



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Profils génétique et hématologique des β -thalassémies dans l'Est Algérien

Présenté et soutenu par : LAOUAR Rania
SAADA Maroua

Le : 04/07/2017

Jury d'évaluation :

Président : CHETTOUM Aziz (MCA- UFM Constantine 1)

Rapporteur : BECHKRI Sakina (MCB - UFM Constantine 1)

Examineur : REZGOUNE Mohamed Larbi (MCB- UFM Constantine 1)

*Année universitaire
2016 - 2017*

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier **DIEU** tout puissant :

Merci de nous avoir tenues en bonne santé pour la réalisation de ce mémoire, merci de nous avoir guidées vers le chemin de la lumière et du savoir, merci de nous avoir donnée la force et le courage d'entreprendre ce travail. Que gloire et louanges vous soient consacrées pour l'éternité.

Notre reconnaissance et nos remerciements vont en premier lieu à notre encadreur Madame **Bechkri Sakina**, Maitre de conférences B à l'Université des frères Mentouri Constantine, pour ses conseils avisés, son aide, sa gentillesse et ses encouragements qui ont constitués un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos vifs remerciements vont également à Madame **Rezgoune-Chellat Djalila**, Maitre de conférences A à l'Université des frères Mentouri Constantine, on vous remercie pour votre précieuse aide lors de la réalisation de la partie pratique.

Nous tenons à remercier Monsieur **Chettoum Aziz**, Maitre de conférences A à l'Université des frères Mentouri Constantine, nous sommes très honorées de vous avoir comme président du jury.

Nous remercions Monsieur **Rezgoune Mohamed Larbi**, Maitre de conférences B à l'Université des frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté d'examiner notre travail et avoir fait l'honneur de siéger au jury de notre soutenance.

Nos sincères remerciements à tout les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études. Enfin, on remercie toutes les personnes qui ont participés de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire de Master.

MERCI

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire :

*À ma très chère maman **SALIMA**, affable, honorable, aimable :*

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence,

la source de tendresse et l'exemple du dévouement

qui n'a pas cessé de m'encourager

et de prier pour moi.

*À mon père **MOSTEFA**, à l'homme que j'aime, mon exemple éternel,*

mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est

sacrifié toute sa vie pour me voir réussir.

Sans toi ce jour n'aurais pas existé !

Merci tout simplement d'être ...mon père

Je vous dédie chers parents ce travail en témoignage de mon profond amour.

Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie

et bonheur.

*À mon frère **Zoheir**, à ma sœur **Yasmine** Je vous exprime à travers ce mémoire*

mes sentiments de fraternité et d'amour.

*Mon binôme **Maroua**, pour la sœur agréable qu'elle était et qu'elle restera pour*

moi

À tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime

*À toute la famille **Laouar** et **Kebbache***

Rania.

Dédicace

Je dédie ce modeste mémoire :

*À mes très chers parents en remerciant Dieu de les
avoir protégé pour être témoins de ma réussite.*

*Ma mère **SALIHA** la plus belle chose dans ma vie,*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu
mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma
naissance, à ce jour la.*

*Mon père **SAID** pour sa patience, sa confiance et son respect de mes
choix, rien au monde ne vont les efforts fournis jour et nuit pour mon
éducation et mon bien être.*

*À mes frères : **Hamza** et **Islem**, à ma sœur **Meriem**, en témoignage de
l'attachement, de l'amour et de l'affection
que je porte pour vous.*

*À ma grand-mère **Houria**, à ma tante **Fatima**, qui ont été un soutien morale
généreux et précieux pendant toutes mes années d'études.*

*Mon amie et binôme **Rania** pour son esprit d'équipe et à sa famille.*

À tous ceux qui m'aiment et tous ceux que j'aime

À toute la famille Saada et Belounis

Maroua.

Liste des abréviations

AHSP :	α -Hemoglobin Stabilising Protein
AP2 :	Activation Protein2
BBP :	Bleu de Bromo Phénol
BET :	Bromure d'éthidium
β-TI :	Béta Thalassémie Intermédiaire
β-TM :	Béta Thalassémie Majeure
CCMH:	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CHUC :	Centre Hospitalo-Universitaire Constantine
CYP :	Cytochrome P 450
DNase :	Desoxyribonucléase
DO :	Densité Optique
EDTA :	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
EKLF :	Erythroïd Kruppel-Like Factor
EPO :	Erythropoïétine
FAD :	Flavine Adenine Dinucléotide
FOG1 :	Friend of GATA-1
GR :	Globule Rouge
Hb :	Hémoglobine
HbA :	Hémoglobine Adulte
HbE :	Hémoglobine E
HbF :	Hémoglobine foétale
HCT:	Hématocrite
HMRUC:	Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine
Hinf I :	Haemophilus influenzae I
HRI :	Heme Regulator Inhibitor
HS:	Hypersensitive sites
Kb :	Kilo bases
KDa :	Kilo Dalton
LCR:	Locus Control Region
MGG :	May Grünwald Giemsa
MspI:	Moraxella species I

MTHFR:	Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase
NF-E2 :	Nuclear Factor Erythroïd 2
Oligo F:	Forward primer
Oligo R:	Reverse primer
OR:	Odds Ratio
Pb :	Paire de base
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PCR/RFLP :	Polymerase Chain Reaction /Restriction Fragment Length Polymorphism
pH :	Potentiel Hydrogène
Protéïnase K :	Protéïnase Kératine
P value :	Valeur de Probabilité
SAM :	S adenosyl-L méthionine
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SNV :	Science de la Nature et de la Vie
Taq :	Thermophilus Aquaticus
TBE :	Tris Borate EDTA
TCMH :	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
TDT :	Thalassémie Dépendante des Transfusions
TDNT :	Thalassémie Non-Dépendante des Transfusions
TE :	Tris EDTA
VGM :	Volume Globulaire Moyen

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation d'une molécule tétramérique $\alpha_2\beta_2$ de l'hémoglobine adulte normale (HbA).....	2
Figure 2 :	Sites d'érythropoïèse et expression des chaînes de globine du stade embryonnaire au stade adulte.....	3
Figure 3 :	Le locus de la β -globine.....	5
Figure 4 :	Les éléments structuraux appartenant aux régions promotrices des différents gènes de la globine.....	6
Figure 5 :	Répartition de la β -thalassémie dans l'ancien monde.....	10
Figure 6 :	Conséquences de l'excès de production de chaînes d' α -globines libres dans la β -thalassémie.....	13
Figure 7 :	Mode de transmission de la β -thalassémie.....	14
Figure 8 :	Les différents types de mutations β -thalassémiques.....	15
Figure 9 :	Localisation du gène <i>MTHFR</i> sur le chromosome 1.....	18
Figure 10 :	Sites de restriction de l'enzyme <i>MspI</i>	29
Figure 11 :	Site de restriction de l'enzyme <i>Hinfl</i>	29
Figure 12 :	Répartition des patients selon l'âge du diagnostic de la β -thalassémie.....	31
Figure 13 :	Répartition des patients selon leur âge actuel.....	31
Figure 14 :	Répartition des patients selon le sexe.....	31
Figure 15 :	Répartition des patients selon leur origine.....	32
Figure 16 :	Répartition des patients selon le degré de consanguinité.....	32
Figure 17 :	Répartition des patients selon leurs antécédents familiaux.....	32
Figure 18 :	Frottis sanguin.....	35
Figure 19 :	Cellules du frottis sanguin d'un β -thalassémique homozygote.....	36
Figure 20 :	Répartition des patients selon le type de β -thalassémie.....	36
Figure 21 :	Profils électrophorétique d'individus.....	36
Figure 22 :	Arbre généalogique de la famille représentative d'Azzaba (Skikda).....	37
Figure 23 :	Contrôle PCR du polymorphisme T3801C du <i>CYP1A1</i> m1 (une bande de 340pb).....	37
Figure 24 :	Contrôle PCR du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> (une bande de 198pb).....	38
Figure 25 :	Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des fragments après digestion par l'enzyme <i>MspI</i>	38

Figure 26 : Fréquences génotypiques du T3801C du <i>CYP1A1</i> des patients et des témoins.....	39
Figure 27 : Fréquences alléliques du T3801C du <i>CYP1A1</i> des patients et des témoins...	39
Figure 28 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des fragments après digestion par l'enzyme <i>HinfI</i>	40
Figure 29 : Fréquences génotypiques du C677T du <i>MTHFR</i> des patients et des témoins	41
Figure 30 : Fréquences alléliques du C677T du <i>MTHFR</i> des patients et des témoins.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Composants du mélange réactionnel de PCR.....	27
Tableau 2 :	Programmation d'un cycle de la PCR.....	28
Tableau 3 :	Tableau de contingence.....	30
Tableau 4 :	Variation du nombre des globules rouges chez les patients hétérozygotes..	33
Tableau 5 :	Répartition des patients hétérozygotes selon le taux d'Hb au diagnostic...	33
Tableau 6 :	Variation du taux de VGM chez les patients hétérozygotes.....	33
Tableau 7 :	Variation du taux de CCMH chez les patients hétérozygotes.....	34
Tableau 8 :	Variation du nombre des globules rouges chez les patients homozygotes..	34
Tableau 9 :	Répartition des patients homozygotes selon le taux d'Hb au diagnostic...	34
Tableau 10 :	Variation du taux de VGM chez les patients homozygotes.....	35
Tableau 11 :	Variation du taux de CCMH chez les patients homozygotes.....	35
Tableau 12 :	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du <i>CYP1A1</i>	39
Tableau 13 :	Répartition des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du <i>MTHFR</i>	40

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Première partie : Revue de littérature

Chapitre 1 : L'hémoglobine

I. Présentation.....	2
II. Structure des hémoglobines.....	2
III. Rôle.....	2
IV. L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines.....	3
V. Gènes des globines.....	4
V.1. Structure et famille des gènes des globines.....	4
V.2. Localisation des gènes de l'hémoglobine.....	4
V.3. La famille des gènes des chaînes β -globine.....	4
VI. La régulation de la transcription des gènes de la globine.....	5
VI.1. Les séquences <i>cis</i> régulatrices.....	5
VI.1.1. Promoteurs.....	5
VI.1.2. Enhancers ou séquences stimulatrices.....	6
VI.1.3. Silencers ou séquences extinctrices.....	6
VI.1.4. LCR β -globine.....	6
VI.2. La régulation en <i>trans</i>	7
VII. La régulation traductionnelle.....	7
VIII. La régulation équilibrée des deux loci de globine.....	7
IX. Les hémoglobinopathies.....	8

Chapitre 2 : La β -thalassémie

I. Définition.....	9
II. Histoire de la β -thalassémie.....	9
III. Epidémiologie.....	10
IV. Classification des syndromes β -thalassémiques.....	11
IV.1. La β -thalassémie majeure (β -TM).....	11
IV.2. La β -thalassémie intermédiaire (β -TI).....	11
IV.3. La β -thalassémie mineure.....	11
V. Complications de la β -thalassémie.....	11
VI. Physiopathologie de la β -thalassémie.....	12

Chapitre 3 : Génétique de la β -thalassémie

I. Transmission héréditaire.....	14
II. Bases moléculaires de la β -thalassémie.....	14
II.1. Les mutations ponctuelles.....	15
II.2. Les formes délétionnelles.....	16
III. Corrélation génotype-phénotype.....	16
IV. Les facteurs modulateurs d'origine génétique de la β -thalassémie.....	17

IV.1. Facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes α et β	17
IV.2. Les facteurs génétiques influençant la synthèse d'HbF à l'âge adulte.....	17
V. Polymorphismes génétiques.....	17
V.1. Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase (MTHFR) et la β -thalassémie.....	18
V.1.1. Structure et localisation du gène <i>MTHFR</i>	18
V.1.2. Structure et fonction de la protéine MTHFR.....	18
V.1.3. Le polymorphisme C677T.....	19
V.2. Cytochrome P450 et la β -thalassémie.....	19
V.2.1. Cytochrome P450.....	19
V.2.2. Enzyme CYP1A1.....	19
V.2.3. Le gène <i>CYP1A1</i>	19
V.2.4. Polymorphisme T3801C.....	20

Chapitre 4 : Diagnostic et Traitement

I. Diagnostic	21
I.1. Diagnostic biologique et clinique.....	21
I.1.1. Diagnostic de la β -thalassémie majeure.....	21
I.1.2. Diagnostic de la β -thalassémie intermédiaire.....	21
I.1.3. Diagnostic de la β -thalassémie mineure.....	22
I.2. Analyses de génétique moléculaire.....	22
I.3. L'enquête familiale.....	22
I.4. Diagnostic prénatal.....	22
I.5. Diagnostic préimplantatoire.....	23
II. Traitements des β -thalassémies.....	23
II.1. Le traitement conventionnel.....	23
II.2. Les nouvelles approches thérapeutiques.....	23
III. Conseil génétique.....	24

Deuxième partie : Matériels et méthodes

I. Patients.....	25
I.1. Recrutement.....	25
I.2. Critères d'inclusion / exclusion.....	25
I.2.1. Critères d'inclusion.....	25
I.2.2. Critères d'exclusion.....	25
II. Méthodes.....	25
II.1. Prélèvement sanguin.....	25
II.2. Hémogramme.....	25
II.3. Frottis sanguin.....	26
II.4. Electrophorèse.....	26
II.5. Questionnaire.....	26
II.6. Arbres généalogiques.....	26
II.7. Extraction de l'ADN.....	26
II.8. Génotypage du polymorphisme T3801C du <i>CYP1A1</i>	26
II.8.1. La PCR.....	27
II.9. Génotypage du polymorphisme C677T du <i>MTHFR</i>	29
II.10. Analyse statistique génétique.....	29

Troisième partie : Résultats et discussions

I. Résultats.....	31
I.1. Caractéristiques épidémiologiques.....	31

I.1.1. Age des patients.....	31
I.1.2. Sexe des patients.....	31
I.1.3. Origine des patients.....	32
I.2. Consanguinité et antécédents familiaux.....	32
I.3. Profil hématologique.....	33
I.3.1. Hémogramme des β -thalassémiques hétérozygotes.....	33
I.3.2. Hémogramme des β -thalassémiques homozygotes.....	34
I.4. Frottis sanguin.....	35
I.5. Electrophorèse de l'hémoglobine.....	36
I.6. Arbre généalogique.....	37
I.7. Profil génétique.....	37
I.7.1. Résultats de l'électrophorèse de la PCR.....	37
I.7.2. Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques.....	38
II. Discussion.....	42
II.1. Répartition selon l'âge du diagnostic.....	42
II.2. Répartition selon le sexe.....	42
II.3. Le taux de consanguinité chez les patients thalassémiques.....	42
II.4. Profil hématologique et électrophorétique des patients.....	43
II.4.1. β -thalassémiques hétérozygotes.....	43
II.4.2. β -thalassémiques homozygotes.....	43
II.5. Arbre généalogique de la famille représentative.....	44
II.6. Profil génétiques des β -thalassémiques.....	44
II.6.1. Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du gène <i>CYP1A</i>	44
II.6.2. Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène <i>MTHFR</i>	44
Conclusion et perspectives.....	46
Références bibliographiques	47
Annexes	
Résumé	

Introduction

Les thalassémies sont des maladies génétiques, caractérisées par un défaut de synthèse des chaînes de globine qui interviennent dans la composition de l'hémoglobine. Elles font partie du groupe des hémoglobinopathies. Elles sont à l'origine soit d'une diminution soit d'une absence totale de synthèse des chaînes de globines. En fonction du type des chaînes de globine atteintes on parle de β ou α -thalassémie.

De transmission autosomique récessive, la β -thalassémie présente un problème de santé publique vu sa fréquence et ses difficultés de traitement. Non prise en charge, elle entraîne le décès des malades dans l'enfance. Alors qu'elle est asymptomatique à l'état hétérozygote, elle se traduit à l'état homozygote par une anémie plus ou moins sévère et une surcharge martiale. Cette dernière étant due non seulement aux multiples transfusions de concentrés globulaires nécessaires pour assurer le bon développement staturo pondéral des enfants mais également à la physiopathologie de la maladie.

Plus de 300 mutations ponctuelles, et rarement des formes délétionnelles, affectant l'expression du gène β -globine ont été rapportés, celles-ci constituent le groupe hétérogène des thalassémies, mais cette diversité n'explique que très partiellement l'hétérogénéité de la présentation clinique. Le diagnostic moléculaire occupe actuellement une place importante dans le cadre du diagnostic, du conseil génétique et du diagnostic prénatal mais il nécessite toujours au préalable une analyse phénotypique précise (Couque *et al.* 2016).

Notre travail de recherche comporte une étude transversale et une étude analytique moléculaire. Il a pour principaux objectifs:

- Actualisation des données de littérature, notamment en ce qui concerne la génétique de la maladie.
- Caractérisation des critères familiaux, hématologiques, biologiques et biochimiques des patients atteints de β -thalassémie colligés au sein de la pédiatrie de l'HMRUC,
- Recherche par RFLP-PCR d'éventuelles associations entre les polymorphismes T3801C du *CYP1A1* et C677T de la *MTHFR* et la β -thalassémie.

Le présent mémoire est structuré de la manière suivante :

- Une introduction
- Une revue de littérature, mettant la lumière sur les principales notions clés du thème
- Une partie pratique reprenant la méthodologie adoptée, les principaux résultats obtenus et leur discussion
- Une conclusion

**Revue
de littérature**

I- Présentation

L'hémoglobine est le constituant majeur des érythrocytes. Un érythrocyte normal contient 640 millions de molécules d'Hb qui confèrent au sang sa couleur rouge (Steiger 2015). La concentration en Hb dans le sang est en moyenne de 14g/dl chez la femme et de 16g/dl chez l'homme (Horn *et al.* 2005).

II- Structure des hémoglobines

Les hémoglobines sont des tétramères constituées de quatre chaînes polypeptidiques, les chaînes de globine, dont il existe plusieurs entités (leur structure primaire), et elles sont identiques deux à deux. À chaque globine est fixée une molécule d'hème qui contient un atome de fer pouvant lier une molécule d'oxygène.

L'hémoglobine A (HbA), la forme majoritaire circulant dans le sang des adultes de l'espèce humaine, est constituée de deux chaînes de type α et deux chaînes de type β , une structure qui est résumée par l'abréviation $\alpha_2\beta_2$ (Figure 1). La chaîne α comporte 141 résidus d'acides aminés et la chaîne β 146 (Schechter 2008 ; Wahed et Dasgupta 2015; Baudin 2016).

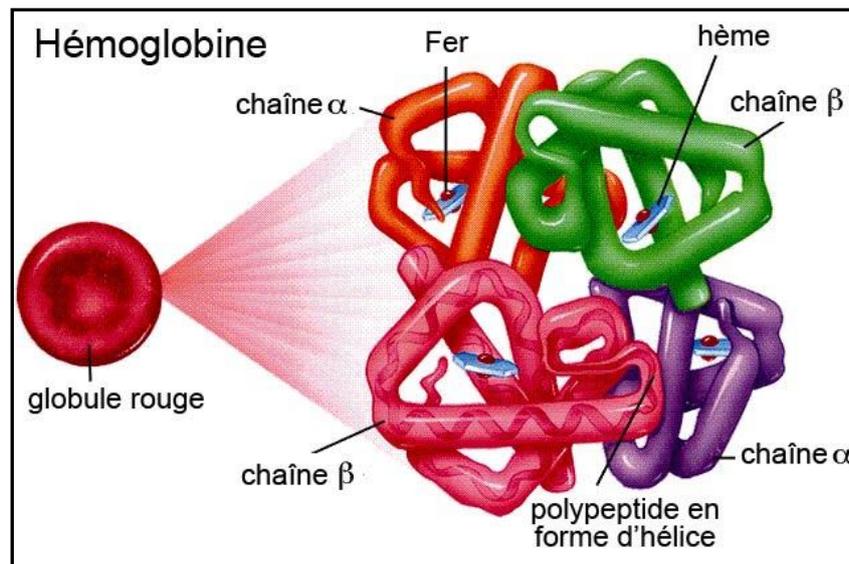


Figure1 : Représentation d'une molécule tétramérique $\alpha_2\beta_2$ de l'hémoglobine adulte normale (HbA) (El Kamah et Amr 2015).

III- Rôle

L'hémoglobine a un rôle physiologique, elle permet de fixer l' O_2 au niveau des poumons pour le transporter vers les différents tissus de l'organisme (Schechter 2008), en fixant quatre molécules d' O_2 par tétramère, une par groupement hème (Murray *et al.* 2010). Elle joue aussi un rôle dans le maintien du pH sanguin à 7.4 grâce à son pouvoir tampon (Horn *et al.* 2005).

IV- L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines

Au cours du développement ontogénique, les hémoglobines synthétisées et leur lieu d'expression varient, la structure de la protéine restant cependant toujours du même type : deux chaînes de type α (ζ ou α) associées à deux chaînes de types β (ε , γ , δ ou β) (Figure 2).

Trois grands types peuvent être distingués:

- L'hémoglobine embryonnaire, détectable de la 3^e semaine de gestation jusqu'à la 10^e semaine et correspondant aux tétramères suivants : Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$).
- L'hémoglobine fœtale (HbF: $\alpha_2\gamma_2$), qui constitue le principal transporteur d'O₂ durant la gestation.
- L'hémoglobine adulte (HbA : $\alpha_2\beta_2$), qui remplace l'hémoglobine fœtale peu de temps après la naissance ainsi qu'un composant minoritaire adulte, l'HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$).

Sous des conditions standard, les érythrocytes d'un adulte contiennent approximativement 97-98% d'HbA, 2-3% d'HbA₂ et des traces d'HbF (<1%) (Manning *et al.* 2007 ; Schechter 2008 ; Couque et De Montalembert 2013 ; Wahed et Dasgupta 2015).

