

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 Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : *Génétique moléculaire*

N° d'ordre :
N° de série :

Intitulé :

**Profils épidémiologique, hématologique et génétique de β -thalassémiques
et de drépanocytaires, dans la région de Constantine**

Présentée et soutenue par : BENARIBA Samah

Le 02/07/2018

SAADA KHELKHAL Selma

Jury d'évaluation :

Président : CHELLAT Djalila (MCA- Université Frères Mentouri Constantine 1).

Encadreur : BECHKRI Sakina (MCB - Université Frères Mentouri Constantine 1).

Examineur : CHETTOUM Aziz (MCA - Université Frères Mentouri Constantine 1).

**Année universitaire
2017 - 2018**

Remerciements

En tout premier lieu, nous tenons à remercier ALLAH qui nous aide et nous donne la force, la volonté, la patience et le courage durant ces longues années d'étude pour accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance et nos remerciements à notre encadreur Madame **BECHKRI Sakina**, maître de conférences B à l'Université frères Mentouri Constantine 1, pour son aide, ses conseils pertinents, sa confiance, sa gentillesse, son respect, amabilité et patience ont permis à notre travail d'aboutir et de voir le jour.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury, pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche, en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions :

Nous remercions Madame **REZGOUNE-CHELLAT Djalila**, maître de conférences A à l'Université frères Mentouri Constantine 1, pour son précieuse aide lors de la réalisation de la partie pratique et nous sommes très fiers de vous avoir comme présidente de jury.

Nous tenons à remercier Monsieur **CHETTOUM Aziz**, maître de conférences A à l'Université frères Mentouri Constantine 1, de nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail.

Nous remercions aussi le personnel de la pédiatrie EHS mère-enfant, pour toute l'aide qu'il nous a apporté. Ainsi, la doctorante **MAGRA Khawla** de la CRBT, qui nous a apporté son assistance en nous fournissant les produits dont nous avons besoin pour la réalisation de notre projet.

Sincères remerciements à Madame le Professeur **SATTA Dalila**, Monsieur **REZGOUNE Mohamed Larbi** et tous les enseignants qui nous ont enseignés. Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire de Master.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents **SALAH** et **HAYETTE**. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur maman que j'adore.

A celui qui j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce travail :

*Chers frères **AHMED** et **MOHAMED NAIL**, mes chères sœurs **KHAOULA**, **MERIEM**, **CHAHINEZ** et **SAMAH** et mes cousines **ZAYNEB** et **RAYEN***

*Mes trésors : mon neveu **ABD EL NOUR** et ma nièce **MAISS** et mon oncle **ABD EL HAK***

*Mes chères copines : **RAYEN**, **SARA**, **LEILA**, **ISMAHANE**, **RYM**, **BOUTEINA**, **NESRINE**, **RADJA**, **SABRINA**, **AMINA***

*Ma sœur et binôme **SAMAH** que dieu te garde*

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

*A toute la famille **Saada khelkhal** et **Lakehal***

selma

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes chers parents **MAAMER** et **FARIDA**. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur maman que j'adore.

A celui qui j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce travail :

*Chers frères **AMINE**, **ABD ELDJALIL** et **MOHAMED TAKI EDDINE**, mes chères sœurs **SELMA**, **LEILA** et **WISSEM** et mes cousines **IBTIHEL**, **SADIL**.*

*Mes chères copines : **SAWSEN**, **SABRINA**, **RADJA**, **NESRINE**, **IBTISSEM**.*

*Ma sœur et binôme **SELMA** que dieu te garde*

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

*A toute la famille **BENARIBA** et **MEGHLAOUI***

Samah

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 de l'hémoglobine..... 3

IV- L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines..... 3

V- Gènes des globines..... 4

VI- La régulation de la transcription des gènes de la globine..... 6

VII- La régulation traductionnelle..... 7

VIII- La régulation équilibrée des deux loci de globine..... 8

IX- Les hémoglobinopathies..... 8

Chapitre 2: La β -thalassémie

I- Présentation..... 9

II- Histoire de la β -thalassémie..... 9

III- Epidémiologie..... 10

IV- Classification des syndromes β -thalassémiques..... 10

V- Complications de la β -thalassémie..... 11

VI- Physiopathologie de la β -thalassémie..... 12

VII- Génétique de la β -thalassémie..... 13

VIII- Diagnostic 16

IX- Traitements des β -thalassémies..... 18

X- Conseil génétique..... 19

Chapitre 3: La drépanocytose

I- Présentation..... 20

II- Histoire de la drépanocytose..... 20

III- Epidémiologie..... 20

IV- Classification des syndromes drépanocytaires 21

V- Les hémoglobinopathies associées à la drépanocytose..... 22

VI- Complication de la drépanocytose.....	23
VII- physiopathologie de la drépanocytose.....	23
VIII- Génétique de la drépanocytose.....	24
IX- L'effet modulateur de la drépanocytose.....	26
X- Diagnostic biologique de la drépanocytose.....	27
XI-Le traitement de la drépanocytose.....	28
XII-Prise en charge de la drépanocytose.....	29
XIII-Conseil génétique.....	30

Chapitre 4 : Le polymorphisme génétique

I- Le polymorphisme génétique.....	31
II- Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase (MTHFR).....	31
II-1- Structure et localisation du gène MTHFR.....	31
II-2- Structure et fonction de la protéine MTHFR.....	31
II-3- Les polymorphismes du gène MTHFR.....	32
II-4- Le polymorphisme C677T.....	32
II-5- Le polymorphisme du gène MTHFR et la β -thalassémie.....	32
II-6- Le polymorphisme du gène MTHFR et la drépanocytose.....	33

Deuxième partie: Matériels et méthodes

I- Patients.....	34
I-1- Lieu et durée du stage.....	34
I-2- Recrutement.....	34
I-3- Critères d'inclusion / exclusion.....	34
II- Méthodes.....	34
II-1- Questionnaire.....	34
II-2- prélèvement sanguin.....	35
II-3- Hémogramme.....	35
II-4- Frottis sanguin.....	35
II-5- Electrophorèse.....	35
II-6- Arbres généalogiques.....	35
II-7- Extraction de l'ADN.....	36
II-8- Génotypage du polymorphisme C677T du MTHFR.....	36
II-8-1- La PCR.....	36

Troisième partie : Résultats et discussions

I- Résultats.....	40
-------------------	----

I-1- Caractéristiques épidémiologiques.....	40
I-1-1- Age des patients.....	40
I-1-2- Sexe des patients.....	40
I-1-3- Origine des patients.....	41
I-2- Consanguinité et antécédents familiaux.....	41
I-3- Signes cliniques de la découverte des maladies.....	41
I-4- Profil hématologique.....	42
I-4-1- Hémogramme des patients β -thalassémiques.....	43
I-4-2- Hémogramme des patients drépanocytaires.....	43
I-4-3- Hémogramme des patients thalasso-drépanocytaires.....	43
I-5- Electrophorèse de l'hémoglobine.....	44
I-6- Frottis sanguin	45
I-7- Arbres généalogiques.....	47
I-8- Profil génétique.....	48
I-8-1- Résultats de la PCR.....	48
I-8-1-1- Profil électrophorétique du polymorphisme C677T du MTHFR	48
I-8-1-2- Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène MTHFR	49
II- Discussions.....	50
II-1- Répartition selon l'âge du diagnostic.....	50
II-2- Répartition selon le sexe.....	50
II-3- Répartition de la population par région.....	50
II-4- Le taux de consanguinité chez les patients	50
II-5- Signes cliniques de la découverte des maladies	51
II-6- Profils hématologique et électrophorétique des patients.....	51
II-6-1- β -thalassémiques.....	51
II-6-2- Drépanocytaires	51
II-6-3- Association thalasso-drépanocytaires	52
II-7- Frottis sanguin.....	52
II-8- Arbres généalogiques.....	52
II-8-1- Arbres généalogique d'une famille représentative de la β -thalassémie.....	52
II-8-2- Arbres généalogique d'une famille représentative de la drépanocytose.....	52
II-9- Profils génotypiques.....	53
II-9-1- Résultats de la PCR.....	53

Conclusion et perspective.....	54
Références bibliographiques	55
Annexes	
Résumé	

Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
AHSP:	α -Hemoglobin Stabilising Protein
AP2:	Activation Protein2
Arg:	Arginine
ARNm:	Acide Ribonucléique Messenger
β-TI:	Béta Thalassémie Intermédiaire
β-TM:	Béta Thalassémie Majeure
CCMH:	Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CHU:	Centre Hospitalo-Universitaire
CRBT:	Centre National de Techerche en Biotechnologie
CVO:	Crise Vaso-Oclusive
CSH:	Cellule Souche Hématopoïétique
DFP:	Défériprone
DFO:	Deferroxamine
DFX:	Déférasirox
dNTP:	désoxyribonucléotides Triphosphates
EDTA:	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
FAD:	Flavine Adenine Dinucléotide
Glu:	Glutamine
GR:	Globule Rouge
Hb:	Hémoglobine
HbA:	Hémoglobine Adulte
HbC:	Hémoglobine C
HbE:	Hémoglobine E
HLA:	Human Leucocyte Antigen.
HbF:	Hémoglobine foétale
HbS:	Hémoglobine S
HCT:	Hématocrite
Hinf I:	Haemophilus influenzae I
HPLC:	Chromatographie en Phase liquide haute performance
GvH:	Greffon contre l'Hôte
KD:	Kilo Dalton
LCR:	Locus Control Region

Lys:	Lysine
MGG:	May Grünwald Giemsa
MTHFR:	Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase
NADPH:	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
Pb:	Paire de base
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PCR/RFLP:	Polymerase Chain Reaction /Restriction Fragment Length Polymorphism
pH:	Potentiel Hydrogène
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAM:	S adenosyl-L méthionine
SDM:	Syndrome Drépanocytaire Majeur
Taq:	Thermophilus Aquaticus
TCMH:	Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
UTR:	Untranslated Transcribed Region
VGM:	Volume Globulaire Moyen

Liste des figures

Figure 1: Représentation d'une molécule tétramérique de l'hémoglobine adulte normale.....	2
Figure 2: Sites d'érythropoïèse et expression des chaînes de globine du stade embryonnaire au stade adulte.....	3
Figure 3: Organisation des gènes des chaînes α -globine.....	5
Figure 4: Organisation des gènes des chaînes β -globine.....	6
Figure 5: Les éléments structuraux appartenant aux régions promotrices des différents gènes de la globine.....	6
Figure 6: Répartition de la β -thalassémie dans l'ancien monde.....	10
Figure 7: Conséquences de l'excès de production de chaînes d' α -globines libres dans la β - Thalassémie.....	12
Figure 8: Mode de transmission de la β -thalassémie.....	13
Figure 9: Les différents types de mutations β -thalassémiques.....	14
Figure 10: Distribution historique et contemporaine de la drépanocytose.....	21
Figure 11: Mode de transmission de la drépanocytose.....	24
Figure 12: Mutation génétique conduisant à la drépanocytose.....	26
Figure 13: Haplotypes étendus des chromosomes drépanocytaires.....	27
Figure 14: Localisation du gène <i>MTHFR</i> sur le chromosome 1.....	31
Figure 15: Site de restriction de l'enzyme <i>HinfI</i>	38
Figure 16: Répartition des patients selon l'âge du diagnostic des trois maladies.....	40
Figure 17: Répartition des patients selon leur âge.....	40
Figure 18: Répartition des patients selon le sexe.....	40
Figure 19: Répartition des patients selon leur origine.....	41
Figure 20: Le pourcentage de patients issus d'un mariage consanguin et non consanguin....	41
Figure 21: Répartition des patients selon le degré de consanguinité.....	42
Figure 22: Répartition des patients selon leurs antécédents familiaux.....	42
Figure 23: Signes cliniques de la découverte des maladies.....	42
Figure 24: Représentation schématique des profils électrophorétiques de trois Hémoglobinopathies	44
Figure 25: Frottis sanguin (MGG x 400).....	46
Figure 26: Cellules du frottis sanguin d'un β -thalassémique (MGG x400).....	46
Figure 27: Cellules du frottis sanguin d'un drépanocytaire (MGG x400).....	47
Figure 28: Cellules du frottis sanguin d'un thalasso-drépanocytaire (MGG x400).....	47

Figure 29: Arbre généalogique de la famille représentative de la β -thalassémie.....	47
Figure 30: Arbre généalogique de la famille représentative de la drépanocytose.....	48
Figure 31: Contrôle PCR du polymorphisme C677T de la MTHFR.....	48
Figure 32: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des fragments après digestion par l'enzyme <i>HinfI</i>	49

Liste des tableaux

Tableau 1: Différentes hémoglobines exprimées au cours de la vie.....	4
Tableau 2: Risque d'atteinte des enfants en fonction du génotype des parents.....	25
Tableau 3: Composants du mélange réactionnel de PCR.....	37
Tableau 4: Profil thermique de la PCR.....	38
Tableau 5: Paramètres d'hémogramme des enfants β -thalassémiques.....	43
Tableau 6: Paramètres d'hémogramme des enfants drépanocytaires.....	43
Tableau 7: Paramètres d'hémogramme des enfants thalasso-drépanocytaires.....	44
Tableau 8: L'électrophorèse de l'hémoglobine d'un enfant β -thalassémique et ses parents..	45
Tableau 9: L'électrophorèse de l'hémoglobine d'un enfant drépanocytaire et ses parents....	45
Tableau 10: L'électrophorèse de l'hémoglobine d'un enfant atteint de l'association thalasso-drépanocytose et ses parents.....	45

Introduction

Les thalassémies et les drépanocytoses sont des hémoglobinopathies représentant la catégorie la plus fréquente des troubles héréditaires. Elles sont causées par un défaut de la synthèse des chaînes de globine qui participent à la formation des hémoglobines.

La β -thalassémie est le résultat d'une diminution ou de l'absence totale de fabrication d'une des chaînes (α ou β). Elle est caractérisée par un nombre élevé de mutations qui sont majoritairement de nature ponctuelle. Lorsque le déficit touche la chaîne β , il s'agit d'une β -thalassémie. Lorsque le déficit concerne les chaînes α , on parle de l' α -thalassémie (Litte 2016). La drépanocytose se caractérise par une anomalie de l'hémoglobine S, où la mutation causale est unique. Ceci aboutit à la déformation des globules rouges qui apparaissent en forme de faucille (Deguelle 2014).

Ces deux maladies deviennent un problème de santé publique en Algérie. Leur transmission est autosomique récessive, elles sont asymptomatiques à l'état hétérozygote, mais une anémie plus ou moins sévère avec des complications peut apparaître chez les homozygotes.

Les objectifs de notre travail sont:

- Mettre à jour les données de littérature, surtout en ce qui concerne la génétique des deux maladies, et spécialement l'implication de la MTHFR et du polymorphisme dans les deux maladies.
- Caractériser des critères familiaux, hématologiques, biologiques et biochimiques des patients atteints de la β -thalassémie, de drépanocytose ainsi que de thalasso-drépanocytose.
- Procéder à une initiation de la biologie moléculaire en réalisant une extraction de l'ADN à partir du sang des patients concernés et une recherche par RFLP-PCR d'une association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR de la β -thalassémie et la drépanocytose.

Notre mémoire est structuré de la manière suivante :

- Une introduction
- Une revue de littérature
- Matériel et méthodes
- Résultats et discussion
- Conclusion

**Revue
de littérature**

Chapitre 1:

L'hémoglobine

I- Présentation

L'hémoglobine est la protéine majoritaire des globules rouges du sang. Elle constitue le pigment rouge qui donne aux érythrocytes leur coloration. La production de l'hémoglobine se fait dans les jeunes globules rouges au niveau de la moelle osseuse; sa synthèse est stimulée par une hormone appelée érythropoïétine. La valeur normale de l'hémoglobine dans le sang est de 14-18 g/dl (Quiraouani 2015).

II- Structure des hémoglobines

La molécule de l'hémoglobine est un tétramère de poids moléculaire de 64500 dalton, elle est formée d'une partie protéique « la globine » et d'un groupement prosthétique « l'hème » (Figure1). La partie protéique est constituée de 4 chaînes polypeptidiques de globines semblables deux à deux (deux chaînes α constituées chacune de 141 acides aminés et de deux chaînes β composées de 146 acides aminés). Chaque chaîne est caractérisée par une conformation spatiale qui lui confère une forme globuleuse, ménageant une poche superficielle dans laquelle se trouve l'hème qui est un anneau ayant en son centre un atome de fer capable de lier jusqu'à 4 molécules d'oxygène de façon réversible (Montalembert et Couque 2013; Pierre et Bernard 2017).

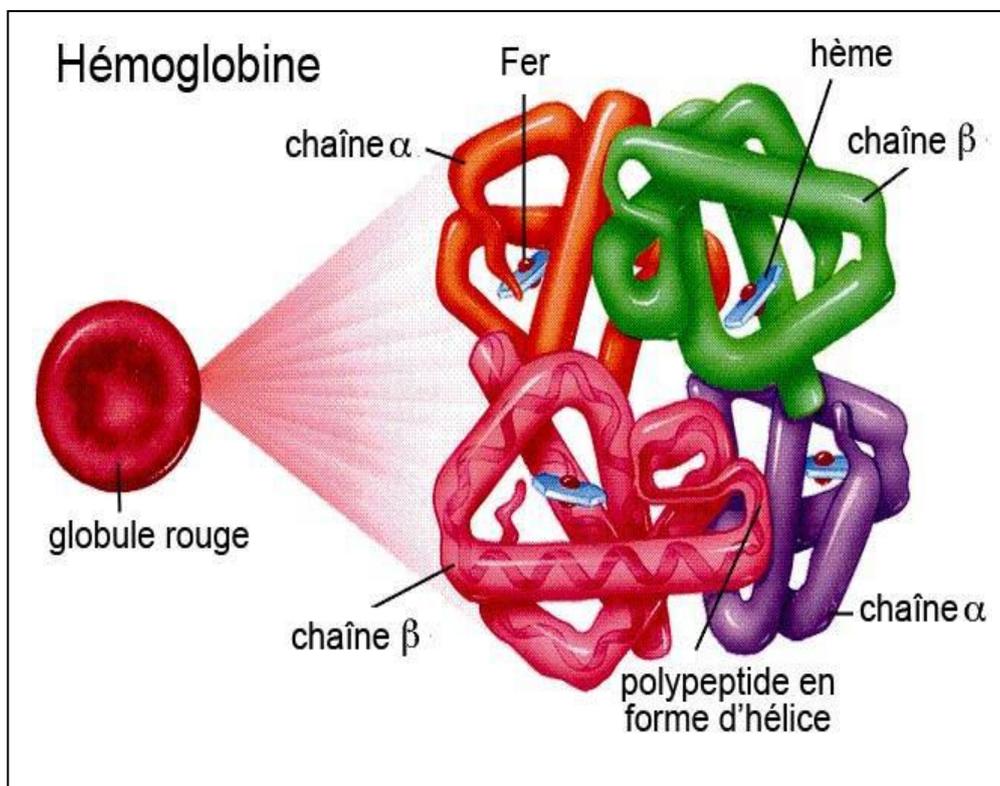


Figure 1: Représentation d'une molécule tétramérique $\alpha_2\beta_2$ de l'hémoglobine adulte normale (El Kamah et Amr 2015).

III- Rôle de l'hémoglobine

Le rôle de l'hémoglobine consiste à transporter l'oxygène dans le sang à partir des poumons vers le reste du corps, pour ainsi préserver les fonctions vitales et capter le CO₂ des tissus et des organes afin de le ramener aux poumons pour pouvoir l'éliminer. D'autre part, l'hémoglobine joue également un rôle dans le transport des ions H⁺ pour le maintien du pH sanguin (Aroud 2016).

IV- L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines

Plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie, et à tout moment, il en existe plusieurs simultanément (Figure 2). Ces hémoglobines se distinguent par la nature des sous unités qui les constituent. Au cours de l'évolution ontogénique, le profil des hémoglobines change deux fois, La première de ces commutations « Switch » coïncide avec le passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale, la seconde avec celui de la vie fœtale à la vie adulte. De même, la proportion relative des Hb évolue en fonction du changement de lieu de l'érythropoïèse au cours des étapes successives de la vie (Ilougbad 2014).

