologiques en faveur d'une NMP) et sans mutation JAK2 V617F

4. Comparaison clinique et biologique entre les TE JAK2 et les TE doubles mutés JAK2 et CALR ou MPL

Nous avons voulu comparer les caractéristiques cliniques et biologiques des TE mutées JAK2 V617F et les TE doubles mutées JAK2 V617F et MPL ou CALR.

Les patients TE doubles mutées JAK2 V617F et MPL ou CALR ont un taux de plaquettes significativement plus élevé que les TE mutées JAK2 seul (p= 0.005). La charge allélique est significativement plus basse chez les TE doubles mutées (p<0.001).

Nous remarquons également que l'absence d'événement thrombotique est significativement associée à la présence d'une double mutation CALR ou MPL (p= 0.0019) (Tableau 15)

Caractéristiques	Thrombocytémie essentielle JAK2 V617F	Thrombocytémie essentielle JAK2 V617F double muté CALR ou MPL	**p value**
Nombre n, (%) de patients	216 (96.4)	8 (3.6)	
Sexe ratio M/F, n	90/126	1/7	
Age, médiane, années			
Total	67	68.5	
Homme	66	78	
Femme	67	68	
Hémoglobine médiane, g/L	141 (75-195)	120.5 (98-149)	
Hématocrite médiane	0.43 (0.24-0.58)	0.37 (0.31-0.47)	
Globules rouges médiane, T/L	4.8 (1.95-7.36)	4.6 (3.5-5.6)	
Globules blancs médiane, G/L	9.75 (2.6-46)	11.5 (8-13.9)	
Plaquettes médiane, G/L	635 (179-2289)	1064 (470-2300)	**0.005**
Charge allélique JAK2 V617F médiane, %	11 (0.16-89.29)	0.32 (0.05-3.69)	**<0.001**
Evénements thrombotiques au diagnostic, n (%)	78 (36)	1 (11)	**0.0019**

Tableau 15: Caractéristiques biologiques et cliniques des thrombocytémies essentielles en fonction du profil mutationnel.

Partie IV : Discussion

A. Objectif principal : Risque thrombotique et charge allélique JAK2 V617F

L'objectif principal de notre étude était de déterminer si la charge allélique JAK2 avait une influence sur le risque de thrombose au diagnostic et au suivi des patients JAK2 positifs. Nous avons fait une synthèse des articles sur le lien entre le risque thrombotique et la charge allélique JAK2 présentés dans les tableaux suivants :

Equipe et Revue	Modèles statistiques	Facteurs confondant pris en compte	Risque thrombotique et charge allélique JAK2 V617F pour la Polyglobulie de Vaquez	
			Au diagnostic	Au suivi
Vannucchi et al 2007 (Blood) (58) Rétrospective, n = 323 PV	- Régression logistique multivariées - Kaplan Meier (Test Log Rank) - Modèles de COX multivariés	- Age, sexe, ATCD de thromboses, leucocytes (>15), hématocrite, plaquettes, splénomégalie	- Pas d'association entre charge allélique JAK2 > 50% et < 50% et le risque de thromboses au diagnostic et au suivi des PV (p > 0.05 log Rank)	- Pas d'association entre charge allélique JAK2 > 50% et < 50% et le risque de thromboses au diagnostic et au suivi des PV (p > 0.05 log Rank)
Tefferi et al 2006 (Cancer) (69) Retrospective, n = 63 PV	- Tests non paramétriques (Mann Withney, Kruskal Wallis)	- Age, sexe, hémoglobine, plaquettes, leucocytes	- Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 >50% et < 50% et les thromboses au diagnostic dans les PV (p= 0.23)	Non étudié
Vannucchi et al 2007 (Leukemia) (70) Prospective, n = 173 PV	- Régression logistique multivariées - Kaplan Meier (Test Log Rank)	- Age, sexe, hematocrite, leucocytes, plaquettes, LDH, splénomégalie, type de traitement (chimiothérapie)	- Pas d'association entre charge allélique JAK2 compris entre 1-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100% et le risque de thromboses au diagnostic des PV	- **RR thromboses au suivi = 7.1** (95% CI, 1.6–10.1), p = 0.003) **chez les PV avec charge allélique JAK2 > 75%** par rapport aux PV avec charge allélique JAK2 < 25%
Passamonti et al 2010 (Leukemia) (71) Prospective, n = 338 PV	- Modèles de COX multivariés - Kaplan Meier (Test Log Rank)	-Age, leucocytes >11, plaquettes, hémoglobine, ATCD de thromboses, splénomégalie	- Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 >50% et < 50% et les thromboses au diagnostic dans les PV	- Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 >50% et < 50% et les thromboses au suivi dans les PV (HR = 1, 95% CI 0.9–1, p = 0.8)
Horvat 2019 (Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia)(72) Prospective, n = 258 134 TE 70 PV	- Tests non paramétriques (Mann Withney, Chi-deux) - Régression logistique multivariées	- Age, sexe, anomalie du bilan de thrombophilie, plaquettes, globules blancs, hémoglobine, FDRCV	Non étudié	- **RR thromboses veineuse au suivi = 1.9 (95%CI 0.4-9.3, p = 0.03) chez PV > 90.4% de charge allélique JAK2**

Tableau 16 : Synthèse des articles sur le risque thrombotique et la charge allélique JAK2 V617F pour la PV uniquement