Durant les périodes de vie intra-utérine, le cluster α globine subit une seule commutation ou *switch* pendant le développement ($\zeta \rightarrow \alpha$), alors que le cluster β en subit deux : ($\varepsilon \rightarrow \gamma$) pendant la vie embryonnaire puis ($\gamma \rightarrow \beta$) qui s'achève vers l'âge de 6 à 120 mois (Lewin 2004 ; Girot et De Montalembert 2006 ; Wajcman 2013; Joly *et al.* 2014).

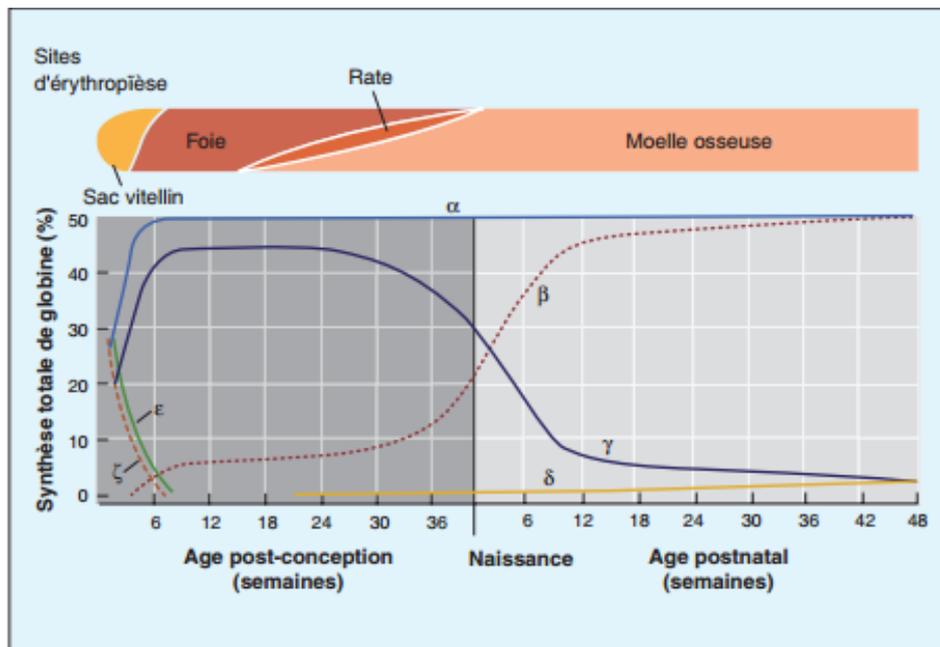


Figure 2: Sites d'érythropoïèse et expression des chaînes de globine du stade embryonnaire au stade adulte (Joly *et al.* 2014).

V- Gènes des globines

V-1- Structure et famille des gènes des globines

Les gènes de globine ont généralement la même structure chez toutes les espèces, ils dérivent d'un ancêtre unique (il y a environ 450 millions d'années), ceci explique leur structure globale identique (3 exons et 2 introns). L'ordre des gènes, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au sein de chaque complexe reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse (Lewin 2004). Tous les différents gènes de globines sont issus de recombinaisons et/ou de duplications du gène ancestral unique. Chaque gène a ensuite pu évoluer indépendamment par des événements de mutations ou de recombinaisons divers qui ont abouti aux variations observées entre les différents gènes (Hardison 2012). Les gènes de la globine humaine sont regroupés en familles multigéniques (cluster : « agrégat »), le cluster α (ζ , α_2 , α_1) et le cluster β (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β). Ces gènes sont relativement petits, respectivement de 1.8 Kb et 1.2 Kb (Greene *et al.* 2015).

V-2- Localisation des gènes de l'hémoglobine

Les gènes de la famille α sont localisés près de l'extrémité télomérique du bras court du chromosome 16 (16pter), et ceux de la famille β sur l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 (11p15.5) (Joly *et al.* 2014).

V-3- La famille des gènes des chaînes β -globine

Le cluster β -globine s'étend sur 45 Kb, il comprend 6 gènes dont 5 sont exprimés : un gène embryonnaire (ϵ), deux gènes fœtaux ($G\gamma$, $A\gamma$), et deux gènes adultes (δ et β), et un pseudo-gène $\psi\beta 1$ dans l'ordre 5' → 3' (Figure 3). Le gène ϵ le plus distal en 5', est le premier à être exprimé, durant la vie embryonnaire. Les gènes $G\gamma$ et $A\gamma$ s'expriment durant la vie fœtale (HbF : $\alpha_2\gamma_2$). Leur produit ne diffère que par un seul acide aminé en position 136 sur la chaîne polypeptidique, qui est une glycine dans le gène $G\gamma$, et une alanine dans le gène $A\gamma$. Les gènes δ et β sont également très homologues et ne diffèrent dans leur partie codante que par quelques nucléotides. Le pseudo-gène est localisé entre les paires $G\gamma/A\gamma$ et δ/β .

La transcription globale du cluster β -globine est régulée par une région dite LCR située à l'extrémité 5' et constituée de 5 sites hypersensibles à l'ADNase I (HS1 à HS5), dont le rôle primordial a été démontré dans l'ouverture de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes au cours du développement (Bensimon 1999 ; Banello-Palot et Badens 2010 ; Joly *et al.* 2014 ; Couque *et al.* 2016).

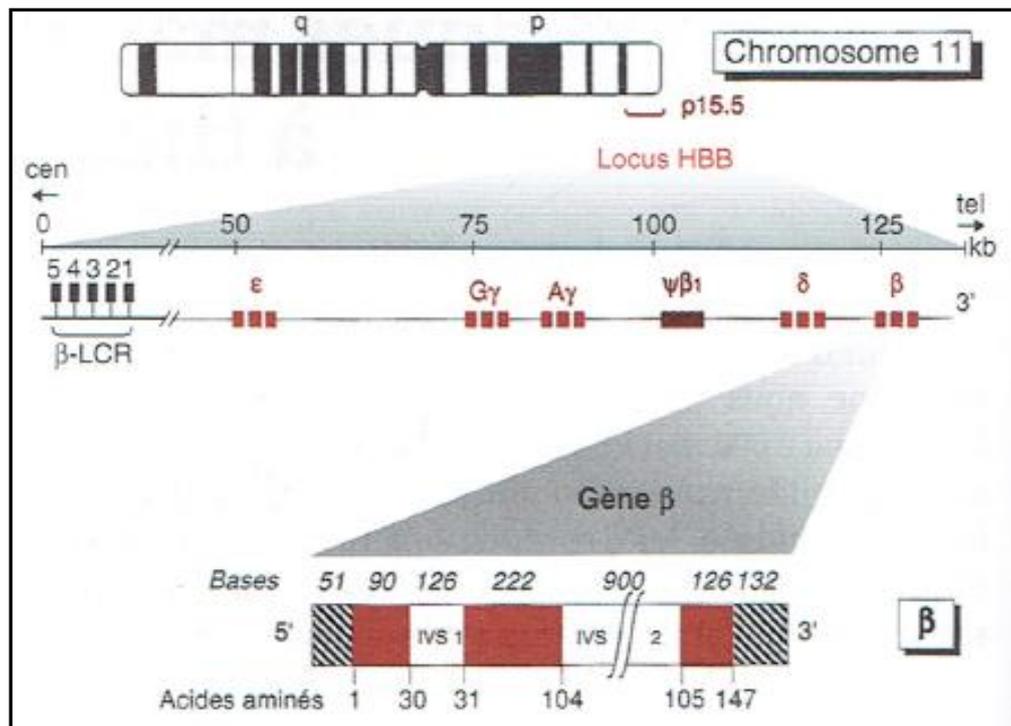


Figure 3: Le locus de la β -globine (Kaplan et Delpech 2007).

VI- La régulation de la transcription des gènes de la globine

La régulation de la transcription des gènes de la globine requiert trois éléments : les séquences en *cis* (promoteurs, enhancers et silencers), le β -LCR (activateur de l'ensemble du locus) et les facteurs protéiques nucléaires ou facteurs transcriptionnels érythroïde-spécifiques et ubiquitaires. L'interaction physique du LCR avec les régions promotrices via les facteurs *trans*-régulateurs est nécessaire à l'activation transcriptionnelle des gènes (Kaplan et Delpech 2007).

VI-1- Les séquences *cis* régulatrices

Les séquences *cis* régulatrices sont localisées au voisinage de chaque gène du locus :

VI-1-1- Promoteurs

Dans le cluster β globine, chaque promoteur proximal est caractérisé par une combinaison unique de séquences d'ADN, hautement conservées pendant l'évolution, et liant différents facteurs transcriptionnels (Figure 4). Les éléments régulateurs en 5' des gènes structuraux sont la boîte TATA présente dans tous les promoteurs et où se forme le complexe basal d'initiation de la transcription, les boîtes CACCC, CCAAT et la séquence consensus fixant le facteur érythroïde spécifique GATA -1 (Marini *et al.* 2004).

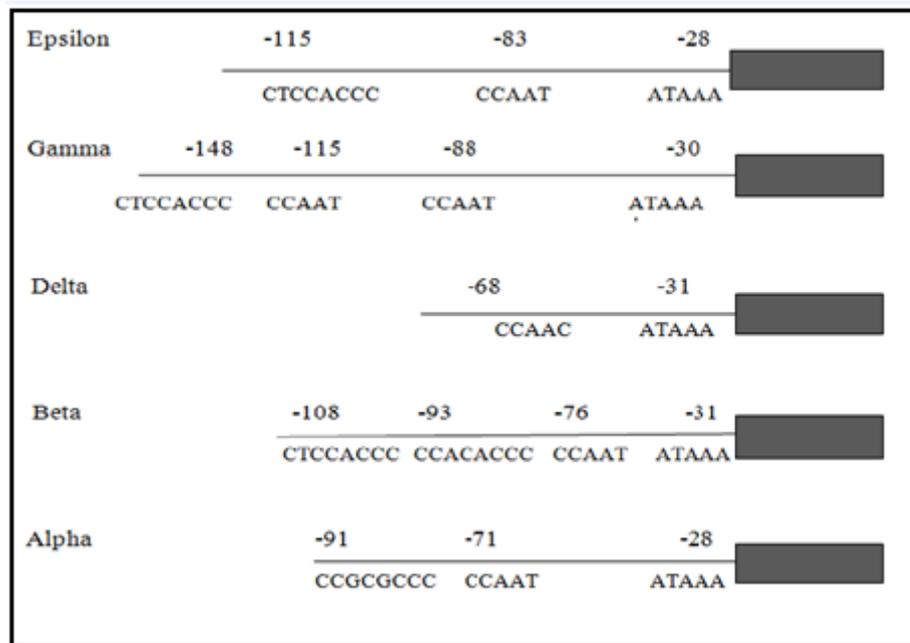


Figure 4 : Les éléments structuraux appartenant aux régions promotrices des différents gènes de la globine (Addour 2008).

VI-1-2- Enhancers ou séquences stimulatrices

L'enhancer active la transcription d'un gène en augmentant l'affinité de l'ARN polymérase. Dans le cluster β globine, des séquences stimulatrices localisées en 3' du gène β , et une autre en 3' du gène $A\gamma$ active la transcription (Kaplan et Delpech 2007). Des sites de fixation pour des facteurs érythroïdes spécifiques (GATA-1) et ubiquitaires (AP2 et CP 1) ont été localisés (Thein 2005).

IV-1-3- Silencers ou séquences extinctrices

Les séquences extinctrices sont localisées à proximité du gène ϵ . Une autre séquence à 0.5 Kb en amont du gène β sur laquelle se fixe le facteur BP1 (dont le gène est localisé sur le chromosome 17, serait une isoforme d'un gène homéotique impliqué dans les processus du développement).

IV-1-4- LCR β -globine

Le LCR β -globine est impliqué dans l'ouverture de la chromatine et jouant un rôle primordial dans le contrôle de l'expression des gènes de la famille β au cours du développement. Ainsi, l'expression érythroïde-spécifique et séquentielle des gènes résulte de l'interaction du LCR de façon spécifique avec les promoteurs individuels des gènes de globine par formation de boucles chromatiniennes complexes (Rund et Rachmilewitz 2005 ; Kaplan et Delpech 2007). Les sites HS1 à HS4 ont une spécificité érythroïde, le site HS5 est retrouvé dans tous les tissus. En 3' du locus à environ 20 Kb en aval du gène β , un site 3'HS limite le locus qui s'étend au total sur près de 100 Kb (Kaplan et Delpech 2007).

VI-2- La régulation en *trans*

L'expression des gènes de la β -globine est contrôlée par deux types de facteurs : les facteurs érythroïdes spécifiques (GATA1, NF-E2, EKLF, SSP, FOG) et les facteurs ubiquitaires (YY1, Sp1, CBP, NFY ou CP1). Le facteur GATA-1 est nécessaire aux étapes tardives de la maturation érythroïde, le facteur GATA-2 est impliqué dans les étapes précoces. Le facteur EKLF se fixe sur les séquences CACCC, et est impliqué dans la commutation fœtale \rightarrow adulte (Lapie et Elion 2005 ; Costello 2009 ; Katsumura *et al.* 2013). Un des derniers facteurs de transcription découverts, BCL11A, semble avoir un rôle majeur comme répresseur de l'expression des gènes γ (Cao et Galanello 2010 ; Sankaran *et al.* 2011).

VII- La régulation traductionnelle

L'initiation de la traduction peut constituer un niveau important de régulation de l'expression génique chez les eucaryotes. Ainsi l'ARNm α , produit de la transcription des deux gènes α_2 , α_1 est en excès d'environ 40% par rapport à l'ARNm β . Pourtant la synthèse des chaînes α et β de la globine est équilibrée avec un rapport de biosynthèse α/β égale à 1 (Lodish 1976). Le processus de traduction des ARNm de globine ne peut se faire qu'en présence de quantités suffisantes d'hème. Un mécanisme est mis en jeu lorsque les quantités d'hème sont limitées. Cette régulation est illustrée par la protéine HRI. En absence d'hème ou en présence de faibles concentrations ou alors dans des cas de déficience en fer, la protéine Kinase HR1 est activée et agit au niveau traductionnel en inhibant l'initiation de la traduction des chaînes de globine par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction EF-2. Des travaux sur des souris thalassémiques ont montré que la protéine HRI module l'accumulation de l'excès des chaînes α globine et diminuerait de ce fait la sévérité de la pathologie (Han *et al.* 2005).

VIII- La régulation équilibrée des deux loci de globine

La nécessité d'un tel équilibre est attestée par la pathologie thalassémique induite en cas de déséquilibre. Une avancée importante dans la compréhension de cette coordination a été la mise en évidence d'une protéine chaperonne AHSP. Cette protéine, stabilisant spécifiquement les monomères α -Hb, est synthétisée dans les cellules érythroïdes. Lorsqu'elle rencontre un monomère β -Hb libre, le monomère α -Hb se dissocie de l'AHSP pour former un dimère $\alpha\beta$ stable. C'est l'association des dimères qui va aboutir à la forme tétramérique fonctionnelle de l'Hb telle que l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) (Kaplan et Delpech 2007, Ribeil *et al.* 2013).

IX- Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies peuvent être classées en trois grandes catégories:

- **Anomalies quantitatives** : synthèse diminuée ou nulle d'une chaîne de globine entraînant ainsi des perturbations dans la synthèse de l'Hb (syndromes thalassémiques) ;
- **Anomalies qualitatives** : synthèse d'une chaîne de globine structurellement anormale (Drépanocytose ...).
- **Défaut de switch de chaînes de globine après la naissance** : par exemple la persistance héréditaire de l'Hb F (Giordano 2013).

I- Définition

Le terme «thalassémie» est dérivé des mots grecs «Thalassa» (mer) et «Haema» (sang). Il correspond à des troubles associés à la synthèse défectueuse des sous-unités de globines, α ou β de l'HbA ($\alpha_2\beta_2$) (Eliezer et Giardina 2011).

Les β -thalassémies sont un groupe de troubles sanguins héréditaires caractérisés par des anomalies dans la synthèse des chaînes β de l'Hb, qui se traduisent par des phénotypes variables allant de l'anémie grave aux individus cliniquement asymptomatiques (Alain et Marengo-Rowe 2007). Elles comprennent trois formes principales : la thalassémie majeure ("Anémie de Cooley" ou "Anémie méditerranéenne"), la thalassémie intermédiaire et la thalassémie mineure ("Porteurs de β -thalassémie" ou "Trait β -thalassémique" ou " β -thalassémie hétérozygote") (Galanello et Origa 2010).

II- Histoire de la β -thalassémie

Quelques dates rappellent les principales étapes dans la compréhension de la maladie, dans sa description clinique et dans sa physiopathologie:

-Dans les années 1800, Von Jaksch découvre à Prague une anémie non leucémique chez un enfant de 14 mois porteur d'une splénomégalie et qui mourut avant l'âge de deux ans (Yameogo 2009).

-En 1925, la thalassémie a été décrite aux Etats-Unis, à Détroit, par deux pédiatres, Cooley et Lee (Brumpt et Pays 1988). Le terme « thalassémie » fut introduit par Whipple et Bradford pour désigner une anémie en 1932.

-Aux Etats-Unis, Valentine et Neel, en 1944 et 1948 ont rapproché les différentes observations des chercheurs et ont donné la description classique de thalassémie à hérédité mendélienne hétérozygote et homozygote, telle que nous la connaissons aujourd'hui.

-Haldane, en 1949 pensait que la microcytose causée par la thalassémie était bénéfique pour les gens souffrant de malnutrition ou de maladies infectieuses, comme le paludisme.

-En 1959, Ingram et Strett ont suggérèrent l'existence de deux types de thalassémies : la thalassémie α et la thalassémie β . Deisseroth a ensuite démontré que les gènes pour les deux types de chaînes étaient sur différents chromosomes. Fessas rapporte que ce sont les chaînes libres α ou β qui lèsent les GR et causent l'hémolyse.

Nous arrivons aux dernières années quand le repérage des gènes a permis d'explorer les cas de thalassémie non seulement au niveau des symptômes cliniques, des paramètres hématologiques, des études de familles, de la source même de la maladie : séquence et structure de l'ADN (Yameogo 2009).

III- Epidémiologie

La β -thalassémie est répandue dans les pays Méditerranéens, Moyen-Orient, Asie centrale, Inde, Sud de la Chine et l'Extrême-Orient, ainsi que le long des pays de la côte nord de l'Afrique et en Amérique du Sud. La figure 5 représente la prévalence de la maladie dans les pays de l'ancien monde.

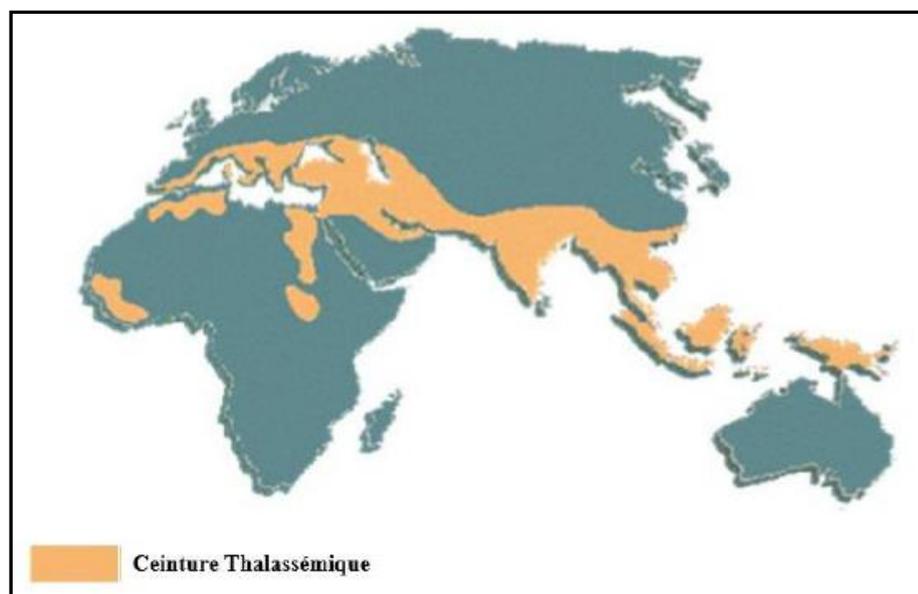


Figure 5 : Répartition de la β -thalassémie dans l'ancien monde (Lahlou 2016).

La fréquence la plus haute des porteurs est signalée à Chypre (14%), en Sardaigne (10,3%) et en Asie du Sud-Est. La migration de populations et le mariage mixte entre les différents groupes ethniques a introduit la thalassémie dans presque tous les pays du monde, y compris l'Europe du Nord où la thalassémie était auparavant absente. On a estimé qu'environ 1,5% de la population mondiale (80 à 90 millions de personnes) sont des porteurs de β -thalassémie, avec environ 60 000 individus symptomatiques nés chaque année. L'incidence annuelle totale des personnes symptomatiques est estimée à 1 sur 100 000 à travers le monde et 1 sur 10 000 personnes dans l'Union Européenne (Galanello et Origa 2010).

En Algérie, la prévalence du trait thalassémique est variable, allant de 1.66 à 3% selon les différentes enquêtes réalisées sur plusieurs échantillons (Addour *et al.* 2009, Belhani 2009). Les approches épidémiologiques réalisées témoignent d'une augmentation de la prévalence de la maladie. En 2006, 750 patients ont été recensés et 931 en 2014, dont 56 enfants (59.7%) et 66% sont des thalassémiques majeurs (Tensaout 2017).