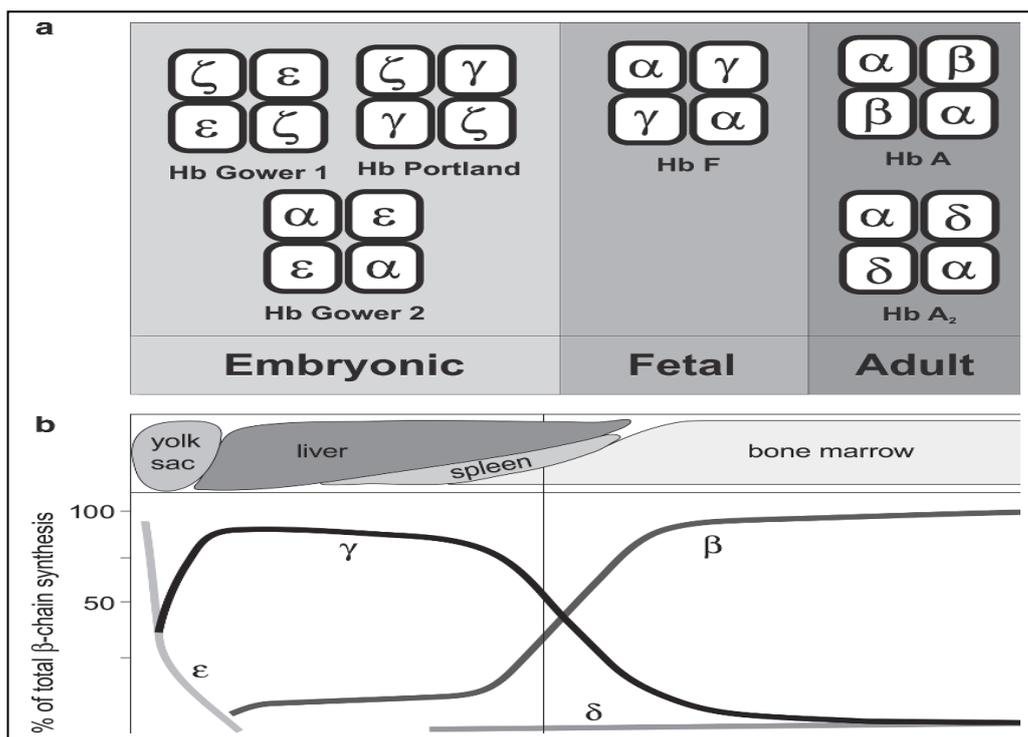


Figure 2: Sites d'érythropoïèse et expression des chaînes de globine du stade embryonnaire au stade adulte (Djemaa 2013).

Le tableau 1 représente les différents types d'hémoglobines ainsi que leurs proportions relatives

Tableau 1 : Différentes hémoglobines exprimées au cours de la vie (Djeddi et Benameur 2017).

Age	Types d'hémoglobines rencontrées	Proportion des différentes hémoglobines	Chaînes de globine	Lieu de synthèse
Adulte	Hb A	97 %	$\alpha_2\beta_2$	La moelle osseuse
	Hb A2	2,2 – 3,2 %	$\alpha_2\delta_2$	
	Hb F	< 1 %	$\alpha_2\gamma_2$	
Fœtus	Hb F	80 – 95 %	$\alpha_2\gamma_2$	Le foie et de la rate
	Hb A	5 – 20 %	$\alpha_2\beta_2$	
Embryon	Hb Gower 1		$\xi_2\varepsilon_2$	Le sac vitellin
	Hb Gower 2		$\alpha_2\varepsilon_2$	
	Hb Portland		$\xi_2\gamma_2$	

- L'hémoglobine embryonnaire: présente pendant les 3 premiers mois de la gestation, 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: $\alpha_2\gamma_2$), détectable à partir de la 5ème semaine de la vie intra-utérine, et représente le constituant principal de la période fœtale.

- L'hémoglobine adulte: (HbA: $\alpha_2\beta_2$), remplace l'hémoglobine fœtale peu de temps après la naissance avec un composant minoritaire adulte (HbA2: $\alpha_2\delta_2$) (Yacouba 2015).

V- Gènes des globines

V-1- Structure et famille des gènes des globines

Les gènes de la globine ont la même structure chez toutes les espèces, ils sont organisés sur le même modèle à 3 exons séparés par deux introns, et ils dérivent par duplications successives d'un ancêtre commun existant il y a environ 450 millions d'années. L'ordre des gènes de 5' en 3', au sein de chaque complexe reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse. La structure des gènes de la globine présente un degré de similitude qui ne peut être dû au hasard. Les globines sont donc des protéines homologues ainsi que les gènes qui les

codent. Les gènes des globines forment une famille multi-génique (cluster): le cluster alpha et le cluster bêta (Hardison 2012; Greene *et al.* 2015).

V-2- Localisation des gènes de l'hémoglobine

Les gènes de la famille α -globine sont situés sur le bras court du chromosome 16 proche de la région télométrique (16p13.3), et ceux de la famille β -globine sur l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 (11p15.5) (Joly *et al.* 2014).

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

Le cluster alpha (Figure 3) comporte trois gènes fonctionnels: un gène embryonnaire (ζ) et deux gènes exprimés dès la vie fœtale ($\alpha 1$ et $\alpha 2$). En amont des gènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, se situent 4 régions non codantes hautement conservées: MCS-R1, MCS-R2, MCS-R3, MCS-R4 qui contrôleraient l'expression des gènes du cluster alpha. Actuellement, seul MCS-R2 a été démontré comme essentiel à l'expression des gènes α . Ce cluster ne subit qu'une seule transition ou «Switch» d'expression de gènes, ζ vers α , qui a lieu dès la 6ème semaine de vie embryonnaire (Elion *et al.* 2016).

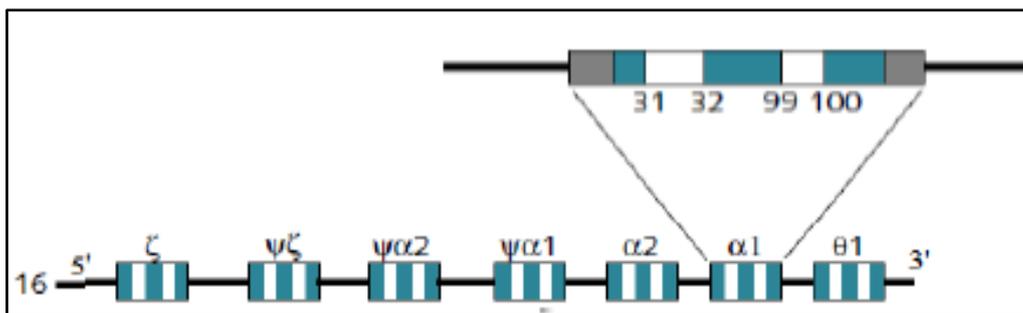


Figure 3 : Organisation des gènes des chaînes α -globine
(Djeddi et Benameur 2017).

V-4- La famille des gènes des chaînes β -globine

Le cluster bêta (Figure 4) comporte 5 gènes fonctionnels: un gène embryonnaire (ϵ), deux gènes fœtaux (γ et $A\gamma$) et deux gènes adultes (δ et β). De façon similaire à la famille des gènes α , en amont des gènes se situe le LCR (Locus Control Region) qui joue 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. Ce cluster est le siège de deux « switch » consécutifs: le premier de ϵ vers γ a lieu précocement durant la vie embryonnaire, le second de γ vers δ et β , beaucoup plus tardif commence à la fin de la vie fœtale. Ce dernier, responsable de la transition de l'HbF vers l'HbA, est encore actuellement imparfaitement élucidé (Elion *et al.* 2016).

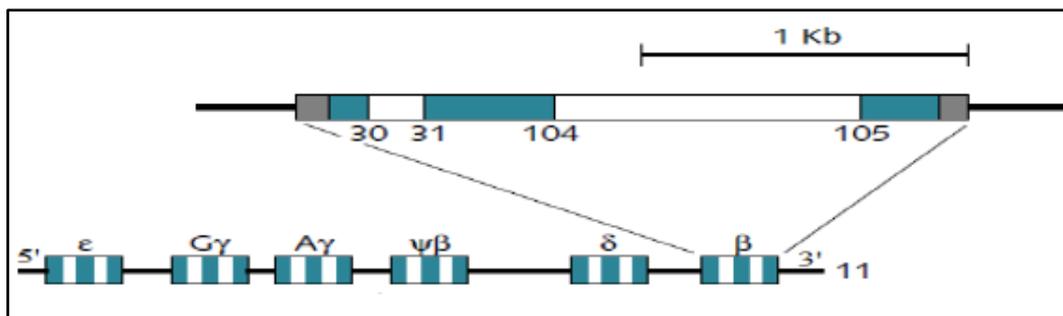


Figure 4 : Organisation des gènes des chaînes β-globine (Djeddi et Benameur 2017).

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

La régulation de la transcription des gènes de la globine nécessite une interaction entre les éléments d'ADN situés en cis au voisinage de chacun des gènes et d'autres séquences situées beaucoup plus en amont, et qui constituent le LCR. Cette interaction est réalisée par l'intermédiaire de facteurs transactivateurs, ubiquitaires ou spécifiques des tissus érythroïdes (Ilougbade 2014).

VI-1- Les séquences cis régulatrices

VI-1-1- Les promoteurs

Dans le cluster β globine, chaque promoteur est caractérisé par une combinaison de séquences d'ADN identiques, hautement conservées pendant l'évolution, et liant différents facteurs transcriptionnels (Figure 5). Au niveau de l'extrémité 5' des gènes structuraux, il existe des éléments régulateurs qui 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 (Djemaa 2013).

Epsilon	-115	-83	-28	
	CTCCACCC	CCAAT	ATAAA	
Gamma	-148	-115	-88	-30
	CTCCACCC	CCAAT	CCAAT	ATAAA
Delta		-68	-31	
		CCAAC	ATAAA	
Beta	-108	-93	-76	-31
	CTCCACCC	CCACACCC	CCAAT	ATAAA
Alpha	-91	-71	-28	
	CCGCGCCC	CCAAT	ATAAA	

Figure 5 : Les éléments structuraux appartenant aux régions promotrices des différents gènes de la globine (Addour 2008).

VI-1-2- Enhancers ou séquences stimulatrices

L'enhancer joue un rôle dans l'activation de la transcription des gènes par l'augmentation de l'affinité de l'ARN polymérase II et requiert un promoteur intact. Dans le cluster β globine, il existe des séquences stimulatrices localisées en 3' des gènes $A\gamma$ et β globine ainsi que dans le deuxième intron du gène de la β globine. 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 , et la délétion du gène ϵ dans la région 5' suggère la participation d'un "silencer" à la spécificité tissulaire de son expression. Le second "silencer" a été identifié en amont du gène β globine sur lequel se fixe le facteur BP1 (Djemaa 2013).

IV-1-4- LCR β -globine

La régulation de l'expression des gènes du locus β globine s'effectue en partie à travers l'interaction de leurs séquences régulatrices, en particulier le promoteur avec des facteurs protéiques nucléaires. Cependant, cette régulation ne peut pleinement s'exercer qu'en présence d'une région éloignée des gènes structuraux (ϵ , γ , δ et β), différente des enhancers et située en 5' du cluster β : le β LCR, dont l'importance a été soulignée par de nombreux travaux, intervient à différents niveaux de la régulation et possède plusieurs propriétés dont l'activation de l'expression tissu-spécifique des gènes de la famille β globines (Djemaa 2013).

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) et les facteurs ubiquitaires (YY1, Sp1, CBP, NFY ou CP1). Un autre facteur de transcription a été découvert, le BCL11A qui pourrait 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'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 . 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 (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 sont des affections héréditaires mono-géniques, causées par des mutations qui touchent la partie protéique de l'hémoglobine. Les hémoglobinopathies sont classiquement scindées en deux catégories :

- L'anomalie quantitative: C'est la synthèse amoindrie d'une ou plusieurs chaînes de globine entraînant ainsi des perturbations dans la synthèse de l'Hb, ce qui correspond à une thalassémie (α ou β thalassémie).
- L'anomalie qualitative: c'est la synthèse en quantité normale d'une hémoglobine anormale; ce qui aboutit le plus souvent à une drépanocytose (Giordano 2013).

Chapitre 2:

La β -thalassémie

I- Présentation

Le terme « thalassémie » provient du grec « Thalassa » mer et « Hemi » sang. Elle est considérée comme une anémie infantile héréditaire, à transmission autosomique récessive. La β -thalassémie est une maladie monogénique la plus fréquente dans monde, elle est due à une insuffisance quantitative de synthèse des chaînes de l'hémoglobine. Elle se présente sous trois formes cliniques différentes: la forme homozygote ou thalassémie majeure (maladie ou anémie de Cooley), la forme hétérozygote ou bien thalassémie mineure et la forme intermédiaire (Littee 2016; Aubry 2016).

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:

- La première description clinique détaillée de la forme majeure est attribuée à Cooley et Lee en 1925 aux USA, observée chez des enfants d'origine Italienne ou grecque, d'où l'appellation « anémie de Cooley ».
- En 1933, Wipple et Bradford proposent pour la première fois le terme thalassémie, en raison de l'origine géographique des maladies. Successivement, la forme sévère et la forme atténuée ont été appelées respectivement thalassémie majeure et thalassémie mineure.
- En 1943 et 1947, le caractère génétique, et la transmission autosomique récessive de la maladie ont été confirmés. Il a été établi que l'anémie de Cooley et la forme mineure représentent respectivement, l'état homozygote, et hétérozygote de la maladie.
- Entre 1956 et 1961, la structure chimique de l'hémoglobine a été définie, et la séquence complète des chaînes de globine a été précisée. Ainsi, il a été conclu que la β -thalassémie résulte d'un défaut de production de l'hémoglobine adulte; cette hypothèse a été confirmée par la synthèse des chaînes de la globine *in vitro*.
- En 1959, Ingram et Strett suggérèrent l'existence de deux types de thalassémies : la α -thalassémie et la β -thalassémie. 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.
- En 1978, le clonage des gènes et les techniques d'ADN recombinant ont permis d'établir la carte génétique des complexes α et β globine, puis la structure et la séquence des gènes.
- 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; Tensaout 2017).

III- Epidémiologie

La β -thalassémie est la maladie génétique la plus répandue avec plus de 300 000 porteurs dans le monde (figure 6). Fréquente dans le bassin méditerranéen, mais se rencontre aussi dans le sud-est asiatique (Thaïlande), plus rarement au Moyen Orient, en Afrique et aux Antilles. La répartition est devenue ubiquitaire en raison des mouvements migratoires des populations.

Globalement, on estime qu'environ 1,5% de la population mondiale sont des porteurs de β -thalassémie, avec environ 60 000 individus symptomatiques nés chaque année. En Algérie, la prévalence du trait thalassémique est variable, allant de 1.66 à 3%, selon les différentes enquêtes réalisées sur plusieurs échantillons. Les approches épidémiologiques faites en Algérie témoignent d'une augmentation de la prévalence de la maladie, En 2006, 750 patients ont été recensés et 931 en 2014, dont 556 enfants (59,7%) et 66% sont des thalassémiques majeurs (Djeddi 2017; Tensaout 2017).

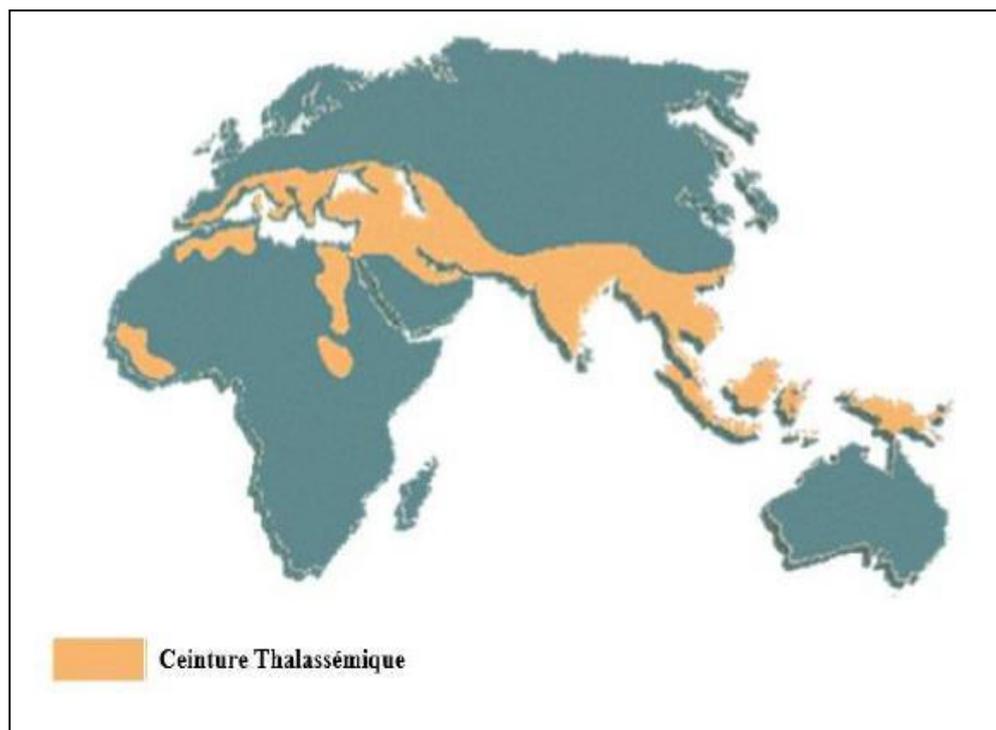


Figure 6: Répartition de la β -thalassémie dans l'ancien monde (Lahlou 2016).

IV- Classification des syndromes β -thalassémiques

On distingue trois syndromes cliniques de sévérité variable :

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

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

La β -thalassémie correspond. Souvent au génotype homozygote β^0/β^0 et parfois avec la combinaison allélique β^{+}/β^0 . Il existe une suppression totale (forme β^0) ou une diminution considérable (forme β^{+}) de la synthèse des chaînes β de l'hémoglobine. L'organisme réagit en augmentant la synthèse des chaînes γ , ce qui aboutit à un très fort pourcentage d'hémoglobine fœtale. Ce mécanisme compensateur est très imparfait et la quantité d'hémoglobine ainsi produite reste insuffisante. Dans la forme β^0 , la quasi-totalité de l'hémoglobine du sang est de type fœtal, et le reste étant constitué par l'hémoglobine A2. Plusieurs complications apparaissent en l'absence de toute possibilité transfusionnelle ou suivi médical aboutissant à la mort du patient (Sandhya *et al.* 2013; Joly *et al.* 2014).

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

La β -thalassémie intermédiaire s'applique généralement à certaines formes homozygotes atténuées de l'anémie Cooley. 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 (Thuret 2014).

IV-3- La β -thalassémie mineure

La β -thalassémie mineure 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'hémoglobine normale ou proche de la normale. Les sujets porteurs d'une β -thalassémie hétérozygotes (porteurs sains) sont souvent asymptomatiques, mais peuvent présenter une anémie. Biologiquement, le taux d'hémoglobine est normal ou discrètement diminué (entre 10 et 13g/l) (Joly *et al.* 2014; Thuret 2014).

V- Complications de la β -thalassémie

Les personnes atteintes de la β -thalassémie développent habituellement des symptômes dans les premières années de la vie. Dans de nombreux cas, les symptômes sont assez sévères et les patients nécessitent des transfusions sanguines répétées tout au long de leur vie, celles-ci peuvent être inadéquates ou provoquant:

- Des infections: Les personnes atteintes de thalassémie ont un risque accru d'infection. Ceci est particulièrement vrai si elles ont subi l'ablation de la rate.
- La surcharge en fer: Les personnes atteintes de thalassémie peuvent obtenir trop de fer dans le corps, soit de la maladie elle-même ou par des transfusions sanguines fréquentes. Un taux élevé de fer peut endommager le cœur, le foie et le système endocrinien, qui comprend des glandes responsables de la production des hormones régulant les processus tout au long de la vie.

- Hypertrophie de la rate (splénomégalie): Les β -thalassémiques sont caractérisés par un gonflement de la rate, dans ce cas, une amputation de l'organe est obligatoire (Sayed *et al.* 2013; Agarwal 2004; Noetzli *et al.* 2012).

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 des chaînes β est nul ou diminué, l'équilibre est rompu, un excès proportionnel de chaîne α est donc observé. Un mécanisme compensateur se met dès lors en place entraînant une synthèse accrue d'HbF, cela n'est néanmoins pas suffisant pour pallier le déficit complet d'HbA. Il en résulte donc une diminution de l'hémoglobine totale avec instauration d'une anémie microcytaire hypochrome. De plus, on observe un excès de chaînes d'alpha globine qui précipitent dans les érythroblastes entraînant une hémolyse intra-médullaire (figure 7). L'ensemble de ces éléments conduit à une érythropoïèse inefficace. En réponse à l'anémie, une synthèse accrue d'érythropoïétine se met en place entraînant ainsi une hyperplasie érythroïde réactionnelle secondaire. Cette hyperactivité de la moelle est responsable de la déformation osseuse retrouvée chez les patients non traités (Schwaller Hélène 2016).