Equipe et Revue	Modèles statistiques	Facteurs confondants ou covariables pris en compte	Risque thrombotique et charge allélique JAK2 V617F pour la **Thrombocytémie essentielle**	
			Au diagnostic	Au suivi
Wolanskyj AP et al 2006 (Mayo Clinic Proceedings) (73) Rétrospective, n = 322 TE	- Modèles de COX multivariés - Kaplan Meier (Test Log Rank)	- Age, Sexe, ATCD de thromboses, leucocytes (>15 G/L), FDRCV	- Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 >50% et < 50% et les thromboses au diagnostic dans les TE	- Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 >50% et < 50% et les thromboses au suivi dans les TE
Vannucchi et al 2007 (Blood) (58) Rétrospective, n = 639 TE	- Régression logistique multivariées - Kaplan Meier (Test Log Rank) - Modèles de COX multivariés	- Age, sexe, ATCD de thromboses, leucocytes (>15 G/L), hématocrite, plaquettes, taille rate	**- Thromboses plus fréquentes au diagnostic et au suivi chez les TE homozygotes (>50%)** que chez les TE hétérozygotes (<50%) et les TE JAK2 sauvages. (HR = 3.97, 95%CI 1.34–11.7; p = 0.013) - Thromboses artérielles > thromboses veineuses au diagnostic - Autant de thromboses artérielles et de thromboses veineuses au suivi	
Antonioli 2008 (Haematologica) (74) Rétrospective n = 260 TE	Régression logistique multivariée	- Age, leucocytes, hémoglobine, plaquettes	- Pas de différence significative entre la charge allélique et les thromboses totales au diagnostic **- Thromboses artérielles plus fréquente chez TE avec charge allélique > 25% (RR= 3, 95%CI 1.3-6.8, p=0.01).**	Non étudié
De Stefano et al 2010 (Ann Hematology) (75) Rétrospective, n =143 TE	- Kaplan Meier (Test Log Rank) - Modèles de COX multivariés	- Age, sexe, type de traitement, FDRCV, ATCD de thromboses	Non étudié	- Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 >50% et < 50% et les thromboses récidivantes au suivi dans les TE (HR= 2.94, 95% CI 0.73-11.78)
Zhao S 2016 (International Journal of Medical Science) (76) Rétrospective n = 116 TE n = 54 PV	- Régression logistique - Kaplan Meier (Test Log Rank) - Modèles de COX multivariés	- Age, sexe, leucocytes, hémoglobine, taille rate	Non étudié	**- Thromboses totales plus fréquente chez TE avec charge allélique > 16.5% (HR = 1,23, 95%CI 1.08-1.39, p= 0.02)**
Horvat 2019 (Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia) (77) Prospective, n = 258 134 TE 70 PV	- Tests non paramétriques (Mann Withney, Chi-deux) - Régression logistique multivariées	- Age, sexe, anomalie du bilan de thrombophilie, plaquettes, globules blancs, hémoglobine, FDRCV	Non étudié	**- Thromboses artérielles plus fréquentes chez TE avec charge allélique > 14.6% (RR= 2.9, 95%CI 1.2-6.8)**

Tableau 17: Synthèse des articles sur le risque thrombotique et la charge allélique pour la TE uniquement

Equipe et revue	Modèles statistiques	Covariables	Risque thrombotique et charge allélique JAK2 pour les NMP (TE et PV confondus)	
			Au diagnostic	Au suivi
Carobbio et al 2009 (Experimental Hematology) (78) Rétrospective, n = 867 TE n = 415 PV	- Modèles de COX multivariés - Kaplan Meier (Test Log Rank)	- Age, ATCD de thrombose, Leucocytes	Pas de différence significative entre charge allélique JAK2 1-25%, 26-50% et > 50% et la fréquence des thromboses	**Après 5 ans : thromboses (total = TA + TV) plus fréquente (TE + PV) à partir de JAK2 > 25% en analyse multivariée (HR= 1.74, 95%CI 1.00- 3.5, p= 0.01)**
Borowczyk M et al 2015 (Thrombosis Research) (79) Rétrospective n = 53 PV n = 114 TE	- Régression logistiques multivariées - Courbe ROC	- Age, Sexe, ATCD de thromboses, leucocytes, hémoglobine, hématocrite, Plaquettes, type de traitement	- **Charge allélique >20% augmente le risque de TV en particulier le risque de thrombose veineuse profonde au diagnostic (RR= 7.4, 95%CI 1.6-33.7, p = 0.004)**	Non étudié
Bertozi et al 2017 (Ann Haematology)(80) Rétrospective n = 121 TE n = 124 PV	- Modèles de COX multivariés - Kaplan Meier (Test Log Rank)	Age, Hématocrite,	- Pas de correlation entre la charge allélique et les thromboses au diagnostic.	**- Charge allélique > 50% augmente le risque de thrombose (HR=3.58, 95%CI 1.42-9.03, p =0.007) comparé à charge allélique < 25%** **- Charge allélique > 75% augmente le risque de thrombose (HR= 4.74, 95%CI 2.1-10.69, p = 0.0002) comparé à charge allélique < 25%**
Trifa Ap et al 2018 (Bloods cells molecules diseases) (81) Rétrospective n = 316 PV n = 390 TE	- Tests non paramétrique (Test exact de Fischer et Mann Withney)	- Age, Sexe, Leucocytes, FDRCV	- **Risque thrombotique (Thromboses totale= TA +TV) plus élevé au diagnostic de NMP** en fonction de la charge allélique (variable continu)	Non étudié

Tableau 18 : Synthèse des articles sur le risque thrombotique et la charge allélique pour les NMP en général

Sur les 112 patients mutés JAK2 étudiés et suivi jusqu'en mai 2018 (cf figure 1), nous retrouvons un risque de récidives d'événements thrombotiques (thromboses artérielles et veineuses) augmenté au delà de 25% de charge allélique JAK2 en analyse multivariée (p=0.027). Ce résultat est en accord avec les articles de la littérature, (78) (80) étudiant la survenue d'événements thrombotiques dans le suivi des NMP. L'étude de Carobbio (78) montre un risque thrombotique total plus élevé à partir de 25% de charge allélique JAK2 chez les TE et les PV confondus. L'équipe de Bertozzi (80) montre aussi qu'une charge allélique supérieur à 50% dans les TE et PV augmente le risque de thrombose au suivi des patients.

Lorsque que nous nous intéressons précisément au suivi des PV, nos résultats ne montrent pas de différence significative au risque de 5% en analyse multivariée. Nous concluons seulement à une tendance à faire plus d'événements thrombotiques au cours du temps chez les PV avec plus de 25% de charge allélique. Concernant les PV étudiées seules, les résultats des études dans la littérature (58), (69), (70), (71), (72) sont très hétérogènes sur la question. L'étude prospective de Vannucchi (70) sur 173 PV conclue à un risque thrombotique plus important chez les patients avec une charge allélique > 75% par rapport à ceux ayant une charge allélique < 25%. Mais l'étude prospective de Passamonti sur 338 PV (71) ne montre pas de différence significative entre la charge allélique JAK2 > 50% et la charge allélique JAK2 < 50%. De plus deux autres études rétrospectives (58) (69) viennent controverser nos résultats puisque qu'elles ne montrent aucune différence significative entre la charge allélique et le risque thrombotique des PV.

Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par des différences entre : le nombre de patients, les techniques de PCR, les traitements utilisés, les modèles statistiques employés et par les covariables prises en compte qui sont très disparates entre les études.

Nous n'avons pas pu évaluer le risque thrombotique chez les TE et les MFP. Dans la TE, la charge allélique semble plus facilement être associée à une augmentation des thromboses artérielles au diagnostic et des thromboses veineuses et artérielles récidivantes (58), (74), (76), (77). Seule 2 études (73), (75) ne retrouve pas de différence significative entre la charge allélique et le risque thrombotique au diagnostic et au suivi des TE.