IV- Classification des syndromes β -thalassémiques

Les β -thalassémies sont réparties en trois grands syndromes selon l'importance des signes cliniques exprimés :

- La β -thalassémie majeure et la β -thalassémie intermédiaire, constituent les formes sévères ;
- La β -thalassémie mineure qui représente généralement la forme asymptomatique.

IV-1- La β -thalassémie majeure (β -TM)

La β -thalassémie majeure, également nommée TDT, est la forme habituelle à l'état homozygote où il existe une suppression totale (forme β^0) ou une diminution considérable (forme β^+) de la synthèse des chaînes β de l'Hb. L'organisme réagit pour compenser le manque en augmentant la synthèse des chaînes γ , ce qui aboutit à un fort pourcentage de l'HbF. Cela n'est néanmoins pas suffisant pour pallier le déficit complet d'HbA. Il en résulte alors une diminution de l'Hb totale. Les transfusions sont vitales (Sandhya *et al.* 2013).

IV-2- La β -thalassémie intermédiaire (β -TI)

La β -TI désigne une entité clinique de gravité très variable, plus sévère que la forme mineure, mais moins sévère que la thalassémie majeure. Elle représente 5 à 10% de l'ensemble des β -thalassémies homozygotes. Sur le plan génotypique, la β -thalassémie intermédiaire est habituellement β^+/β^+ ou peut être β^+/β^0 (Perrimond 2001 ; Thuret 2014). Les β -TI sont également nommées TNDT (Taher *et al.* 2013).

IV-3- La β -thalassémie mineure

La β -thalassémie mineure ou hétérozygote, est due à la mutation d'un seul des deux gènes de la β -globine, l'autre gène est capable de compenser l'anomalie et produire un taux d'Hb normal ou proche de la normale. Elle est en règle asymptomatique et ne nécessite aucune prise en charge spécifique (Desrosiers 2003 ; Joly *et al.* 2014 ; Thuret 2014).

V- Complications de la β -thalassémie

Les patients atteints de β -TM nécessitent des transfusions sanguines répétées tout au long de leur vie pour survivre, celles-ci peuvent être inadéquates ou provoquant des infections, ce qui entraîne de nombreuses complications : troubles cardiaques, endocriniens et hépatiques associés aux surcharges de fer et les toxicités des chélateurs de fer (Agarwal 2004). La majorité de ces problèmes dépendent de l'âge. L'atteinte cardiaque est la complication la plus importante et le principal déterminant de la survie (Dimitrios et Kremastinos 2001). Elle est responsable de plus de la moitié des décès, celle-ci peut prendre la forme de cardiomyopathie, hypertension pulmonaire, d'insuffisance cardiaque, d'arythmies, péricardite et de myocardite (Sayed *et al.* 2013). Malgré que la surcharge en fer soit la cause principale, d'autres facteurs génétiques, immunitaires ou infectieux, peuvent

êtres importants. Les complications endocriniennes incluent le diabète sucré, l'hypothyroïdie, l'hypo-parathyroïdie, l'hypogonadisme et la puberté retardée (Ayfer *et al.* 2011 ; Noetzli *et al.* 2012). Les complications les moins importantes comprennent l'atteinte hépatique, les complications neurologiques et la manifestation psychologique (Deborah et Elizer 2005 ; Manoj *et al.* 2013).

VI- Physiopathologie de la β -thalassémie

Physiologiquement, les globines β et α sont synthétisées en quantité équivalente, afin qu'une globine en particulier ne soit pas excédentaire après formation du tétramère $\alpha_2\beta_2$ de l'HbA. Lorsque le taux de chaînes β est nul ou diminué, l'équilibre est rompu, un excès proportionnel de chaîne α est donc observé. Cette diminution de la production d'Hb est plus évidente chez les porteurs sains, aboutissant à la réduction de la concentration intracellulaire d'Hb et du VGM. Ceci à peu de conséquence clinique. Le déséquilibre de production des chaînes des globines a des conséquences importantes sur les précurseurs érythrocytaires ce qui aboutit au final à leur destruction précoce et massive à la fois dans la moelle osseuse mais aussi dans les sites extra-médullaires. Cette érythropoïèse inefficace est la caractéristique principale de la thalassémie.

L'hémolyse périphérique contribue moins à l'anémie dans la forme majeure que dans la forme intermédiaire et survient quand les chaînes α -globines insolubles induisent des lésions membranaires des érythrocytes circulants. La première réponse à l'érythropoïèse inefficace et à l'anémie est l'augmentation de la production d'érythropoïétine aboutissant à une hyperplasie érythroïde dont les conséquences potentielles sont une majoration de la splénomégalie, des déformations des os et du squelette, une ostéoporose et dans certains cas à la survenue de masses extra médullaires. Les patients présentant une thalassémie majeure non-traitée ou sous-traitée ont un retard de croissance résultant de l'anémie, mais aussi du surcroît de charge sur le métabolisme imposé par l'expansion des lignées érythroïde. L'anémie peut induire une hypertrophie cardiaque et dans certains cas une insuffisance cardiaque. L'érythropoïèse inefficace est aussi associée à une augmentation de l'absorption du fer, via principalement une augmentation de l'absorption intestinale consécutive à une inhibition de la synthèse d'hepcidine (peptide de 25 acides aminés synthétisé par le foie qui joue un rôle central dans l'homéostasie martiale). La physiopathologie des β -thalassémies est résumée dans la figure 6.

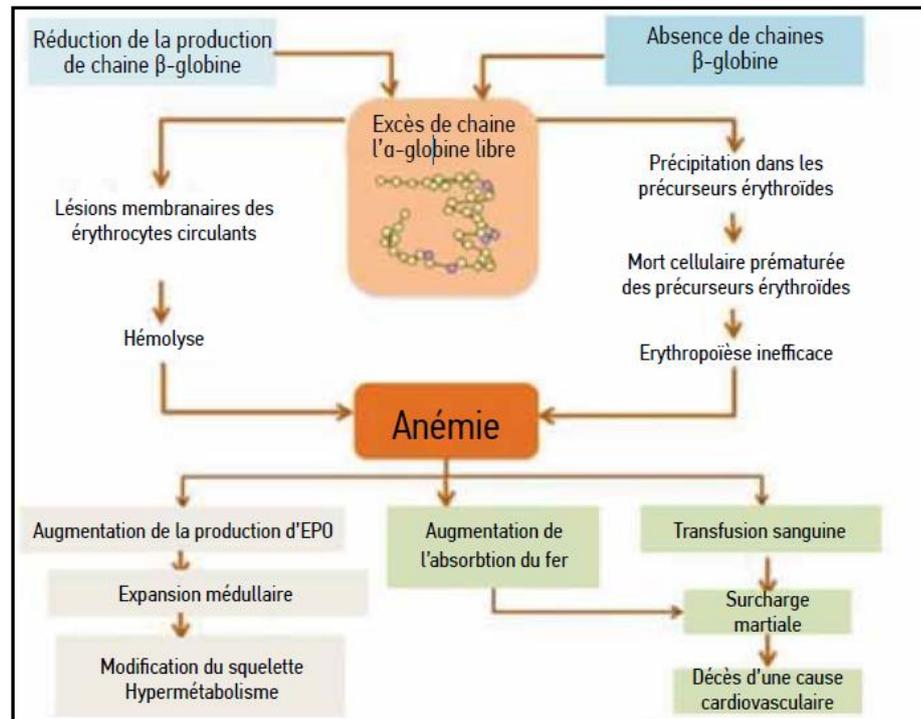


Figure 6 : Conséquences de l'excès de production de chaînes d' α -globines libres dans la β -thalassémie (Cappellini *et al.* 2014).

I- Transmission héréditaire

La β -thalassémie se transmet selon le mode autosomique récessif. Les parents d'un enfant atteint sont obligatoirement hétérozygotes et portent une seule copie du gène muté de la β -globine. À la conception, chaque enfant issu de parents hétérozygotes a 25% de chances d'être atteint (homozygote), 50% de chances d'être porteur asymptomatique (hétérozygote) et 25% de chances d'être sain et non porteur (figure7) (Sandhya *et al.* 2013). L'un des problèmes des maladies autosomiques récessives réside dans le fait que les couples à risque l'ignorent souvent, les hétérozygotes n'étant pas symptomatiques, leur statut de porteur sain n'est pas forcément connu. C'est parfois seulement à la naissance d'un enfant malade que la présence d'une mutation chez les parents est décelée.

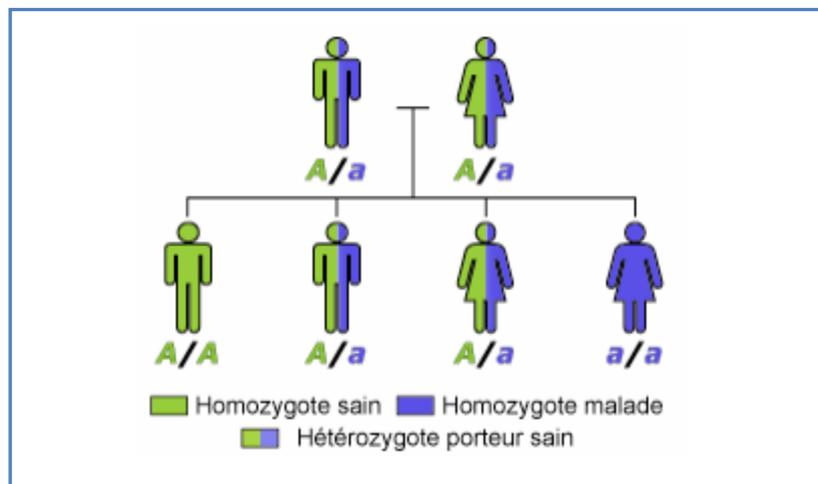


Figure7 : Mode de transmission de la β -thalassémie (Encyclopédie Orphanet Grand Public 2008).

II- Bases moléculaires de la β -thalassémie

Si le tableau clinique des thalassémies est relativement homogène, les bases moléculaires en sont extrêmement variées. Plus de 300 mutations ponctuelles, rarement des délétions, affectant l'expression des gènes de globine ont été rapportées, les 3 quarts concernant le locus β -globine (Bonello-Palot et Badens 2010 ; Couque *et al.* 2016). On sait que la grande majorité des β -thalassémies est due à des mutations ponctuelles ou à des micro-délétions ou insertions de nucléotides. Ces mutations ont été observées sur toute l'étendue du gène β : exons, introns, promoteurs, autres régions non transcrites ou non traduites en 5' et en 3' (figure 8). Elles ont par ailleurs été identifiées à toutes les étapes de la synthèse protéique : transcription, maturation de l'ARNm, traduction, et même pendant l'étape post-traductionnelle (Lapie et Elion 2005).

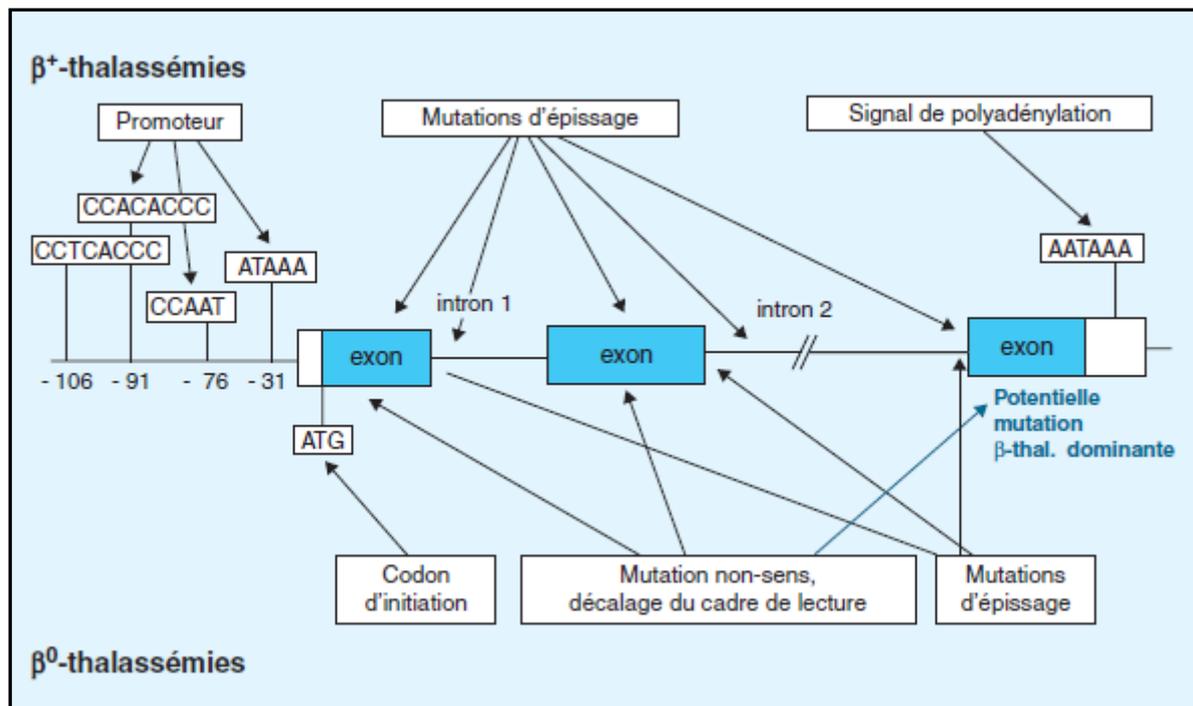


Figure 8 : Les différents types de mutations β -thalassémiques (Joly *et al.* 2014).

II-1- Les mutations ponctuelles

Les anomalies les plus fréquentes dans le locus β sont les mutations ponctuelles. On distingue les mutations β^+ -thalassémiques qui diminuent l'expression du gène sans l'abolir, des mutations β^0 -thalassémiques qui abolissent totalement l'expression du gène β -globine :

- Mutations aboutissant à une suppression totale ou presque totale de l'expression du gène (mutation β^0 -thalassémique). Ce sont des mutations non sens, des insertions ou délétions entraînant un décalage du cadre de lecture ou des mutations des sites d'épissage ou du codon d'initiation.
- Mutations entraînant une diminution de l'expression : certaines mutations affectent des séquences régulatrices comme les séquences conservées du promoteur (TATA box, CAAT box ou motifs CACCC) ou les séquences 5' ou 3' non traduites. D'autres créent ou activent un site alternatif d'épissage. Ce dernier type de mutation peut être localisé dans une région codante du gène et avoir donc 2 effets : un effet faux-sens qui va aboutir à la synthèse d'une chaîne de globine anormale et donc à une Hb anormale, et un effet sur l'épissage (en créant ou en activant un site cryptique d'épissage) qui conduit à une diminution du niveau de production de la chaîne protéique anormale. On parlera ici de variant de l'Hb à effet thalassémiant ; le plus fréquent de ces variant est l'HbE particulièrement répandue en Asie.
- Certaines mutations siégeant dans le promoteur ou dans les régions 5' et 3' non traduites ont un effet particulièrement discret sur le niveau de synthèse de la chaîne β -globine. Chez l'hétérozygote, elles n'entraîneront aucune modification clinique ou biologique. Chez

l'homozygote, elles produisent un tableau classique de trait thalassémique avec microcytose, polyglobulie et élévation de l'HbA₂. Elles ne seront réellement pathogènes qu'en association avec une mutation β^0 -thalassémique sur l'autre allèle et produiront un phénotype de thalassémie intermédiaire. On les appelle des mutations β -thalassémiques silencieuses ou mutations β^{++} -thalassémiques (Bonello-Palot et Badens 2010).

II-2- Les formes délétionnelles

Les formes de β -thalassémies dues à des délétions sont plus rares mais pas exceptionnelles (Pissard *et al.* 2013). On distingue deux types principaux, l'un relativement fréquent et l'autre extrêmement rare :

-Délétions emportant le gène β : elles emportent soit le gène β uniquement (β^0 -thalassémie), soit les gènes δ et β ($(\delta\beta)^0$ -thalassémie), soit l'intégralité du cluster β -globine ($(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -thalassémie). Les conséquences hématologiques sont les mêmes à l'âge adulte que celles des allèles β^0 -thalassémique à la différence près que le taux d'HbA₂ n'est pas augmenté dans les deux derniers cas. Certaines délétions qui emportent les gènes β , δ et parfois $G\gamma$ induisent une persistance de l'HbF à l'âge adulte qui atténue le phénotype δ - β -thalassémie en bloquant la commutation γ vers β qui se produit normalement entre 3 mois et 2 ans. Ce blocage est dû à la délétion de la région située entre les gènes $A\gamma$ et δ , zone de fixation de la protéine BCL11A indispensable à la répression des gènes γ de globine à l'âge adulte (Sankaran *et al.* 2011 ; Couque *et al.* 2016).

-Délétions emportant le LCR : il s'agit de délétions plus ou moins larges qui emportent toute ou une partie de la région qui régule la transcription de l'intégralité du cluster β -globine. Les délétions décrites au niveau de cette région semblent indiquer que c'est la région HS3 qui est primordiale pour la transcription du cluster β -globine puisque son absence est le point commun à toutes les délétions de ce type entraînant une $(\epsilon\gamma\delta\beta)^0$ -thalassémie (Joly *et al.* 2011). Au niveau hématologique, l'hypochromie et la microcytose apparaîtraient dès la vie embryonnaire puisque les gènes ϵ , $G\gamma$ et $A\gamma$ d'expression embryonnaire et fœtale sont également inactivés (Joly *et al.* 2014 ; Couque *et al.* 2016).

III- Corrélation génotype-phénotype

Il existe une corrélation assez forte entre le type de mutation β -thalassémique qui conditionne le niveau de perturbation de la synthèse de la chaîne protéique et la sévérité clinique. L'effet d'une mutation sur le niveau d'expression du gène dépend de sa nature et de sa localisation. Les mutations β -thalassémiques sont schématiquement classées en β^0 , β^+ , β^{++} ou selon un retentissement décroissant sur le niveau d'expression du gène. Les mutations

localisées dans le promoteur ou dans les introns sont en principe moins délétères que les mutations non-sens ou les mutations localisées sur les sites consensus d'épissage ou encore les délétions emportant l'ensemble du gène. En règle générale, l'hétérozygote β -thalassémique ou porteur sain n'est pas symptomatique, il présente seulement les modifications érythrocytaires typiques (pseudo-polyglobulie et microcytose) et une élévation modérée de l'HbA₂. Chez l'homozygote ou l'hétérozygote composite, les 2 allèles sont mutés ; on observe alors, en fonction de la nature des mutations, un continuum de sévérité pouvant aller d'une forme intermédiaire à une forme majeure (Bonello-Palot et Badens 2010 ; Bonello-Palot *et al.* 2016).

IV- Les facteurs modulateurs d'origine génétique de la β -thalassémie

IV-1- Facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes α et β

-Le type de mutation dans le gène β -globine

-Une α -thalassémie associée : l'inactivation d'un ou plusieurs gènes α -globine peut corriger le déséquilibre de synthèse des chaînes de globine en normalisant le rapport α/β . La sévérité de la thalassémie est proportionnelle au niveau de déséquilibre entre les chaînes de globine (Bonello-Palot *et al.* 2016).

-La protéine AHSP: elle a un rôle éventuel dans la modulation de la sévérité chez le sujet β -thalassémique. Ce rôle a été suggéré, mais d'autres visant à le démontrer ont donné des résultats contradictoires (Bonello-Palot et Badens 2010).

IV-2- Facteurs génétiques influençant la synthèse d'HbF à l'âge adulte

-Un facteur présent dans le locus β -globine : une mutation dans le promoteur $A\gamma$, couramment appelée polymorphisme Xmn1. Des études ont montré que ce polymorphisme est associé à un taux d'HbF plus élevé à l'âge adulte.

-Autres facteurs présents non liés au locus β -globine : Des polymorphismes d'une région en 6q23 ont été associés à un taux d'HbF élevé (Bonello-Palot *et al.* 2016).

V- Polymorphismes génétiques

La caractérisation et la compréhension des variations génétiques constituent un véritable défi en génétique humaine tant pour les individus indemnes de toute pathologie que les personnes malades. L'intérêt de l'étude des variants génétiques est de démontrer leur implication dans l'influence de l'expression des gènes et par conséquent de les mettre en relation avec l'expression d'un phénotype précis. En effet, la plupart des variations peuvent

être neutres et l'enjeu est de mettre en évidence celles qui ont un caractère fonctionnel (Ghesquieres 2010).

V-1-Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase (MTHFR) et la β -thalassémie

La β -thalassémie est une pathologie hypercoagulable chronique, le risque de développer une thrombophilie peut varier d'un individu β -thalassémique à un autre à cause des polymorphismes pouvant être associés à celui-ci. Les résultats rapportés dans diverses études se concentrent sur le rôle du polymorphisme *MTHFR* dans le risque de développer une thrombophilie. Chez les patients atteints de β -TM, ils ont montré des résultats négatifs (Al-Sweedan *et al.* 2009).

V-1-1-Structure et localisation du gène *MTHFR*

Le gène *MTHFR* est localisé sur le chromosome 1, en 1p36.22 (Figure 9). Il comprend 11 exons et s'étend sur une longueur de 2.2 Kb. Sa région promotrice contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription, mais ne possède pas une séquence TATA box. Sur l'exon 1 du gène, il y a un site d'épissage alternatif ; la région UTR de ce gène est longue, montrant la complexité dans la régulation de ce gène (Goyette *et al.* 1998).