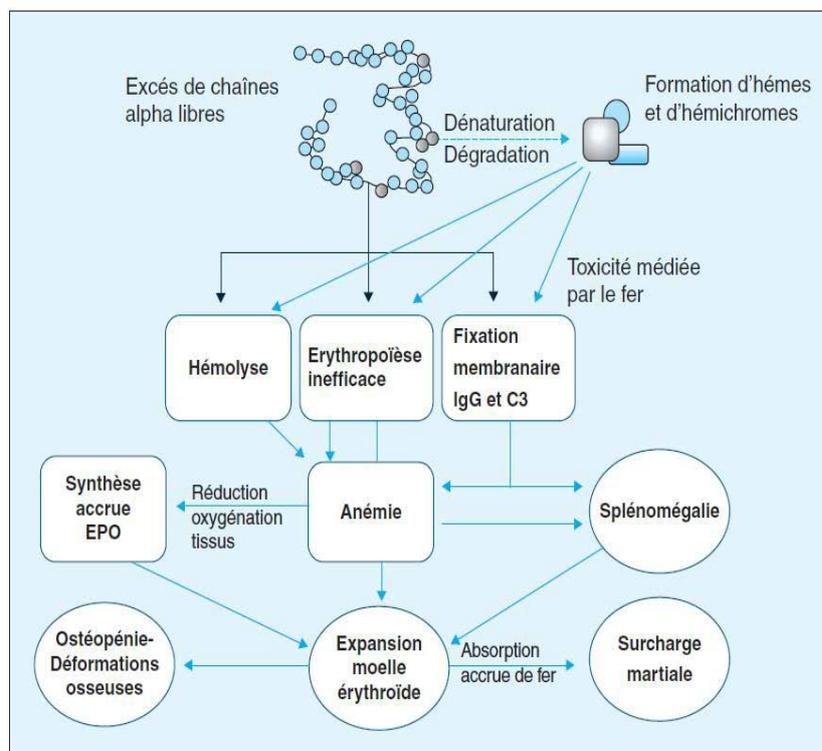


Figure 7: Conséquences de l'excès de production de chaînes d' α -globines libres dans la β -thalassémie (Schwaller Hélène 2016).

VII- Génétique de la β -thalassémie

VII -1- Transmission héréditaire

La transmission de la β -thalassémie se fait de façon autosomique récessive. Les parents d'un enfant atteint sont obligatoirement hétérozygotes et portent un exemplaire du gène muté de la β -globine. Seuls les enfants ayant reçu le gène muté à la fois de leur père et de leur mère sont atteints. A la conception, chaque enfant de parents hétérozygotes a 25% de risque d'être touché par la maladie, 50% de risque d'être porteur asymptomatique, et 25% de chance d'être non affecté et non porteur (Figure 8) (Sandhya et al. 2013).

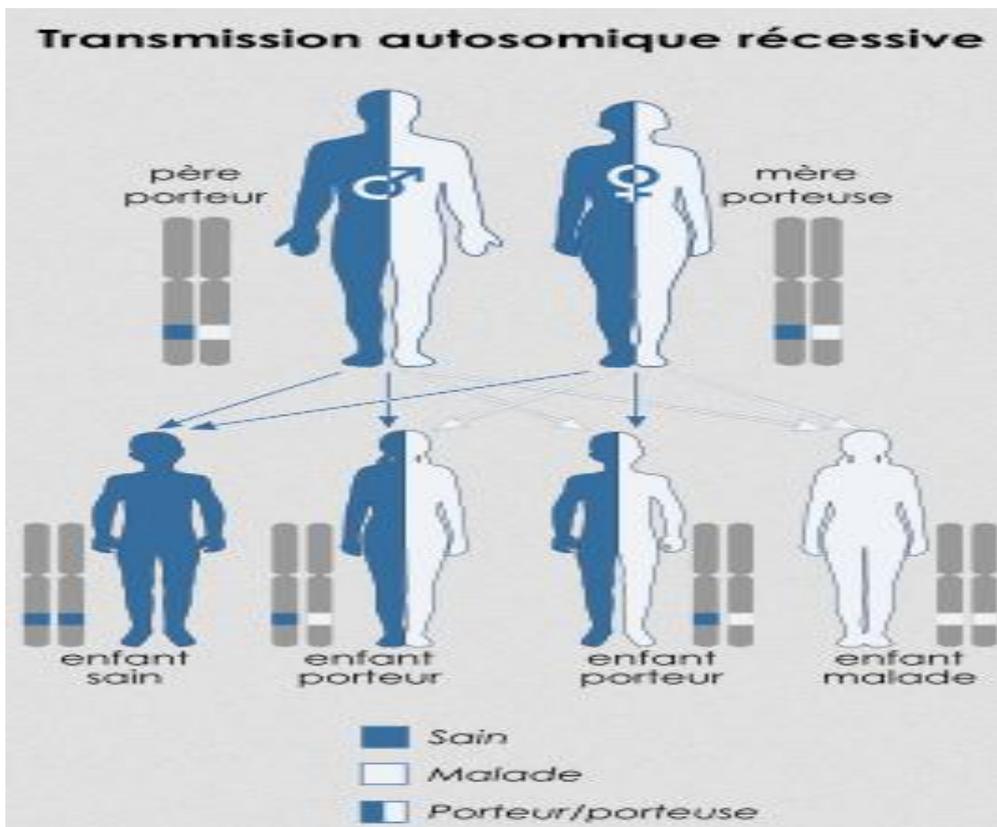


Figure 8 : Mode de transmission de la β -thalassémie (Alain Gervais 2015).

VII-2- Bases moléculaires de la β -thalassémie

Les bases moléculaires sont extrêmement variées (Figure 9). Plus de 300 mutations ponctuelles, et des délétions très rares, affectant l'expression des gènes de globine ont été rapportées, les 3 quarts concernant le locus β -globine (Badens 2010; Couque et al. 2016). La β -thalassémie est due à un nombre élevé de défauts moléculaires spécifiques à chaque population. 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'. 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; Yassouba Issaka 2015).

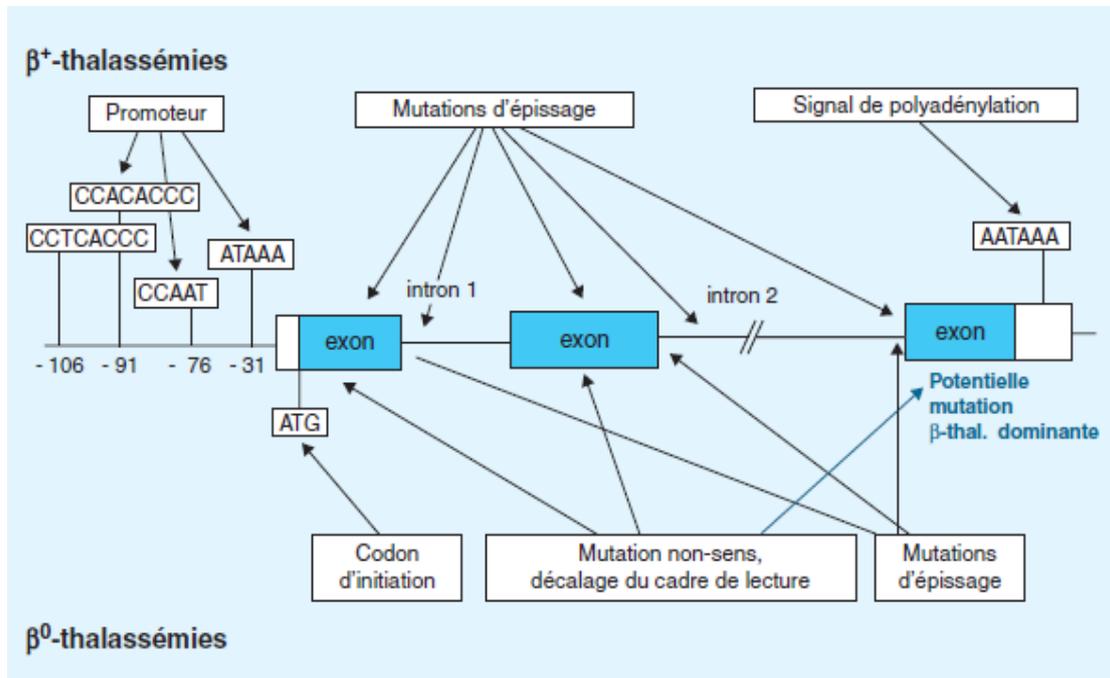


Figure 9: Les différents types de mutations β -thalassémiques (Joly et al. 2014).

VII-2-1-Les mutations ponctuelles

-Mutations β^0 thalassémiques: Ce sont des mutations qui touchent principalement les sites consensus d'épissage GT et AG, les mutations non-sens qui entraînent un arrêt de la traduction, les mutations par insertion ou délétion d'un ou deux nucléotides qui entraînent un décalage du cadre de lecture avec apparition d'un codon non-sens en aval, aussi les rares mutations du codon d'initiation (Couque et Montalbert 2014).

-Mutations β^+ thalassémique: Il s'agit souvent des mutations au niveau des séquences régulatrices comme les séquences conservées du promoteur (TATA box, CAAT box ou motif CACCC) conduisant à une diminution de la fixation des facteurs de transcription, au niveau des séquences 5', 3' non traduites. D'autres mutations faux-sens sont également observées et entraînent des anomalies sur les chaînes de globine (Weatherall et Fucharoen 2012; Bourkeb et Kehlat 2017).

-Mutations β thalassémiques dominantes: Ce sont des altérations rares à transmission dominante, représentées par des mutations faux sens au niveau de l'exon 3 du gène HBB. Ces mutations conduisent à la synthèse d'une chaîne protéique tronquée et hyper instable incapable de s'associer avec la chaîne α -globine normale et rapidement détruite dans l'érythroblaste (Weatherall et Fucharoen 2012 ; Bourkeb et Kehlat 2017).

VII-2-2- Les formes délétionnelles

- Délétions emportant le gène β d'une façon isolée ou en association avec d'autres gènes du locus.
- Délétions ne concernant que la région régulatrice (LCR) située en amont du locus.
- D'autres délétions conservent un cadre de lecture entre 2 gènes et aboutissent à des gènes hybrides (Hb Lepore) (Tensaout 2017).

VII-3-Corrélation génotype-phénotype

Il faut distinguer ici les hétérozygotes des homozygotes ou hétérozygotes composites pour des mutations du gène HBB.

- Les patients porteurs d'une mutation hétérozygote dans le gène HBB sont des porteurs asymptomatiques qui présentent des indices érythrocytaires modifiés avec la présence d'une pseudo-polyglobulie, d'une microcytose et d'une hypochromie et une fraction d'HbA2 > 3,2 %.
- Les patients porteurs d'une mutation homozygote ou de 2 mutations (hétérozygote composite) présentent une β -thalassémie de sévérité variable en fonction de la nature des mutations, pouvant aller d'une forme intermédiaire à une forme majeure. Il existe un continuum de sévérité entre le porteur sain et le patient β -thalassémique majeur en fonction d'une part, de la nature des mutations dans le gène HBB et d'autre part, d'un certain nombre de facteurs modulateurs de la β -thalassémie (Bonello-Palot *et al.* 2016).

VII-4- Les facteurs modulateurs d'origine génétique de la β -thalassémie

VII-4-1- Facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes α et β

- Le type de mutation dans le gène HBB.
- 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 (Mathieu Cerino *et al* 2016).

VII-4-2- Facteurs génétiques influençant la synthèse d'HbF à l'âge adulte

- Un facteur présent dans le locus β -globine: une mutation dans le promoteur HBG2, 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. Dans cette région, se trouvent deux gènes, HBS1L et cMYB qui jouent un rôle au cours de l'érythropoïèse.

- Une seconde région a été mise en évidence plus récemment, au locus 2p15, contenant le gène BCL11A. Plusieurs études ont montré que des polymorphismes de ce gène sont liés à une augmentation du taux d'HbF chez des personnes d'origines géographiques différentes. Ce gène joue un rôle dans la régulation des gènes de globine et notamment dans la répression des gènes fœtaux à l'âge adulte (Cerino *et al.* 2016).

VIII- Diagnostic

VIII-1- Diagnostic biologique et clinique

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

- Diagnostic hématologique

L'hémogramme est marqué par une anémie sévère (Hb inférieure à 7g/dl), qui commence dès la petite enfance, associée à une anémie microcytaire et une hypochromie. Le taux des réticulocytes est bas, voisin de 100 000 par mm³. Le frottis sanguin montre des anomalies érythrocytaires. La moelle osseuse est très riche en érythroblastes (Bonello-Palot *et al.* 2016).

- Diagnostic biochimique

L'étude biochimique de l'hémoglobine du patient montre une fraction d'hémoglobine fœtale majoritaire et une hémoglobine adulte absente (β^0) ou en faible proportion (β^+) et celle des deux parents présente un trait bêta-thalassémique (Kerroume 2015).

- Diagnostic clinique

La présentation clinique de la β -thalassémie majeure se produit entre 6 et 24 mois. Les nourrissons atteints deviennent progressivement pâles, souffrant d'irritabilité, de fièvre et de 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; Kerroume 2015; Bonello-Palot *et al.* 2016).

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

-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) (Bonello-Palot *et al.* 2016).

- Diagnostic biochimique

L'électrophorèse de l'Hb montre une augmentation significative du taux de l'HbF (supérieure à 7%). 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 %. Le taux d'HbA2 est

anormalement élevé (entre 4 et 7%), avec la présence d'HbA (Joly *et al.* 2014; Bonello-Palot *et al.* 2016).

- 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).

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

Les sujets porteurs sont asymptomatiques, exceptionnellement une splénomégalie peut être constatée. Le taux d'hémoglobine est normal ou peu diminué. Les signes biologiques sont l'augmentation du nombre de globules rouges, la microcytose, l'hypochromie et le diagnostic est confirmé par l'étude de l'hémoglobine avec une augmentation du taux d'HbA2 >3.3 % (Kerroume 2015).

VIII-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).

VIII-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).

VIII-4- Diagnostic prénatal

Le diagnostic prénatal est proposé pour déterminer le statut du fœtus, suivi d'une interruption médicale de grossesse si nécessaire. Il s'effectue sur l'ADN du fœtus obtenu à partir d'une ponction amniotique (entre la 15ème et la 18ème semaine de la gestation) ou d'une biopsie placentaire. Il n'est pratiqué que lorsque les parents acceptent sa sanction qui est l'interruption thérapeutique de grossesse (Lionnet 2016).

VIII-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 en la recherche de l'anomalie génétique responsable de la maladie sur des embryons obtenus par fécondation *in vitro* (Djemaa 2013).

IX-Traitements des β -thalassémies

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

IX-1-Le traitement conventionnel

- **Transfusion sanguine:** Elle est basée sur l'injection du sang ou des globules rouges aux patients, dans le but de corriger l'anémie, diminuer l'érythropoïèse et rééquilibrer l'absorption intestinale du fer. Dans la forme majeure, la transfusion est décidée directement après le diagnostic de façon régulière (chaque mois) durant toute la vie. Tandis que dans la forme β -TI, les transfusions se font d'une façon irrégulière (Al-Riyami *et al.* 2014).

- **La chélation du fer:** Afin d'éviter les complications, des traitements caractéristiques sont prescrits: la deferoxamine (DFO), déféripone (DFP) et déférasirox (DFX). La prise des chélateurs de fer débute chez les patients β -TM après 10 à 20 transfusions quand le taux de ferritine atteint 1000 μ g/L, mais chez les β -TI ils sont préconisés lorsque la concentration en fer hépatique est supérieure à 7 mg de fer par gramme de foie sec (Joly *et al.* 2014; Saliba *et al.* 2015).

- **Splénectomie:** Elle consiste à retirer la rate par chirurgie, surtout lorsque les besoins transfusionnels sont trop élevés. En effet la rate représente le siège de destruction des globules rouges et intervient aussi dans la défense contre certains germes, donc son ablation permet la réduction de l'importance de l'anémie. D'un autre côté, elle rend le patient vulnérable à certaines infections, c'est pourquoi il est conseillé d'attendre l'âge de 5-6 ans avant d'opérer l'enfant (Ferry 2014; Thuret 2014).

IX-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:** Le seul traitement qui puisse guérir définitivement la maladie est la transplantation de la moelle osseuse, appelée également « transplantation de cellules souches hématopoïétiques », en remplaçant la moelle osseuse malade par une autre non malade, venant d'un donneur sain ou atteint de la forme mineure et possédant un HLA

compatible. Le but de cette thérapie est de synthétiser, de nouveau, des globules rouges normaux (Jagannath *et al.* 2014; 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 (Tensaout 2017).

- La thérapie génique

Les espoirs de guérison se fondent aujourd'hui sur la thérapie génique. Le but de cette technique prometteuse est de greffer un gène sain de la β -globine dans les cellules souches hématopoïétiques des thalassémiques. Des essais encourageants ont été réalisés sur des modèles animaux de la maladie. Des chercheurs ont appliqué ce type de thérapie à deux patients souffrant de β -thalassémie, le premier patient, traité en 2007, n'a plus besoin de transfusion sanguine et sa qualité de vie s'est donc considérablement améliorée. Aux États-Unis, un essai clinique fondé sur un protocole similaire a été développé chez des patients thalassémiques (Elion 2014).

X-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).

Chapitre 3:

La drépanocytose

I- Présentation

Le mot drépanocytose vient du grec drepanon qui signifie « faucille » et « sickle » en anglais, désignant la forme que prennent les globules rouges des malades dans certaines circonstances. La drépanocytose fait partie de la famille des hémoglobinopathies les plus fréquentes dans le monde, elle est constitutionnelle avec une anémie hémolytique, aussi appelée hémoglobinose S ou anémie de cellule falciforme, les enfants sorcier, S/S maladie qui broie les os. Cette maladie est due à une anomalie de la chaîne peptidique de l'hémoglobine par une mutation de l'hémoglobine normale A en hémoglobine S (HBS). La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire autosomique co dominante, qui peut paraître comme récessive sur le plan génétique (Ndons 2012; Deguelle 2014).

II- Histoire de la drépanocytose

- Les premières traces de la drépanocytose ont été observées en 1846 par le Dr. Leiby à l'aide d'une autopsie sur un patient fébrile, dépourvu de rate. En 1898, les mêmes traces ont été observées par le Dr. Hodenpyl chez un patient qui présentait des douleurs dans tout le corps avec une jaunisse et une pleurésie.
- En 1910, James Herrick, médecin cardiologue à Chicago a observé l'apparition des globules rouges déformés chez un patient noir originaire de la Grenade lors d'une analyse d'un frottis sanguin.
- De 1917 jusqu'à 1940, des chercheurs (Emmel, Hahn, Gillespie et Sherman) montraient qu'en basse pression d'oxygène, les globules rouges subissent une falciformation. Neuf ans après James Neel, un médecin généticien, affirme que la transmission de cette pathologie est typiquement Mendélienne.
- En 1957, Ingram a déclaré que cette pathologie est à l'origine d'une substitution d'un acide glutamique par une valine. Ceci fut également confirmé par Moratta et Allenen (1977).
- En 1984, la première transplantation de la moelle chez un enfant a produit une guérison complète. Cette transplantation a été réalisée pour traiter une leucémie aigue et la guérison de la drépanocytose était un cas brusque.
- En 1995, le premier médicament Hydroxyurée a été décrit, qui prévient les complications de la drépanocytose (Aufradet 2013; Tebbani 2017).

III- Epidémiologie

Une hypothèse a été posée et confirmée par une étude géographique détaillée (Figure 10), et selon laquelle le gène drépanocytaire est fortement exprimé dans les régions où le taux de paludisme est élevé. Ce gène est originaire de l'Afrique sub-saharienne, du bassin méditerranéen (Grèce et Italie), du Moyen-Orient et de certaines régions du subcontinent

indien. Durant les derniers siècles, le gène drépanocytaire s'est principalement localisé dans les côtes orientales de l'Amérique, dans les Caraïbes et l'Europe de l'ouest. Les géostatistiques ont été utilisées pour réaliser des cartes géographiques et estimer la fréquence allélique du gène drépanocytaire dans les régions pour lesquelles les données épidémiologiques sont rares ou absentes, 18% des fréquences alléliques les plus élevées sont observées au nord de l'Angola et plus de 10% ont été localisées en Afrique centrale, en Afrique de l'ouest, en Inde et en Arabie Saoudite (Piel 2013).

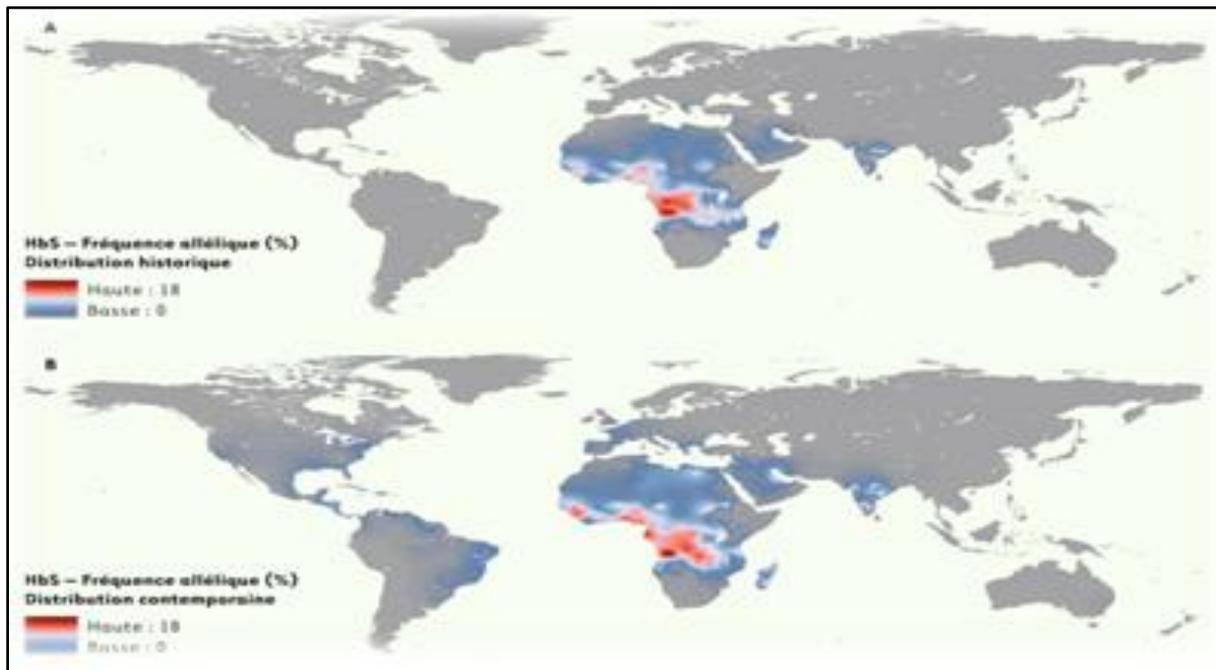


Figure 10: Distribution historique et contemporaine de la drépanocytose (Piel 2013).

