

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des sciences de la nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département de la Biologie Animale

قسم بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé

**Etude Moléculaire du polymorphisme T786C du gène *NOS3*  
chez les patients atteints de la drépanocytose**

Présenté et soutenu par : Meghezzi Ghada

Djamaa Randa

Jury d'évaluation

**Président** : Dr SEMMAME Ouarda (MCA-université Frères Mentouri, Constantine 1)

**Encadreur** : Dr DAOUI Zineb (MCB-université Moustafa Ben Boulaid, Batna 2)

**Examineur** : Dr SEDRATI Khadidja (MCA-université frères Mentouri, costantine 1)

Année universitaire

2023-2024

**REMERCIEMENT**

## Remerciements

قال الله تعالى : { يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ }

Au nom de Dieu le Miséricordieux, Le grand merci Lui revient pour nous avoir donné le courage et la patience de mener à terme ce travail.

Nos remerciements et nos gratitude pour notre encadrante **Docteur Daoui zeineb** maitre de conférences qui a eu la gentillesse de nous confier ce travail très intéressant et de nous guider à chaque étape de sa réalisation , malgré ses obligations professionnelles, elle nous a réservés toujours le meilleur accueil. Votre générosité madame, simplicité, Bienveillance, encouragements, et vos grandes qualités humaines et capacité intellectuelle vous placent au rang des grands. Nous profitons de cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude et vous témoigner notre respect.

On tient à remercier le personnel du laboratoire du Centre de Recherche et Biotechnologies ( CRBT) , particulièrement **Docteur Rehab Hamza**.

On remercie sincèrement **Docteur Semmam Ouarda** qui a accepté de présider le jury de ce mémoire. On remercie également le membre du jury **Docteur Sedrati Khadija** qui n'a pas hésité à juger ce travail.

Toute notre gratitude pour ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



**DEDICACE**

## Dédicace

Je dédie ce travail...

A mes chers parents. A la personne la plus chère pour moi dans se monde , Ma mère **Delloul Samia** qui est la fleur de ma vie, le symbole de l'amour et la tendresse qui s'es sacrifier pour mon bonheur et ma réussite. Mon père **Salah** qui a fait de moi, ce que je suis aujourd'hui. Je vous remercie mes chères pour tout ce que vous avez fait pour moi, depuis tant d'années, pour votre éducation, les valeurs que vous nous transmettez, votre soutien indéfectible, et pour nous pousser toujours vers le succès , vous êtes en bonne santé et vivez longtemps afin que je puisse vous obtenir en retour sans jamais vous laisser tomber . A mon très chers et unique frère **Ouadjih** , les mots ne suffise guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour lui , je vous souhaite bonne chance pour l'avenir.

Ma chère cousine **Delloul Lyna** et son mari **Dajebr** , son aide et ses conseils m'ont permis de surmonter les moments les plus difficiles .

A mon binôme **Randa** , merci pour votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir m' ont énormément marqués.

Ghada

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes chers parents, qui m'ont prodigué amour, compréhension, encouragements et conseils tout au long de mon parcours.*

*Mon seul frère Younes et mes sœurs : Ines, Sabrina, Raouia que je les aime très très fort*

*Mes neveux et nièces : Baraa, Roeya, Saden, Makka, Tadjou, Salah, Imran*

*Ma copine Dounia et tous les amies que je les aime et m'aiment*

*Ma cousine Khouloud et tous les membres de ma grande famille*

*Mon binôme Ghada avec qui j'ai partagé les efforts de ce travail*

*Randa*

# TABLE DES MATIERS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

INTRODUCTION

1

## Etude Bibliographique

<b>I. Hémoglobine humaine</b>	<b>3</b>
<b>1. Définition</b>	<b>3</b>
<b>2. Structure de l'hémoglobine</b>	<b>3</b>
2.1. Hème	4
2.2. Globine	5
2.3. Liaisons entre les sous-unités de l'hémoglobine	5
<b>3. Rôle et fonction de l'hémoglobine</b>	<b>5</b>
<b>4. Biosynthèse de l'hémoglobine</b>	<b>6</b>
<b>5. Gènes de l'hémoglobine</b>	<b>6</b>
5.1. Groupe des gènes de type $\alpha$	7
5.2. Groupe des gènes de types $\beta$	8
5.3. Régulation de gène d'hémoglobine	9
<b>6. Anomalies d'hémoglobine</b>	<b>9</b>
6.1. Hémoglobinopathies	10
6.1.1 Hémoglobine S	10
6.1.2 Hémoglobine C	10
6.1.3 Hémoglobine E	11
6.2. Thalassémies	11
6.2.1. $\beta$ -Thalassémies	11
6.2.2. $\alpha$ -Thalassémies	12
<b>II. Drépanocytose</b>	<b>12</b>
<b>1. Définition</b>	<b>12</b>