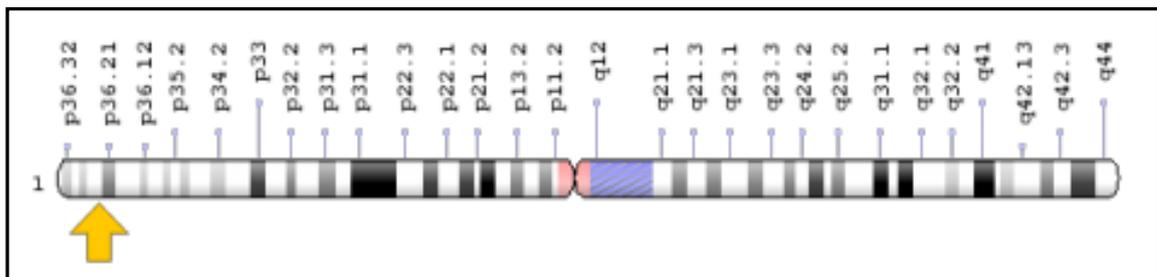


Figure 9 : Localisation du gène *MTHFR* sur le chromosome 1 (Genetics Home Reference 2017).

V-1-2- Structure et fonction de la protéine MTHFR

Chez l'homme, le produit du gène *MTHFR* est une protéine catalytique active de 77KDa, c'est la 5,10-MTHFR qui est un homodimère présent dans le cytoplasme. Cette protéine est composée de 656 acides aminés possédant un domaine catalytique présentant un site de liaison pour le coenzyme, le FAD et un domaine régulateur où se lie l'inhibiteur allostérique, la SAM. La 5,10-MTHFR catalyse la conversion du 5,10 méthylènetétrahydrofolate (5,10- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$) en 5-méthyltétrahydrofolate (5- $\text{CH}_3\text{-FH}_4$) qui est la forme biologique majeure des folates et la principale source du carbone nécessaire pour la conversion de l'homocystéine en méthionine. Cette conversion est très importante pour la biosynthèse des nucléosides, la méthylation de l'ADN, et ainsi le métabolisme de l'homocystéine (Leclerc et Rozen 2007).

V-1-3- Le polymorphisme C677T

Une substitution d'une cytosine par une thymine au niveau de la 677^{ème} paire de base dans le quatrième exon (C677T), aboutit à un remplacement d'une alanine par une valine dans la séquence protéique. Cette mutation entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 30% chez les hétérozygotes (CT) et de 70% chez les homozygotes (TT) (Robien et Ulrich 2003). Il s'agit d'un polymorphisme commun dans la population générale. Sa fréquence à l'état homozygote varie entre 5–15% avec une distribution hétérogène significative parmi les différents groupes ethniques. Dans les pays du Maghreb, les résultats ont montré une fréquence allélique de 17.8% en Tunisie (Jerbi *et al.* 2005) et de 34.3% en Algérie (Bourouba *et al.* 2009).

V-2-Cytochrome P450 et la β -thalassémie

A notre connaissance, aucun travail traitant de la relation entre le polymorphisme CYP1A1 et la β -thalassémie n'a été réalisé.

V-2-1- Cytochrome P450

Le système d'enzymes Cytochrome P450s (CYPs) est une superfamille d'enzymes impliqués dans les processus de détoxifications, le métabolisme oxydatif des composés endogènes tels que les stéroïdes, les acides gras, les leucotriènes et les prostaglandines et le métabolisme des produits chimiques étrangers tels que les médicaments, les agents cancérigènes et d'autres polluants environnementaux (Merabet 2012 ; Pandey *et al.* 2016).

Les CYP, formés d'environ 500 acides aminés, ont une partie très conservée qui se retrouve dans le cœur de la protéine et reflète le mécanisme commun de transfert d'électrons et de protons et d'activation d'oxygène. La région la plus variable correspond à la partie amino-terminale impliquée dans l'ancrage à la membrane du réticulum endoplasmique et des mitochondries, et à la séquence de liaison et de reconnaissance du substrat (Zidoune 2016).

V-2-2-Enzyme CYP1A1

CYP1A1 est un membre de la famille CYP1, il joue un rôle clé dans le métabolisme des médicaments et des produits chimiques environnementaux. L'enzyme CYP1A1 humaine est la plus active parmi les CYPs dans le métabolisme de pro-cancérigènes, en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques, en intermédiaires hautement réactifs. Lorsque ces composés se lient à l'ADN et forment des adduits, ils peuvent contribuer à la carcinogénèse (Meng *et al.* 2015).

V-2-3- Le gène *CYP1A1*

Le gène *CYP1A1* est localisé sur la région 15q22-q24. Il contient 7 exons et 6 introns et s'étale sur 5,810pb (Merabet 2012).

V-2-4- Polymorphisme T3801C

Le polymorphisme T3801C, T6235C, m1 ou *CYP1A1*2A*, est la mutation découverte en premier, résulte d'un remplacement d'une thymine par une cytosine au niveau de la 3801ème paire de base (3801T>C) en créant un nouveau site de clivage pour *MspI* au niveau de la région non codante 3', en aval de l'exon 7 (Paraskevaidis *et al.* 1998 ; Merabet 2012 ; Mandi 2014).

I-Diagnostic

I-1- Diagnostic biologique et clinique

I-1-1- Diagnostic de la β -thalassémie majeure

I-1-1-1- Diagnostic hématologique

L'hémogramme est marqué par une anémie sévère (Hb<7-8g/dl), qui commence dès la petite enfance, associée à une anémie microcytaire (VGM <70fl) et une hypochromie (CCMH <20pg) (Thuret 2014). Le taux des réticulocytes est bas, voisin de 100 000 par mm³. Le frottis sanguin montre des anomalies érythrocytaires (anisocytose, poikilocytose, hématies à ponctuations basophiles et érythroblastose parfois très élevée, jusqu'à 100 000 éléments par mm³). La moelle osseuse est très riche en érythroblastes (Steiger 2012 ; Bonello-Palot *et al.* 2016).

I-1-1-2- Diagnostic biochimique

L'électrophorèse de l'Hb montre que le taux de l'HbA est nul dans les formes (β^0) ou quasi-nul dans les formes (β^+), l'HbF devient donc la fraction majoritaire avec un taux supérieur à 90%, le taux d'HbA₂ est normal ou augmenté (Vinatier 2006). La bilirubine non conjuguée est augmentée du fait de l'hémolyse chronique. Le taux du fer est toujours augmenté, même en absence de transfusion, du fait de l'hyperabsorption intestinale du fer, secondaire à la dysérythropoïèse (Djemaa 2013).

I-1-1-3- Diagnostic clinique

La présentation clinique de la β -TM se produit entre 6 et 24 mois. Les nourrissons atteints deviennent progressivement pâles, souffrant d'irritabilité, fièvre, diarrhée. L'élargissement progressif de l'abdomen causé par la spléno-hépatomégalie peut survenir mais il n'est plus observé de nos jours du fait de la prise en charge précoce par des transfusions régulières. En l'absence de transfusion, l'espérance de vie est inférieure à 20 ans (Taher *et al.* 2008 ; Bonello-Palot *et al.* 2016).

I-1-2- Diagnostic de la β -thalassémie intermédiaire

I-1-2-1- Diagnostic hématologique

La numération sanguine montre une pseudo-polyglobulie associée à une anémie de sévérité variable (Hb entre 6 et 9g/dl), microcytaire (VGM entre 50 et 80fl) et hypochrome (CCMH entre 26 et 30pg). L'hyper réticulocytose, l'érythroblastose et la poikilocytose sont plus ou moins prononcés (Bonello-Palot *et al.* 2016).

I-1-2-2- Diagnostic biochimique

L'électrophorèse de l'Hb montre une augmentation significative du taux de l'HbF (>7-8%). Ce taux est extrêmement variable d'un patient à un autre en fonction de l'importance du

déficit relatif en chaînes β -globine et il peut atteindre 60-70 % (Joly *et al.* 2014). Le taux d'HbA₂ est anormalement élevé entre 4 et 7%, avec la présence d'HbA (Bonello-Palot *et al.* 2016).

I-1-2-3- Diagnostic clinique

Les formes de β -TI ont une sévérité qui peut être très variable mais qui ne sont pas dépendantes des transfusions ou seulement pendant certaines périodes de la vie. Certains patients, pendant leur enfance et leur adolescence peuvent évoluer vers une transfuso-dépendance totale avec l'âge. Dans ces formes atténuées, l'anémie sera plus ou moins bien tolérée. La surcharge en fer est également une complication même en l'absence de transfusion, car l'anémie chronique entraîne une augmentation de l'absorption intestinale du fer (Bonello-Palot *et al.* 2016).

I-1-3- Diagnostic de la β -thalassémie mineure

Les porteurs de la β -thalassémie mineure présentent une hypochromie et une microcytose marquées ainsi qu'une augmentation du taux d'HbA₂ (entre 3,8 et 5,5 % le plus souvent) et un taux variable d'HbF (0,5 à 4 %). Le frottis sanguin peut montrer une anisocytose et une poïkilocytose (Joly *et al.* 2014 ; Thuret 2014).

I-2- Analyses de génétique moléculaire

La prévalence d'un nombre limité de mutations dans chaque population a considérablement facilité les tests de génétique moléculaire. Les mutations communes du gène de la β -globine sont détectées par des procédures basées sur la PCR. Les méthodes les plus couramment utilisées sont : dot-blot inverse ou l'amplification spécifique de l'amorce, avec un ensemble d'amorces complémentaires aux mutations les plus courantes dans la population d'où provient l'individu concerné (Al Mosawy 2017).

I-3- L'enquête familiale

L'enquête familiale est indispensable au diagnostic et peut révéler que les deux parents présentent une β -thalassémie hétérozygote avec à l'hémogramme une pseudo-polyglobulie microcytaire et à l'électrophorèse de l'Hb une augmentation du taux d'HbA₂ > 3.3%. Ce qui définit le caractère homozygote de la β -TM (Tensaout 2017).

I-4-Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal pour les grossesses à risque accru est possible par l'analyse de l'ADN extrait de cellules fœtales obtenues par amniocentèse, habituellement réalisée environ 15 à 18 semaines de gestation ou sur des villosités choriales à 11 semaines de la gestation. L'analyse de cellules fœtales dans le sang maternel et l'analyse de l'ADN fœtal dans le plasma maternel peuvent également être réalisées (Sandhya *et al.* 2013).

I-5- Diagnostic préimplantatoire

Le diagnostic préimplantatoire peut être disponible pour les familles dans les quelles les mutations responsables de maladies ont été identifiées. Il consiste à la recherche de l'anomalie génétique responsable de la maladie sur des embryons obtenus par fécondation *in vitro* (Djemaa 2013).

II- Traitements des β -thalassémies

Il existe deux types de traitement des β -thalassémies : le traitement conventionnel et les nouvelles thérapeutiques.

II-1- Le traitement conventionnel

-Transfusion sanguine: Transfusions concentrées de globules rouges de façon régulière pour maintenir l'Hb au-dessus de 9-10g/dl afin de permettre une croissance et une activité normales. Le second but des transfusions est la répression de l'érythropoïèse thalassémique pour prévenir déformations osseuses, splénomégalie et « tumeurs » d'hématopoïèse extra-médullaire (Galanello et Origa 2010 ; Thuret 2014 ; Joly *et al.* 2014).

- La chélation du fer : Le traitement chélateur du fer est systématiquement associé aux transfusions régulières. Il a pour but de prévenir les décès d'origine cardiaque et la morbidité secondaire à la surcharge en fer (Olivieri et Brittenham 2013 ; Thuret 2014).

- Splénectomie : Lorsque les besoins transfusionnels sont trop élevés il peut s'avérer nécessaire de retirer la rate par chirurgie (splénectomie) La splénectomie expose donc les patients à un risque infectieux accru notamment aux germes encapsulés comme le pneumocoque. Pour cela, il faut attendre l'âge de 5-6 ans avant d'opérer un enfant (Joly *et al.* 2014 ; Litte 2016).

II-2- Les nouvelles approches thérapeutiques

Ces approches thérapeutiques potentielles peuvent être divisées en trois catégories, visant à agir sur la synthèse des chaînes de globine par adressage ou compensation.

-La transplantation de moelle osseuse : Egalement appelée transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Elle est en pratique courante, le seul traitement curateur. Elle est indiquée chez l'enfant ou l'adolescent disposant d'un donneur familial HLA-identique, permettant actuellement de guérir 9 enfants sur 10 (Lucarelli *et al.* 2012 ; Thuret 2014).

-Inducteur de l'HbF : Pour compenser la synthèse de la chaîne β -globine réduite ou absente chez les patients β -thalassémiques, des agents pharmacologiques capables d'induire la production d'HbF sont utilisés (Bonello-Palot *et al.* 2016).

- La thérapie génique

Aujourd'hui, la seule possibilité reconnue de traiter définitivement la β -thalassémie est de recourir à la greffe allogénique de moelle osseuse. Mais cette approche est limitée par la disponibilité de donneur compatible pour seulement 25% des patients et le risque significatif de réaction de greffon contre l'hôte. La thérapie génique pourrait alors représenter une alternative pour traiter définitivement l'hémoglobinopathie en cas d'impossibilité de recourir à un donneur pour une greffe allogénique, en offrant la possibilité d'une greffe autologue : les propres cellules souches hématopoïétiques du patient sont génétiquement modifiées avant de lui être réinjectées. Ainsi, l'addition du gène β -globine par un vecteur et son intégration chromosomique dans les cellules souches hématopoïétiques du patient est une approche de choix, grâce à des éléments de régulation génétiques appropriés contenus dans le vecteur. Les virus ont la capacité d'intégrer leur propre matériel génétique dans les cellules humaines, ils représentent donc de potentiels vecteurs pour ce type de thérapie. Le principe général est d'ôter au virus les séquences génétiques responsables de son caractère pathologique, le rendant inoffensif, et de lui supprimer la capacité de se reproduire. Enfin, Le gène à visée thérapeutique vient remplacer ces séquences. Les obstacles à cette thérapie étant la nécessité d'améliorer l'efficacité du transfert de gène, réguler et maintenir l'expression du gène introduit et insérer le gène dans un site non-oncogénique. Des transferts de gènes de globines ont été effectués avec succès dans des cellules hématopoïétiques humaines et de primates (Lahlou 2016).

III-Conseil génétique

Le conseil génétique fournit des informations pour les individus et les couples à risque (c'est-à-dire les deux porteurs) concernant le mode de transmission, le risque génétique d'avoir affecté des enfants atteints et l'histoire naturelle de la maladie, y compris le traitement disponible et les thérapies en cours de recherche (Sandhya *et al.* 2013).

Matériel et méthodes

I-Patients

I-1- Recrutement

Notre étude a porté sur 36 enfants atteints de β -thalassémie venant de différentes régions de l'Est Algérien, diagnostiqués et traités à la pédiatrie de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine, sur une période de 3 mois (de Mars à Mai 2017). L'étude génétique a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire du CHU Ibn Badis Constantine³ (extraction de l'ADN) et au laboratoire de biologie moléculaire - Faculté SNV - Constantine 1 (PCR/ Digestion). Dans l'étude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques, les profils de 10 témoins nous ont été fournis par Dr. REZGOUNE D.

I-2- Critères d'inclusion / exclusion

I-2-1-Critères d'inclusion

- Tous les enfants atteints d'une β -thalassémie et dont le diagnostic a été confirmé par une électrophorèse de l'Hb.

I-2-2- Critères d'exclusion

- Enfants dont le diagnostic est évoqué mais non confirmé par l'électrophorèse de l'Hb.
- Enfants atteints d'une association β -thalassémie / Drépanocytose.

II- Méthodes

Nous avons entrepris une étude transversale des critères familiaux, hématologiques, biologiques et biochimiques des patients atteints de β -thalassémie, ainsi qu'une étude analytique des profils génotypiques et alléliques de 12 patients par RFLP-PCR de deux polymorphismes (T3801C du gène *CYP11A1* et C677T du gène *MTHFR*).

II-1- Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin a été réalisé pour chaque patient à partir du sang veineux au pli du coude, sous des conditions stériles. Le sang est recueilli dans des tubes vacutainer contenant l'anticoagulant EDTA (en quantité de 5 ml) qui est un inhibiteur de l'action des enzymes ADNase ou nucléases, préservant ainsi l'intégrité moléculaire. La collecte de sang a eu lieu dans un intervalle de temps de transfusions d'un mois. Tous les prélèvements ont été stockés à +4°C pendant une semaine au maximum. Notons que ce prélèvement est réalisé par un laborantin du service.

II-2- Hémogramme

L'Hémogramme est un examen essentiel mettant en évidence un éventuel dysfonctionnement de la moelle osseuse ou des perturbations dites "périphériques". Il est le premier examen donnant des renseignements utiles permettant de suspecter une anomalie

hémoglobinique. Il s'effectue à distance de toute transfusion. Les paramètres inclus dans l'héogramme sont : Taux de GR, d'Hb, de VGM, d'HCT, de TCMH et de CCMH (Lahlou 2016).

II-3- Frottis sanguin

Le frottis sanguin, précieux outil de diagnostic cytologique, permet de déceler les anomalies morphologiques (taille, forme, coloration, inclusions) des hématies. Il consiste en l'étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre, colorée par le MGG et lue au microscope optique. Le protocole est fourni dans l'annexe 1 (Picaut 2006).

II-4- Electrophorèse

L'électrophorèse sépare les hémoglobines en fonction de leur différence de charge dans un champ électrique. La méthode de l'électrophorèse à pH alcalin a été entreprise dans notre étude. A pH 8.6, la molécule d'Hb chargée négativement migre vers l'anode (+), les hémoglobines qui ont un gain de charge positive migrent plus lentement (Couque et De Montalembert 2013).

II-5- Questionnaire

Un recueil de données a été effectué au niveau du service de pédiatrie ; à partir des dossiers des patients, complété par nos enquêtes personnelles (Annexe 2). Un consentement oral pour l'inclusion des enfants dans cette étude a été obtenu des parents ou tuteurs légaux. La confidentialité des données a été respectée tout au long de notre étude.

II-6- Arbres généalogiques

Une famille originaire d'Azzaba (Skikda) a été choisie comme famille représentative vu qu'elle renferme tous les cas de figures étudiés.

II-7- Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolation de l'ADN pur des leucocytes sanguins de chaque individu. Au cours de cette étude, la méthode d'extraction au NaCl a été entreprise (Annexe 3). L'extraction de l'ADN leucocytaire se résume en 3 étapes :

- Préparation des leucocytes ;
- Extraction de l'ADN proprement dite ;
- Solubilisation.

II-8- Génotypage du polymorphisme T3801C du *CYP1A1*

Le génotypage du variant allélique 3801T>C du gène *CYP1A1* a été réalisé par une RFLP-PCR en utilisant l'enzyme de restriction *MspI*. Le profil de digestion a été obtenu par plusieurs étapes successives :

- PCR suivie d'une électrophorèse des produits sur gel d'agarose.

- Digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction *MspI*.
- Séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur gel d'agarose.
- Visualisation des produits de digestion par trans-illumination sous UV.

II-8-1- La PCR

La PCR permet l'amplification exponentielle d'une faible quantité d'ADN connue en utilisant un mélange réactionnel contenant tous les réactifs nécessaires. L'ensemble est soumis à une succession de réactions appelées cycles de réplication. Chaque cycle est composé de 3 étapes : une dénaturation des brins d'ADN, une hybridation des amorces et une élongation.

II-8-1-1-Dilution de l'ADN

Pour procéder à la PCR, les ADN fortement concentrés, doivent être dilués (10µL d'ADN dans 30µL d'eau distillée).

II-8-1-2- Préparation du milieu réactionnel

Les réactifs utilisés dans cette étape de PCR doivent d'abord être dilués selon la formule suivante : $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ Où :

C_1 : Concentration initiale de chaque réactif.

V_1 : Volume initial nécessaire à la dilution (inconnu).

C_2 : Concentration finale.

V_2 : Volume final.

Une fois que le volume initial (V_1) est connu, le volume de l'eau distillée nécessaire pour la dilution de chaque réactif est calculé comme suit :

$$\text{Veau distillée} = V_2 - V_1$$

La composition du mélange réactionnel est mentionnée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Composants du mélange réactionnel de PCR.

Réactifs	Volumes nécessaires pour un échantillon (µL)
dNTP 0.2mM	4.8
Tampon 10x	3
ADN de 20ng/µL à 50ng/µL	3
Oligo F 5'-GGCTGAGCAATCTGACCCTA-3' (100ng/µL)	3
Oligo R 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3' (100ng/µL)	3
MgCl ₂ 1.5mM	0.9
Taq Polymérase 5 U/µL	0.24
Eau distillée	12.06

Après avoir préparé le mix, dans un tube à PCR, 27 μ L de ce mélange ont été additionnés à 3 μ L d'ADN pour chaque échantillon.

II-8-1-3- Déroulement de la PCR

Nous avons programmé le thermocycleur pour 30 cycles. Les conditions pour le déroulement de l'amplification par PCR sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2: Programmation d'un cycle de la PCR

Étapes	Température (°C)	Durée
Dénaturation initiale	94	4min
Dénaturation	94	30sec
Hybridation	61	30sec
Elongation	72	30sec

II-8-1-4- Electrophorèse des produits de la PCR

Une électrophorèse est nécessaire pour le contrôle de la taille des fragments amplifiés par PCR et la détection d'une éventuelle contamination de l'ADN (grâce au témoin négatif). La migration d'une molécule d'ADN dépend de sa taille et de la concentration du gel d'agarose, mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent également.

Dans notre étude, nous avons assuré ce contrôle dans une cuve horizontale sur un gel d'agarose à 2% (TBE à 1X) dans lequel ont été incorporé 10 μ l de BET (un agent intercalant se fixant entre les bases nucléiques, rendant l'ADN fluorescent sous UV pour visualiser les bandes résultantes).