IV- Classification des syndromes drépanocytaires

IV-1- La drépanocytose homozygote (malade, individu SS)

Lorsque les deux gènes sont mutés, la double mutation est donc la forme SS et représente la cause principale des SDM. L'électrophorèse de l'hémoglobine du sujet homozygote ou la chromatographie liquide mettent en évidence la présence d'HbS, d'HbF, d'HA2 et l'absence totale d'HbA (Orphenet 2011).

IV-2- La drépanocytose hétérozygote (porteur sain, individus AS)

Lorsqu'un seul des gènes β de la globine est muté sur la paire de chromosome. Les caractéristiques hématologiques du sang périphérique des patients drépanocytaires hétérozygotes sont identiques à celles du sang normal. La morphologie des hématies est normale et il n'y a pas de drépanocytes en circulation. Cependant, l'électrophorèse de l'hémoglobine montre une fraction majeure d'HbA de 60 à 55 %, une fraction importante

d'HbS de 40 à 45 % et enfin une fraction mineure d'Hb A2 de 2 à 3 %. La drépanocytose homozygote est caractérisée quant à elle par un taux d'hémoglobine situé entre 7 et 9 g/dl (Orphenet 2011).

V- Les hémoglobinopathies associées à la drépanocytose

V-1- Hétérozygote composite

Ce sont des formes où les deux gènes β de la globine n'ont pas la même mutation. Cette variation de mutations entre les deux globines est responsable de signes cliniques de sévérité variable selon les cas (Ndong 2012).

V-2- Hétérozygote composite SC

La drépanocytose composite SC représente 20% à 30% des SDM et est principalement fréquente en Afrique de l'ouest notamment au Nigeria. Elle constitue une entité autonome de la drépanocytose homozygote et résulte de l'association de deux gènes β mutés de la globine, le gène S et le gène C chez un même patient. L'hémoglobine C (HbC) est la deuxième par la fréquence des hémoglobines anormales africaines. Les individus hétérozygotes pour HbC (AC) sont asymptomatiques alors que les homozygotes pour HbC (CC) présentent le plus souvent une hémolyse compensée par une discrète splénomégalie. Chez les hétérozygotes composites SC, HbC provoque une déshydratation intracellulaire qui déclenche la précipitation de l'Hb S et donc la falciformation d'où une augmentation de la pathogénicité comparée aux hétérozygotes AS. Ces patients SC présentent des symptômes cliniques semblables à la forme SS mais avec un SDM "atténué" par rapport à la forme homozygote SS. Ainsi, leur espoir de vie est supérieure de 20 ans à celle des drépanocytaires homozygotes (Nagel 2003; Orphanet 2011).

V-3- Hétérozygote composite S β -thalassémique (S β)

La drépanocytose composite S β est le troisième SDM par sa fréquence. Elle est représentée par deux génotypes d'expression clinique très différente : la S β 0 et la S β +. Dans la S β 0, il n'y a aucune synthèse d'HbA puisqu'aucune synthèse de globine β et le tableau clinique est proche de la drépanocytose homozygote. Dans la S β + on a une sécrétion d'HbA comprise entre 3% et 25 % de l'hémoglobine totale circulante (dans la forme AS l'HbA est supérieure à 50%). La sévérité clinique et biologique de la drépanocytose S β + est inversement proportionnelle à la quantité d'HbA présent (Duguelle 2014; Djeddi et Benameur 2017).

V-4- Les autres formes d'association drépanocytaire

Il existe plusieurs formes, principalement en fonction de la localisation géographique des patients, ou avec d'autres mutations. Ces formes sont plus rares mais de gravité d'égale importance, par exemple le :

-S/D-los Angeles

-S/D-Punjad

-A/S-Antilles

-S/O-Arab

Toutes ces formes sont également responsables de SDM (Derlin 2012).

VI- Complications de la drépanocytose

Les patients drépanocytaires présentent diverses complications spécifiques à chaque patient.

Parmi les complications, nous citerons:

VI-1-Les manifestations aiguës

- Une anémie hémolytique
- Des crises vaso-occlusives
- Des crises neurologiques aiguës
- Des syndromes thoraciques aigus
- Des infections

VII-2-Les Manifestations chroniques

- Une splénomégalie
- Un retard de croissance
- Des anomalies rétinienne
- Gonflement des mains et des pieds

VII- Physiopathologie de la drépanocytose

Le schéma physiopathologique de la drépanocytose est basé sur le fait, que l'hémoglobine S est sous forme désoxygénée basse et se polymérise et s'organise en grandes fibres à l'intérieur du globule rouge, qui le déforme et le fragilise. A côté de ce processus, il y a d'autres caractéristiques qui impliquent la déshydratation des GR drépanocytaires, leurs propriétés anormales d'adhérence à l'endothélium vasculaire, la participation de phénomènes inflammatoires et d'activation de toutes les cellules présentes dans le vaisseau et enfin des anomalies du tonus vasculaire et du métabolisme du monoxyde d'azote. Le schéma physiopathologique classique de la drépanocytose rend compte de l'anémie hémolytique et des aspects mécaniques des crises vaso-occlusives (CVO). La polymérisation de l'HbS à cause d'un défaut de déformabilité des globules rouges (drépanocytes) en milieu pauvre en oxygène. Les accidents évolutifs les plus fréquents surviennent dans des conditions qui favorisent la réduction durable et profonde de l'hémoglobine (hypoxie, stase, acidose). Ils consistent en des microthrombi des capillaires profonds qui finissent par générer des infarctus tissulaires. Chez le petit enfant, ce sont surtout les régions distales des membres qui sont

concernées. Plus tard, ces CVO peuvent survenir en n'importe quel point du squelette, mais aussi au niveau des viscères profonds (thorax, abdomen). La maladie drépanocytaire s'accompagne d'une sensibilité aux infections et les CVO favorisent la surinfection des zones infarciées. L'immunodépression des drépanocytaires est expliquée en partie par l'asplénie fonctionnelle consécutive aux infarctus spléniques multiples. (Aubry et Gauzère 2017).

VIII- Génétique de la drépanocytose

VIII-1-Transmission héréditaire

Elle se transmet selon le mode autosomique récessif. Les parents d'un enfant atteint sont obligatoirement porteurs ou hétérozygotes portant une seule copie du gène muté. Les sujets hétérozygotes sont dits AS et les homozygotes sont dits SS. Seuls les homozygotes sont considérés comme malades. Dans un couple de sujets hétérozygotes (AS), à chaque grossesse, la probabilité de naissance d'un enfant homozygote SS et malade est de 1/4, celle d'un enfant homozygote AA normal ou sain est également de 1/4. Les hétérozygotes AS et sains apparaissent avec la fréquence de 1/2. Ce mode de transmission est schématisé dans la figure 11.

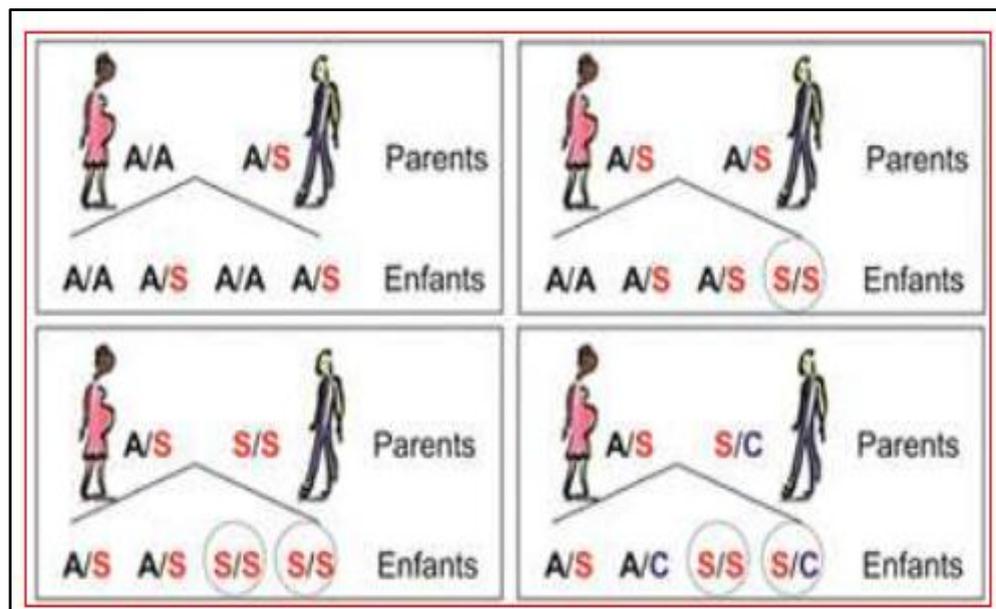


Figure 11: Mode de transmission de la drépanocytose (Ouakassa 2015)

A/A : Sujet sain non porteur

A/S : Sujet porteur du gène S

S/S : Sujet drépanocytaire

A /C : Sujet porteur hétérozygote du gène C

L'allèle S étant l'allèle malade et l'allèle A étant sain

Tableau 2: Risque d'atteinte des enfants en fonction du génotype des parents
(Ouakassa 2015)

Père Mère ⇒ ⇩	AA	AS	SS
AA	AA = 100%	AA = 50% AS = 50%	AS = 100%
AS	AA = 50% AS = 50%	AA = 25% SS = 25% AS = 50%	AS = 50% SS = 50%
SS	AS = 100%	AS = 50% SS = 50%	SS = 100%

VIII-2- Les mutations de la drépanocytose

La drépanocytose est due à une seule mutation qui est une substitution au niveau du 6ème codon de la β -globine (Figure 12), située sur le bras court du chromosome 11, conduisant au remplacement d'une adénine par une thymine ($GAG \rightarrow GTG$) et donc au remplacement de l'acide Glu(hydrophile) par la Val(hydrophobe). Cela se répercute sur la séquence protéique dans laquelle une globine β normale est remplacée par une globine β^s . En raison de cette mutation, l'hémoglobine des drépanocytaires est dite hémoglobine S pour sickle, et faucille en français. Cette transition de la chaîne latérale apolaire à une chaîne polaire modifie la configuration spatiale de la molécule d'Hb et induit des propriétés physicochimiques spécifiques de l'HbS telle que la diminution de la solubilité conduisant à une apparition d'un site hydrophobe au niveau de la globine β^s . Lorsque cette dernière est désoxygénée, elle devient un point d'ancrage d'une autre globine β^s entraînant une polymérisation de l'HbS. La mutation de la drépanocytose est parfois associée à des mutations responsables d'autres maladies de l'hémoglobine comme la β -thalassémie (Tiendrebeogo 2013).

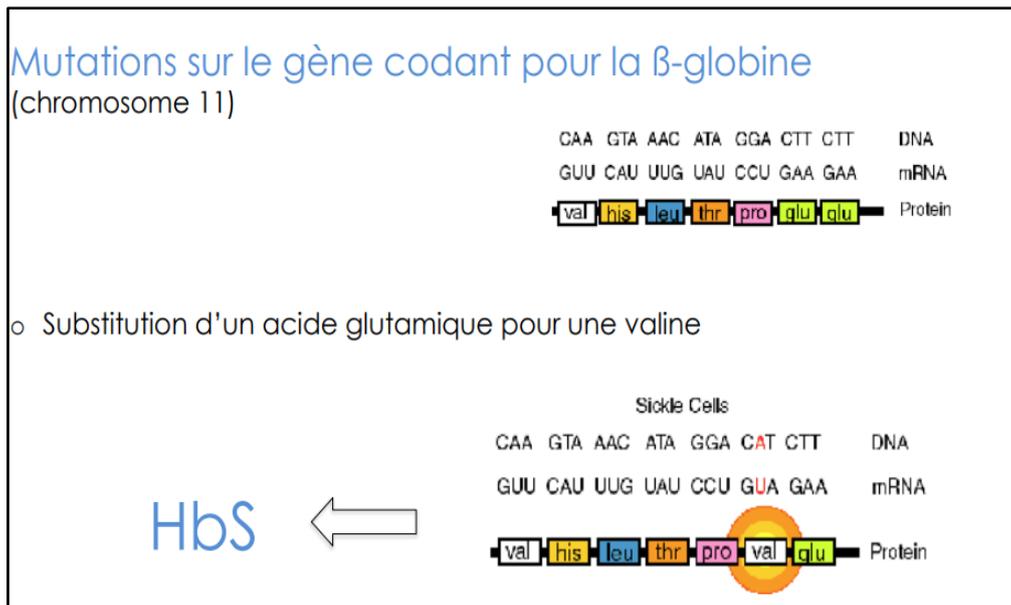


Figure 12: Mutation génétique conduisant à la drépanocytose (Tiendrebeogo 2013).

IX- L'effet modulateur de la drépanocytose

L'association à une α -thalassémie diminue la concentration intra-érythrocytaire d'Hb et donc la polymérisation de la désoxy-HbS. De même, l'Hb F forme des molécules hybrides $\alpha 2\beta S\gamma$ qui interrompent la formation du polymère.

Les gènes γ étant proches du gène β . Une avancée fondamentale a été, en 1978, la découverte par Kan et Dozy d'un polymorphisme de restriction (RFLP) affectant un site de l'enzyme HpaI en aval de la mutation βS . Il s'agissait de la première description d'un polymorphisme de l'ADN humain, qui indiquait également que la mutation βS avait pu apparaître dans des contextes génétiques différents. L'identification d'autres RFLP dans le locus β -globine a ensuite permis de définir des haplotypes de restriction, souvent spécifiques d'une population, et d'établir l'origine pluricentrique de la mutation.

Certains microsatellites pourraient être le site de fixation de facteurs et intervenir dans la structure chromatinienne du locus. Plusieurs de ces polymorphismes ont été identifiés dans la région promotrice du gène β dans le deuxième intron des gènes γ , et enfin au niveau du site HS2 du LCR < L'haplotype étendu > regroupant RFLP et microsatellites se présente dans chacun des groupes ethniques comme spécifique du chromosome porteur de la mutation βS , et pourrait intervenir dans l'expression phénotypique de la maladie. L'haplotype « Sénégal » s'accompagne d'un taux élevé d'HbF, de même que l'haplotype « indien » auquel est associé, en outre, un taux abaissé de production de la chaîne βS . Cependant, il a été démontré que les haplotypes ne participent que très partiellement à la variabilité d'expression de l'HbF et qu'en aucun cas ils ne permettent un pronostic individuel.

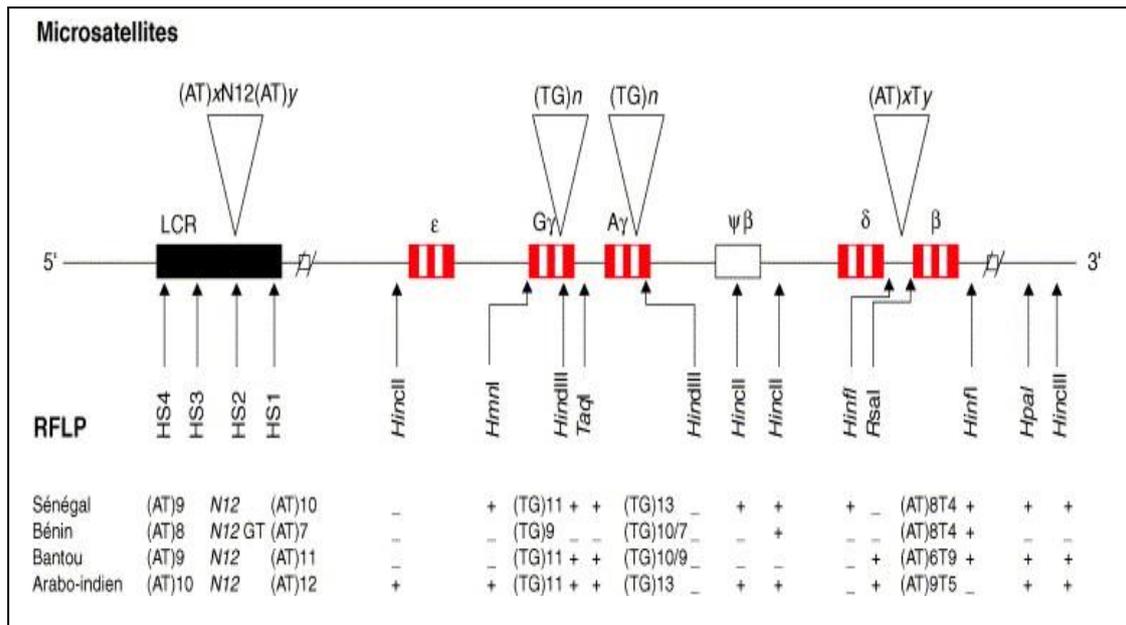


Figure 13: Haplotypes étendus des chromosomes drépanocytaires (Labie *et al.* 2005)

X- Diagnostic biologique de la drépanocytose

Le diagnostic biologique peut être réalisé par plusieurs techniques:

- Le test de falciformation ou test d'Emmel: Permet de reconnaître rapidement la présence de l'HbS dans les hématies, sans toutefois différencier la forme homozygote de la forme hétérozygote.
- Le test de solubilité réduite ou test d'Itano: Consiste à mélanger un hémolysât de globules rouges avec un tampon phosphate concentré en présence d'un réducteur, l'hydrosulfate de sodium. L'apparition d'un trouble dans le milieu indique l'existence d'une Hb anormale HbS ou HbC que l'on peut par la suite différencier par centrifugation.
- Diagnostic électrophorétique: basé sur la migration des différents types d'Hb dans un champ électrique, sur un support approprié, en fonction de leur charge électrique et de leur solubilité. Le sang est prélevé sur anticoagulant et débarrassé du plasma et des leucocytes; les globules rouges sont ensuite lysés pour obtenir une solution d'Hb libre. Plusieurs types d'électrophorèses sont utilisés: à pH alcalin, à pH acide, l'électrophorèse des chaînes de globine, l'iso-électrofocalisation et l'électrophorèse capillaire.
- Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC): C'est une méthode d'analyse qui permet le dosage des différentes fractions de l'Hb et l'identification d'un nombre important d'Hémoglobines anormales. Elle permet en particulier le dosage de l'HbA2 et de l'HbF. Elle est très utile dans l'interprétation des profils d'Hb pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose (Tamini *et al.* 2012).

XI- Le traitement de la drépanocytose

XI-1- Greffe de moelle osseuse

La greffe géno-identique myéloablative qui a été proposée en France depuis vingt-cinq ans, chez l'enfant, l'adolescent et le jeune, permet maintenant de guérir 97 % d'entre eux. Le taux de mortalité liée à la greffe et le risque de rejet ont été réduits chacun à moins de 2 % avec l'anti-thymoglobuline (ATG), et moins de 1 % des patients vivent avec une réaction du greffon contre l'hôte (GvH) chronique. Aux États-Unis, l'utilisation des conditions non myéloablatifs permet l'extension des indications aux adultes ayant un donneur géno-identique avec des survies sans maladie de 87% et sans GvH. A l'inverse les essais de greffes non apparentées ont exposé les patients à un grand risque de rejets (Daosavanh 2016).

XI-2- Thérapie génique

La stratégie consiste à transférer un gène *ex vivo* dans les CSH. Le gène introduit est un variant du gène de l'HbA, modifié pour prévenir sa polymérisation. Cette modification empêche la polymérisation de l'HbS. L'allogreffe de CSH est la seule possibilité de guérir la drépanocytose après un conditionnement myélo-ablatif et immunosuppresseur.