Dans la MFP, nous pouvons difficilement répondre à la question du lien charge allélique/thrombose en raison des rares publications. Notre faible effectif ne nous a pas permis

de répondre à la question. Seule une étude Barbui (22) a montré que la présence de la mutation JAK2 était indépendamment associée à une incidence accrue de thromboses.

Nous pouvons toutefois affirmer par nos résultats, que la plupart des PV qui ont évolué en myélofibrose secondaire avaient toutes une charge allélique élevée au delà de 50% et significativement différente de la charge allélique des PV qui n'avaient pas évolué en myélofibrose secondaire. Ce résultat est en accord avec Vanucchi (58) et Bertozi (80) qui ont confirmé que les PV avec une charge allélique > 75% voir > 50% avaient un risque jusqu'à 8 fois plus important de développer une myélofibrose secondaire. Une étude récente (82) a montré que les patients TE et les patients en myélofibrose précoce avec une charge allélique > 50% avaient un risque plus important de transformation en myélofibrose secondaire (HR=3.04, 95%CI=1.3-6.7).

Sur les 397 patients diagnostiqués entre 2011 et 2018, les résultats ne montrent pas de différence significative sur le risque thrombotique et la charge allélique JAK2 au diagnostic. Seule l'étude de Carobbio (78) sur 867 TE et 415 PV vient conforter nos résultats puisque les auteurs ne trouvent pas de différence significative entre la charge allélique et la fréquence des thromboses au diagnostic.

Dans notre étude, nous remarquons qu'au diagnostic, la charge allélique JAK2 n'est pas associée au risque thrombotique contrairement au suivi où elle représente un facteur de risque de récidive à partir de 25%. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses à cette discordance :

Premièrement la forte sensibilité de notre méthode proche de 0,1% nous permet de diagnostiquer des patients faiblement positifs ce qui induit un diagnostic très précoce de la maladie. En effet 7,7% des patients de notre cohorte (groupe des thromboses isolées) ont une médiane à 0.79% de charge allélique JAK2. Ni la charge allélique ni l'âge ne sont associés à la gravité de la thrombose puisque l'on observe dans notre cohorte que, 54% des thromboses veineuses cérébrales ont une charge allélique < 3% et que 23% des thromboses veineuses splanchniques ont une charge allélique <3%. De plus une charge allélique <3% est difficile à interpréter d'un point de vue clinique. On peut supposer que des facteurs génétiques en plus de la faible charge allélique mutationnelle JAK2 soient nécessaires au développement biologique du NMP. Par ailleurs la mutation JAK2 seule, serait suffisante pour augmenter le risque thrombotique via d'autres mécanismes soutenus par certains auteurs (83) (84) comme

les cellules endothéliales qui portent la mutation JAK2 V617F et pourraient jouer un rôle nouveau dans la physiopathologie de la thrombose.

D'autres études récentes (85) (86) ont démontré que des mutations somatiques clonales comme JAK2 V617F, peuvent être présentes dans le sang d'individus en bonne santé, c'est ce que nous appellons les « CHIP » ou hématopoièse clonale de potentiel indéterminé. L'équipe de Wolach et al (38) ont examiné l'association entre une CHIP JAK2 V617F positive et les thromboses veineuses dans une cohorte comprenant des patients schizophrènes et des témoins en bonne santé. Les patients avec CHIP associé à la mutation JAK2 V617F étaient associés de manière significative à des événements thrombotiques veineux notamment des thromboses veineuses profondes et des embolies pulmonaires, survenus dans 25% des cas. De même dans les CHIP, les mutations JAK2 entraîne un risque de coronaropathie accrue, malgré l'absence du phénotype biologique du NMP (87). Ces résultats vont dans notre sens et suggèrent que les mutations JAK2 V617F, même à faible charge allélique et en l'absence de signes de la NMP sont associées à un risque élevé d'événements thrombotiques.

Avec l'apport de techniques de type « Next Generation Sequencing » et de micro puces à ADN, un nombre croissant d'anomalies génétiques a été identifié dans des gènes distincts de JAK2 chez les patients NMP et qui pourrait expliqué en partie l'hétérogénéité de ces maladies. Elles sont également retrouvées dans d'autres hémopathies malignes (SMD, LAM). Ces mutations touchent les régulateurs épigénétiques (TET2, IDH1/2, ASLX1, EZH2, DNMT3A), d'épissage (SF3B1, SRSF2, U2AF1) ou des facteurs transcriptionnels (P53, RUNX1, ETV6). Ces mutations supplémentaires peuvent induire sur la sévérité et la transformation de la maladie comme EZH2, ASXL1, SRSF2 ou IDH1/2 et peuvent aussi favoriser la progression de la TE ou la MF (88). Des études sont en cours pour comprendre comment ces mutations coopèrent pour favoriser le développement d'une NMP.

Plus récemment JAK2 V617F a pu être identifié chez des sujets non atteints à une fréquence de 0,2% (89). Les auteurs soutiennent que la prévalence de l'hématopoïèse clonale JAK2 V617F parmi les témoins représente probablement une combinaison de personnes ayant un NMP non diagnostiqué, des personnes pouvant développer une futur NMP, et d'autres qui ne développeront jamais un trouble hématologique.

A notre connaissance, pour répondre à la question du lien entre charge allélique/ thromboses récidivantes, aucune étude n'a étudié conjointement les patients avec thromboses JAK2 isolées et les NMP classiques. D'après nos résultats la charge allélique JAK2 > 25% représente un facteur de risque de récidives thrombotiques selon les arguments suivants :

Premièrement, la charge allélique est le seul facteur de risque de récidive retrouvé dans notre étude parmi l'âge, le sexe, le traitement cytoréducteur, les facteurs de risques cardiovasculaires, le traitement par kardegic® (anticoagulants non pris en compte) et le type de NMP. Selon nos résultats, une forte charge allélique dans les TE et les PV est corrélée à une myélopoièse plus importante induisant une hyperleucocytose ce qui est en accord avec Vannucchi (90) ; cette hyperleucocytose étant un facteur de risque de thrombose artérielle dans la TE (21).