Dans chaque puits du gel et du côté cathode (-), nous avons déposé un mélange de 7 μ l du produit d'amplification et 3 μ l du marqueur de mobilité BBP qui permet de suivre le front de migration, en réservant 2 puits, un pour le dépôt du marqueur de taille (100pb) et le deuxième pour le dépôt du blanc (témoin négatif). Ensuite, le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 min. Après migration, la visualisation des produits amplifiés est réalisée sous UV.

II-8-1-5-Digestion des produits de PCR par l'endonucléase de restriction *MspI*

L'ADN est soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction. Dans notre étude, 20 μ l du produit PCR sont mélangés à 0,7 μ l d'enzyme de restriction *MspI*. L'ensemble, est ensuite incubé toute une nuit à 37°C. La mutation T3801C du *CYP1A1* crée un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *MspI* (Figure 10). L'action de clivage de cette enzyme est détectée par une variation du

nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après une digestion enzymatique.



Figure 10 : Sites de restriction de l'enzyme *MspI*.

II-8-1-6-Électrophorèse des produits de digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse, la petite taille de ces fragments, a nécessité la préparation d'un gel d'agarose plus résolutif à 3% (3g d'agarose dans 100ml de TBE à 1X). Dans chaque puits, +/- 20µl du produit digéré et 3µl de BBP sont déposés. La migration s'effectue sous un courant de 100volts pendant 30min. Les fragments résultants sont ensuite visualisés sous UV. Le gel est ensuite photographié.

II-9- Génotypage du polymorphisme C677T du *MTHFR*

Pour aboutir au génotypage du variant alléliques 677 C>T du gène *MTHFR* nous avons suivi un protocole similaire que celui du génotypage du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* à l'exception de quelques modifications :

- Les séquences des amorces du gène *MTHFR* utilisées :

oligo F : 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA -3'

oligo R : 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG -3'

- Le thermocycleur a été programmé pour 40 cycles.
- La température d'hybridation de la PCR est de 69°C.
- Digestion du produit de PCR par l'enzyme de restriction *HinfI*.

L'*HinfI* reconnaît et clive la séquence G/ANTC codant pour l'Alanine en position 222 (Figure 11).



Figure 11: Site de restriction de l'enzyme *HinfI*.

II-10- Analyse statistique génétique

Dans ce travail, nous avons effectué une étude statistique d'association entre le polymorphisme du *CYP1A1* T3801C et la β-thalassémie et le polymorphisme de la *MTHFR* C677T et la β-thalassémie. L'étude statistique est basée sur l'OR et la *p-value* dans le but de

déterminer s'il existe une association significative entre les polymorphismes étudiés et la β -thalassémie (tableau 3). Les calculs ont été faits en utilisant le logiciel EPI-info 5.01b.

Pour le calcul de l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2×2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne. L'IC est de 95 % (ou 0,95).

Tableau 3 : Tableau de contingence.

	Patients	Témoins	Total
Exposé	a	b	a + b
Non exposé	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b+ c+ d

L'OR est calculé comme suit: **OR = a*b / c*d**

Si :

OR = 1 : pas d'association entre l'exposition et la maladie.

OR < 1 : association négative.

OR > 1 : association positive.

Pour la valeur p , le seuil critique *à priori* est de 0,05 (vu que l'IC pour l'OR est de 95 %). Si la valeur de p calculée *à posteriori* est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

Résultats et discussion

I-Résultats

I-1-Caractéristiques épidémiologiques

I-1-1-Age des patients

L'âge des patients au moment du diagnostic est illustré dans la figure 12.

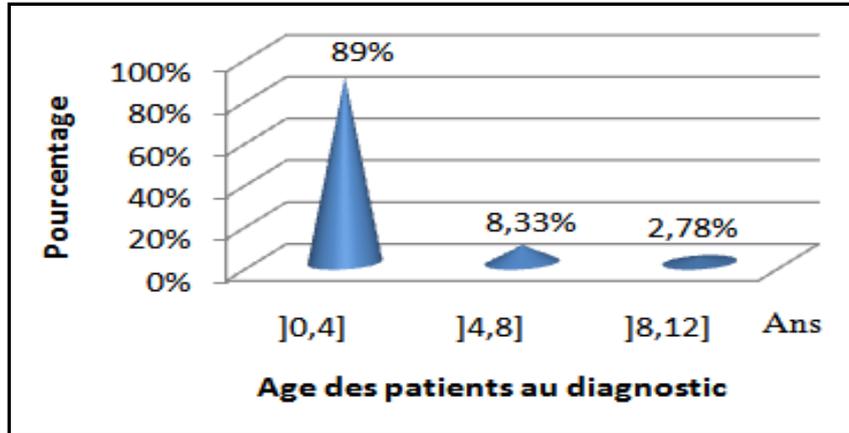


Figure 12 : Répartition des patients selon l'âge du diagnostic de la β -thalassémie.

L'âge des patients pendant la période de notre stage est illustré dans la figure 13.

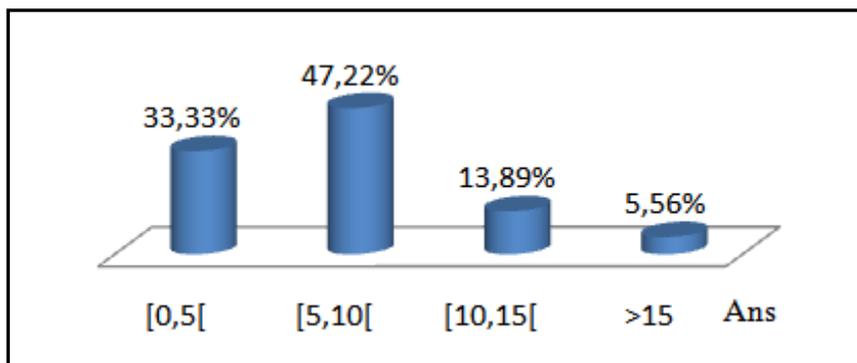


Figure 13: Répartition des patients selon leur âge actuel.

I-1-2- Sexe des patients

La répartition selon le sexe est illustrée dans la figure 14. Nous soulignons une prédominance masculine avec un sexe ratio (M/F) de 2.27.

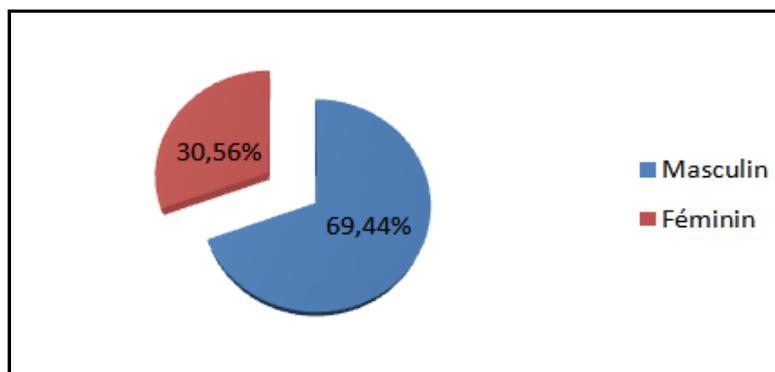


Figure 14 : Répartition des patients selon le sexe.

I-1-3- Origine des patients

La figure 15 illustre la répartition des patients selon leur origine géographique.

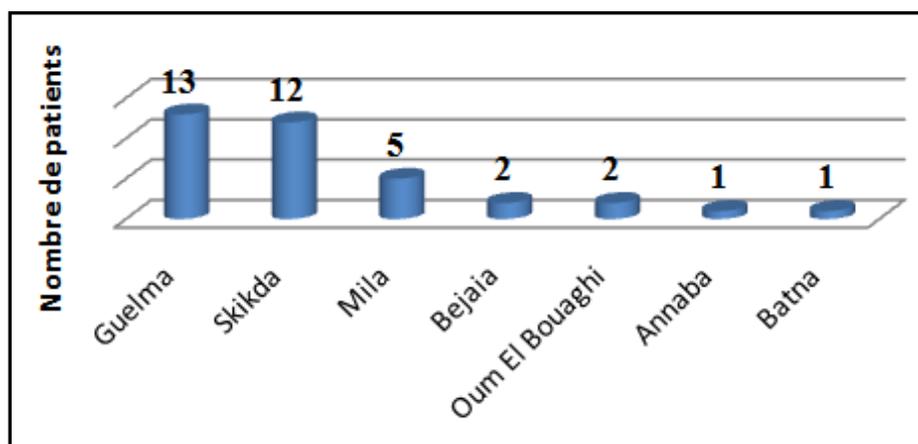


Figure 15 : Répartition des patients selon leur origine.

I-2- Consanguinité et antécédents familiaux

En ce qui concerne le nombre de patients issus d'un mariage consanguin, plusieurs cas ont été répertoriés (figure 16).

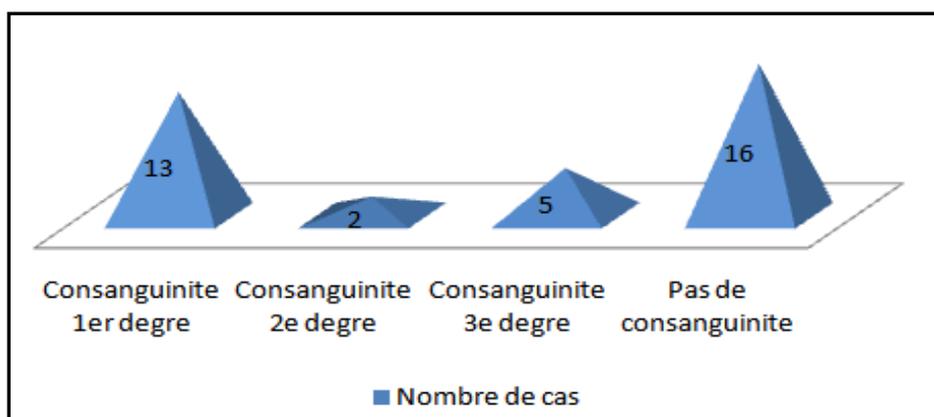


Figure 16 : Répartition des patients selon le degré de consanguinité.

La figure 17 représente la répartition des patients selon leurs antécédents familiaux.

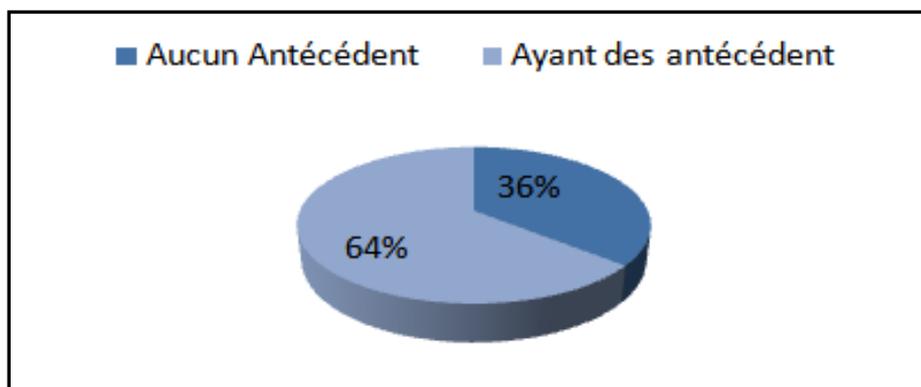


Figure 17 : Répartition des patients selon leurs antécédents familiaux.

I-3- Profil hématologique

Nos résultats de numération sanguine sont répertoriés selon les normes adaptées au laboratoire d'accueil (Laboratoire d'hémobiologie de l'HMRUC) (Tableau 1, annexe 4).

I-3-1- Hémogramme des β -thalassémiques hétérozygotes

I-3-1-1-Globules rouges

Le nombre de globules rouges chez les β -thalassémiques hétérozygotes au diagnostic, varie entre $2.37(x10^6/\mu\text{L})$ et $6.45(x10^6/\mu\text{L})$ avec une moyenne de $5.48(x10^6/\mu\text{L})$ (Tableau 4).

Tableau 4: Variation du nombre des globules rouges chez les patients hétérozygotes.

Nombre des GR ($x10^6/\mu\text{L}$)	Nb de cas	Pourcentage (%)
< 3.83	1	9.09
3.83- 5.08	0	0
>5.08	10	90.91
Total	11	100

I-3-1-2- Hémoglobine

Les taux d'Hb chez les β -thalassémiques hétérozygotes au diagnostic, varient entre 6.7 et 11.7g/dl avec une moyenne de 10.12g/dl (Tableau5).

Tableau 5: Répartition des patients hétérozygotes selon le taux d'Hb au diagnostic.

Taux d'Hb (g/dl)	Nb de cas	Pourcentage (%)
<11.7	10	90.91
11.7- 15.5	1	9.09
>15.5	0	0
Total	11	100

I-3-1-3- Volume globulaire moyen (VGM)

Le taux de VGM chez les β -thalassémiques hétérozygotes au diagnostic, varie entre 54.9fL et 81.8fL avec une moyenne de 62.04fL (Tableau 6).

Tableau 6 : Variation du taux de VGM chez les patients hétérozygotes.

Taux de VGM (fL)	Nb de cas	Pourcentage (%)
<80.4	10	90.91
80.4 – 95.9	1	9.09
>95.9	0	0
Total	11	100

I-3-1-4- Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

Le taux de CCMH chez les β -thalassémiques hétérozygotes au diagnostic, varie entre 17.8 et 29.2g/dl avec une moyenne de 19.34g/dl (Tableau 7).

Tableau 7 : Variation du taux de CCMH chez les patients hétérozygotes.

Taux de CCMH (g/dl)	Nb de cas	Pourcentage (%)
<32.5	8	72.73
32.5 – 35.2	3	27.27
Total	11	100

I-3-2- Hémogramme des β -thalassémiques homozygotes

I-3-2-1-Globules rouges

Le nombre de globules rouges chez les β -thalassémiques homozygotes au diagnostic, varie entre $2.10(x10^6/\mu\text{L})$ et $6(x10^6/\mu\text{L})$ avec une moyenne de $3.34(x10^6/\mu\text{L})$ (Tableau 8).

Tableau 8 : Variation du nombre des globules rouges chez les patients homozygotes.

Nombre des GR ($x10^6/\mu\text{L}$)	Nb de cas	Pourcentage (%)
< 3.83	21	84
3.83- 5.08	3	12
>5.08	1	4
Total	25	100

I-3-2-2- Hémoglobine

Les taux d'Hb chez les β -thalassémiques homozygotes au diagnostic, varient entre 4.8 et 9.1g/dl avec une moyenne de 7.03g/dl (Tableau 9).

Tableau 9 : Répartition des patients homozygotes selon le taux d'Hb au diagnostic.

Taux de l'Hb (g/dl)	Nb de cas	Pourcentage (%)
<11	25	100

I-3-2-3- Volume globulaire moyen (VGM)

Le taux de VGM chez les β -thalassémiques homozygotes au diagnostic, varie entre 63.7fL et 90.8fL avec une moyenne 74.33fL (Tableau 10).

Tableau 10 : Variation du taux de VGM chez les patients homozygotes.

Taux de VGM (fL)	Nb de cas	Pourcentage (%)
<80.4	21	84
80.4 – 95.9	4	16
>95.9	0	0
Total	25	100

I-3-2-4- Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH)

Le taux de CCMH chez les β -thalassémiques homozygotes au diagnostic, varie entre 15 et 34.3g/dl avec une moyenne de 25g/dl (Tableau 11).

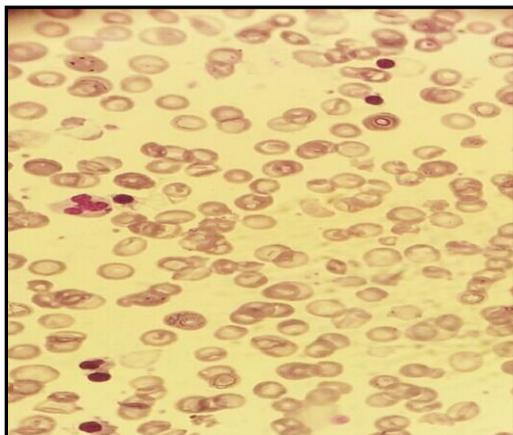
Tableau 11: Variation du taux de CCMH chez les patients homozygotes.

Taux de CCMH (g/dl)	Nb de cas	Pourcentage (%)
<32.5	7	28
32.5 – 35.2	11	44
>35.2	7	28
Total	25	100

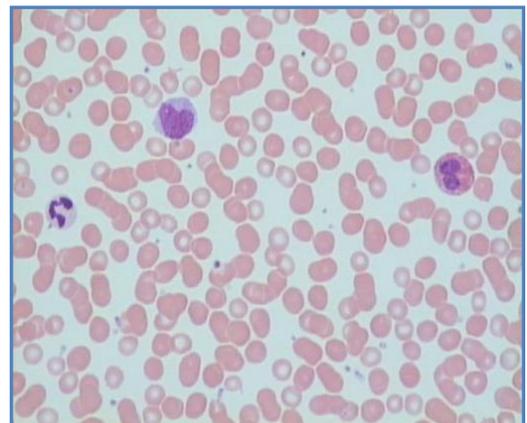
I-4- Frottis sanguin

Le frottis sanguin d'un patient homozygote avant transfusion comparé à un frottis d'une personne saine (Figure 18) a mis en évidence :

- Une hypochromie avec anisocytose poikilocytose-schizocytose.
- La présence de cellules cibles.



-a-



-b-

Figure 18 : Frottis sanguin : a- β -thalassémique homozygote b- Personne saine (MGG x100).

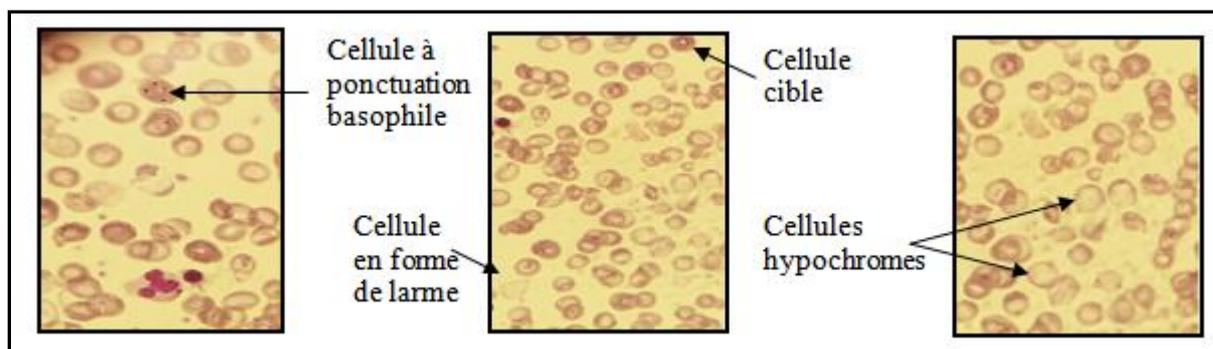


Figure 19: Cellules du frottis sanguin d'un β -thalassémique homozygote (MGG x100).

I-5-Electrophorèse de l'hémoglobine

L'électrophorèse a été réalisée chez tous les patients au moins une fois. Elle a objectivé une β -thalassémie hétérozygote chez 11 patients et une β -thalassémie homozygote chez 25 patients (Figure 20).

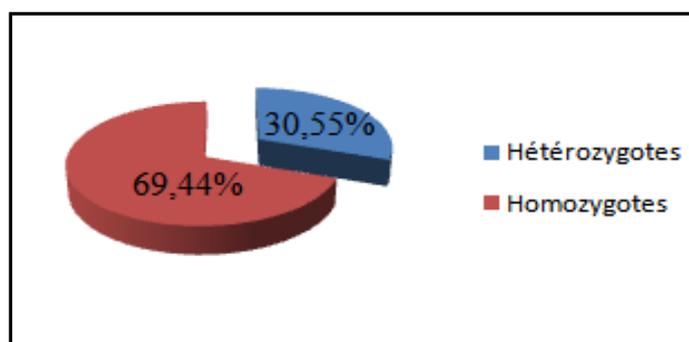


Figure 20 : Répartition des patients selon le type de β -thalassémie.

Les résultats de l'électrophorèse des 11 patients hétérozygotes ont révélé une augmentation du taux d'HbA₂ qui varie entre 3.7 et 6.8% avec une moyenne de 5.6%. Les résultats des patients atteints de formes sévères de β -thalassémie (β -TM et β -TI) ont révélés une augmentation de l'HbF qui varie entre 6.4 et 98.6%.

Les profils électrophorétique sont représentés dans la figure 21.

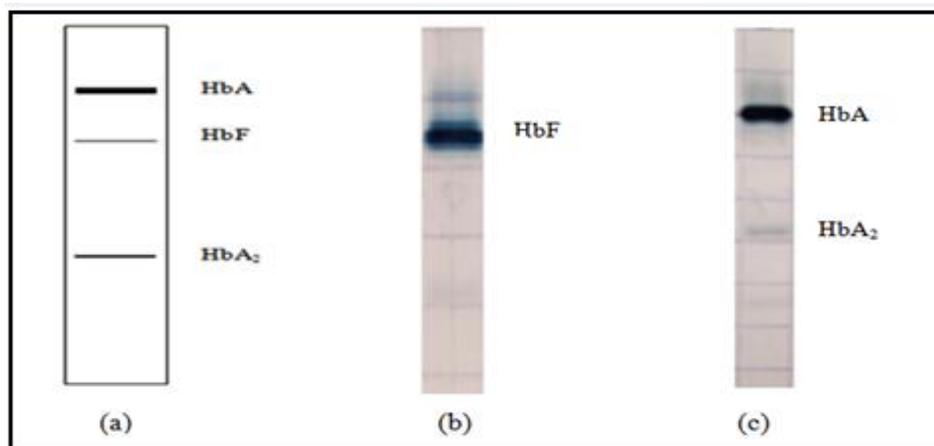


Figure 21 : Profils électrophorétique d'individus a) sain b) homozygote c) hétérozygote

I-6- Arbre généalogique

La figure 22 représente l'arbre généalogique de la famille représentative. Les autres arbres sont représentés dans l'annexe 5.