Dans les premiers essais de thérapie génique, des vecteurs β rétroviraux qui conduisent à une mutagenèse d'insertion ont été utilisés. Par contre, dans une étude récente réalisée par Rossi et Salvetti (2016), le vecteur utilisé est dérivé d'un lentivirus qui est capable de s'insérer au hasard dans les régions de transcription active; plutôt qu'à proximité des promoteurs. Cette nouvelle génération de vecteurs est caractérisée par l'inactivation des régions amplificatrices du LTR viral, qui peuvent être inactivées par elles-mêmes, d'où son nom « self-inactive ». L'assemblage des CSH pour le transfert *ex vivo*, est réalisé conventionnellement sous anesthésie générale et ponctions médullaires multiples au niveau des crêtes iliaques. La réinjection des cellules autologues modifiées doit être précédée d'une chimiothérapie myélo-ablative par busulfan, induisant une phase d'aplasie d'environ un mois. Par contre, en pré et post greffe, l'allogreffe est dépourvue, de tout immunosuppresseur puisqu'il n'ya pas de risque de rejet, ni de réaction du greffon contre l'hôte GvH. Dès la sortie de la phase d'aplasie, le transgène est détecté et il reste stable dans tous les neutrophiles, avec un recul de 18 mois. La production de l'hémoglobine thérapeutique connue par sa mutation anti-polymérisation est détectée en parallèle avec la production de l'HbS. Cliniquement, le mélange de ces hémoglobines permet la disparition de tous les symptômes cliniques et biologiques de la drépanocytose (Cavazzana 2010; Rossi et Salvetti 2016).

Le premier succès de la thérapie génique

Le premier jeune patient Français atteint de la drépanocytose qui a reçu une thérapie génique pour traiter sa drépanocytose est en rémission. Il s'agit d'une avancée majeure qui donne un nouvel espoir pour les patients touchés par cette maladie. En 2017 soit deux ans et demi plus tard, la rémission est complète. Après un mois d'hospitalisation post-greffe, le patient n'a plus besoin de transfusion mensuelle des médicaments antidouleurs, ni d'hospitalisation. Il a repris une fréquentation régulière de l'école et des activités physiques normales (Liffran2017).

XII- Prise en charge de la drépanocytose

XII-1- Prise en charge hospitalière

Dans la drépanocytose, les traitements utilisés ont généralement une action symptomatique. Ils permettent de limiter les signes cliniques et de prévenir les manifestations aiguës et chroniques ; la prise en charge de ces manifestations est hospitalière.

XII-2- Prise en charge des manifestations aiguës

Une surveillance régulière de l'état basal permet une prise en charge rapide des complications aiguës et chroniques. Devant toutes complications aiguës, une hyperhydratation doit être effectuée de façon systématique.

XII-3- Prise en charge des manifestations chroniques

-La transfusion sanguine ou échange transfusionnel: La réalisation de la transfusion du sang chez un patient drépanocytaire est utilisée pour deux raisons: la correction de l'anémie et/ou la diminution du taux de l'HbS. Le risque causé par ces transfusions répétées est l'allo-immunisation, une hémolyse post transfusionnelle retardée. Selon Chou *et al.* (2013), les taux de l'allo-immunisations vont de 7% à 47%. Ce risque est d'autant plus élevé chez les patients européens qui ont une origine africaine ou antillaise recevant du sang de caucasiens. Cinq antigènes différents dont deux (C et E) sont exprimés dans la population caucasienne, mais pas dans la population africaine ou antillaise. Cette différence augmente le taux du risque qu'un anticorps du receveur agisse contre des antigènes sur les globules rouges du donneur et donc une hémolyse des globules rouges. L'autre effet indésirable de la transfusion est l'hémolyse post transfusionnelle, qui a lieu de 5 à 15 jours après la transfusion; elle peut survenir en absence d'anticorps selon un mécanisme qui est toujours inconnu.

-Saignée sans transfusion: Dans le cas de saignée sans transfusion, les patients drépanocytaires, en particulier ceux ayant un taux élevé d'Hb sont traités par érythropoïétine ou hydroxyurée. Le but de saignée est de diminuer le taux d'Hb.

-Hydroxyurée: L'hydroxyurée appelée aussi hydroxycarbamide a été utilisée dès 1969. Une étude, réalisée en 1995 par Charache, a montré les bienfaits de cette molécule chez les patients drépanocytaires, induisant une diminution de la falciformation et de la fréquence des crises annuelles. Elle peut également causer des effets indésirables obligeant les patients traités de faire des bilans sanguins réguliers (Deguelle 2014).

-Greffe de moelle osseuse: La greffe de la moelle osseuse n'est employée que dans les cas très graves (souannavong 2016).

-Allogreffe de la moelle: Cette technique est effectuée pendant l'enfance, à partir d'un donneur HLA identique issu de la fratrie. L'allogreffe ne s'indique que dans certaines conditions telles qu'une vasculopathie cérébrale, des CVO, ou des syndromes persistants sous un traitement hydroxyurée.

La chance de guérison est de 95% et les 3% correspondent aux risques de rejet de greffes, et 2% pour des réactions du greffon contre l'hôte. Cependant, cette méthode est lourde utilisant un conditionnement myélo-ablatif avant greffe. La majorité des projets de greffe est impossible car le donneur HLA doit être issu de la fratrie (souannavong 2016).

XIII- Conseil génétique

Les femmes qui ont un conjoint drépanocytaire peuvent éviter de donner naissance à un enfant atteint grâce aux diagnostics prénatal. Lorsque les deux partenaires sont porteurs d'HbS ou d'une association susceptible d'aboutir à un syndrome drépanocytaire, le médecin praticien doit expliquer au couple le risque théorique de 25% d'avoir un enfant atteint et de les orienter vers un généticien. Si les parents acceptent de prendre le risque d'une grossesse, ils doivent savoir qu'ils peuvent bénéficier d'un diagnostic prénatal à effectuer (Lionnet 2016).

Chapitre 4:

Le polymorphisme génétique

I- Le polymorphisme génétique

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 (Ghesquieres 2010).

II- Méthylène-Tétrahydro-Folate-Réductase (MTHFR)

II-1- Structure et localisation du gène MTHFR

Le gène MTHFR est localisé sur le bras court du chromosome 1 (1p36.3). Il comporte 11 exons (Figure 14). Sa région promotrice contient plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription, mais ne possède pas de TATA box. L'exon 1 porte un site d'épissage alternatif; la région UTR de ce gène est longue, montrant la complexité dans la régulation de l'expression (Lemoine *et al.* 2005).

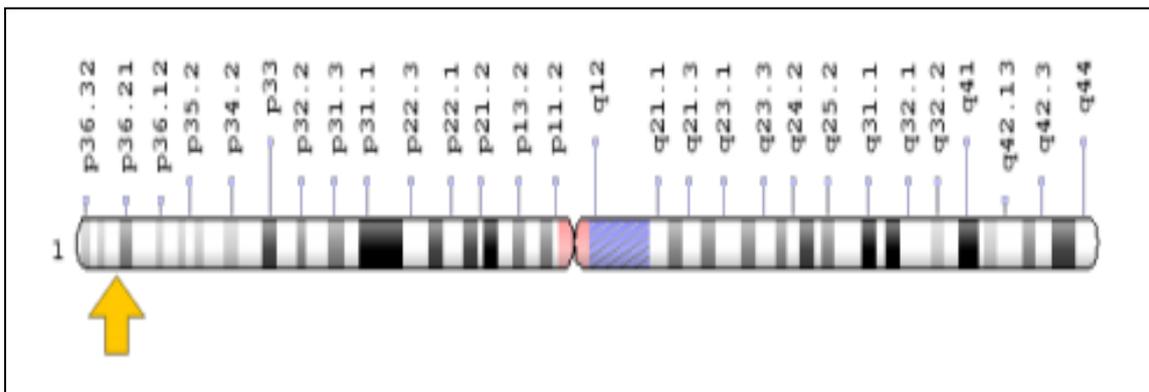


Figure 14: Localisation du gène *MTHFR* sur le chromosome 1 (Saffroy *et al.* 2005).

II-2- Structure et fonction de la protéine MTHFR

II-2-1- Structure

La protéine MTHFR est un homodimère présent dans le cytoplasme. Sa séquence est composée de 656 AA. Elle est formée de deux sous unités identiques de 150 KD. Chaque sous unité est formée de deux domaines : le domaine de régulation à l'extrémité C-terminale contient le site de liaison de SAM qui est un puissant inhibiteur allostérique de la réaction catalysée par la MTHFR. Le domaine catalytique à l'extrémité N-terminale liant le FAD, le NADPH et 5,10 méthylène-THF, catalyse la réduction irréversible du 5,10 méthylène-THF, qui représente la forme majeure des folates dans le sang. Entre ces deux domaines se trouve une forte région hydrophobe avec une séquence d'acides aminés Lys-Arg-Arg-Glu-Glu constituant un site de clivage par la trypsine (Benchikhe 2012).

II-2-2- Fonction

La MTHFR est une enzyme clé dans le métabolisme des folates, elle catalyse la conversion irréversible du 5,10 méthylène tétrahydro-folate (5,10- CH₂-FH₄) en 5-méthyltétrahydrofolate (5-CH₃-FH₄). Cette conversion est très importante pour la biosynthèse des nucléosides, la méthylation de l'ADN, et ainsi le métabolisme de l'homocystéine. Le processus métabolique de la 5,10-MTHFR dépend de plusieurs activateurs et inhibiteurs dont la S-adénosyl méthionine (SAM) est un inhibiteur allostérique et le FAD un coenzyme. Une activité normale de la protéine MTHFR maintient un pool adéquat en folates circulant et prévient l'augmentation des concentrations de l'homocystéine. Une activité diminuée de la protéine induit une diminution des niveaux des folates, une diminution de la biodisponibilité de méthionine ainsi qu'une augmentation des concentrations de l'homocystéine (Saffroy *et al.* 2005; Leclerc 2007).

II-3-Les polymorphismes du gène MTHFR

Un défaut d'activité de la protéine 5,10MTHFR avec une activité résiduelle est du à plusieurs polymorphismes. La majorité d'entre eux sont découverts chez seulement une ou deux familles, il s'agit des polymorphismes T1317C, G1793A, T1081C, G1027T, T1084C et T1711C. Certains de ces polymorphismes ont été décrits en association avec le polymorphisme C677T et ceci diminue l'activité enzymatique de la protéine MTHFR de façon remarquable, alors que d'autres n'altèrent pas la séquence des acides aminés et leur rôle n'est pas bien décrit (Robien *et al.* 2003).

II-4- Le polymorphisme C677T du gène MTHFR

Une substitution d'une cytosine par une thymine au niveau de la 677ème paire de base dans le quatrième exon du gène MTHFR, aboutit à un remplacement d'une alanine par une valine en position 222 de la protéine MTHFR et se situe dans le domaine catalytique de l'enzyme au niveau du site de liaison avec le cofacteur FAD. La protéine résultante de ce polymorphisme présente une activité enzymatique réduite à 37°C et plus, pour cela la protéine est souvent appelée thermolabile. *In vitro*, il a été démontré que la mutation C677T réduit l'activité enzymatique de la protéine MTHFR jusqu'à 70% chez les individus homozygotes (TT) et 40% chez les individus hétérozygotes (Robien 2003; Bourouba *et al.* 2009).

II-5- Le polymorphisme du gène 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).

II-6- Le polymorphisme du gène MTHFR et la drépanocytose

Il existe une enzymopathie très répandue en Afrique pouvant compliquer le pronostic clinique de la drépanocytose. Le métabolisme des folates est régulé par l'enzyme MTHFR réductase, une mutation C677T sur le gène MTHFR est responsable de la réduction de son activité enzymatique, par conséquent il provoque une diminution de la quantité d'acide folique chez les patients drépanocytaires signalant que ce paramètre doit être stable (Simpore 2016).

Matériel et méthodes

I- Patients

I-1- Lieu et durée du stage

Notre étude a porté sur des enfants atteints chacun d'une β -thalassémie, une drépanocytose ou encore d'une association β -thalassémie-drépanocytose venant de différentes régions de l'Est Algérien, diagnostiqués et traités à la pédiatrie de l'EHS mère-enfant Constantine, sur une période de 3 mois (de Mars à Mai 2018). L'étude génétique a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie et génétique moléculaire du CHU Ibn Badis Constantine (extraction de l'ADN) et au centre national de recherche en biotechnologie (CRBT) Constantine 2 (électrophorèse, PCR, RFLP-PCR).

I-2- Recrutement

L'échantillonnage comprend 56 patients dont 22 filles et 34 garçons, et dont la tranche d'âge se situe entre 1 et 15 ans.

I-3- Critères d'inclusion / exclusion

I-3-1- Critères d'inclusion

- Des enfants atteints chacun d'une β -thalassémie, une drépanocytose, ou une association β -thalassémie-drépanocytose, dont le diagnostic a été confirmé par une électrophorèse de l'Hb.

I-3-2- Critères d'exclusion

- Des enfants dont le diagnostic est évoqué mais non confirmé par l'électrophorèse de l'Hb.
- Des enfants ayant bénéficié d'une transfusion qui remonte à une période inférieure à un mois.
- Des enfants qui ont subi une greffe de la moelle osseuse ou du sang placentaire.

II- Méthodes

Nous avons entrepris une étude transversale des critères familiaux, hématologiques, biologiques et biochimiques des patients atteints des maladies sus-citées, ainsi qu'une initiation à une étude analytique des profils génotypiques et alléliques de 15 patients par RFLP-PCR du polymorphisme C677T du gène MTHFR (5 β -thalassémiques, 5 drépanocytaires et 5 association β -thalassémie-drépanocytose).

II-1- 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-2- Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin a été pratiqué pour chaque patient à partir du sang veineux, sous des conditions stériles. Le sang est recueilli dans des tubes vacutainer de 4 ml contenant l'anticoagulant EDTA 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 transfusion mensuelle. Tous les prélèvements sont conservés pendant une semaine au maximum à une température comprise entre 2 et 8 °C. Notons que ces prélèvements sont réalisés par un infirmier de service.

II-3- 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'hémogramme sont: Taux de l'Hb, GR, de VGM, d'HCT, de TCMH et de CCMH (Lahlou 2016).

II-4- Frottis sanguin

Le frottis sanguin est l'étude utile au diagnostic cytologique de nombreuses maladies hématologiques. Dans cette étude, c'est la qualité des globules rouges qui est notée (taille, forme, coloration, inclusions). Ainsi, Le frottis sanguin consiste en l'étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre suivie d'une coloration et d'une lecture au microscope optique. Les réactifs consommables utilisés sont la solution de May Grûnwald et celle de Giemsa diluée à 10% dans l'eau tamponnée à pH= 7, Le protocole est fourni dans l'annexe 1 (Tabani 2017).

II-5- Electrophorèse

L'électrophorèse désigne l'ensemble des méthodes visant à séparer et à identifier les constituants d'une phase solide chargée, suspendue dans une phase liquide tamponnée quand on leur applique un champ électrique continu. Elle permet en outre la détermination du taux de chaque constituant par densitométrie après coloration ou par spectrophotométrie après élution (Halimi 2013).

II-6- Arbres généalogiques

Deux familles ont été retenues comme échantillons représentatifs vu qu'elles renferment tous les cas de figures étudiés. La première famille originaire d'Oum El-Bouaghi, présente un phénotype thalassémique, et l'autre, originaire de Constantine, présente un phénotype drépanocytaire.

II-7- Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolation de l'ADN pur des cellules sanguines. Les leucocytes sanguins représentent la source majeure de l'ADN. Au cours de cette étude, nous avons retenu la méthode d'extraction au NaCl (Annexe 3), qui se déroule en 3 étapes :

- Préparation des leucocytes
- Extraction de l'ADN
- Solubilisation

II-8- Génotypage du polymorphisme C677T du MTHFR

Le génotypage du variant allélique C677T du gène MTHFR a été réalisé par une RFLP-PCR en utilisant l'enzyme de restriction *HinfI*. 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 *HinfI*.
- 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 est une technique d'amplification d'ADN in vitro. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie en utilisant tous les réactifs nécessaires. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN
- Hybridation
- Elongation

II-8-1-1- Détermination de la pureté de l'ADN

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, un bon résultat est à écarter dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder par la réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée. L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport R est compris entre 1,8 et 2 ($1,8 < R \leq 2$).

II-8-1-2- Détermination de la concentration de l'ADN

La concentration de l'ADN est déterminée directement par spectrophotométrie.

II-8-1-3- 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-8-1-4- Préparation du milieu réactionnel

Les réactifs utilisés dans cette étape de PCR doivent d'abord être dilués selon la formule suivante: $C1 \times V1 = C2 \times V2$ Où:

C1: Concentration initiale de chaque réactif.

V1: Volume initial nécessaire à la dilution (inconnu).

C2: Concentration finale.

V2: Volume final.

Une fois que le volume initial (V1) est connu, le volume de l'eau distillée nécessaire pour la dilution de chaque réactif est calculé comme suit :

$$\text{Veau distillée} = V2 - V1$$

La composition du mélange réactionnel est mentionnée dans le tableau 3.

Tableau 3: 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'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA -3' (100ng/µL)	3
Oligo R 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG -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, 27µL de ce mélange ont été additionnés à 3µL d'ADN pour chaque échantillon.

II-8-1-5- Déroulement de la PCR

Nous avons programmé le thermocycleur pour 40 cycles. Les conditions pour le déroulement de l'amplification par PCR sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4: Profil thermique de la PCR

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

II-8-1-6- 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). Ce contrôle est assuré dans une cuve horizontale sur un gel d’agarose à 2% (TBE à 1X) dans lequel ont été incorporé 10µl 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 7µl du produit d’amplification et 3µl 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-8-1-7-Digestion des produits de PCR par l’endonucléase de restriction *HinfI*

L’ADN est soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction. Dans notre étude, 20µl du produit PCR sont mélangés à 0,7µl d’enzyme de restriction *HinfI*. L’ensemble, est ensuite incubé toute une nuit à 37°C. La mutation C677T du MTHFR crée un site de reconnaissance pour l’enzyme de restriction *HinfI* (Figure 15). 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 15: Site de restriction de l’enzyme *HinfI*.

II-8-1-8-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 100 volts pendant 30min. Les fragments résultants sont ensuite visualisés sous UV. Le gel est ensuite photographié.

Résultats

I-Résultats

I-1- Caractéristiques épidémiologiques

I-1-1- Age des patients

L'âge des patients au moment du diagnostic est représenté dans la figure 16. Pour la majorité des patients, à savoir 34 cas, soit 60,7%, l'âge du diagnostic est situé entre 0 et 1 an.

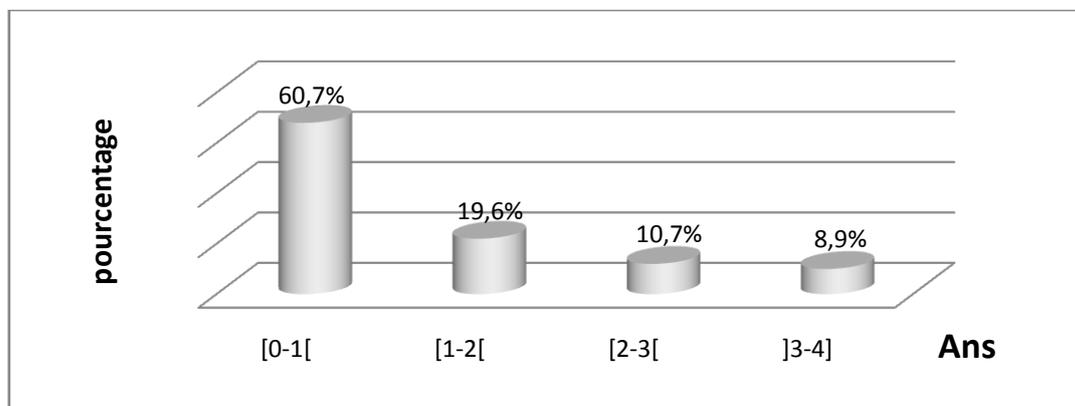


Figure 16: Répartition des patients selon l'âge du diagnostic des trois maladies.

L'âge des patients pendant la période de notre stage est illustré dans la figure 17. La majorité des patients ont entre 4 et 8 ans.

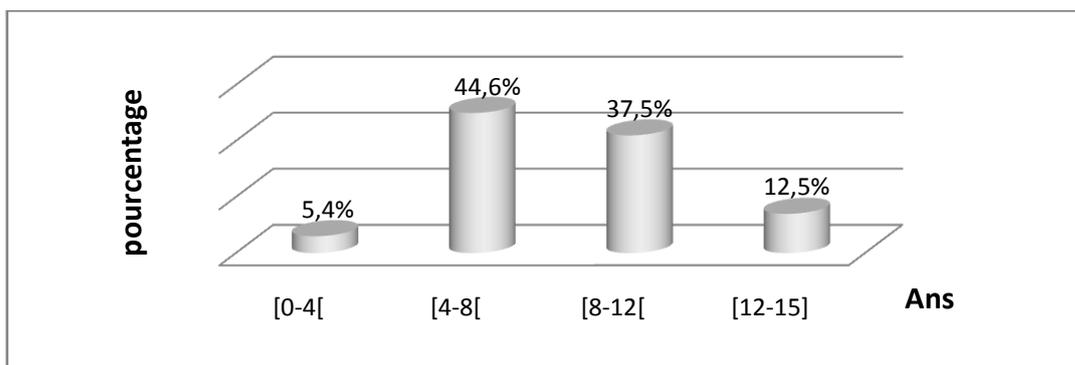


Figure 17: Répartition des patients selon leur âge.