Deuxièmement, les thromboses récidivantes avec une charge allélique > 25% pourraient être liées à un mauvais contrôle du traitement cytoreducteur. D'après l'étude de De Stephano (35), les patients TE et PV ont présenté un risque de récidives thrombotiques supérieur à 40% chez ceux qui avaient un traitement cytoréducteur mal équilibré. De plus, d'après Vannucchi (58), une forte charge allélique dans les TE et les PV est corrélée à des perturbations plus importante de la NFS (notamment de l'hyperleucocytose) au suivi malgré le traitement cytoréducteur. On peut donc supposer dans notre population JAK2 >25% que ces anomalies persistent au suivi, même sous traitement cytoréducteur et qu'elles pourraient contribuer, conjointement à une forte charge allélique au développement d'une thrombose.

B. Objectifs Secondaires:

1. Etude des facteurs de risque de thrombose

Le tabac et les plaquettes < 450G/L sont des facteurs prédictifs de thrombose retrouvés au diagnostic des NMP dans notre étude. Le tabac est un facteur de risque cardiovasculaire de thrombose artérielle décrit dans les NMP par certains auteurs (21). Plusieurs équipes dont Landolfi (50) et Tefferi (91) ont montré que la thrombocytose n'est pas considérée comme un facteur de risque de thrombose. Nos résultats vont dans le même sens que Gugliotta (92) qui

observe que la fréquence de thromboses était significativement supérieure chez les patients présentant un taux de plaquette < 700 G/L par rapport à ceux >700 G/L. Pris séparément, la TE et la PV présentent des facteurs de risques différents en fonction des thromboses artérielles et veineuses.

Le sexe masculin, la leucocytose >11 G/L et l'hypertension artérielle ont été identifiés comme des facteurs de risques de thromboses artérielles dans la TE et pas dans la PV. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Carobbio sur 891 TE (21). La différence entre les facteurs de risques pour les thromboses artérielles et veineuses est liée à un rôle spécifique de la leucocytose et des marqueurs inflammatoires dans les artères. La présence de facteurs de risques cardiovasculaires et l'hyperleucocytose dans la TE doivent être pris en compte et une approche thérapeutique plus agressive pourrait être envisagée.

2. Etude des thromboses veineuses cérébrales et embolies pulmonaires

Nous avons voulu déterminer en seconde partie d'étude, la fréquence de la mutation JAK2 V617F sur toutes les TVC et embolies pulmonaires adressées au laboratoire entre 2017 à 2018. Nous retrouvons une fréquence de la mutation JAK2 de 15% sur les TVC. Notre fréquence à l'APHM est élevée comparé à la littérature, rapportant dernièrement une prévalence de 5,6% (33). Cette différence peut s'expliquer par notre faible effectif. Puis par la sensibilité de notre technique qui est de 0,1% alors que celle utilisée par Lamy (33) sur les thromboses veineuses cérébrales est de 1%. Les outils moléculaires que nous utilisons sont également différents des autres auteurs (techniques commerciales/maisons, amorces sens et anti-sens différentes, gène de ménage différent).

La fréquence de la mutation JAK2 atteint 13,6% pour les embolies pulmonaires. Ce chiffre nous interpelle car la majorité des études étudiant cette question rapporte une prévalence de moins de 2%. Une hypothèse pourrait être en plus de la forte sensibilité de notre méthode, la sélection des patients par les différents services spécialisés de l'APHM (médecine interne, centre de thrombophilie, service de neurovasculaire) qui demandent une recherche de mutation JAK2 chez des cas où la thrombose serait inexpliquée par les autres facteurs de risques.

Un de nos objectifs secondaires était de détecter un sous groupe de patients à risque d'être porteur de la mutation JAK2 V617F. Nous avons comparé les caractéristiques cliniques

et biologiques de deux groupes de patients atteints de TVC (l'un JAK2 positif sans NMP définis, l'autre JAK2 négatif) et de deux groupes de patients atteints d'embolies pulmonaires (l'un JAK2 positif sans NMP définis, l'autre JAK2 négatif). Nos résultats montrent plus de thromboses veineuses chez les TVC JAK2 positifs sans NMP définis par rapport aux TVC JAK2 négatifs. Ce résultat rejoint ceux de Martinelli (94) qui montre que les NMP avec TVC sont exposées à un nombre plus important de thromboses veineuses par rapport aux NMP avec thromboses extra-cérébrales.

La haute fréquence observée et le risque élevé de thromboses veineuses justifie un dépistage systématique JAK2 chez tous les patients atteints de thromboses veineuses cérébrales même en l'absence de signes biologiques évidents de NMP.

Dans les TVC et les EP JAK2 mutés sans NMP définis, nous n'avions pas retrouvé de différence significative sur les anomalies du bilan de thrombophilie par rapport aux groupes des TVC et des EP JAK2 négatif. Ce résultat est en accord avec Colaizzo (93) et Martinelli (94) qui ont montré que les anomalies du bilan de thrombophilie retrouvées chez les patients NMP sont moins fréquentes que ceux de la population générale. Bien que des facteurs de risques thrombophiliques peuvent se rajouter augmentant le risque de récidive, leurs prévalences sont plus élevées chez les patients non NMP suggérant une pathogénèse différente dans ce contexte.

3. Etudes des patients TE doubles positifs

Enfin une faible proportion de patients TE sont doubles mutées JAK2 /MPL ou JAK2/CALR. Sur un plan biologique nous remarquons que ces doubles mutants ont un taux de plaquette significativement plus élevé que les TE JAK2 seul. Au niveau clinique, les événements thrombotiques des TE doubles mutés sont significativement moins fréquents que les TE mutés JAK2 seul.

Récemment de rares cas de doubles mutations JAK2/CALR et JAK2/MPL ont été rapporté dans la littérature. Des cas de co-mutations JAK2 V617F/CALR ont été signalés dans quelques cas de NMP et la fréquence est généralement inférieure à 1%. Cependant une étude de 2015 étudiant 91 TE par technique HRM rapporte une fréquence de 6,8% de TE JAK2 V617F associée à la mutation CALRdel (95). De plus les auteurs rapporte que les

patients TE doubles mutées JAK2/ CALR ont été associées à un groupe d'âge plus élevé et à des événements thrombotiques artérielle plus important après le diagnostic.

Des mutations coexistantes de JAK2 V617F / MPL et de JAK2 V617F / JAK2 exon-12 ont déjà été rapportées. Cependant, la fréquence de ces mutations coexistantes et le fond génétique (charge en allèles JAK2 V617F) qui leur est associé n'ont pas été bien étudiés. Nussenzveig et al (96) rapportent une fréquence de 2,9% de mutations coexistantes chez les patients présentant une charge allélique JAK2 V617F faible (<12%). Les auteurs n'ont cependant pas relevé les renseignements cliniques de ces patients.