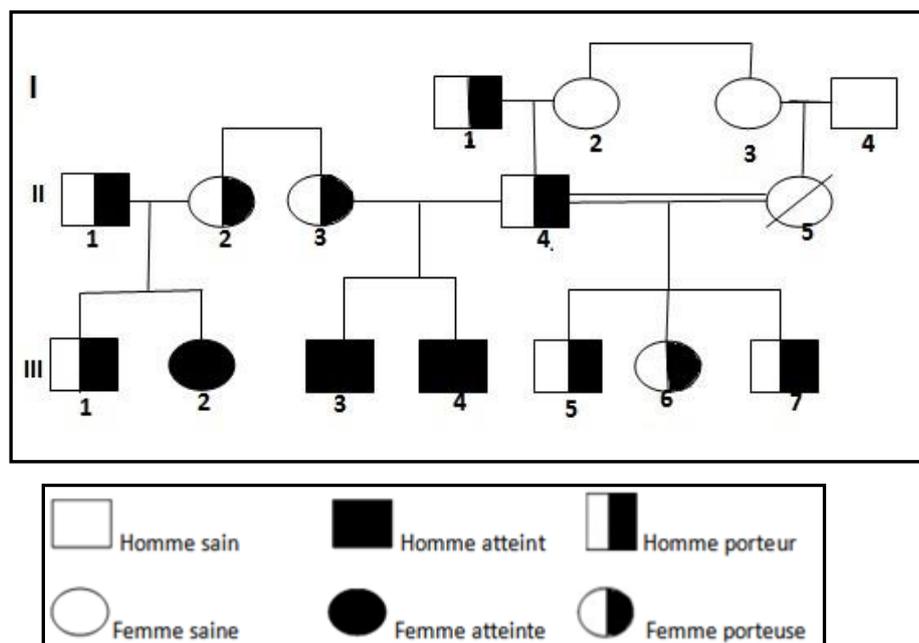


Figure 22: Arbre généalogique de la famille représentative d'Azzaba (Skikda).

I-7- Profil génétique

I-7-1-Résultats de l'électrophorèse de la PCR

I-7-1-1- Profil électrophorétique du polymorphisme T3801C du *CYP1A1*

Le profil électrophorétique de la PCR du polymorphisme T3801C du *CYP1A1* est représenté dans la figure 23.

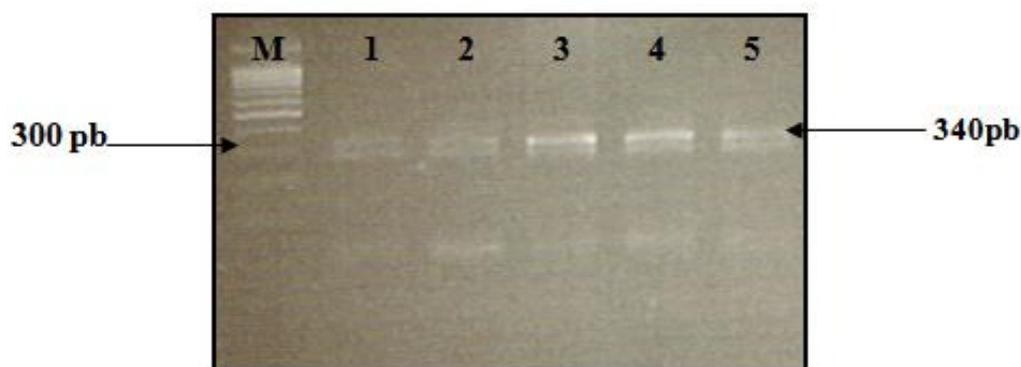


Figure 23 : Contrôle PCR du polymorphisme T3801C du *CYP1A1*m1 (une bande de 340pb).

M : marqueur ; 1-5 : patients

I-7-1-2- Profil électrophorétique du polymorphisme C677T de la *MTHFR*

Le profil électrophorétique de la PCR du polymorphisme C677T de la *MTHFR* est représenté dans la figure 24.

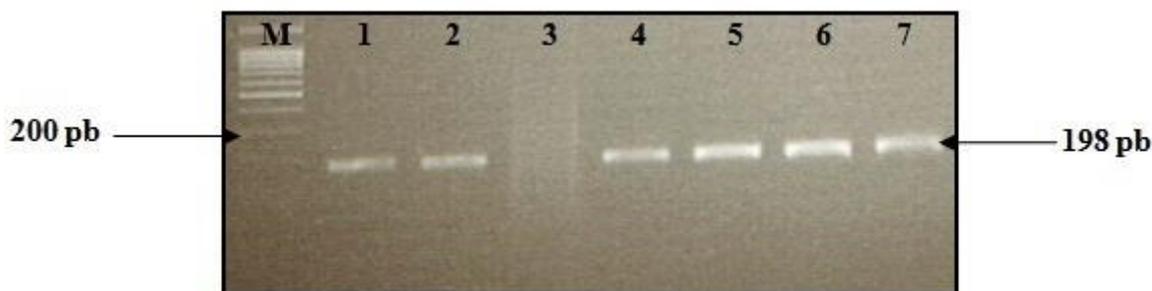


Figure 24 : Contrôle PCR du polymorphisme C677T de la *MTHFR* (une bande de 198pb).
M : marqueur ; 1-7 : patients

I-7-2- Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques

I-7-2-1- Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du gène *CYP1A1*

Notre analyse moléculaire vise à rechercher une association éventuelle entre le variant alléliques T3801C du gène *CYP1A1* et la β -thalassémie.

La digestion du produit d'amplification du gène *CYP1A1* par l'enzyme de restriction *MspI* a révélé 3 fragments. Le premier apparait sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande correspondant au type homozygote normal TT (une bande de 340pb), le deuxième sous forme de deux bandes (une de 200pb et l'autre de 140pb) correspondant au type homozygote muté CC, le troisième sous forme de 3 bandes correspondant au type hétérozygote TC (bandes de 340pb, 200pb et 140pb) (Figure 25).

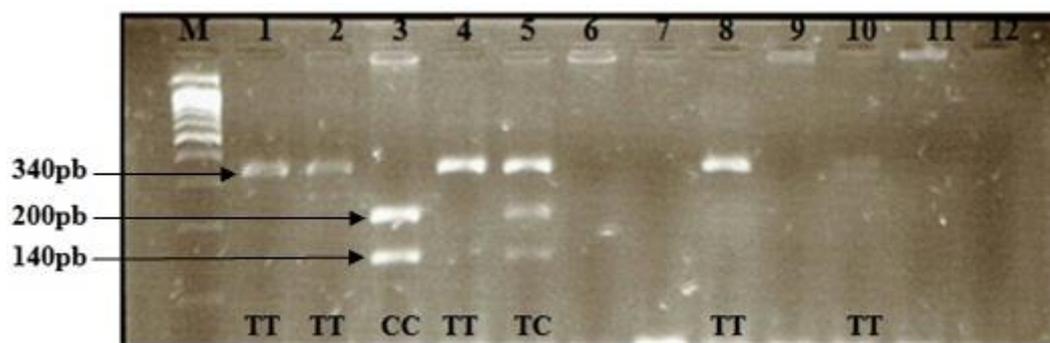


Figure 25: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des fragments après digestion par l'enzyme *MspI*.
M : marqueur ; 1-12 : sujets.

Notons que nous n'avons pas obtenu de résultats pour les individus 6, 7, 9, 11, 12. Ceci pourrait être du à une erreur de manipulation lors de l'extraction ou à une contamination.

Les fréquences génotypiques et alléliques des différentes formes ont été calculées pour les sujets génotypés (7 patients et 10 témoins) (Tableau 12, Figures 26 et 27).

Tableau 12: Répartition des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du *CYP1A1*.

		Patients		Témoins		OR	p value
		n	%	n	%		
Fréquences génotypiques	3801 TT	5	71,43	5	50	/	/
	3801 TC	1	14,28	5	50	0,20[0,01-3,32]	0,43
	3801 CC	1	14,29	0	0	indéfini	0,92
Fréquences alléliques	T	11	78,57	15	75	/	/
	C	3	21,43	5	25	0,82 [0,12-5,31]	0,86

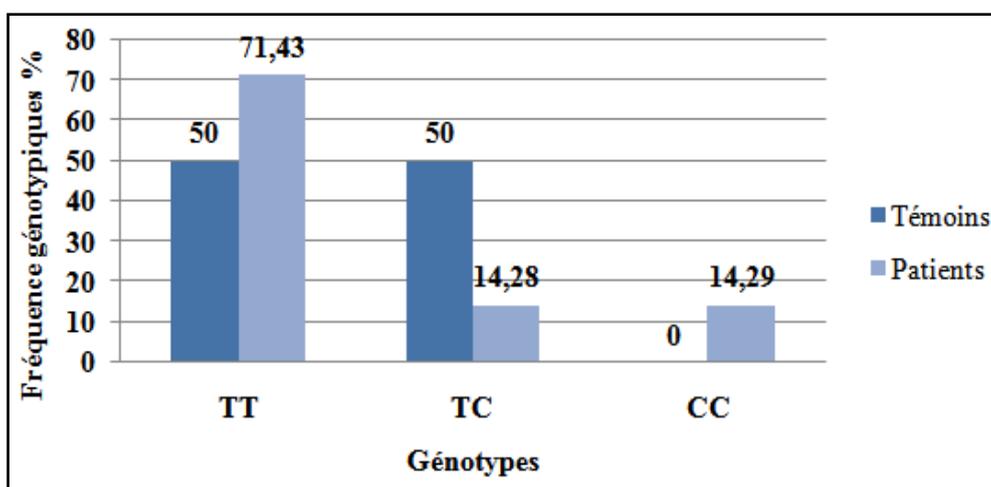


Figure 26 : Fréquences génotypiques du T3801C du *CYP1A1* des patients et des témoins.

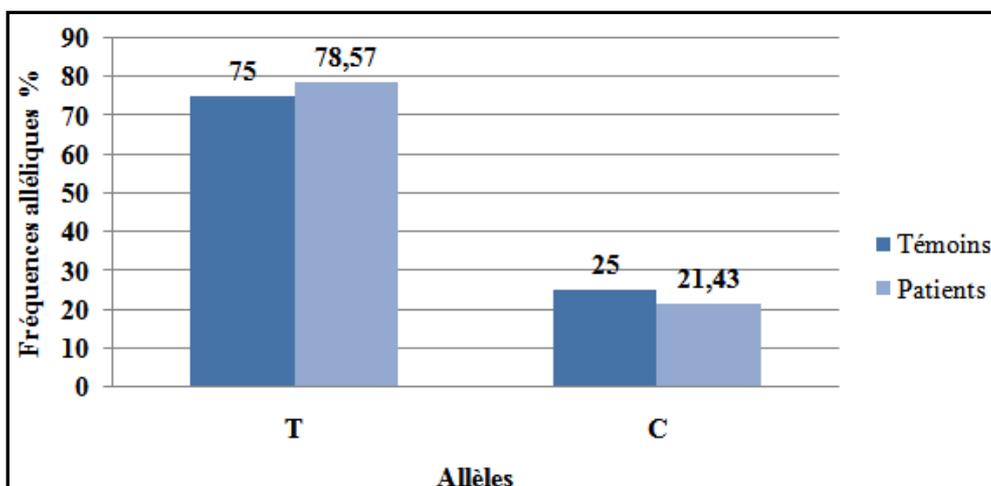


Figure 27 : Fréquences alléliques du T3801C du *CYP1A1* des patients et des témoins.

I-7-2-2-Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène *MTHFR*

La digestion du produit d'amplification du gène *MTHFR* par l'enzyme de restriction *HinfI* a reflété 2 fragments. Le premier apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande (198pb) correspondant au type homozygote normal CC, le deuxième qui est normalement sous forme d'une seule bande (175pb), correspondant au type homozygote muté TT, n'a pas été retrouvé dans nos échantillons, le type hétérozygote CT apparaît sous forme de 2 bandes (198pb et 175pb) (Figure 28).

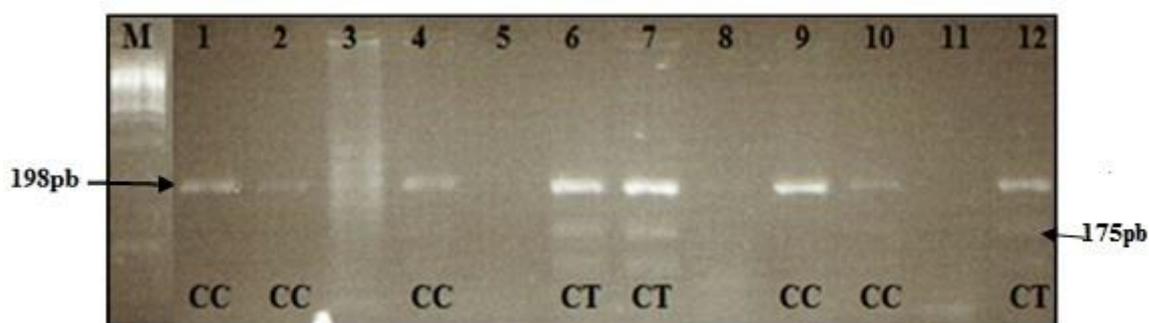


Figure 28: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des fragments après digestion par l'enzyme *HinfI*.

M : marqueur ; 1-12 : sujets

Les fréquences génotypiques et alléliques des différentes formes ont été calculées pour les sujets génotypés (8 patients et 10 témoins) (Tableau 13, Figures 29 et 30).

Tableau 13 : Répartition des fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du *MTHFR*.

		Patients		Témoins		OR	<i>p value</i>
		n	%	n	%		
Fréquences génotypiques	677CC	5	62,5	6	60	/	/
	677CT	3	37,5	2	20	1,80[0,14-25,91]	1
	677TT	0	0	2	20	0[0-7,98]	0,67
Fréquences alléliques	C	8	72.73	8	66.67	/	/
	T	3	27.27	4	33.33	0,54 [0,08-3,24]	0.69

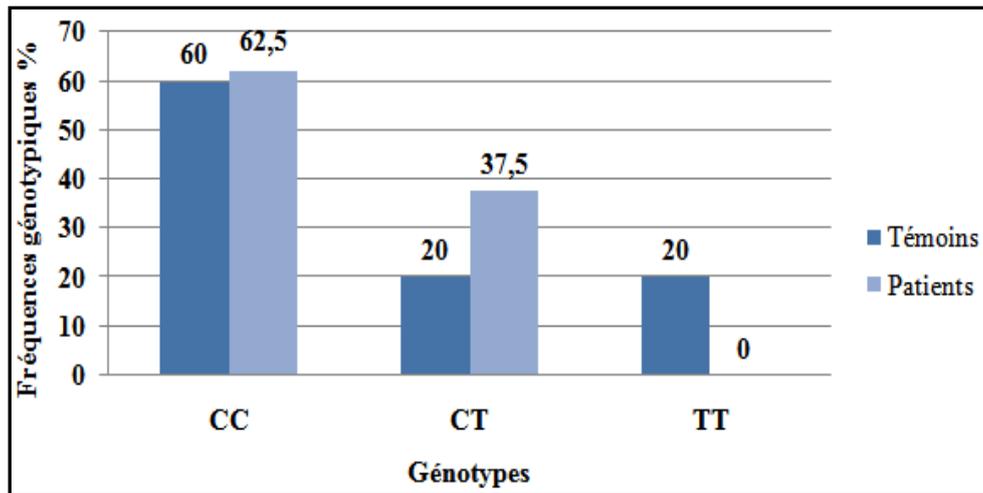


Figure 29 : Fréquences génotypiques du C677T du *MTHFR* des patients et des témoins.

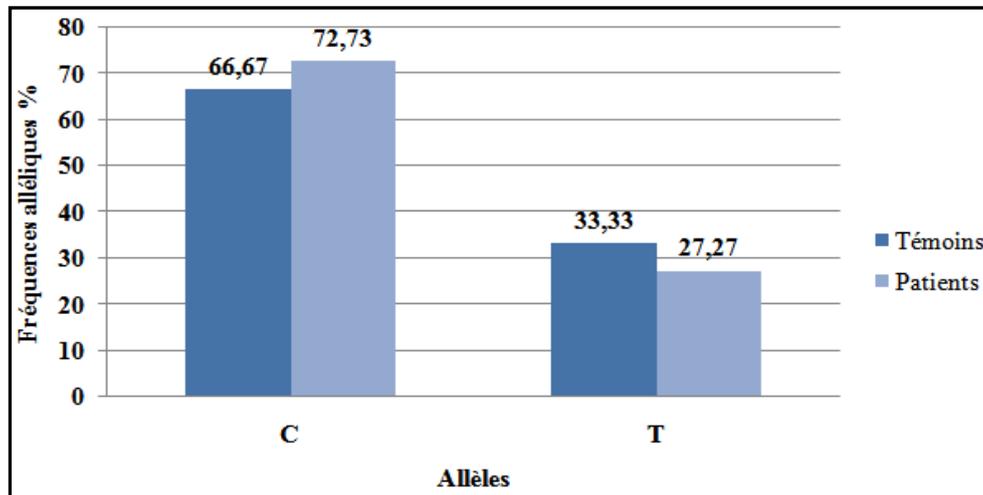


Figure 30 : Fréquences alléliques du C677T du *MTHFR* des patients et des témoins.

II-Discussions

II-1- Répartition selon l'âge du diagnostic

La répartition des patients selon leurs tranches d'âges montre que la β -thalassémie est une maladie à révélation pédiatrique, elle se déclare dès la petite enfance et les complications apparaissent au fur et à mesure de l'évolution. Dans nos résultats, l'âge moyen du diagnostic est de 1,9 an avec des extrêmes allant de 3 mois à 10 ans, alors que selon Lahlou (2016), Bedir et Miloudi (2006), l'âge moyen du diagnostic est de 5ans. Romdhane et *al.* (2014) indiquent, par contre, un âge moyen de 9 ans dans la population tunisienne avec des extrêmes allant de 2 à 17 ans.

II-2- Répartition selon le sexe

Les résultats obtenus sont analogues à ceux de Djamaa (2013) et Romdhane (2014) soulignant une prédominance masculine. La prédominance masculine ne peut pas être expliquée par une relation entre le sexe et la maladie puisque sa transmission est autosomique récessive c'est à dire qu'elle touche les deux sexes de façon égale (Bedir et Miloudi 2006). Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Haddad et Bradai (2016), Sall *et al.* (2014) rapportant une légère prédominance féminine avec un sexe ratio respectivement de 1.3 et 0.87. Le nombre de patients étudiés (36 patients) ne permet pas d'établir une conclusion dans ce sens.

II-3-Le taux de consanguinité chez les patients thalassémiques

Dans notre série, 20 patients, soit 55.56% des cas sont issus d'un mariage consanguin, dont 36.11% du premier degré, 5.56% de 2ème degré et 13.89% de 3ème degré. Ces résultats sont appuyés par ceux de Bedir et Miloudi (2006) et Djamaa (2013), avec des taux de consanguinité respectivement de 68% et de 61%. Par ailleurs selon Djenouni et *al* dans une étude allant de 1995 à 2002, 23% des patients du CHU Annaba ont un antécédent de consanguinité. La consanguinité seule, ne semble pas être la cause principale de la thalassémie mais elle augmente la probabilité de l'apparition de la maladie. Sa fréquence élevée dans les pays du Maghreb est expliquée par la fréquence élevée des mariages consanguins dans ces régions. Le nombre d'enfants thalassémiques dans une famille peut avoir des répercussions significatives sur la prise en charge des malades. Plus il y a d'enfants malades, plus les charges sont élevées, plus il y a de décès. Dans notre étude, 4 patients, soit 11.11% des cas ont un autre membre dans la fratrie atteint de thalassémie. Dans l'étude de Djenouni et *al.* 39,5% des cas dans la fratrie sont rapportés.

II-4- Profils hématologique et électrophorétique des patients

II-4-1- β -thalassémiques hétérozygotes

Nos résultats sont analogues à ceux de Haddad et Bradai (2016) rapportant la présence d'une pseudo-polyglobulie microcytaire chez les enfants avec les taux moyens suivants : VGM 62.84fL, GR $5.22 \times 10^6/\mu\text{L}$, et d'HbA₂ 5.7%. Les résultats publiés par Dogaru *et al.* (2011) ont par ailleurs, montré que les taux d'HbA₂ varient entre 3.5 et 7.8%. Sall *et al.* (2014) expliquent la microcytose par la survenue d'une déficience lors de la synthèse de l'Hb, aboutissant à une réduction de sa concentration cytoplasmique et à une augmentation du nombre de mitoses afin de poursuivre une certaine maturation de l'érythroblaste. Cette microcytose est souvent accompagnée d'une hypochromie et constitue un signe biologique évocateur d'une hémoglobinopathie telle la β -thalassémie. En outre, Desrosiers (2003) explique la pseudo-polyglobulie par la réaction de la moelle osseuse qui augmente la synthèse de GR pour satisfaire aux besoins de transport de l'O₂. Joly *et al.* (2014) indiquent que l'augmentation du taux d'HbA₂ est la conséquence d'une augmentation relative de la proportion des chaînes δ -globine par rapport aux chaînes β -globine.