I-1-2- Sexe des patients

La répartition selon le sexe est illustrée dans la figure 18. Nous soulignons une prédominance masculine avec un sexe ratio (M/F) de 1,55.

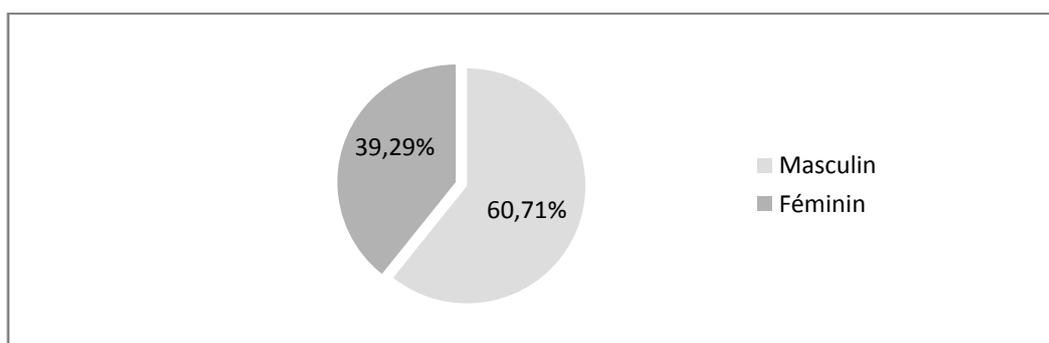


Figure 18: Répartition des patients selon le sexe.

I-1-3- Origine des patients

La figure 19 représente la répartition des patients selon leur origine géographique. Vu que nous avons travaillé à la pédiatrie de Constantine, nous notons une prédominance des patients originaires de la région.

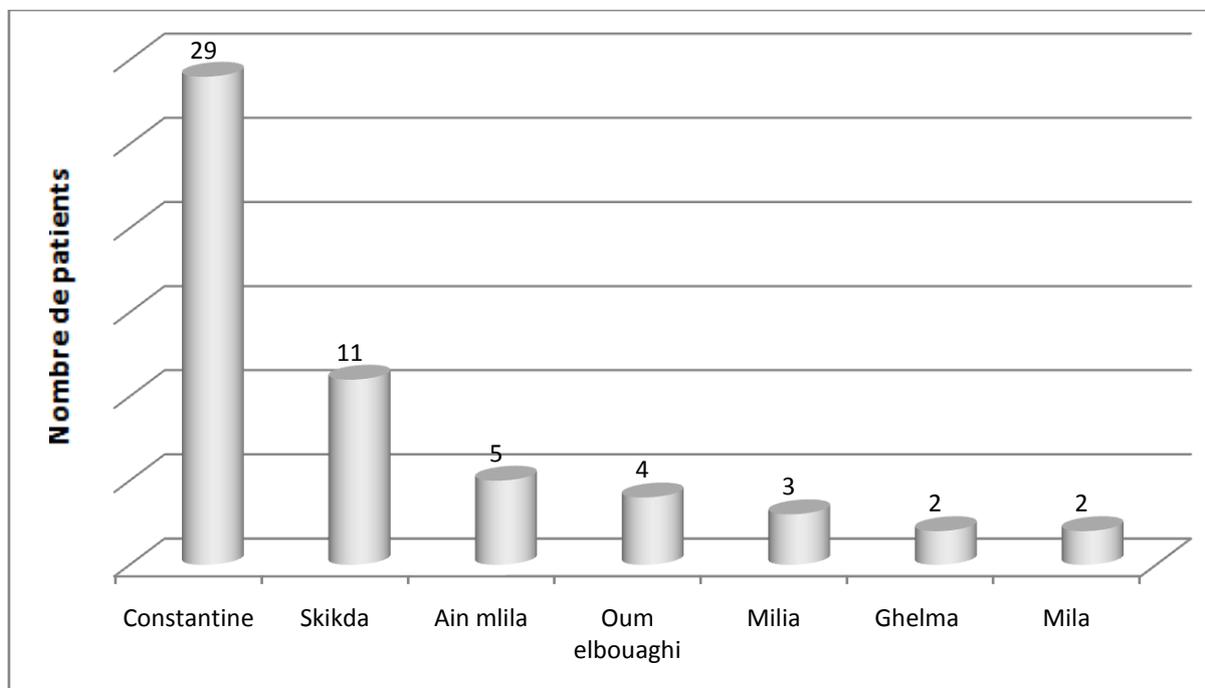


Figure 19: Répartition des patients selon leur origine.

I-2- Consanguinité et antécédents familiaux

Le nombre de patients issus de mariage consanguin et non consanguin est illustré dans la figure 20. Les patients issus d'un mariage consanguin représentent 33,93%, alors que les patients issus de mariage non consanguin représentent 66,07%.

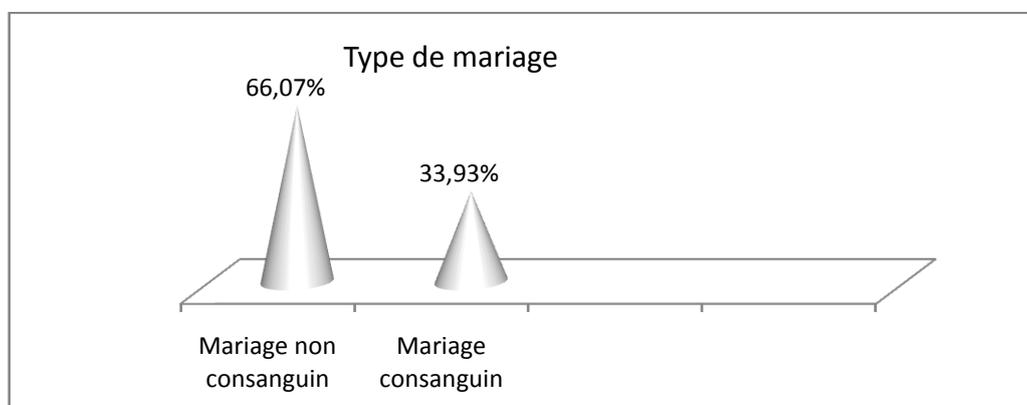


Figure 20: Pourcentage de patients issus d'un mariage consanguin et non consanguin

La figure 21 représente la répartition des patients selon le degré de consanguinité. Nous notons une prédominance du 1^{er} degré de consanguinité, suivie du 2^{ème} puis du 3^{ème} degré.

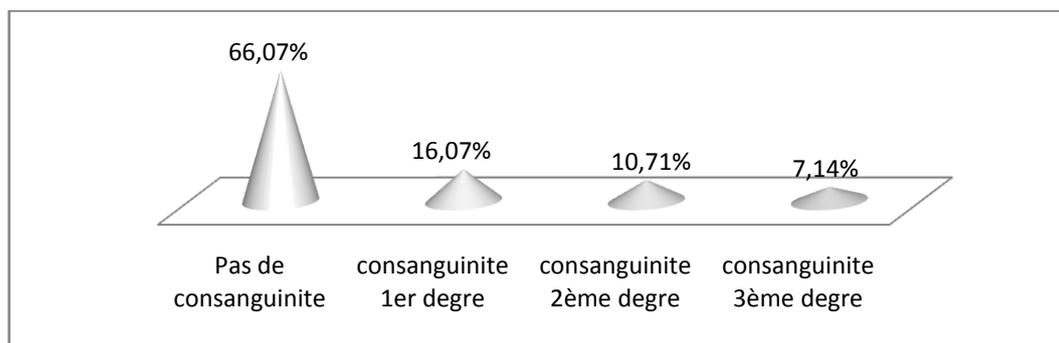


Figure 21: Répartition des patients selon le degré de consanguinité.

La figure 22 représente la répartition des patients selon leurs antécédents familiaux. Nous notons une prédominance des patients qui ont des antécédents familiaux par rapport à ceux qui non n'ont pas.

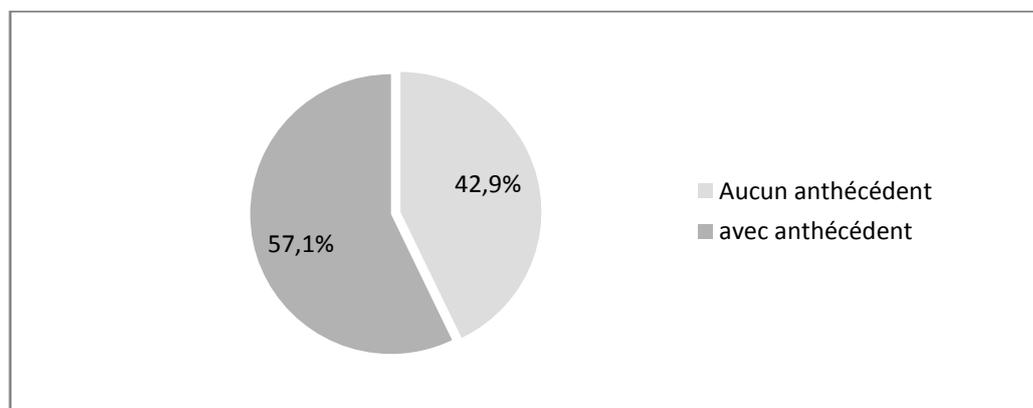


Figure 22: Répartition des patients selon leurs antécédents familiaux.

I-3- Signes cliniques de la découverte des maladies

Les signes cliniques de la découverte des trois maladies sont représentés dans la figure 23.

Dans la majorité des cas, les maladies se manifestent par une anémie, et rarement, par des douleurs abdominales.

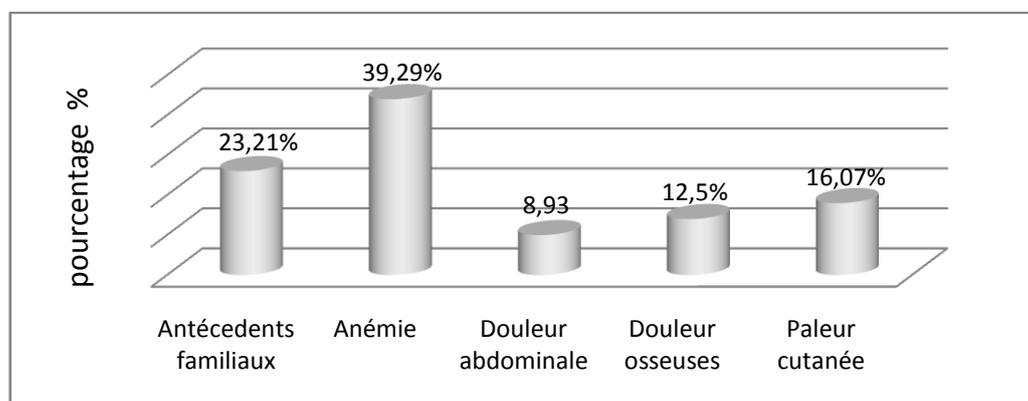


Figure 23: Signes cliniques de la découverte des maladies.

I-4- Profil hématologique

Les résultats des hémogrammes réalisés sur des enfants β -thalassémiques, drépanocytaires et thalasso-drépanocytaires sont répertoriés selon les normes adaptées au laboratoire d'accueil.

I-4-1- Hémogramme des patients β -thalassémiques

L'hémogramme que nous avons réalisé sur des enfants β -thalassémiques montre l'existence des taux variables des différents paramètres. Il montre également la présence une anémie hypochrome microcytaire (tableau 5).

Tableau 5: Paramètres d'hémogramme des enfants β -thalassémiques.

Hémogramme	Taux	Moyenne
Hémoglobine (g/dl)	3,5-9,2	8,2
Globule rouge (/L)	0,95-2,91	2,13
Hématocrite%	10,7-24,4	19,6
VGM (μ 3)	66-87	79,9
CCMH %	39,2-44,8	42,2

I-4-2- Hémogramme des patients drépanocytaires

Les résultats des hémogrammes réalisés sur les enfants drépanocytaires sont rapportés dans le tableau 6. Ces résultats illustrent également une anémie d'intensité variable.

Tableau 6: Paramètres d'hémogramme des enfants drépanocytaires.

Hémogramme	Taux	La moyenne
Hémoglobine (g/dl)	5,3-10,5	8,23
Globule rouge (/L)	1,42-2,95	2,48
Hématocrite%	14,2-28	22,47
VGM (μ 3)	86,9-100,3	83,87
CCMH %	35,8-39,6	37,71

I-4-3- Hémogramme des patients thalasso-drépanocytaires

L'hémogramme que nous avons réalisé sur des enfants thalasso-drépanocytaires montre également l'existence d'un taux variable des différents paramètres semblable aux enfants β -thalassémiques et drépanocytaires (tableau 7).

Tableau 7: Paramètres d'hémogramme des enfants thalasso-drépanocytaires.

Hémogramme	Taux	La moyenne
Hémoglobine (g/dl)	5,6-10,6	7,82
Globule rouge (/L)	1,58-3,2	2,53
Hématocrite%	11,3-28,9	21,57
VGM (μ 3)	69,7-72,5	70,75
CCMH %	34,8-38,3	37

I-5-Electrophorèse de l'hémoglobine

Un diagnostic de certitude est établi grâce à une électrophorèse d'hémoglobine. Aussi, la présence d'une fraction d'hémoglobine de migration différente des hémoglobines normales permet de poser le diagnostic des trois hémoglobinopathies. Nous avons retenu les résultats de l'électrophorèse de l'hémoglobine de trois enfants représentant les trois pathologies, ainsi que leurs parents qui confirment l'existence des hémoglobinopathies (Figure 24).

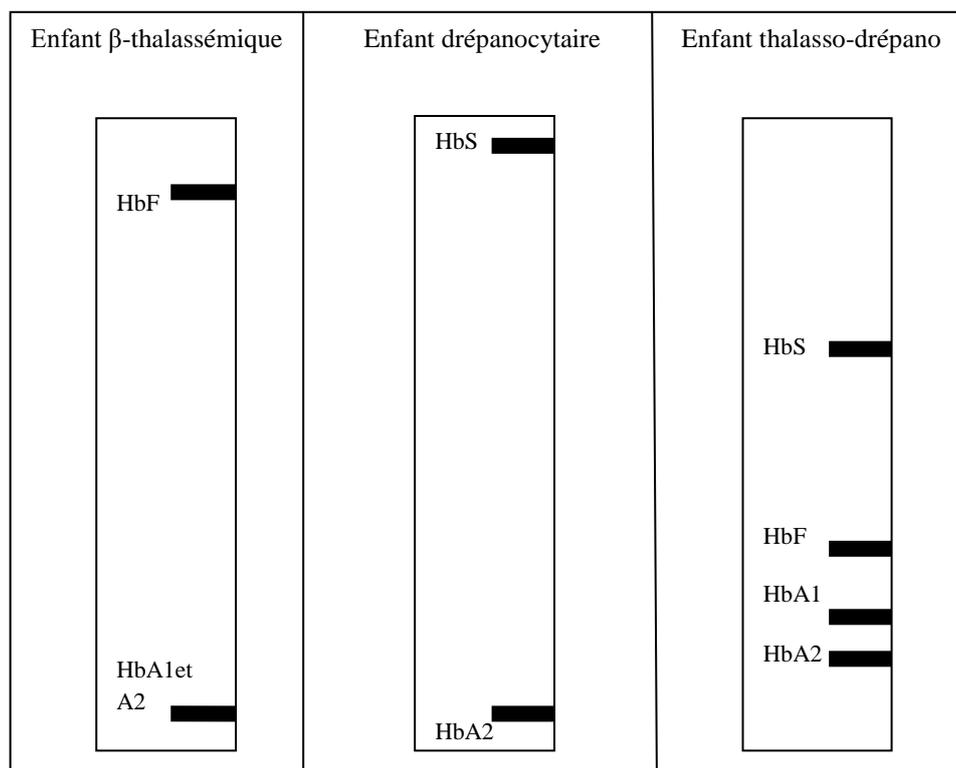


Figure 24: Représentation schématique des profils électrophorétiques de trois hémoglobinopathies

Les Tableaux 8, 9, 10 représentent les résultats de l'électrophorèse de l'hémoglobine de trois enfants représentant les trois pathologies.

Tableau 8: L'électrophorèse de l'hémoglobine d'un enfant β -thalassémique et ses parents.

Type d'Hb	Enfant	Père	Mère
HbF	96%	0%	0,6%
HbA1	2%	94%	94,3%
HbA2	2%	6%	5,1%

Tableau 9: L'électrophorèse de l'hémoglobine d'un enfant drépanocytaire et ses parents.

Type d'Hb	Enfant	Père	Mère
HbS	98%	38,2%	35,8%
HbA1	0%	58,3%	61,6%
HbA2	2%	3,5%	2,6%

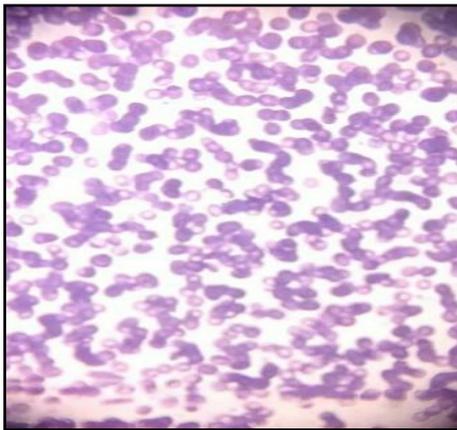
Tableau 10: L'électrophorèse de l'hémoglobine d'un enfant atteint de l'association thalasso-drépanocytose et ses parents.

Type d'Hb	Enfant	Père	Mère
HbS	64,9%	41,8%	34%
HbF	16,5%	-	1%
HbA1	10,6%	56%	63%
HbA2	8%	2,2%	2%

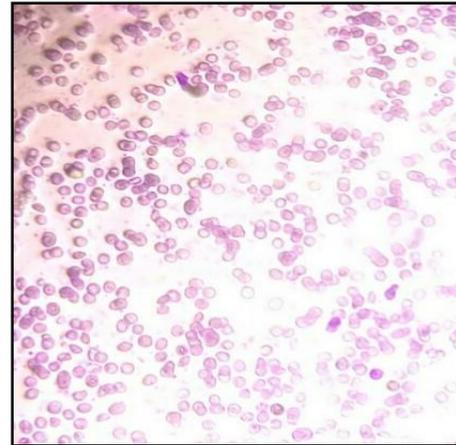
I-6- Frottis sanguin

Le frottis sanguin de patients β -thalassémique, drépanocytaire et thalasso-drépanocytaire comparé à un frottis d'une personne saine (Figure 25) a mis en évidence:

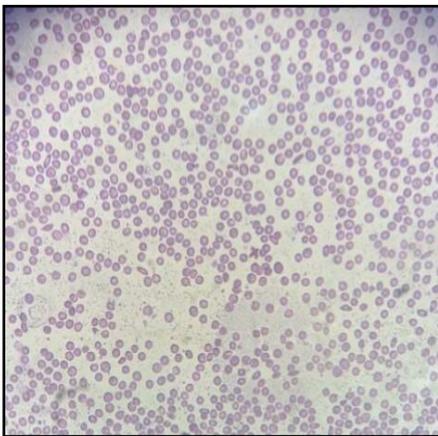
- Une microcytose.
- Une hypochromie.
- La présence de cellules cibles.
- une hématie en forme de faucille (chez les drépanocytaires et les thalasso-drépanocytaire).



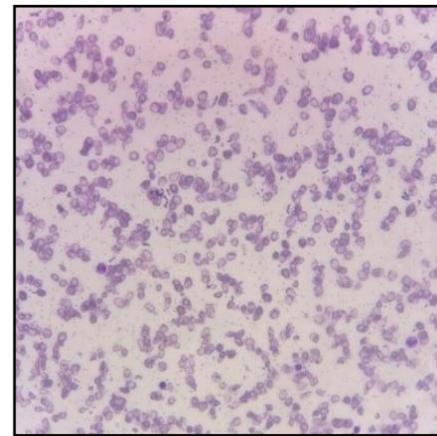
a- Personne saine



b- Un enfant β -thalassémique



c- Un enfant drépanocytaire



d- Un enfant thalasso-drépanocytaire

Figure 25: Frottis sanguin (MGG x 400).