Une étude récente menée en 2016 dans le service du Professeur Gabert de Biologie moléculaire à l'hôpital Nord a été faite sur le sujet (97). Parmi les 164 cas incluent dans la cohorte, la mutation JAK2 V617F était associée aux mutations CALR (n = 4) et MPL (n = 4) chez 8 des 103 patients atteints de TE. Ces cas portaient une charge allélique JAK2 V617F <4% et un nombre de plaquettes nettement plus élevé par rapport aux patients à mutation unique JAK2 V617F (p<0,001) et CALR (p = 0,001). Les résultats de cette étude plaident en faveur de la coexistence de mutations des gènes JAK2, CALR et MPL dans les NMP et suggèrent que les gènes CALR et MPL devraient être analysés non seulement chez les patients JAK2 négatifs, mais également chez les patients à faible charge allélique JAK2 V617F ce qui est fait au laboratoire depuis 2016.

La présence de ces co-mutations définit un sous-groupe spécifique de patients nécessitant des études supplémentaires pour savoir s'ils présentent ou non un risque plus important d'événements thrombotiques.

C. Limites de l'étude

Notre étude comporte plusieurs limites.

En premier lieu nos résultats sur la comparaison entre les TVC JAK2 positif isolés et les TVC JAK2 négatif manquent de puissance statistique en raison du faible nombre de patients. Il faudrait faire une étude sur un plus grand échantillon et calculer la prévalence sur plusieurs années pour pouvoir vérifier nos résultats.

Deuxièmement, d'un point de vue méthodologique nous nous sommes intéressés au suivi, aux thromboses récidivantes uniquement et nous n'avons pas pris en compte toute les covariables possibles au moment d'une thrombose survenant au suivi comme les anticoagulants (AOD, AVK), la numération formule sanguine (notamment la persistance d'une hyperleucocytose sous traitement cytoréducteurs), le bilan de thrombophilie, la présence d'autres facteurs de risques de thromboses (maladies auto-immunes, autres types de cancers, chirurgies programmées…).

Nous avons aussi choisi de confondre les thromboses aux antécédents de moins de 3 ans avec les thromboses au diagnostic ce qui peut surestimés nos résultats.

De plus, le suivi était incomplet pour certains patients ce qui peut réduire la puissance statistique de notre analyse.

Conclusion

Notre étude rétrospective visait principalement à évaluer si la charge allélique était un facteur de risque thrombotique. Nous avons retrouvé, un risque d'événements thrombotiques récidivants augmenté, au delà de 25% de charge allélique JAK2 au suivi des patients.

Au delà du rôle de la mutation JAK2 V617F dans le diagnostic des néoplasies myéloprolifératives, les résultats de notre étude pourraient fournir des informations pronostiques intéressantes, chez les patients ayant eu un événement thrombotique initial, en particulier lorsque la charge allélique JAK2 dépasse les 25%. La charge allélique JAK2 pourraient être considérée, en plus de l'âge et des antécédents de thromboses, comme un indicateur pronostique supplémentaire à la fois sur les thromboses récidivantes mais aussi sur la transformation en myélofibrose secondaire. Elle pourrait être une variable candidate pour améliorer la stratification des patients par exemple, pour la conception de futurs essais cliniques sur un traitement anti-JAK2. La gestion de la prophylaxie secondaire antithrombotique chez les patients avec une charge allélique > 25% mérite d'être étudié. Nous pouvons ajouter que la signification clinique d'une faible charge allélique JAK2 < 4% n'est pas complétement connue de nos jours.

Il convient de souligner que chaque sous-type de NMP a ses facteurs de risque spécifiques, impliquant une pathogenèse différente. L'influence de certains facteurs de risques, comme la leucocytose ou les facteurs de risques cardiovasculaires sur l'apparition d'une thrombose artérielle, doit être pris en compte dans la TE. Des études multicentriques plus importantes, sur la prévalence de la mutation JAK2 V617F, chez les patients présentant des thromboses non splanchniques avec ou sans NMP, sont nécessaires afin de confirmer nos résultats et d'intégrer la mutation JAK2, dans le bilan diagnostique de routine de la maladie thrombo-embolique veineuse et artérielle.

Référence bibliographiques

(1) W Vainchenker et S N Constantinescu, « JAK/STAT Signaling in Hematological Malignancies », *Oncogene* 32, nº 21 (mai 2013): 2601‑13.

(2) Rajintha M Bandaranayake et al., « Crystal Structures of the JAK2 Pseudokinase Domain and the Pathogenic Mutant V617F », *Nature Structural & Molecular Biology* 19, nº 8 (août 2012): 754‑59.

(3) Chloé James et al., « A Unique Clonal JAK2 Mutation Leading to Constitutive Signalling Causes Polycythaemia Vera », *Nature* 434, nº 7037 (avril 2005): 1144‑48.

(4) Florence Pasquier, « Identification et fonction de nouvelles mutations des récepteurs à la thrombopoïétine et à l'érythropoïétine dans les néoplasmes myéloprolifératifs et les érythocytoses. » (Université Paris-Saclay, 2015).

(5) S. Hasan et al., « JAK2V617F Expression in Mice Amplifies Early Hematopoietic Cells and Gives Them a Competitive Advantage That Is Hampered by IFN », *Blood* 122, nº 8 (22 août 2013): 1464‑77.

(6) Odile Moulard et al., « Epidemiology of Myelofibrosis, Essential Thrombocythemia, and Polycythemia Vera in the European Union », *European Journal of Haematology* 92, nº 4 (avril 2014): 289‑97.

(7) Roberto Marchioli et al., « Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera », *Journal of Clinical Oncology* 23, nº 10 (avril 2005): 2224‑32, https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.062.

(8) A. Tefferi et al., « Long-Term Survival and Blast Transformation in Molecularly Annotated Essential Thrombocythemia, Polycythemia Vera, and Myelofibrosis », *Blood* 124, nº 16 (16 octobre 2014): 2507‑13.

(9) F. Passamonti et al., « A Dynamic Prognostic Model to Predict Survival in Post-Polycythemia Vera Myelofibrosis », *Blood* 111, nº 7 (1 avril 2008): 3383‑87.

(10) Naseema Gangat et al., « Leucocytosis in Polycythaemia Vera Predicts Both Inferior Survival and Leukaemic Transformation », *British Journal of Haematology* 138, nº 3 (août 2007): 354‑58.

(11) Maya Koren-Michowitz et al., « JAK2V617F Allele Burden Is Associated with Transformation to Myelofibrosis », *Leukemia & Lymphoma* 53, nº 11 (novembre 2012): 2210‑13.