II-4-2- β -thalassémiques homozygotes

Nos résultats montrent d'une part, une intense diminution du nombre de globules rouges chez les patients atteints de formes sévères de β -thalassémie (84% des cas), accompagnée d'une anémie sévère chez tous les patients (100%), alors que l'anémie microcytaire est marquée chez 84% des cas, l'hypochromie n'a été marquée que chez 7 patients. D'autre part, une augmentation du taux de l'HbF variant entre 6.4 et 98.6% a été observée. Ces observations sont largement confirmées par Bonnelo-Palot *et al.* (2016) rapportant que les formes sévères de β -thalassémies sont marquées par une anémie plus ou moins profonde liée directement au déficit quantitatif de la chaîne β qui limite ou empêche la formation du tétramère, la chaîne α privée de son partenaire, précipite dans l'érythroblaste et dans le globule rouge et entraîne leur destruction. Selon Mario et Sala (2016), une β -thalassémie intermédiaire ou majeure est évoquée devant une anémie (Hb<10g/dl) microcytaire hypochrome, et un taux augmenté d'HbF pour compenser le manque en augmentant la synthèse des chaînes γ .

Nos résultats se rapprochent de ceux publiés par Loutfi *et al.* (2016), indiquant que deux tiers des anémies diagnostiquées étaient des anémies microcytaires. De même, Belhadi (2011), a indiqué un taux moyen de globules rouges de $3.899 \times 10^6/\mu\text{L}$ chez les malades, un taux bas de VGM, CCMH et d'Hb.

II-5- Arbre généalogique de la famille représentative

L'individu II.4 s'est marié la première fois avec sa cousine qui était saine (mariage consanguin 1^{er} degré), tous leurs enfants (III.5, III.6, et III.7) sont des porteurs de β -thalassémie. Après le décès de son épouse, il s'est remarié avec une autre femme (II.3) dans un mariage non consanguin, cette deuxième femme était une porteuse de β -thalassémie, ses enfants III.3 et III.4 sont des β -thalassémiques homozygotes. II.2 la sœur d'II.3 est également porteuse de la β -thalassémie et est mariée avec un porteur (II.1), l'un de leurs enfants est porteur (III.1) et l'autre atteint (III.2). Ces observations concordent avec ce qui est rapporté dans la littérature concernant, d'une part le mode de transmission de la β -thalassémie qui est autosomique récessif puisque plusieurs enfants atteints (homozygotes) et appartenant aux deux sexes, sont issus de parents non atteints (hétérozygotes). Ainsi, la présence des deux allèles mutés du gène est nécessaire pour que la maladie se manifeste. D'autre part, la consanguinité n'est pas la cause principale de l'apparition de la maladie mais elle augmente sa probabilité.

II-6- Profil génétique des β -thalassémiques

II-6-1- Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme T3801C du gène *CYP1A1*

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme T3801C du *CYP1A1*, montre que le génotype sauvage (TT) est le plus fréquent dans la population malade. Le génotype hétérozygote (TC) vient en deuxième position dans les deux populations (saine et malade). Par ailleurs, le génotype homozygote muté (CC) n'a été retrouvé que chez les malades. Les calculs de l'OR et de la *p-value* montrent que le polymorphisme T3801C du *CYP1A1* ne représente pas un facteur de risque pour la β -thalassémie (*p value* >0.05). Ces résultats ne sont pas concluants vu le nombre réduit de notre échantillon. En ce qui concerne les fréquences alléliques du T3801C du *CYP1A1*, les calculs de l'OR et de la *p-value* ne montrent aucune corrélation entre le polymorphisme T3801C du *CYP1A1* et la β -thalassémie. A notre connaissance aucune étude, nous permettant de confirmer ou infirmer nos résultats, n'a été établie concernant la relation entre le polymorphisme T3801C du *CYP1A1* et la β -thalassémie.

II-6-2- Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques dupolymorphismeC677T du gène *MTHFR*

La distribution des fréquences génotypiques du polymorphisme C677T du *MTHFR* dans notre échantillon montre que le génotype homozygote sain (CC) est le génotype prédominant dans les deux populations (patients et témoins). Le génotype hétérozygote (CT) est

prédominant dans la population malade. En ce qui concerne le génotype homozygote muté (TT), il est présent uniquement dans la population saine. Les calculs de l'OR et de la *p-value* suggèrent que le polymorphisme C677T du *MTHFR* ne semble pas impliqué dans la survenue de la β -thalassémie. La répartition des fréquences alléliques du C677T du *MTHFR* indique que l'allèle C est prédominant dans la population malade, tandis que l'allèle T est plus fréquent dans la population saine. Les calculs de l'OR et de la *p-value* indiquent qu'il n'existe aucune association entre le polymorphisme en question et la β -thalassémie.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs études. En effet, Mustafa *et al.* (2010), dans une étude menée au Kuwait et portant sur 50 patients β -thalassémiques et 50 témoins sains, montrent que 32% des patients étaient hétérozygotes et 4% étaient homozygotes pour la mutation C677T *MTHFR*. Ils ont révélé que le polymorphisme en question ne semble pas être un facteur de risque dans les événements thrombotiques. De même, une étude Iranienne effectuée par Rahimi *et al.* (2008) qui a porté sur 151 patients atteints de β -TM et 7 patients atteints de β -TI dont 82 hommes et 76 femmes avec un âge moyen de 13.6+/- 6.3ans, et 180 témoins (103 hommes et 77 femmes) avec un âge moyen de 16.8+/- 2.1, ont mentionné que la prévalence du polymorphisme C677T de la *MTHFR* était légèrement plus élevée chez les patients (50%) que chez les témoins sains (48.3%), et que les mutations thrombophiliques ne sont pas associées à des événements thrombotiques chez les patients β -thalassémiques, suggérant que ces résultats doivent être confirmés par une étude sur un échantillon de taille plus importante. Dans une étude Jordanienne, évaluant la prévalence de la mutation C677T de la *MTHFR* chez les β -thalassémiques, Al-Sweedan *et al.* (2009) ont constaté que cette mutation était légèrement plus élevée, mais non significative, chez les patients atteints de β -TM que les témoins. La β -TM est ainsi une maladie hypercoagulable chronique indépendante de facteurs génétiques prédisposant. Dans deux autres études de la région de la Méditerranée orientale menées par Zalloua *et al.* (2003) et Iolascon *et al.* (2001), la présence de la mutation C677T de la *MTHFR* n'a pas été significativement corrélée avec le risque thrombotique.

Alors qu'aucune association entre le polymorphisme C677T et la β -thalassémie n'a été rapporté, nous suggérons que l'allèle C en position 677 de la *MTHFR* est très conservé dans notre population d'étude. Ces résultats ne peuvent être concluants que si la taille de la population d'étude sera plus importante.

Conclusion

Notre travail de recherche a consisté en étude avec deux volets ; une étude descriptive transversale para-clinique (hématologique et biochimique), et une étude génétique analytique (cas-témoins par génotypage du *CYP11A1* pour le polymorphisme T3801C, et génotypage de la *MTHFR* pour le polymorphisme C677T).

Nos résultats ont montré que la β -thalassémie est une maladie à révélation pédiatrique avec une prédominance masculine, et que son apparition n'est pas uniquement due à la consanguinité. Ainsi, les résultats obtenus par l'étude des profils hématologiques et biochimiques des deux types de β -thalassémies (homozygotes et hétérozygotes) concordent totalement avec ce qui est rapporté dans la littérature.

Par ailleurs, l'exploration génotypique des deux polymorphismes, indiquent que ces derniers ne sont pas associés à la β -thalassémie. Cependant, la taille relativement restreinte des cohortes utilisées pour ces études ne permet pas de mettre en évidence l'effet réel de ces polymorphismes sur cette pathologie.

Afin de diminuer l'incidence des β -thalassémies, il serait nécessaire de développer un programme de prévention reposant sur l'éducation sanitaire, la diminution des mariages consanguins, le dépistage des hétérozygotes, le conseil génétique, le dépistage anténatal de la maladie et la création de centres spécialisés.

À la lumière de ce travail nous proposons en perspectives de :

- Identifier les mutations du gène de la β -globine dans nos échantillons.
- Poursuivre l'étude de l'influence du polymorphisme C677T de la *MTHFR* et du polymorphisme T3801C du *CYP11A1* sur la β -thalassémie en utilisant un échantillon de taille plus importante.

Références bibliographiques

- ADDOUR NB. 2008. Caractérisation moléculaire des β -thalassémies dans la population Algérienne : impact des mutations sur l'expression clinique. Thèse de doctorat. USTHB.
- ADDOUR NB, ZIDANI N, CARION N, LABIE D, BELHANI M, BELDJORD. 2009. Molecular Heterogeneity of β -Thalassemia in Algeria: How To face Up To a Major Health Problem. *Hemoglobin*. 1(33): 25.
- AGARWAL MB. 2004. Advances in management of thalassemia. *Indian pediatrics*. 41 (10) : 989-992.
- ALAIN J, MARENGO-ROWE MD. 2007. The thalassemias and related disorders. *Baylor University Medical Center Proceedings*. 20 : 27-31.
- AL-MOSAWY WF. 2017. The beta-thalassemia. *Scientific Journal Of Medical Research*. 1 (1): 24-30.
- AL-SWEEDAN SA, JARADAT S, IRAQI M, BESHTAWI M. 2009. The prevalence of factor V Leiden (G1691A), prothrombin G20210A and methylentetrahydrofolate reductase C677T mutations in Jordanian patients with beta-thalassemia major. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 20 (8) : 675-678.
- AMATO A, GIORDANO P. 2009. Screening and genetic diagnosis of hemoglobinopathies in Southern and Northern Europe : two examples. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 1(1).
- AYFER GP, TURGAY D, GOKALP D, BEVAZIT N, HASPOLAT K, SOKER M. 2011. Assessment of thyroid function in children aged 1-13 years with beta-thalassemia major. *Iranian Journal of Pediatrics*. 1 (21): 77-82.
- BAUDIN B. 2016. Les hémoglobines normales et pathologiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 481: 27-34.
- BEDIR L, MILOUDI R. 2006. Prévalence de thalassémie dans la wilaya d'El-Oued. Mémoire de fin d'études supérieures en Biochimie. Université Kasdi-Merbah. pp44-45.
- BELHADI K. 2011. Etude des hémoglobinopathies dans la population de la région de Batna. Mémoire de Magister en Biologie cellulaire et physiologie animale. Université El-Hadj-Lakhdar. pp 29-57.
- BELHANI M. 2009. Epidémiologie de la β -thalassémie homozygote en Algérie. *Revue Algérienne d'hématologie*. 1 : 22.

- BENSIMON D. 1999. Les gènes des globines humaines : que nous apprend leur polymorphisme?. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique (4) : 242-248.
- BONELLO-PALOT N, BADENS C. 2010. Bases moléculaires des syndromes thalassémiques et facteurs génétiques modulateurs de sévérité de la beta-thalassémie. Revue Méditerranéenne de Génétique Humaine. 1 : 1-10.
- BONELLO-PALOT N, CERINO P, JOLY P, BADENS C. 2016. Les thalassémies en 2016. Revue Francophone Des Laboratoires. 481: 67-75.
- BOUROUBA R, HOUCHER B, DJABI F, EGIN Y, AKAR N. 2009. The prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T, factor V 1691 G-A, and prothrombin 20210 G-A mutations in healthy populations in Setif, Algeria. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 15(5): 529-534.
- BRUMPT LC, PAYS JF. La thalassémie bêta zéro eurasiatique et les migrations mongoles. Communication présentée à la séance du 27 février 1988 de la Société française d'Histoire de la Médecine.67-68.
- CAO A, GALANELLO R. 2010. Beta-thalassemia. Genetics in Medicine. 12 (2): 61-76.
- CAPPELLINI MD, COHEN A, PORTER J, TAHER A, VIPRAKASIT V. 2014. Recommandations pour la prise en charge des thalassémies dépendantes des transfusions (TDT). Thalassaemia International Federation. pp 16-17.
- COSTELLO R. 2009. Actualités sur les thalassémies. La Revue de la Médecine Interne. 30: 22-23.
- COUQUE N, DE MONTALEMBERT M. 2013. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. Feuilles de Biologie. 311: 5-18.
- COUQUE N, TRAWINSKI E, ELION J. 2016. Génétique des maladies de l'hémoglobine. Revue Francophones Des Laboratoires. 481 : 49-60.
- DEBORAH R, ELIZER R. 2005. Medical progress beta-thalassemia. The New England Journal of Medecine. 11 (353): 1135-1146.
- DESROSIERS P. 2003. La thalassémies mineure. Le Médecin du Québec. 10 (38) : 59.
- DIMITRIOS T, KREMASTINOS MD. 2001. Heart failure in β -Thalassemia. Congestive Heart Failure. 6 (7): 312-314.

- DJEMAA I. 2013. Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des bêta thalassémies et drépanocytose. Mémoire de Magister en génétique moléculaire des populations humaines. Université de Tlemcen. pp11-20.
- DJENOUNI A, GRIFI F, BAHLOULI M. Prise en charge des thalassémies majeures au CHU Annaba allant de 1995 à 2002.
- DOGARU M, TALMACI R, CORIU D, BADELITA S. 2011. Sensitivity, specificity and efficiency of different discriminative indexes in differentiation of thalassemia trait from iron deficiency anemia. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 1 (1): 2-8.
- ELIEZER AR, GIARDINA PJ. 2011. How I treat thalassemia. *Blood Journal Hematology*.13 (118): 3479-3488.
- EL KAMAH G, AMR K. 2015. Thalassemia-From Genotype to Phynotype. *Inherited Hemoglobin Disorders*. Anjana Munshi. pp 13-33.
- Encyclopédie Orphanet Grand Public. 2008. La bêta-thalassémie. 7.
- GALANELLO R, ORIGA R. 2010. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal Of Rare Diseases*. 5:1-15.
- GENETICS HOME REFERENCE. 2017. MTHFR gene.
- GHESQUIERES H. 2010. Etude des polymorphismes génétiques des gènes des cytokines dans les lymphomes hodgkiniens. Thèse de Doctorat en Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire. Université Claude Bernard Lyon 1. pp 11-13.
- GIORDANO PC. 2013. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hémoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *International Journal of Laboratory Hematology*. 35: 465-479.
- GIROT R, DE MONTALEMBERT M. 2006. Thalassémies chez l'enfant. *EMC-Pédiatrie-Maladies infectieuses* (6) : 1-3.
- GOYETTE P, PAI A, MILOS R, FROSST P, TRAN P, CHEN Z, CHAN M, ROZEN R. 1998. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Mammalian Genome*. 8 (9): 652-656.
- GREENE D, VAUGN C, CREWS B, AGARWAL A. 2015. Advances in detection of hémoglobinopathies. *Clinica Chimica Acta*. 439: 50-57.
- HADDAD N, BRADAI M. 2016. Epidémiologie de la bêta thalassémie hétérozygote, dans le CHU de Blida: Implications, pour le dépistage de la population. *Santé-Mag*. 53 : 10-13.

- HAN AP, FLEMNIG MD, CHEN JJ. 2005. Heme-regulated eIF2 α kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and β -thalassemia. *The Journal of Clinical Investigation*. 115 (6) : 1562-1570.
- HARDISON RC. 2012. Evolution of Hemoglobin and Its Genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: 1-18.
- HORN F, LINDENNEHER G, GRILHOSL C, MOC I, BERGHOLD S, SCHNEIDER N, MUNSTER B. 2005. *Biochimie Humaine. Medecine Science –Flammarion-* . pp 484.
- IOLASCON A, GIORDANO P, STORELLI AS, LI HH, COPPOLA B, PIGA A, FANTOLA E, FORNI G, CIANCIULLI P, PERROTTA S, MAGNANO C, MAGGIO A, MANGIAGLI A, DEVOTOB M. 2001. Thrombophilia in thalassemia major patients: analysis of genetic predisposing factors. *Haematologica*. 86 (10) : 1112-1113.
- JERBI Z, ABDENNEBI M, DOUIK H, ROMDHANE HB, HARZALLAH L, GUEMIRA F, GHANEM A. 2005. Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Annales de Biologie Clinique*. 63 (5) : 487-491.
- JOLY P, LACAN P, GARCIA C, MELEY R, PONDARRE C, FRANCINA A. 2011. A novel deletion/insertion caused by a replication error in the beta-globin gene locus control region. *Hemoglobin*. 35: 316-322.
- JOLY P, PONDARRE C, BADNES C. 2014. Les beta-thalassémies: aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. *Annales de Biologie Clinique*. 72 (6) : 641-664.
- KAPLAN JC, DELPECH M. 2007. *Biologie Moléculaire et Médecine*. Flammarion. pp 87-88.
- KATSUMURA KR, DEVILBISS AW, POPE NJ, JOHNSON KD, BRESNICK EH. 2013. Transcriptional Mechanisms Underlying Hemoglobin Synthesis. *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*. 3: 1-19.
- LABIE D, ELION J. 2005. Molecular and pathophysiological bases of haemoglobin diseases. *EMC-Hématologie*. 2: 220-239.
- LAHLOU S. 2016. Profil épidémio-clinique, biologique, thérapeutique et évolutif de la thalassémie chez l'enfant. Thèse de doctorat en médecine. Université de Sidi Mohammed Ben Abdellah. pp 80-82.

- LECLERC D, ROZEN R. 2007. Génétique Moléculaire de *MTHFR* Les polymorphismes ne sont pas tous bénins. *Médecine Science*. 3 (23) : 297-302.
- LEWIN B. 2004. *GENES VIII*. Prentice Hall. pp87-88.
- LITTEE K. 2016. Analyse descriptive de quatre patients beta-thalassémiques majeures avec un diagnostic neonatal : apport de la greffe de moelle osseuse allogénique intrafamiliale. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Bordeaux .pp34
- LODISH HF. 1976. Translational control of protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry* (45): 39-72.
- LOUTFI A, JACHE S, EL HIOUI M, KHATTAB M, AHAMI OT. 2015. Profil hématologique et nutritionnel chez les malades béta thalassémies majeur (BTM) au service d'hématologie et d'oncologie pédiatrique SHOP Hôpital d'enfant de Rabat, Maroc. *International Journal of Innovation and Scientific Research*. 2 (23) : 268-273.
- LUCARELLI G, ISGRO A, SODANI P, GAZIEV J. 2012. Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Thalassemia and Sickle Cell Anemia. *Management of the Thalassemias*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2-3.
- MANDI S, HORVAT V, MARCZI K, LUKIC I, GALIC J. 2014. Association Study of Cytochrome P450 1A1*2A Polymorphism with Prostate Cancer Risk and Aggressiveness in Croatians. *Collegium Antropol*. 38 (5) : 141-146.
- MANNING L, RUSSELL E, PADOVAN J, CHAIT B, POPOWICZ A, MANNING R, MANNING J. 2007. Human embryonic, fetal and adult hemoglobin's have different subunit interface strengths. Correlation with lifespan in the red cell. *Protein Science* (16): 1641-1658.
- MANOJ J, ABHAY SB, ASHOK P. 2013. Psychological problems in thalassemic adolescents and young adults. *Chronicles of Young Scientists*. 1 (4) : 21-23.
- MARINI MG, ASUNIS I, PORCU L, SALGO MG, LOI MG, BRUCCHIETTI A, CAO A, MOI P. 2004. The distal beta-globin CACCC box is required for maximal stimulation of the beta-globin gene by EKLF. *British Journal Of Haematology*. 127 (1): 114-117.
- MARIO N, SALA N. 2016. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies. *Revue Francophone des Laboratoires*. 481 : 35-47.

- MENG FD, MA P, SUI CG, TIAN X, JIANG YH. 2015. Association between cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and the risk of renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Scientific Reports*. 1.
- MERABET N. 2012. Association des polymorphismes génétiques du cytochrome P450 1A1 (CYP 1A1) et risque du cancer du sein. Thèse de magistère en Biologie Animale. Université Hadj Lakhdar Batna. pp 28-33.
- MURRAY, BENDER, BOTHAM, KENNELLY, RODWELL, WEIL. 2010. *Biochimie de Harper*. De Boeck Université. pp 45.
- MUSTAFA NY, MAROUF R, AL-HUMOOD S, AL-FADHLI SM, MOJIMINIVI O. 2010. Hypercoagulable state and methylenedihydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation in patients with beta-thalassemia major in Kuwait. *Acta Haematologica*. 123: 37-42.
- NOETZLI LJ, MITTELMAN SD, WATANABE RM, COATES TD, WOOD JC. 2012. Pancreatic iron and glucose dysregulation in thalassemia major. *American Journal of Hematology*. 87: 155-160.
- OLIVIERI NF, BRITTENHAM GM. 2013. Management of the Thalassemias. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 3 :1-11.
- PANDEY S, TRIPATHI A, TRIPATHI J, DUBEY S. 2016. CYP1A1 gene polymorphism among central Indian population and its genetic distribution. *International Journal of Scientific Reports*. 2 (1) : 13-17.
- PARASKEVAIDIS A, DRAKOULIS N, ROOTS I, ORFANOS CE, ZOUBOULIS CC. 1998. Polymorphisms in the Human Cytochrome P-450 1A1 Gene (CYP1A1) as a Factor for Developing Acne. *Dermatology*. 196: 171-175.
- PERRIMOND H. 2001. B-thalassémie- manifestations cliniques. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 94 (2) : 92-94.
- PICAUT C. 2006. Contribution à l'étude statistique de la formule leucocytaire manuelle chez le chien : effet frottis et effet observateur. Thèse de doctorat de vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE. pp19-21.
- PISSARD S, RACLIN V, LACAN P, GARCIA C, AGUILAR-MARTINEZ P, FRANCINA A, JOLY P. 2013. Characterization of three new deletions in the β -globin gene cluster during a screening survey in two French urban areas. *Clinica Chimica Acta*. 415: 35-40.