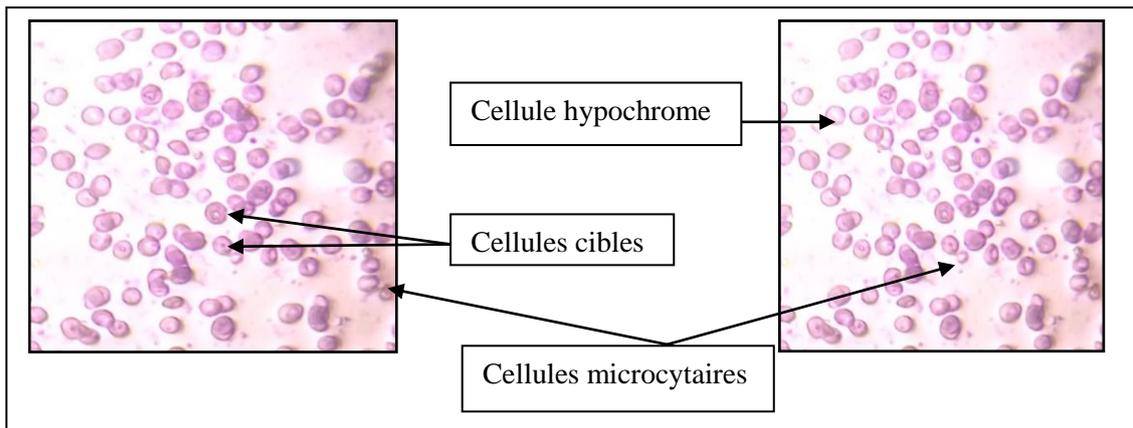


Figure 26: Cellules du frottis sanguin d'un β -thalassémique (MGG x400).

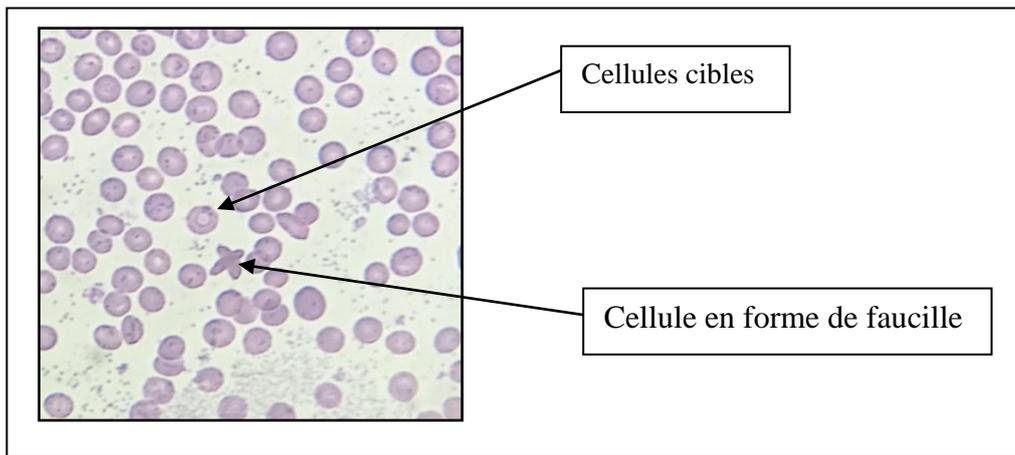


Figure 27: Cellules du frottis sanguin d'un drépanocytaire (MGG x400).

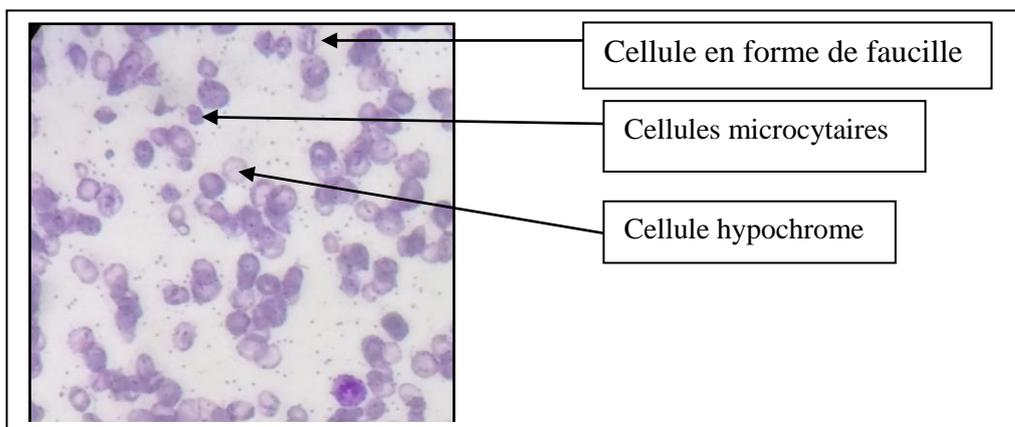


Figure 28: Cellules du frottis sanguin d'un thalasso-drépanocytaire (MGG x400).

I-7- Arbres généalogiques

La figure 29 représente l'arbre généalogique d'une famille représentative d'origine d'Oum Elbouaghui. Notons qu'aucune consanguinité n'est observée au sein de la famille.

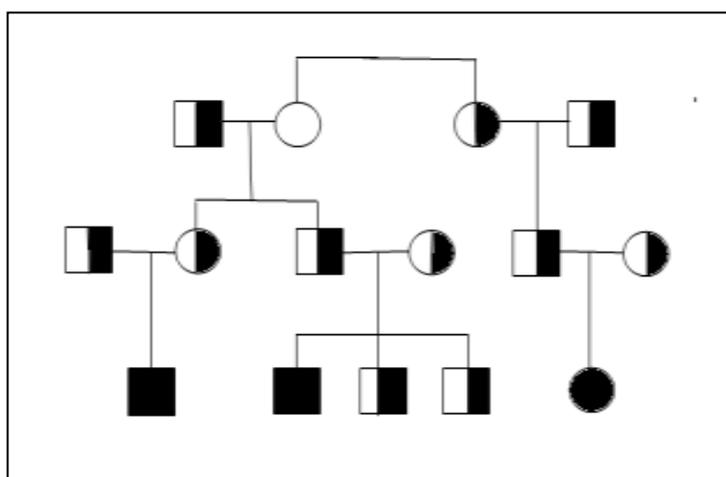


Figure 29: Arbre généalogique de la famille représentative de la β -thalassémie.

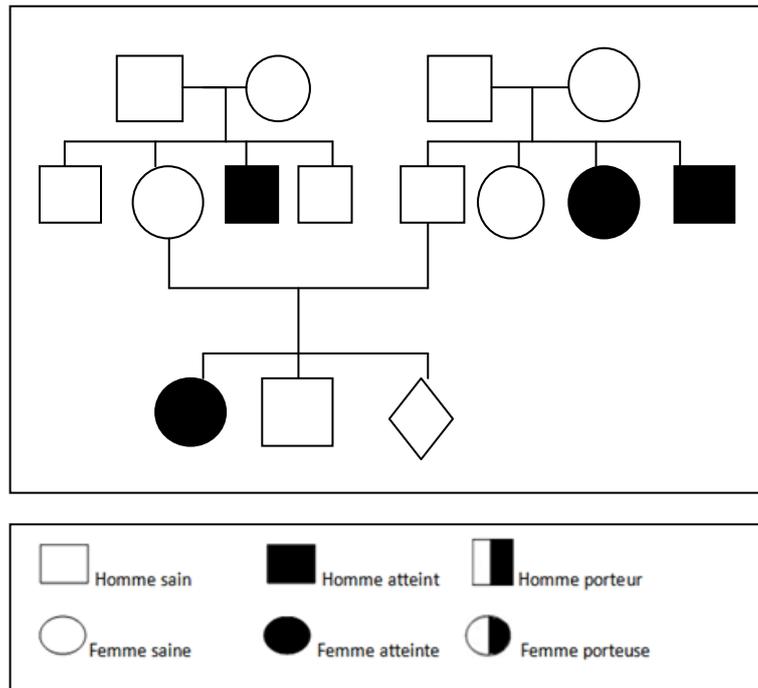


Figure 30: Arbre généalogique de la famille représentative de la drépanocytose

I-8- Profil génétique

I-8-1-Résultats de la PCR

I-8-1-1- Profil électrophorétique du polymorphisme C677T du MTHFR

Le profil électrophorétique de la PCR en utilisant les amorces du polymorphisme C677T du *MTHFR* est représenté dans la figure 31.



Figure 31: Contrôle PCR du polymorphisme C677T de la MTHFR
(une bande de 198pb).

M: marqueur, 1-15: patients.

En dépit de l'apparition de trainées dues a la qualité des produits utilisés dans la préparation du tompon de migration, nous observons l'apparition de bandes reflétant l'amplification par PCR. L'ADN génomique présente une taille d'environ 198 DA.

I-8-1-2-Etude analytique cas-témoins des profils génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T du gène MTHFR

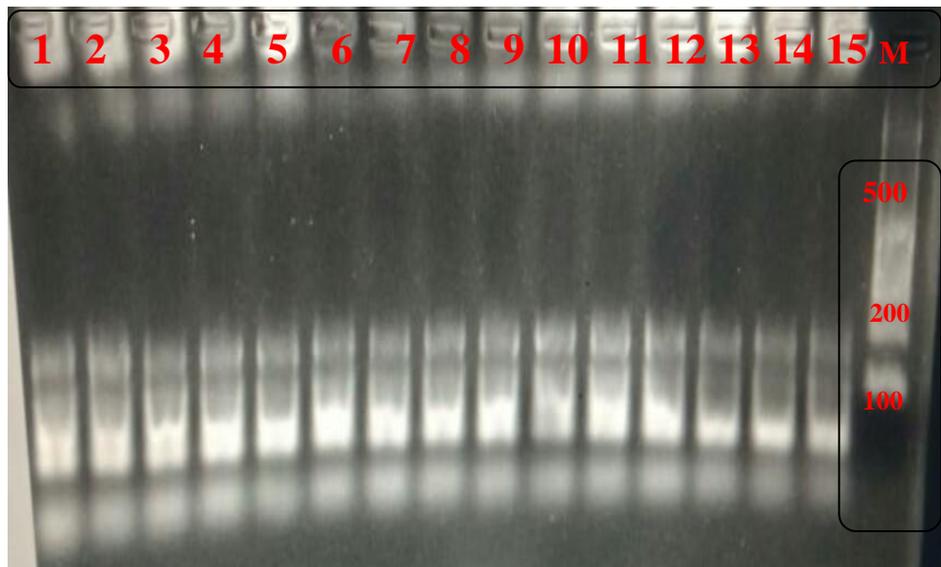


Figure 32: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose (3%) des fragments après digestion par l'enzyme *HinfI*.

M : marqueur, 1-15: sujets

Discussion

II- Discussions**II-1- Répartition selon l'âge du diagnostic**

Pour la majorité des patients, à savoir 34 cas, soit 60,7%, l'âge du diagnostic est situé entre 0 et 1 an. On peut dire que le diagnostic est fait assez précocement et ceci est réalisé grâce à la bienveillance des parents surtout quand ils se savent porteurs d'une hémoglobinopathie, ou qu'ils ont des enfants ou des cas de β -thalassémie, drépanocytose et thalasso-drépanocytose dans la famille, et aussi grâce au concours et à la vigilance des professionnels de la santé qui posent le diagnostic et s'acharnent à le poser le plus précocement possible afin d'instaurer un programme transfusionnel adéquat le moment voulu (Chevet 2015). Selon Bourkeb et Kahlat (2016), Hadjadj et Kezzoul (2016), %, l'âge du diagnostic est estimé entre 0 et 2 ans, ce qui est compatible avec nos résultats.

II-2- Répartition selon le sexe

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe une prédominance masculine avec un sexe ratio M/F de 1,55. La prédominance masculine ne peut pas être expliquée par une relation entre le sexe et les maladies puisque la transmission est autosomique c'est à dire que les pathologies étudiées touchent les deux sexes de façon égale. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Haddad et Bradai (2016), Lahlou (2016) rapportant une légère prédominance féminine avec un sexe ratio respectivement de 1,3 et 0,6. On ne peut pas tirer de conclusions avant d'élargir la taille de l'échantillon.

II-3- Répartition de la population par région

D'après nos résultats, 29 patients sont originaires de Constantine. Ces résultats ne peuvent refléter la réelle répartition des hémoglobinopathies dans la région de Constantine vu le nombre restreint de patients recrutés et chez qui le questionnaire a pu être réalisé.

II-4- Le taux de consanguinité chez les patients

Dans notre série, 19 patients, soit 33,93% des cas sont issus d'un mariage consanguin, dont 16,07% du premier degré, 10,71% de 2ème degré et 7,14% de 3ème degré, alors que 66,07% ne sont pas issus d'un mariage consanguin. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Djemaa (2013) et Lahlou (2016), qui présentent des taux de consanguinité respectivement de 61% et de 52,5%. La consanguinité seule, ne semble pas être la cause principale des maladies mais elle augmente la probabilité de l'apparition de la maladie. Le nombre d'enfants β -thalassémiques ou drépanocytaires 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.

II-5- Signes cliniques de la découverte des maladies

L'une des particularités de la maladie concerne l'hétérogénéité de son expression, tant sur le plan intra-individuel qu'interindividuel. Les manifestations pathologiques de la maladie varient en fréquence et en nature d'un individu à l'autre. Il est ainsi possible d'observer de grandes disparités d'un malade à l'autre, alors qu'en apparence rien ne les différencie sur le plan génétique. Ainsi, l'anémie est le motif de découverte le plus fréquent avec 22 cas, soit 39,29%. Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Hadjadj et Kezzoul (2016), où la pâleur cutanéomuqueuse est le motif de consultation le plus fréquent avec un nombre de cas s'élevant à 15.

II-6- Profils hématologique et électrophorétique des patients

II-6-1- β -thalassémiques

Nos résultats montrent d'une part, une intense diminution du nombre de globules rouges chez les patients atteints de formes sévères de β -thalassémie (55,35% des cas), accompagnée d'une anémie sévère chez tous les patients (100%), alors que l'anémie microcytaire est marquée chez 69% des cas, l'hypochromie chez 41% des cas. D'autre part, une augmentation du taux de l'HbF variant entre 6% et 98% 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 sont identiques à ceux publiés par Loutfi *et al.* (2016), indiquant que la plupart 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-6-2- Drépanocytaires

Dans notre étude, l'hémogramme était pratiqué de façon systématique pour les malades. L'anémie était retrouvée chez tous les enfants, le taux d'hémoglobine variait entre 5,2 et 10,5 g/dl, rejoignant les études faites par Hakek *et al.* (2010). L'anémie est souvent accompagnée d'une hypochromie et constitue un signe biologique évocateur d'une hémoglobinopathie. Le profil électrophorétique a montré que la totalité des patients avaient une bande intense de l'hémoglobine S et une autre bande migrant en position A2 d'intensité variable.

II-6-3- Association thalasso-drépanocytaires

Sur le plan biologique, les anomalies de l'hémogramme les plus rencontrées chez les thalasso-drépanocytaires sont l'anémie sévère présente dans tous les cas, une microcytose dans 58 % et, une hypochromie dans 22,16 % des cas. Pour les enfants thalasso-drépanocytaires, le diagnostic a été porté devant un taux d'hémoglobine S supérieur à 40% excluant une drépanocytose, avec présence de l'hémoglobine A, éliminant ainsi la drépanocytose.

II-7- Frottis sanguin

Le frottis sanguin de patients β -thalassémiques, drépanocytaires et thalasso-drépanocytaires montre l'existence des anomalies érythrocytaires comme l'anisocytose à prédominance microcytaire, une hypochromie avec la présence de cellules cibles, une hématie en forme de faucille (chez les drépanocytaires et les thalasso-drépanocytaires).

II-8- Arbres généalogiques

II-8-1- Arbres généalogique d'une famille représentative de la β -thalassémie

Les individus I.2 et I.3 sont des sœurs, I.2 saine et I.3 porteuse. Elles sont mariées respectivement avec I.1 et I.4 qui sont aussi des porteurs (mariage non consanguin premier degré). Le résultat de leurs descendance II.2, II.3, II.5 (génération deuxième degré) est positif (porteurs). Le mariage s'est effectué malheureusement entre deux individus porteurs (mariage non consanguin deuxième degré) est a donné naissance à des individus de troisième degré:

Mariage II.1 avec II.2 a donné, un garçon malade (III.1), mariage II.3 avec II.4 a donné, un garçon malade (III.2) et deux garçons porteurs (III.3 et III.4), mariage II.5 avec II.6 a donné, une fille malade (III.5). Ces observations concordent avec ce qui est rapporté dans la littérature, le mode de transmission de la β -thalassémie qui est récessif, car les enfants atteints (homozygotes), sont issus de parents non atteints (hétérozygotes). Donc, la présence des deux allèles mutés est nécessaire pour l'apparition de la maladie. Ainsi, la consanguinité n'est pas la cause principale de la manifestation de la maladie.

II-8-2- Arbres généalogique d'une famille représentative de la drépanocytose

Notons qu'aucune consanguinité n'est observée au sein de cette famille. On peut remarquer que les enfants malades, par exemple, II.7 et II.8 ont des parents phénotypiquement sains I.3 et I.4. Ceci signifie que les parents portent tous les deux l'allèle atteint à l'état masqué, qui n'est pas exprimé et qui l'ont transmis à leurs enfants. Même chose pour les individus III.1 et II.3 qui ont aussi des parents sains. Ces observations concordent avec ce qui est rapporté dans la littérature, le mode de transmission de la drépanocytose qui est récessif, car la plus part des enfants atteints, sont descendus de parents non atteints. La présence des deux allèles mutés est

nécessaire pour l'apparition de la maladie. La consanguinité n'est pas la raison principale de la maladie.

II-9-Profiles génotypiques

II-9-1- Résultats de la PCR

La recherche par RFLP-PCR d'une association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR de la β - thalassémie et la drépanocytose a été entravée à cause de problèmes techniques, notamment dans les produits utilisés.

Conclusion

Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons traité les aspects para-clinique, épidémiologique, hématologique et génétique des trois hémoglobinopathies, β -thalassémie, drépanocytose, thalasso-drépanocytose.

L'ensemble des résultats obtenus a permis d'affirmer que, la β -thalassémie et la drépanocytose ne sont pas uniquement dues à la consanguinité, mais sont également associées au mariage non consanguin. Les trois pathologies ont une prédominance masculine.

L'association entre le polymorphisme C677T de la MTHFR et les trois maladies a été entravée à causes de défaillances techniques. Néanmoins, la taille de l'échantillon utilisé dans la partie moléculaire n'aurait pas permis de tirer de conclusion quant à cette association. Cependant, cette partie nous a permis de se familiariser avec les techniques de biologie moléculaire, notamment l'extraction de l'ADN, la PCR, l'électrophorèse de l'ADN et la RFLP-PCR.

Afin de diminuer le risque des deux maladies, il serait important de réaliser une étude pour connaître la prévalence de ces pathologies et de développer un plan de prévention qui repose sur le diagnostic prénatal, le diagnostic des individus porteurs et le conseil génétique.

Nous proposons dans les études ultérieures de :

- Augmenter le nombre de patients et poursuivre l'étude de l'association du polymorphisme C677T de la MTHFR et la β -thalassémie et la drépanocytose.
- Séquencer les mutations des gènes de la β -thalassémie, la drépanocytose et thalasso-drépanocytose.

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.
- AGARWAL MB. 2004. Advances in management of thalassemia. Indian pediatrics. 41. P P 989-992.
- AL-MOSAWY WF. 2017. The beta-thalassemia. Scientific Journal Of Medical Research. P P 24-30.
- AUBRY, BERNARD-ALEX.2017. Diplôme en médecine hémoglobinose. Institut de médecine tropicale. Université de bordeaux. P 3-4.
- AUFRADET E.2013. Drépanocytose et activité physique : conséquence sur les mécanismes impliqués dans l'adhérence vasculaire l'inflammation et le stress-oxydatif. Thèse de doctorat en science et technique des activités physique et sportive université de Lyon. P P 23-24.
- 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. P P29-57.
- BERNAUDIN F, DHEDIN N.2016. Greffe dans la drépanocytose: résultats, indications et perspectives. John Libbery ,n°2 (22) :117-34.
- BONELLO-PALOT N, CERINO P, JOLY P, BADENS C. 2016. Les thalassémies en 2016. Revue Francophone Des Laboratoires. 481. P P 67-75.
- BONELLO P, MATHIEU C, JOLY P. Les thalassémies en 2016. maladie de l'hémoglobine.2016.
- BOURKEB, KAHLAT. Etude de la prévalence de la beta thalassémie dans la région de Bejaia. 2017. P P 8-1.
- BUPHA T.2012. La drépanocytose à l'officine: dispensation du siklos et éducation thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Lorraine. p 58.
- BERNAUDIN F, DHEDIN N.2016. Greffe dans la drépanocytose: résultats, indications et perspectives. John Libbery ,n°2 (22) :117-34.
- BERNAUDIN F, DHEDIN N.2016. Greffe dans la drépanocytose: résultats, indications et perspectives. John Libbery ,n°2 (22) :117-34.
- CAVAZZANA M.2010. thérapie génique dans la drépanocytose, médecine / science ,n°2 (33) :155.
- CHABI ILOUGBADE O. Hémoglobinose C : Étude de Cohorte réalisée au Laboratoire de Biochimie et de Toxicologie de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V (HMIMV) – Rabat. 2014. P P 47-50.