(12) F. Passamonti et al., « Prognostic Factors for Thrombosis, Myelofibrosis, and Leukemia in Essential Thrombocythemia: A Study of 605 Patients », *Haematologica* 93, nº 11 (11 septembre 2008): 1645‑51.

(13) F. Cervantes et al., « New Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis Based on a Study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment », *Blood* 113, nº 13 (26 mars 2009): 2895‑2901,

(14) F. Passamonti et al., « A Dynamic Prognostic Model to Predict Survival in Primary Myelofibrosis: A Study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment) », *Blood* 115, nº 9 (4 mars 2010): 1703‑8.

(15) Naseema Gangat et al., « DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status », *Journal of Clinical Oncology* 29, nº 4 (février 2011): 392‑97.

(16) Ayalew Tefferi et al., « Integration of Mutations and Karyotype Towards a Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS) for Primary Myelofibrosis », *Blood*, décembre 2014, sect. vol. 124 no. 21 406.

(17) Brady L. Stein et al., « Polycythemia Vera: An Appraisal of the Biology and Management 10 Years After the Discovery of *JAK2 V617F* », *Journal of Clinical Oncology* 33, nº 33 (20 novembre 2015): 3953‑60.

(18) Peter J. Campbell et Anthony R. Green, « The Myeloproliferative Disorders », *New England Journal of Medicine* 355, nº 23 (7 décembre 2006): 2452‑66.

(19) A. Casini, P. Fontana, et T.P. Lecompte, « Thrombotic Complications of Myeloproliferative Neoplasms: Risk Assessment and Risk-Guided Management », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11, nº 7 (juillet 2013): 1215‑27.

(20)« Polycythemia Vera: The Natural History of 1213 Patients Followed for 20 Years. Gruppo Italiano Studio Policitemia », *Annals of Internal Medicine* 123, nº 9 (1 novembre 1995): 656‑64.

(21) A. Carobbio et al., « Risk Factors for Arterial and Venous Thrombosis in WHO-Defined Essential Thrombocythemia: An International Study of 891 Patients », *Blood* 117, nº 22 (2 juin 2011): 5857‑59.

(22) T. Barbui et al., « Thrombosis in Primary Myelofibrosis: Incidence and Risk Factors », *Blood* 115, nº 4 (28 janvier 2010): 778‑82.

(23) E. Ong et al., « Cerebrovascular Events as Presenting Manifestations of Myeloproliferative Neoplasm », *Revue Neurologique* 172, nº 11 (novembre 2016): 703‑8.

(24) C. Rossi et al., « Acute Coronary Disease in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera », *Journal of Internal Medicine* 244, nº 1 (juillet 1998): 4953.

(25) Axel Muendlein et al., « Evaluation of the Prevalence and Prospective Clinical Impact of the *JAK2 V617F* Mutation in Coronary Patients: Impact of the JAK2 V617F Mutation in Coronary Patients », *American Journal of Hematology* 89, nº 3 (mars 2014): 295‑301.

(26) Wen Gao et al., « ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Patient with Essential Thrombocythemia without Associated Risk », *International Journal of Cardiology* 180 (février 2015): 223‑25.

(27) Emmanouil Papadakis, Ron Hoffman, et Benjamin Brenner, « Thrombohemorrhagic Complications of Myeloproliferative Disorders », *Blood Reviews* 24, nº 6 (novembre 2010): 227‑32.

(28) Jan Michiels, « Erythromelalgia and Vascular Complications in Polycythemia Vera », *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 23, nº 05 (octobre 1997): 441‑54.

(29) Jean-Christophe Ianotto, « Screening for MPN Mutations in Cases of Deep Vein Thrombosis and/or Pulmonary Embolism: What We have learnt from Studies », *Advanced Techniques in Biology & Medicine* 05, nº 02 (2017).

(30) Mandy N. Lauw et al., « Relevance of the JAK2V617F Mutation in Patients with Deep Vein Thrombosis of the Leg », *Annals of Hematology* 91, nº 1 (janvier 2012): 103‑7.

(31) J. H. Smalberg et al., « Myeloproliferative Neoplasms in Budd-Chiari Syndrome and Portal Vein Thrombosis: A Meta-Analysis », *Blood* 120, nº 25 (13 décembre 2012): 4921‑28.

(32) V. De Stefano et al., « Incidence of the JAK2 V617F Mutation among Patients with Splanchnic or Cerebral Venous Thrombosis and without Overt Chronic Myeloproliferative Disorders », *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, nº 4 (avril 2007): 708‑14.

(33) Matthias Lamy et al., « Should We Screen for Janus Kinase 2 V617F Mutation in Cerebral Venous Thrombosis? », *Cerebrovascular Diseases* 44, nº 3‑4 (2017): 97‑104.

(34) Stephen E. Langabeer, « The JAK2 V617F Mutation in Retinal Vein or Artery Occlusion », *EXCLI Journal; 18:Doc127; ISSN 1611-2156*, 2019.

(35) V. De Stefano et al., « Recurrent Thrombosis in Patients with Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia: Incidence, Risk Factors, and Effect of Treatments », *Haematologica* 93, nº 3 (1 mars 2008): 372‑80.

(36) Vahid Afshar-Kharghan et Perumal Thiagarajan, « Leukocyte Adhesion and Thrombosis », *Current Opinion in Hematology* 13, nº 1 (janvier 2006): 34‑39.

(37) Chiara Cerletti et al., « Platelet-Leukocyte Interactions in Thrombosis », *Thrombosis Research* 129, nº 3 (mars 2012): 263‑66.

(38) Ofir Wolach et al., « Increased Neutrophil Extracellular Trap Formation Promotes Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms », *Science Translational Medicine* 10, nº 436 (11 avril 2018): eaan8292.

(39) Roberto Marchioli et al., « Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera », *New England Journal of Medicine* 368, nº 1 (3 janvier 2013): 22‑33.

(40) Hsieh Chen et al., « Hematocrit and Flow Rate Regulate the Adhesion of Platelets to von Willebrand Factor », *Biomicrofluidics* 7, nº 6 (novembre 2013): 064113.

(41) Marcello Di Nisio et al., « The Haematocrit and Platelet Target in Polycythemia Vera », *British Journal of Haematology* 136, nº 2 (janvier 2007): 249‑59.

(42) G. Castaman et al., « Platelet von Willebrand Factor Abnormalities in Myeloproliferative Syndromes », *American Journal of Hematology* 49, nº 4 (août 1995): 289‑93.