- RAHIMI Z, GHADERI M, NAGEL RL, MUNIZ A. 2008. Prevalence of thrombotic risk factors among beta-thalassemia patients from Western Iran. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 26 (3) : 229-233.
- RIBEIL JA, ARLET JB, DUSSIOT M, MOURA IC, COURTOIS G, HERMINE O. 2013. Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia. *The Scientific World Journal*. 5.
- ROBIEN K, ULRICH CM. 2003. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A HuGE Minireview. *American Journal of Epidemiology*. 7(157): 572.
- ROMDHANE H, AMRA H, ABDELKEFI S, SOUYEH N, CHAKROUN T, JARREY I, BOUSLA MA, BELHEDI S, HUOUISSA B, BOUGHAMMOURA L, JEMNI YACOUB S. 2014. Profil clinic-biologique et immunohématologique des patients atteints de beta thalassémies en Tunisie: à propos de 26 cas. *Transfusion clinique et pathologique*. 6 (21) : 309-313.
- RUND D, RACHMILEWITZ E. 2005. Beta-thalassemia. *The New England Journal of Medicine*. 353: 1135-1146.
- SALL A, TOURE AO, SENE A, DIATTA A, CISSE F, SECK M, FAYE B, DIOP S. 2014. Approche diagnostique par le phénotype de la beta-thalassémie hétérozygote à Dakar. *CAMES SANTE*. 1(2) : 41-44.
- SANDHYA RP, VIJAYAKUMAR S, KUMAR VG, CHANDANA N. 2013. β -Thalassemia- Mini Review. *International Journal of Pharmacology Research*. 2(3): 71-79.
- SANKARAN VG, XU J, BYRON R, GREISMAN HA, FISHER C, WEATHERALL DJ, SABATH D, GROUDINE M, ORKIN S, PREMAWARDHENA A, BENDER M. 2011. A functional element necessary for fetal hemoglobin silencing. *The New England Journal of Medicine*. 365: 807-814.
- SAYED SZ, ALY BA, ABD EL-HAKIM AA, OMAR SM, AMIN AS. 2013. The early cardiac involvement with β -thalassemia major. *The Egyptian Heart Journal*. 65 : 243-249.
- SCHECHTER AN. 2008. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* (112): 3927-3938.
- STEIGER A. 2012. Paramètres hématologiques de la béta-thalassémie. *Point de vue Hématologie* : 1-2.
- STEIGER A. 2015. Hémoglobinopathies. *Point de vue Hématologie* : 1.

- TAHER A, VICHINSKY E, MUSALLAM K, CAPPELLINI MD, VIPRAKASIT V. 2008. Guidelines for the clinical management of thalassemia. *Thalassemia International Federation*. pp1-120.
- TAHER A, VICHINSKY E, MUSALLAM K, CAPPELLINI MD, VIPRAKASIT V. 2013. Guidelines for the management of non-transfusion dependent Thalassemia (NTDT). *Thalassemia International Federation*. pp1.
- TENSAOUT F. 2017. Allogreffe des cellules souches hématopoïétiques dans la β -thalassémie majeure. Thèse de doctorat en science médicales. Université d'Alger. pp 4-12.
- THEIN SL. 2005. Genetic modifiers of β -thalassemia. *Haematologica*. 90 (5): 649-660.
- THUERT I. 2014. Prise en charge des béta-thalassémies. *La revue du praticien* (64) : 1132-1137.
- VINATIER I. 2006. Recommandations pour la mise en œuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine. *Laboratoire CERBA*. 10.
- WAHED A, DASGUPTA A. 2015. Hematology and coagulation. Elsevier. pp 55-61.
- WAJCMAN H. 2013. Hémoglobines : structure et fonction. *EMC Hématologie* (13) : 1-11.
- YAMEOGO P. 2009. Contribution à l'étude des paramètres hématologiques chez les femmes enceintes atteintes d'une Alpha thalassémie au centre médical SAINT CAMILLE DE OUAGADOUGOU. Mémoire de l'école doctorale régionale du RABiotech en Biotechnologie Microbienne et Cellulaire. pp10-11.
- ZALLOUA PA, SHBAKLO H, MOURAD YA, KOUSSA S, TAHER A. 2003. Incidence of thromboembolic events in Lebanese thalassemia intermedia patients. *Thrombosis and Haemostasis*. 89: 767-768.
- ZIDOUNE H. 2016. Facteurs de risque et polymorphisme T3801C du gène *CYP11A1* associés au cancer de la prostate. Mémoire de Master en Génétique Moléculaire. Université des Frères Mentouri Constantine. pp 22-24.

Annexe 1 : Protocole de la réalisation d'un frottis sanguin

La goutte de sang doit être étalée sur une lame porte-objet.

Matériel à disposition :

- Tube à hémolyse contenant du sang ; Pipette compte-gouttes ; 2 lames ; Gants ; Papier essuie-tout ; Feutre indélébile.

Protocole :

Etapas	Précisions
1 - Homogénéiser le sang	- Manipuler délicatement. - Attendre quelques instants après l'agitation avant d'ouvrir.
2 - Ouvrir le tube	- Saisir le bouchon avec un papier, poser le bouchon sur le papier.
3 - Déposer une goutte de sang à 1 cm de l'extrémité de la lame (1)	
4 - Faire glisser la seconde lame à étalement inclinée de 45° vers la goutte de sang jusqu'à la toucher (2).	
5 - Laisser s'étaler la goutte de sang le long de l'arête de la lame à étalement (3).	
6 - Glisser la lame en tirant ou en poussant : tout le sang doit être étalé avant d'atteindre l'autre extrémité de la lame (4).	
7 - Sécher le frottis par agitation dans l'air.	- Le séchage doit être rapide afin d'éviter que les cellules ne se rétractent.
8 - Marquer la lame au feutre, côté frottis.	

Coloration d'un frottis sanguin

La reconnaissance des différentes cellules du sang nécessite une coloration du frottis par le MGG :

Matériel : - La lame de frottis ; Bac de coloration inox + barrettes de support ; Flacons compte-gouttes ; Papier essuie-tout ; Eau distillée ; Un bécher 100mL pour prélever de l'eau distillée au compte-gouttes ; Colorants (MGG) ; Cristalliseur pour la récupération des eaux de rinçage.

Etapas	Manipulations	Durées d'action
1 - Coloration au May - Grünwald	- a : Placer la lame du frottis sur les barrettes de support horizontal d'un bac de coloration. - b : Recouvrir le frottis de 15 gouttes de colorant.	3 minutes
2 - Coloration au May – Grünwald (suite)	- c : Ajouter 15 gouttes d'eau distillée.	2 minutes
3 - Coloration au Giemsa	- a : Eliminer le May – Grünwald sous un faible courant d'eau distillée. - b : Déposer 2 gouttes de Giemsa puis 20 gouttes d'eau distillée	10 minutes
Séchage	- a : Rincer par un faible jet d'eau distillée. - b : Laisser sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure avec du papier essuie-tout.	Au moins 5 minutes

Annexe 2 : Questionnaire

Date :

Numéro (code) :

Nom:

Prénom:

Age :

Adresse:

Diagnostique:

Age du diagnostique:

L'électrophorèse de l'Hb:

A1%:

A2 %:

F%:

Bilan hématologique:

Hb:

GR:

Ht:

VGM:

TCMH:

CCMH:

L'électrophorèse d'Hb des parents:

Père: A1:

A2%:

F%:

Mère : A1%:

A2%:

F%:

L'enquête familiale:

Consanguinité des parents :

degré:

Lien de parenté des parents :

Nb d'enfants par famille:

Nb d'enfants atteints par famille:

Nb d'enfants atteints par grande famille :

Lien de parenté avec les enfants atteints dans la grande famille (cousin, tante maternelle, oncle paternel) :

Nombre des antécédents familiaux:

Nombre des décès:

Annexe 3 : Protocole de l'extraction de l'ADN à l'NaCl

I. Principe :

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260nm sur la DO à 280nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1,5 à 2. (Miller S.A, Dykes D.D. et Polesky H.F. (1988) Nucleic acid research 16(3) 1215).

II. Préparation des leucocytes :

1. Dans un tube falcon de 50ml, mettre le sang et compléter à 25ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.
2. Centrifuger 10min à 3900g (3800rpm).
3. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide.
4. Ajouter quelques ml de TE (20 :5) au culot et le remettre en suspension avec une pastette stérile.
5. Compléter à 25ml du TE 20 :5 et laisser 10min dans la glace.
6. Centrifuger dans les mêmes conditions que la première fois.
7. Aspirer le surnageant avec la trompe à vide : Obtention d'un culot des leucocytes (sion veut s'arrêter à ce niveau les mettre dans un tube nunc de 1,5ml avec du TE 10 : 1 et les conserver à - 20°C dans le réfrigérateur).

III. Extraction de l'ADN :

1. Transvaser le culot de leucocytes dans un tube Falcon de 15ml.
2. Ajouter 3ml de tampon de lyse (NaCl 400mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, pH 8,2) en dilacérant le culot avec une pastette stérile.
3. Ajouter 200µl de SDS à 10%.
4. Ajouter 100µl de protéinase K à 10mg/ml.
5. Agiter le tube sur une roue à 37°C une nuit.
6. Le lendemain, refroidir dans la glace.
7. Ajouter 1ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main.
8. Remettre 5min dans la glace (précipitation des protéines).
9. Centrifuger 15min à 2500rpm.

10. Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 15ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : La pelote d'ADN se forme.

11. Laisser éventuellement 30min à -20°C si la pelote ne se forme pas.

12. Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette Pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%.

13. Mettre la pelote dans un tube nunc.

IV. Solubilisation :

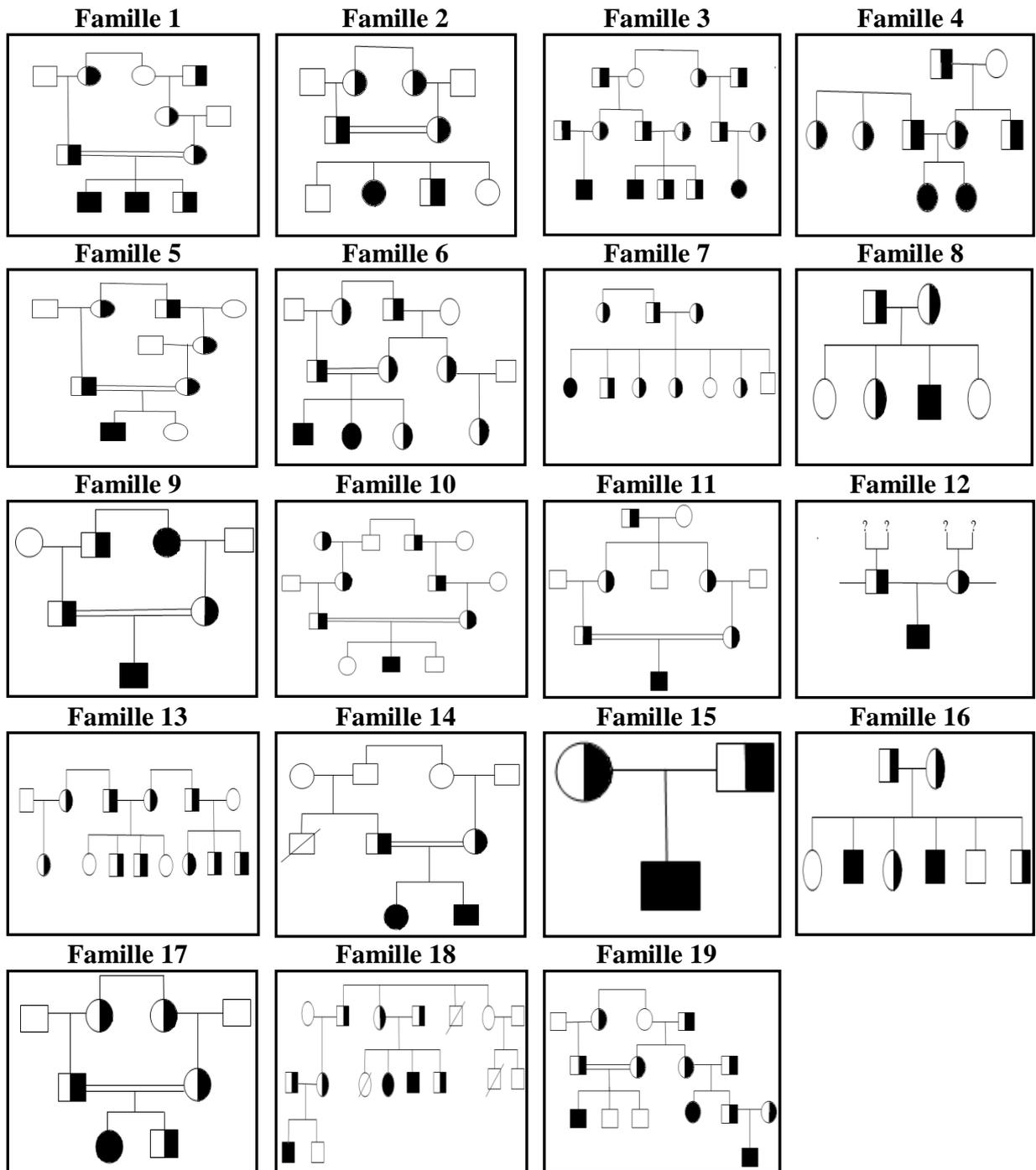
1. Ajouter entre 300 et 1000µl de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.

2. Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

Annexe 4 : Normes d'hémogramme utilisées au laboratoire d'hémiologie de l'HMRUC

Paramètres	Normes
GR	3.83 – 5.08 $10^6/\mu\text{L}$
Hb	11.7 – 15.5 g/dl
VGM	80.4 – 95.9 fL
CCMH	32.5 – 35.2 g/dl

Annexe 5 : Arbres généalogiques



Résumé

La β -thalassémie est une anémie hémolytique héréditaire, sa fréquence en Algérie est de 3%. Ce travail est une étude rétrospective transversale portant sur des cas de β -thalassémies suivis au sein du service de Pédiatrie du HMRUC, sur une période de 3 mois, allant de Mars à Mai 2017.

Notre objectif est d'étudier à travers ces patients, d'une part, les aspects épidémiologiques et para-cliniques de la β -thalassémie, et d'autre part, une étude génétique en recherchant par RFLP-PCR d'éventuelles associations entre les polymorphismes T3801C du *CYP1A1* et C677T de la *MTHFR* et la β -thalassémie.

Nous avons colligé durant cette période 36 cas de β -thalassémies âgés entre 3 mois et 10 ans avec une moyenne de 1.9 ans et un sexe ratio (M/F) de 2.25. Les parents sont consanguins dans 55,56% des cas. Les enfants ont un antécédent familial de thalassémie dans 64 % des cas. L'hémogramme a été marqué par une pseudo-polyglobulie et une anémie microcytaire hypochrome chez les porteurs de trait thalassémiques et une diminution du nombre de globules rouges et une anémie microcytaire sévère chez les patients atteints de formes sévères. L'électrophorèse de l'hémoglobine a objectivé une β -thalassémie hétérozygote dans 11 cas (30.55%) et une β -thalassémie homozygote dans 25 cas (69.44%).

L'analyse statistique des résultats préliminaires des génotypes moléculaires, représentée par l'Odds ratio et la *p-value*, indique l'absence d'association entre les polymorphismes, C677T de la *MTHFR* et T3801C du *CYP1A1* et la β -thalassémie. Cependant, la taille de l'échantillon ne permet pas d'infirmier ou de confirmer avec certitude la présence ou l'absence de cette association.

Mots clés : β -thalassémie, anémie, polymorphisme, MTHFR, CYP1A1, RFLP-PCR.

Summary

The β -thalassemia is an hereditary hemolytic anemia, its frequency in Algeria is 3%. This work is a retrospective cross-sectional study of cases of β -thalassemia followed in the pediatric department of the HMRUC, over a period of 3 months, from March to May 2017.

Our aim is to study the epidemiological and para-clinical aspects of β -thalassemia and, on the other hand, a genetic study using RFLP-PCR for possible associations between T3801C polymorphisms of CYP1A1 and C677T of MTHFR and β -thalassemia.

We collected 36 cases of β -thalassemias aged between 3 months and 10 years with an average of 1.9 years and a sex ratio (M / F) of 2.25. Parents are consanguineous in 55.56% of the cases. Children have a family history of thalassemia in 64% of cases. The hemogram was marked by pseudopolyglobulia and hypochromic microcytic anemia in thalassemic trait carriers and a decrease in the number of red blood cells and severe microcytic anemia in patients with severe forms. Hemoglobin electrophoresis revealed heterozygous β -thalassemia in 11 cases (30.55%) and homozygous β -thalassemia in 25 cases (69.44%).

Statistical analysis of the preliminary results of molecular genotyping, represented by the odds ratio and the p-value, indicates the absence of association between polymorphisms, MTHFR C677T and CYP1A1 T3801C and β -thalassemia. However, the size of the sample does not make it possible to invalidate or to confirm with certainty the presence or absence of this association.

Key word: β -thalassemia, anemia, polymorphism, MTHFR, CYP1A1, PCR-RFLP.

ملخص

الثلاسيميا و تسمى أيضا فقر الدم البحري β هو فقر الدم الانحلالي الوراثي، تردها في الجزائر 3٪. هذا العمل هو دراسة استيعادية مستعرضة حالات β -الثلاسيميا المتبعة في خدمة طب الأطفال بالمستشفى الجامعي الجهوي العسكري بقسنطينة ، على مدى ثلاثة أشهر، من مارس حتى ماي، 2017. هدفنا هو دراسة من خلال هؤلاء المرضى، من جهة، الجوانب الوبائية و الشبه سريرية من β -الثلاسيميا، ومن جهة أخرى، دراسة وراثية من خلال البحث بتقنية RFLP-PCR عن الارتباطات المحتملة بين تعدد الأشكال T3801C من CYP1A1 و C677T من MTHFR و β -الثلاسيميا. جمعنا خلال هذه الفترة 36 حالة من حالات β -الثلاسيميا الذين تتراوح أعمارهم بين 3 أشهر و 10 عاما بمتوسط 1.9 سنوات ونسبة الجنس 2.25 (M / F). نجد زواج القرابة بين الوالدان في 55.56٪ من الحالات. الأطفال لديهم أقارب مصابين بمرض الثلاسيميا في 64٪ من الحالات. تقنية تعداد الدم تميزت بفقر الدم مصحوب بنقص الانصبغ و صغر حجم الكريات الحمراء عند متخالفة الثلاسيميا، و فقر دم حاد مصحوب بصغر حجم الكريات الحمراء و نقص شديد في عدد الكريات الحمراء عند المرضى الذين يعانون من أشكال حادة. الفصل الكهربائي للهيموغلوبين تمكن من تشخيص 11 حالة (30.55٪) لمتخالفة β -الثلاسيميا و 25 حالة (69.44٪) متماثلة الثلاسيميا. التحاليل الإحصائية للنتائج البدائية لتحديد النمط الوراثي الجيني الجزيئي الذي قدمه نسبة الاحتمالات وذات قيمة ص، تدل على عدم وجود علاقة بين الأشكال (CYP1A1T3801C و C677T MTHFR) و β -الثلاسيميا. ومع ذلك، فإن حجم العينة لا يسمح بدحض أو تأكيد بيقين وجود أو عدم وجود هذه العلاقة.

الكلمات المفتاحية: β -الثلاسيميا، فقر الدم، تعدد الأشكال، MTHFR، CYP1A1، PCR-RFLP

Profils génétique et hématologique des β -thalassémies dans l'Est Algérien

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

La β -thalassémie est une anémie hémolytique héréditaire, sa fréquence en Algérie est de 3%. Ce travail est une étude rétrospective transversale portant sur des cas de β -thalassémies suivis au sein du service de Pédiatrie du HMRUC, sur une période de 3 mois, allant de Mars à Mai 2017.

Notre objectif est d'étudier à travers ces patients, d'une part, les aspects épidémiologiques et para-cliniques de la β -thalassémie, et d'autre part, une étude génétique en recherchant par RFLP-PCR d'éventuelles associations entre les polymorphismes T3801C du *CYP1A1* et C677T de la *MTHFR* et la β -thalassémie.

Nous avons colligé durant cette période 36 cas de β -thalassémies âgés entre 3 mois et 10 ans avec une moyenne de 1.9 ans et un sexe ratio (M/F) de 2.25. Les parents sont consanguins dans 55,56% des cas. Les enfants ont un antécédent familial de thalassémie dans 64 % des cas. L'hémogramme a été marqué par une pseudo-polyglobulie et une anémie microcytaire hypochrome chez les porteurs de trait thalassémiques et une diminution du nombre de globules rouges et une anémie microcytaire sévère chez les patients atteints de formes sévères. L'électrophorèse de l'hémoglobine a objectivé une β -thalassémie hétérozygote dans 11 cas (30.55%) et une β -thalassémie homozygote dans 25 cas (69.44%).

L'analyse statistique des résultats préliminaires des génotypages moléculaires, représentée par l'Odds ratio et la *p-value*, indique l'absence d'association entre les polymorphismes, C677T de la *MTHFR* et T3801C du *CYP1A1* et la β -thalassémie. Cependant, la taille de l'échantillon ne permet pas d'infirmer ou de confirmer avec certitude la présence ou l'absence de cette association.

Mots clefs : β -thalassémie, anémie, polymorphisme, MTHFR, CYP1A1, RFLP-PCR.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'hémobiologie du HMRUC

Laboratoire de Biologie et génétique Moléculaire du CHUC

Laboratoire de biologie moléculaire de la faculté SNV, UPMC

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHETTOUM Aziz (MCA - UFM Constantine1).

Rapporteur : BECHKRI Sakina (MCB - UFM Constantine 1),

Examineur : REZGOUNE Mohamed Larbi (MCB - UFM Constantine 1),

Date de soutenance : 04/07/2017