- COBAS. Mesure de l'HbA1c et interférences dues aux troubles de l'hémoglobine. 2014. P 4.
- COUQUE N, DE MONTALEMBERT M. 2013. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. Feuilles de Biologie. 311. P P 5-18.
- COUQUE N, ELISABEUT T, ELION J. Génétique des maladies de l'hémoglobine. Revue Francophone des Laboratoires · 2016. P P 49-50.
- DEGUELLE N.2014. L'automédication antalgique chez les patients drépanocytaires: usage ou mésusage ? Une enquête déclarative réalisée au chu de Rouen. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Rouen. p 20.
- DERLIN G, NDONG A .2012. La drépanocytose a l'officine : dispensation du siklos et éducation thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de l'orraine. p 19.
- DERLIN G, NDONG A .2012. La drépanocytose a l'officine : dispensation du siklos et éducation thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de l'orraine. P 36.
- DJEDDI, BENAMEUR. DEPISTAGE DES HEMOGLOBINOPATHIES AU CHU TLEMCE. 2017. P P 3-27.
- 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. P P11-20.
- DUGUELLE N.2014. L'automédication antalgique chez les patients drépanocytaires: usage ou mésusages ? Une enquête déclarative réalisée au chu de Rouen. Thèse de doctorat. Université de Rouen. pp 24-25.
- DUGUELLE N.2014. L'automédication antalgique chez les patients drépanocytaires: usage ou mésusages ? Une enquête déclarative réalisée au chu de Rouen. Thèse de doctorat. Université de Rouen. pp 43-44.
- ENCYCLOPEDIE ORPHANET GRAND PUBLIC.2011. La drépanocytose. anémie falciforme, anémie à hématies falciforme. pp 4-7.
- ENCYCLOPEDIE ORPHANET GRAND PUBLIC.2011. La drépanocytose anémie falciforme, anémie à hématies falciforme.
- ELION J, LAURANCE S, LAPOUM2ROULINE C.2010. Physiopathologie de la drépanocytose. Médecine tropicale. Université paris Diderot. pp 454-455.
- EL KAMAH G, AMR K. 2015. Thalassaemia-From Genotype to Phynotype. Inherited Hemoglobin Disorders. Anjana Munshi. P P 13-33.
- GALANELLO R, ORIGA R. 2010. Beta-thalassaemia. Orphanet Journal Of Rare Diseases. 5. P P 1- 15.

- 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.
- GREENE D, VAUGN C, CREWS B, AGARWAL A. 2015. Advances in detection of hémoglobinopathies. Clinica Chimica Acta. 439. P P 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..P P 10-13.
- HALIMI. ALPHA THALASSEMIES. 2013. P P 43-45.
- HARDISON RC. 2012. Evolution of Hemoglobin and Its Genes. Cold Spring Harpor Perspectives in Medicine. P 1-18.
- 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). P P 1562-1570.
- JOLY P, PONDARRE C, BADNES C. 2014. Les beta-thalassémies: aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. Annales de Biologie Clinique. P P 641- 664.
- KAPLAN JC, DELPECH M. 2007. Biologie Moléculaire et Médecine. Flammarion. P P 87 88.
- KATSUMURA KR, DEVILBISS AW, POPE NJ, JOHNSON KD, BRESNICK EH. 2013. Transcriptional Mechanisms Underlying Hemoglobin Synthesis. Cold Spring Harbor Perspectives Medicine. P P 1-19.
- 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. P P 80-82.
- LABIE D, ELION J.1996. Modulation polygénique des maladies monogénique: l'exemple de la drépanocytose. Médecine / science. n°3, vol 12. P 344-346.
- Kerroum B. les thalassémies , étude des cas au CHU du fêr. 2015. P P 12-17.
- LIFFRANO .2017.drépanocytose. La thérapie génique offre de nouveaux espoirs pour les malades en Afrique, jeune Afrique.
- LIONNET F .2016. Conseil génétique et grossesse idéalement dans cet ordre. Parcours de soins, n°4. p 301.
- 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. P P 34.

- 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).P P 268-273.
- MAHMOUH A.2013. La drépanocytose chez l'enfant au service de pédiatrie a l'hôpital ALFARABI Oujda. Thèse de doctorat en médecine. Université sidi Mohamed ben Abdallah. N° :083. pp 10-11.
- NAGEL R L, FABRY M E, STEINBERG M H.2003. The paradox of hemoglobin sc disease blood. P 167-178.
- 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.
- OUAKASSA S.2015. Drépanocytose homozygote chez l'enfant à l'hôpital provincial de tranger. Thèse de doctorat en médecine. Université Mohammed v rabat .n°84. p 31.
- PIEL F B. 2013. Distribution géographique de la drépanocytose. Médecine science. P P 965-967.
- QIRAOUANI BOUCETTA. Dosage de l'Hémoglobine glyquée (HbA1c). UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE. 2015. P 2.
- ROBIEN K., CORNELIA M. , ULRICH C. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase. Polymorphisms and Leukemia Risk. Epidemiol (2003).
- ROBIEN K. CORNELIA M. ULRICH C. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk. Epidemiol. 2003.
- ROSSI A, SALVETTI A .2016. Thérapie génique dans la drépanocytose, médecine/science .n°2 (33) : 167.
- RIBEIL JA, ARLET JB, DUSSIOT M, MOURA IC, COURTOIS G, HERMINE O. 2013. Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia. The Scientific World Journal. 5.
- 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. P P 807-814.
- SAFFROY R., LEMOINE A., DEBUIRE B. (2005).MTHFR (5,10- Methylene tetrahydrofolate reductase). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.

- SANDHYA RP, VIJAYAKUMAR S, KUMAR VG, CHANDANA N. 2013. β -Thalassemia- Mini Review. International Journal of Pharmacology Research. 2(3): 71-79.
- SCHWALLER Hélène. BÊTA-THALASSEMIE MAJEURE ET LYMPHOCYTOSE Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patientssuivis au CHRU de NANCY. P 27.
- SAYED SZ, ALY BA, ABD EL-HAKIM AA, OMAR SM, AMIN AS. 2013. The early cardia involvement with β -thalassemia major. The Egyptian Heart Journal. 65 : 243-249.
- SOUANNAVONG DAOSAVANH.2016. Les médecins complémentaires chez les patients drépanocytaire. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Rouen. pp 31-32-33.
- TAMINI .S.F.B.2012. Technique électrophorétique.
- TAHER A, VICHINSKY E, MUSALLAM K, CAPPELLINI MD, VIPRAKASIT V. 2008. Guidelines for the clinical management of thalassemia. Thalassemia International Federation. P P 1-120.
- TEBANI F.2017. Approche descriptive de la drépanocytose chez les enfants scolarisée à sidi Amar (Annaba). Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire. Université frères Mentouri Constantine 1.
- 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. P P 649-660.
- THUERT I. 2014. Prise en charge des béta-thalassémies. La revue du praticien .2014.
- THUERT I. 2014. Prise en charge des béta-thalassémies. La revue du praticien P P 1132.
- TIENDREBEOGO J.2013. Prise en charge des syndromes drépanocytaires majeurs chez les enfants de 0 à 15 ans au centre hospitalier universitaire pédiatrique Charles de gaulle et au centre médical saint Camille de Ouagadougou : marqueurs génétique caractéristique clinique et cout médical direct de la prise en charge. Thèse de doctorat en médecine. Université d'Ouagadougou. pp 20-25.
- TIENDREBEOGO T.2013. Prise en charge des syndromes drépanocytaires majeurs chez les enfants de 0 à 15 ans au centre hospitalier universitaire pédiatrique charlle de gaulle et au centre médical. Saint camille d'Ouagadougou: marqueurs génétiques, caractéristiques cliniques et cout médical direct de la prise en charge. pp 32-33.
- 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. P P10-11.

Annexe

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

Etapes	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)	<p>Mise en contact lamelle / sang</p> <p>1 2 3 4</p> <p>Réalisation du frottis</p>
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 mouvement doit être rapide, régulier, sans trop appuyer, en maintenant la même inclinaison. - 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 Giemsa.

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, Cristalliseur pour la récupération des eaux de rinçage.

Etapes	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%:

S%: (chez les drépanocytaires et les thalasso-drépanocytaires)

Bilan hématologique:

Hb:

GR:

HCT:

VGM:

TCMH:

CCMH:

L'électrophorèse d'Hb des parents:

Père: A1: A2%: F%: S%:

Mère : A1%: A2%: F%: S%:

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 associés 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:

Annexe 3 (suite)

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.

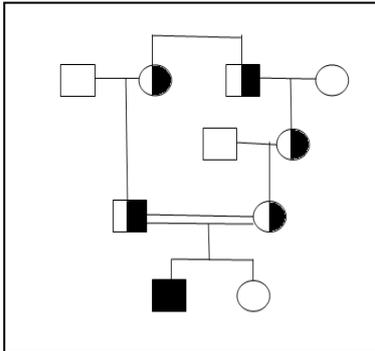
2- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

Annexe 4 : Normes d'hémogramme utilisées au laboratoire d'hémiologie de l'EHS mère enfants.

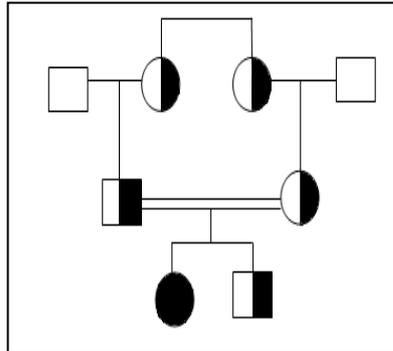
Paramètres	Normes
Hb	12-16 10 ⁶ /μL
GR	3,5-5,5 g/dl
HCT	35-49 g/dl
VGM	80-100 fL
CCMH	31-37 g/dl

Annexe 5 : Arbres généalogiques

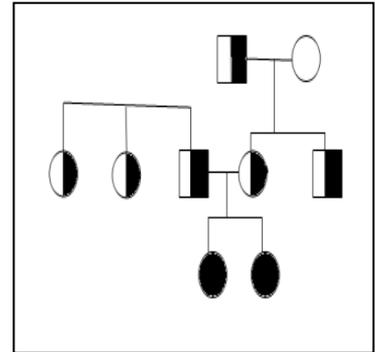
Famille 1



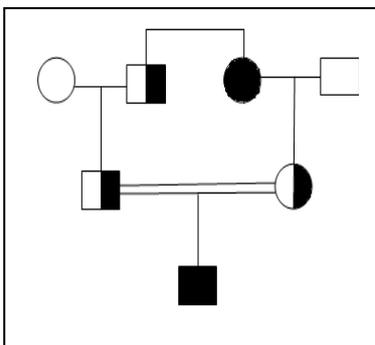
Famille 2



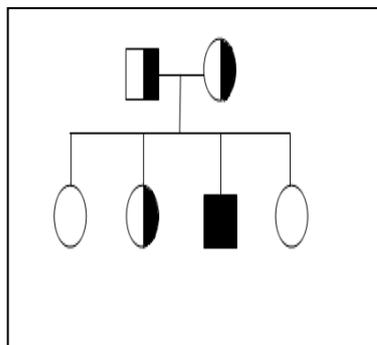
Famille 3



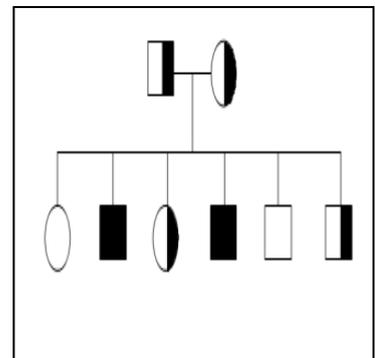
Famille 4



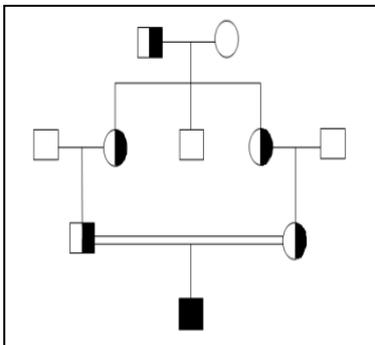
Famille 5



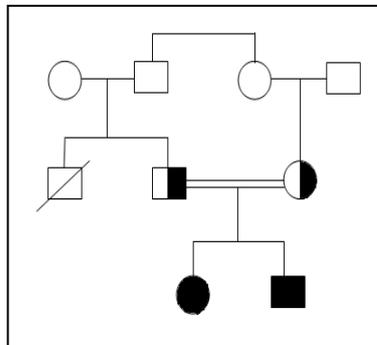
Famille 6



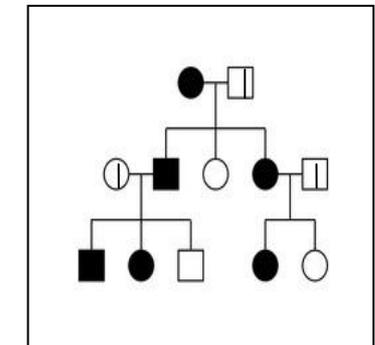
Famille 7



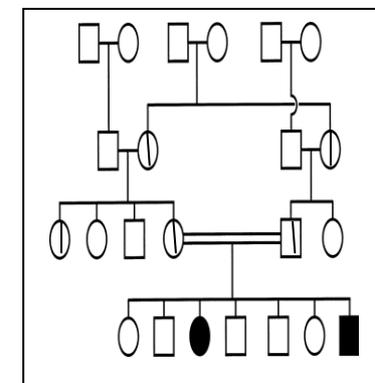
Famille 8



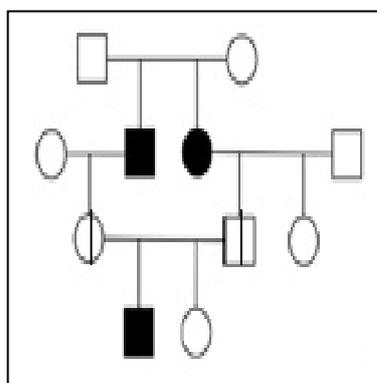
Famille 9



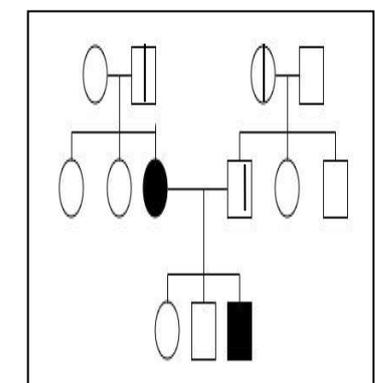
Famille 10



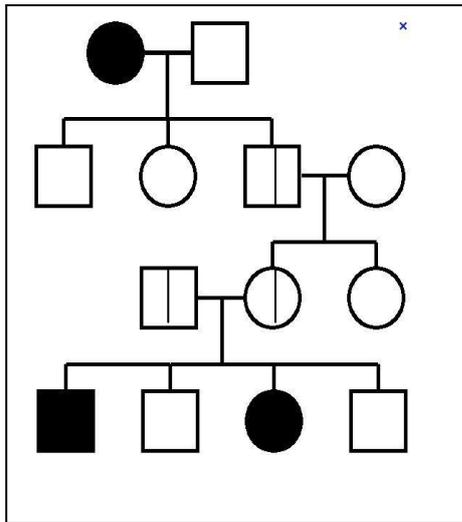
Famille 11



Famille 13



Famille14



Résumé

Les hémoglobinopathies, principalement constituées par les thalassémies et les drépanocytoses, sont des affections héréditaires. Le diagnostic des thalassémies et des drépanocytoses nécessitent la caractérisation de l'anomalie porté par le gène atteint.

Notre objectif était d'étudier les aspects para-clinique, épidémiologique, hématologique et génétique des trois hémoglobinopathies, β -thalassémie, drépanocytose, thalasso-drépanocytose, suivis au sein du service pédiatrique d'EHS mère-enfant Constantine, durant 3 mois.

Durant cette période, 56 patients atteints de la drépanocytose et la thalassémie ont été recrutés. Les patients sont âgés entre 1-15 ans répartis entre les deux sexes. Les parents sont consanguins dans 33,93% des cas. Les enfants ont un antécédent familial dans 42,9%.

L'hémogramme a été marqué par une anémie chez les patients homozygotes atteints de forme sévère. Parfois, une diminution du nombre de globules rouges et une anémie hypochrome microcytaire sont observées.

Une étude de l'association du polymorphisme C677T de la MTHFR et les trois maladies, β -thalassémie, drépanocytose, thalasso-drépanocytose nous a permis de se familiariser avec les techniques de biologie moléculaire.

Mots clés : β -thalassémie, drépanocytose, anémie, polymorphisme, MTHFR.

Summary

Hemoglobinopathies, mainly by the thalassemia and sickle cell anemia, are hereditary. The diagnosis of thalassemia and sickle cell anemia require the characterization of gene carried by the anomaly reached.

Our aim was to study, para-clinical aspects, epidemiological, heamatological and genetic of three hemoglobinopathies, thalassemia, sickle cell anemia, thalasso-sickle cell disease followed in pediatric department of HHF (hospital health facility) mother-child Constantine, over a period of 3 months.

During this period, 56 person suffring of sickle cell anemia and thalassemia were recruited. They aged between 1-15 years, divided between the two sexes. The parents are consanguineous in 33,93 % of the cases. Children have a family history in 42,9 %.

The hemogram was marked by a decrease in the number of red blood cells and hypochromic anemia, in homozygous patients with severe forms.

A study of association of polymorphisms C677T of MTHFR and the three diseases, thalassemia, sickle cell anemia, thalasso-sickle cell disease allowed us to learn with molecular biology techniques.

Key word: thalassemia, sickle cell anemia, anemia, polymorphisms, MTHFR.

ملخص

أمراض خضاب الدم التي تتكون من التلاسيميا وفقر الدم المنجلي هي عبارة عن أمراض وراثية. التشخيص الجزئي لهذه الأمراض يتطلب وصف الوضع الشاذ على المورثة المصابة.

هدفنا هو دراسة الجوانب شبه السريرية، الوبائية، أمراض الدم و الوراثة لكل من الأمراض الثلاثة، التلاسيميا ، فقر الدم المنجلي والارتباط تلاسيميا _ فقر الدم المنجلي ، المتبعة في خدمة طب الأطفال بمستشفى الأمومة و الطفولة قسنطينة لمدة ثلاثة أشهر.

خلال هذه الفترة جمعنا 56 مصاب بالتلاسيميا ، فقر الدم المنجلي و الارتباط تلاسيميا _ فقر الدم المنجلي التي تتراوح أعمارهم ما بين 1-15 سنة مقسمة بين الجنسين. نجد زواج الأقارب بين الوالدين في 33.93 بالمائة من الحالات. الأطفال لديهم أقارب مصابين في 42.90 بالمائة.

عملية تعداد الدم عند المصابين بأشكال حادة، تميزت بنقص شديد في حجم وعدد الكريات الحمراء ونقص الانصبغ. سمحت لنا دراسة الارتباطات بين تعدد الأشكال C677T من MTHFR و التلاسيميا ، فقر الدم المنجلي و الربط بين المرضين التلاسيميا وفقر الدم المنجلي بالتعرف على تقنيات البيولوجيا الجزيئية.

-الكلمات المفتاحية التلاسيميا، فقر الدم المنجلي، فقر الدم، تعدد الأشكال MTHFR

**Profils épidémiologique, hématologique et génétique de β -thalassémiques
et de drépanocytaires, dans la région de Constantine**

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

Les hémoglobinopathies, principalement constituées par les thalassémies et les drépanocytoses, sont des affections héréditaires. Le diagnostic des thalassémies et des drépanocytoses nécessitent la caractérisation de l'anomalie porté par le gène atteint.

Notre objectif était d'étudier les aspects para-clinique, épidémiologique, hématologique et génétique des trois hémoglobinopathies, β -thalassémie, drépanocytose, thalasso-drépanocytose, suivis au sein du service pédiatrique d'EHS mère-enfant Constantine, durant 3 mois.

Durant cette période, 56 patients atteints de la drépanocytose et la thalassémie ont été recrutés. Les patients sont âgés entre 1-15 ans répartis entre les deux sexes. Les parents sont consanguins dans 33,93% des cas. Les enfants ont un antécédent familial dans 42,9%.

L'hémogramme a été marqué par une anémie chez les patients homozygotes atteints de forme sévère. Parfois, une diminution du nombre de globules rouges et une anémie hypochrome microcytaire sont observées.

Une étude de l'association du polymorphisme C677T de la MTHFR et les trois maladies, β -thalassémie, drépanocytose, thalasso-drépanocytose nous a permis de se familiariser avec les techniques de biologie moléculaire.

Mots clés : β -thalassémie, drépanocytose, anémie, polymorphisme, MTHFR.

Laboratoire de recherche : Laboratoire d'hématologie et de biochimie d'EHS mère-enfant Constantine.

Laboratoire de biologie et génétique moléculaire CHU Constantine.

Laboratoire de biologie moléculaire du CRBT Constantine.

Laboratoire de cytogénétique du CRBT Constantine.

Jury d'évaluation :

Président : REZGOUNE-CHELLAT Djalila (MCA-UFM Constantine1).

Rapporteur : BECHKRI Sakina (MCB-UFM Constantine1).

Examineur : CHETTOUM Aziz (MCA -UFM Constantine1).

Date de soutenance : 02/07/2018