(43) Bruce Furie et Barbara C. Furie, « Role of Platelet P-Selectin and Microparticle PSGL-1 in Thrombus Formation », *Trends in Molecular Medicine* 10, nº 4 (avril 2004): 171‑78.

(44) Cláudia Torres et al., « Circulating Endothelial Cells in Patients with Venous Thromboembolism and Myeloproliferative Neoplasms », éd. par Chiara Bolego, *PLoS ONE* 8, nº 12 (5 décembre 2013): e81574.

(45) M. C. Yoder et al., « Redefining Endothelial Progenitor Cells via Clonal Analysis and Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Principals », *Blood* 109, nº 5 (1 mars 2007): 1801‑9.

(46) L Falchi, H M Kantarjian, et S Verstovsek, « Assessing the thrombotic risk of patients with essential thrombocythemia in the genomic era », *Leukemia* 31, nº 9 (septembre 2017): 1845‑54.

(47) Yasuhiro Taniguchi et al., « Elevated Plasma Levels of Procoagulant Microparticles Are a Novel Risk Factor for Thrombosis in Patients with Myeloproliferative Neoplasms », *International Journal of Hematology* 106, nº 5 (novembre 2017): 691‑703.

(48) Marina Marchetti et al., « Phospholipid-Dependent Procoagulant Activity Is Highly Expressed by Circulating Microparticles in Patients with Essential Thrombocythemia », *American Journal of Hematology* 89, nº 1 (janvier 2014): 68‑73.

(49) Nigel Mackman, Rachel E. Tilley, et Nigel S. Key, « Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis », *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, nº 8 (août 2007): 1687‑93.

(50) Raffaele Landolfi et al., « Polycythemia Vera: Gender-Related Phenotypic Differences », *Internal and Emergency Medicine* 7, nº 6 (décembre 2012): 509‑15.

(51) Naseema Gangat et al., « Estrogen-Based Hormone Therapy and Thrombosis Risk in Women with Essential Thrombocythemia: Estrogen Therapy in Thrombocytopenia », *Cancer* 106, nº 11 (1 juin 2006): 2406‑11.

(52) Ayalew Tefferi et Tiziano Barbui, « Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia: 2019 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management », *American Journal of Hematology* 94, nº 1 (janvier 2019): 133‑43.

(53) R Landolfi, L Di Gennaro, et A Falanga, « Thrombosis in Myeloproliferative Disorders: Pathogenetic Facts and Speculation », *Leukemia* 22, nº 11 (novembre 2008): 2020‑28.

(54) R. Landolfi et al., « Leukocytosis as a Major Thrombotic Risk Factor in Patients with Polycythemia Vera », *Blood* 109, nº 6 (15 mars 2007): 2446‑52.

(55) P. J. Campbell et al., « Correlation of Blood Counts with Vascular Complications in Essential Thrombocythemia: Analysis of the Prospective PT1 Cohort », *Blood* 120, nº 7 (16 août 2012): 1409‑11.

(56) G Finazzi et al., « Incidence and Risk Factors for Bleeding in 1104 Patients with Essential Thrombocythemia or Prefibrotic Myelofibrosis Diagnosed According to the 2008 WHO Criteria », *Leukemia* 26, nº 4 (avril 2012): 716‑19.

(57) E Joanna Baxter et al., « Acquired Mutation of the Tyrosine Kinase JAK2 in Human Myeloproliferative Disorders », *The Lancet* 365, nº 9464 (mars 2005): 1054‑61.

(58) A. M. Vannucchi et al., « Clinical Profile of Homozygous JAK2 617V>F Mutation in Patients with Polycythemia Vera or Essential Thrombocythemia », *Blood* 110, nº 3 (19 avril 2007): 840‑46.

(59) Ayalew Tefferi et al., « The Clinical Phenotype of Wild-Type, Heterozygous, and Homozygous JAK2V617F in Polycythemia Vera », *Cancer* 106, nº 3 (1 février 2006): 631‑35.

(60) G. Barosi et al., « JAK2 V617F Mutational Status Predicts Progression to Large Splenomegaly and Leukemic Transformation in Primary Myelofibrosis », *Blood* 110, nº 12 (1 décembre 2007): 4030‑36.

(61) Tiziano Barbui et al., « Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet », *Journal of Clinical Oncology* 29, nº 6 (20 février 2011): 761‑70.

(62) Federico Lussana et al., « Association of V617F Jak2 Mutation with the Risk of Thrombosis among Patients with Essential Thrombocythaemia or Idiopathic Myelofibrosis: A Systematic Review », *Thrombosis Research* 124, nº 4 (septembre 2009): 409‑17.

(63) T. Barbui et al., « Development and Validation of an International Prognostic Score of Thrombosis in World Health Organization-Essential Thrombocythemia (IPSET-Thrombosis) », *Blood* 120, nº 26 (20 décembre 2012): 5128‑33.

(64) Alessandro M. Vannucchi et al., « Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera », *New England Journal of Medicine* 372, nº 5 (29 janvier 2015): 426‑35.

(65) Francesco Passamonti et al., « Ruxolitinib for the Treatment of Inadequately Controlled Polycythaemia Vera without Splenomegaly (RESPONSE-2): A Randomised, Open-Label, Phase 3b Study », *The Lancet Oncology* 18, nº 1 (janvier 2017): 88‑99.

(66) Alessandro Maria Vannucchi et al., « Ruxolitinib Reduces JAK2 p.V617F Allele Burden in Patients with Polycythemia Vera Enrolled in the RESPONSE Study », *Annals of Hematology* 96, nº 7 (juillet 2017): 1113‑20.

(67) Claire N. Harrison et al., « Ruxolitinib vs Best Available Therapy for ET Intolerant or Resistant to Hydroxycarbamide », *Blood* 130, nº 17 (26 octobre 2017): 1889‑97.

(68) J. Berdeja et al., « Phase 2 Study of Gandotinib (LY2784544) in Patients with Myeloproliferative Neoplasms », *Leukemia Research* 71 (août 2018): 82‑88.

(69) Tefferi et al., « The Clinical Phenotype of Wild-Type, Heterozygous, and Homozygous JAK2V617F in Polycythemia Vera ». Cancer 2006, n° 3 (1 février 2006) : 631-635.

(70) Vannuchi et al for the MPD Research Consortium3 et al., « Prospective Identification of High-Risk Polycythemia Vera Patients Based on JAK2V617F Allele Burden », *Leukemia* 21, nº 9 (septembre 2007): 1952‑59.

(71) F Passamonti et al., « A Prospective Study of 338 Patients with Polycythemia Vera: The Impact of JAK2 (V617F) Allele Burden and Leukocytosis on Fibrotic or Leukemic Disease Transformation and Vascular Complications », *Leukemia* 24, nº 9 (septembre 2010): 1574‑79.

(72) Ivana Horvat et al., « Influence of Blood Count, Cardiovascular Risks, Inherited Thrombophilia, and JAK2 V617F Burden Allele on Type of Thrombosis in Patients With Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms », *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 19, nº 1 (janvier 2019): 53‑63.

(73) Alexandra P. Wolanskyj et al., « Essential Thrombocythemia Beyond the First Decade: Life Expectancy, Long-Term Complication Rates, and Prognostic Factors », *Mayo Clinic Proceedings* 81, nº 2 (février 2006): 159‑66.

(74) Elisabetta Antonioli et al., « Influence of JAK2V617F Allele Burden on Phenotype in Essential Thrombocythemia », *Haematologica* 93, nº 1 (janvier 2008): 41‑48.

(75) for the GIMEMA Chronic Myeloproliferative Neoplasms Working Party et al., « Increased Risk of Recurrent Thrombosis in Patients with Essential Thrombocythemia Carrying the Homozygous JAK2 V617F Mutation », *Annals of Hematology* 89, nº 2 (février 2010): 141‑46.

(76) Shixiang Zhao et al., « Impact of JAK2V617F Mutation Burden on Disease Phenotype in Chinese Patients with JAK2V617F-Positive Polycythemia Vera (PV) and Essential Thrombocythemia (ET) », *International Journal of Medical Sciences* 13, nº 1 (2016): 85‑91.

(77) Horvat et al., « Influence of Blood Count, Cardiovascular Risks, Inherited Thrombophilia, and JAK2 V617F Burden Allele on Type of Thrombosis in Patients With Philadelphia Chromosome Negative Myeloproliferative Neoplasms ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 19, n°1 (Janvier 2019) : 53-63.

(78) Alessandra Carobbio et al., « JAK2V617F Allele Burden and Thrombosis: A Direct Comparison in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera », *Experimental Hematology* 37, nº 9 (septembre 2009): 1016‑21.

(79) Martyna Borowczyk et al., « The JAK2 V617F Mutational Status and Allele Burden May Be Related with the Risk of Venous Thromboembolic Events in Patients with Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms », *Thrombosis Research* 135, nº 2 (février 2015): 272‑80.

(80) Irene Bertozzi et al., « Thromboses and Hemorrhages Are Common in MPN Patients with High JAK2V617F Allele Burden », *Annals of Hematology* 96, nº 8 (août 2017): 1297‑1302.

(81) Adrian P. Trifa et al., « Modest Contribution of JAK2 V617F Allele Burden to the Occurrence of Major Thrombosis in Polycthemia Vera and Essential Thrombocythemia », *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 73 (novembre 2018): 45‑46.

(82) Roberto Latagliata et al., « Comparison of *JAK2* ^{V617F} -Positive Essential Thrombocythaemia and Early Primary Myelofibrosis: The Impact of Mutation Burden and Histology », *Hematological Oncology* 36, nº 1 (février 2018): 269‑75.

(83) L. Teofili et al., « Endothelial Progenitor Cells Are Clonal and Exhibit the JAK2V617F Mutation in a Subset of Thrombotic Patients with Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasms », *Blood* 117, nº 9 (3 mars 2011): 2700‑2707.

(84) Alexandre Guy et al., « Vascular Endothelial Cell Expression of JAK2 ^{V617F} Is Sufficient to Promote a pro-Thrombotic State Due to Increased P-Selectin Expression », *Haematologica* 104, nº 1 (janvier 2019): 70‑81.

(85) Giulio Genovese et al., « Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence », *New England Journal of Medicine* 371, nº 26 (25 décembre 2014): 2477‑87.

(86) Siddhartha Jaiswal et al., « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes », *New England Journal of Medicine* 371, nº 26 (25 décembre 2014): 2488‑98.

(87) Siddhartha Jaiswal et al., « Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease », *New England Journal of Medicine* 377, nº 2 (13 juillet 2017): 111‑21.

(88) Yue Yang et al., « Loss of Ezh2 Cooperates with Jak2V617F in the Development of Myelofibrosis in a Mouse Model of Myeloproliferative Neoplasm », *Blood* 127, nº 26 (30 juin 2016): 3410‑23.

(89) D. A. Hinds et al., « Germ Line Variants Predispose to Both JAK2 V617F Clonal Hematopoiesis and Myeloproliferative Neoplasms », *Blood* 128, nº 8 (25 août 2016): 1121‑28.

(90) Alessandro M. Vannucchi, Lisa Pieri, et Paola Guglielmelli, « *JAK2* Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment », *Therapeutic Advances in Hematology* 2, nº 1 (février 2011): 21‑32.

(91) A. Tefferi, « Management of Extreme Thrombocytosis in Otherwise Low-Risk Essential Thrombocythemia; Does Number Matter? », *Blood* 108, nº 7 (1 octobre 2006): 2493‑94.

(92) Luigi Gugliotta et al., « Unbiased Pro-Thrombotic Features at Diagnosis in 977 Thrombocythemic Patients with Philadelphia-Negative Chronic Myeloproliferative Neoplasms », *Leukemia Research* 46 (juillet 2016): 18‑25.

(93) Donatella Colaizzo et al., « Outcome of Patients with Splanchnic Venous Thrombosis Presenting without Overt MPN: A Role for the JAK2 V617F Mutation Re-Evaluation », *Thrombosis Research* 132, nº 2 (août 2013): e99‑104.

(94) Ida Martinelli et al., « Cerebral Vein Thrombosis in Patients with Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms An European Leukemia Net Study: Cerebral Vein Thrombosis in Myeloproliferative Neoplasms », *American Journal of Hematology* 89, nº 11 (novembre 2014): E200‑205.

(95) K-H Lim et al., « Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis », *Blood Cancer Journal* 5, nº 3 (20 mars 2015): e295.

(96) Roberto H. Nussenzveig et al., « Increased Frequency of Co-Existing *JAK2* Exon-12 or *MPL* Exon-10 Mutations in Patients with Low *JAK2* ^{V617F} Allelic Burden », *Leukemia & Lymphoma* 57, nº 6 (2 juin 2016): 1429‑35.

(97) Fabrice Usseglio et al., « Detection of CALR and MPL Mutations in Low Allelic Burden JAK2 V617F Essential Thrombocythemia », *The Journal of Molecular Diagnostics* 19, nº 1 (janvier 2017): 92‑98.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12