<b>2. Historique</b>	<b>12</b>
<b>3. Epidémiologie</b>	<b>13</b>
<b>4. Classification des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM)</b>	<b>14</b>
4.1. Drépanocytose homozygote (malade, individu SS)	14
4.2. Drépanocytose hétérozygote (porteur sain, individu AS)	14
<b>5. Hémoglobinopathies associées à la drépanocytose</b>	<b>15</b>
5.1. Hétérozygote composite SC	15
5.2. Hétérozygote composite Sβ-thalassémique (Sβ)	16
<b>6. Physiopathologie</b>	<b>16</b>
<b>7. Complications</b>	<b>17</b>
7.1. Crise douloureuse vaso-occlusive	17
7.2. Anémie aiguë	17
7.3. Infections	18
7.4. Syndrome thoracique aiguë (STA)	18
7.5. Priapisme	18
<b>8. Diagnostic</b>	<b>18</b>
<b>9. Prise en charge des patients atteints de la drépanocytose</b>	<b>19</b>
<b>III. Génétique de la drépanocytose</b>	<b>20</b>
<b>1. Transmission de la drépanocytose</b>	<b>20</b>
<b>2. Détection de la drépanocytose par analyse génétique</b>	<b>22</b>
2.1. Principe de la détection	21
2.2. Analyse génétique	23
<b>3. Gène <i>NOS3</i></b>	<b>23</b>
3.1. Structure du gène <i>NOS3</i>	23
3.2. Expression du gène <i>NOS</i>	24
3.3. Polymorphismes du gène <i>NOS3</i>	25
3.3.1. Polymorphisme GLU298ASP (RS1799983)	26
3.3.2. Polymorphisme 4 B/A (VNTR DANS L'INTRON 4)	26
3.3.3. Polymorphisme 786 T>C (RS2070744)	27
<b>4. Conseil génétique et le diagnostic prénatal</b>	<b>27</b>

## **Méthodologie**

<b>1. Type d'étude</b>	<b>29</b>
------------------------	-----------



<b>2. Population d'étude</b>	<b>29</b>
2.1. Groupe des témoins	29
2.2. Groupe des patients	29
<b>3. Méthodologie</b>	<b>30</b>
3.1. Collecte des données	30
3.2. Prélèvements sanguins et conservation	30
<b>4. Etude moléculaire</b>	<b>30</b>
4.1. Extraction d'ADN	30
4.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN	32
4.3. Génotypage du gène <i>NOS3</i> par <i>TaqMan</i> ® <i>SNP</i>	32
4.3.1. Principe de la PCR en temps réel par <i>TaqMan</i>	32
4.3.2. Principales réactifs	33
4.3.3. Mécanisme de la PCR	34
4.3.4. Protocole de la PCR	34
4.3.4.1. Directives procédurales	34
4.3.4.2. Préparation des réactifs de la PCR et les échantillons de l'ADN	35
4.3.4.2.1 Dilution et aliquotage des produits <i>TaqMan SNP genotyping Assay</i>	35
4.3.4.2.2. Dilution des échantillons d'ADN	35
4.3.4.2.3. Préparation du mix réactionnel	35
4.3.4.2.4. Préparer la plaque de réaction	36
4.3.4.3. Déroulement des cycles de la PCR	36
4.3.4.4. Effectuer la lecture et l'analyse de la plaque post-PCR	37
4.3.4.5. Graphique de discrimination allélique	37
<b>5. Etude statistique analytique</b>	<b>38</b>

## **Résultats et discussion**

<b>I. Caractéristiques principales des patients</b>	<b>39</b>
1. Âge	39
2. Sexe et sexe-ratio	40
3. Âge et sexe-ratio	42
4. Consanguinité	44
5. Transfusion sanguin	45

<b>II. Résultats de l'analyse moléculaire du polymorphisme</b>	<b>46</b>
<b>T786C du gène <i>NOS</i></b>	
<b>Conclusion et perspective</b>	<b>55</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>56</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

## LISTE DES ABREVIATIONS

AP-1	<i>Activator protein 1</i>
BH4	Tétrahydrobioptérine
CD36	<i>Cluster of differentiation</i>
CVO	Crises vaso-occlusives
glu-lys	Glutamine-lysine
GMP-cyclique	Guanosinemonophosphate cyclique
GR	Globules rouges
Hb	Hémoglobine
Hb A	Hémoglobine adulte
Hb C	Hémoglobine composite
Hb S	Hémoglobine sicklémiq
Hb F	Hémoglobine fœtale
HPRT	Hémolyse par transfusion répétée
HS	Site hypersensible
LCR	<i>Locus control région</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFQ	Non fluorescent quencher
NOS3	Nitric Oxyde Synthase 3
OMS	Organisation mondiale de la santé
OR	Odds ratio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Po2	Pression partielle d'oxygène
SDM	Syndromes drépanocytaires majeurs
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STA	Syndrome thoracique aigu
NTC	<i>Negatif template control</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4	<i>Verylate antigen-4</i>
PTC	<i>Positif template control</i>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure de l'Hb humain	3
Figure 2	Structure de l'hème	4
Figure 3	Différents gènes de globine et les différentes hémoglobines synthétisées	8
Figure 4	Répartition mondiale de la fréquence de l'allèle HbS de la drépanocytose	14
Figure 5	Physiopathologie de la drépanocytose	17
Figure 6	Schéma de transmission de la drépanocytose	21
Figure 7	Structure du gène de la $\beta$ -globine	22
Figure 8	Principe de la détection	22
Figure 9	Détection de la mutation Hb s par l'enzyme de restriction BsuI	23
Figure 10	Structure du gène <i>NOS3</i>	24
Figure 11	Synthèse de l'oxyde nitrique (NO)	25
Figure 12	Localisation des polymorphismes du gène <i>NOS3</i>	26
Figure 13	Discrimination allélique typique	37
Figure 14	Répartition des patients selon le sexe	41
Figure 15	Répartition des patients selon l'âge et le sexe	42
Figure 16	Répartition des patients selon la consanguinité	44
Figure 17	Répartition des patients selon le besoin transfusionnelle	45
Figure 18	Répartition des fréquences génotypiques dans notre population	52
Figure 19	Répartition des fréquences alléliques dans notre population	52

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1	Risque de transmission de la drépanocytose	<b>20</b>
Tableau 2	Types de réactions recommandés pour chaque essai	<b>35</b>
Tableau 3	Mix de réaction	<b>36</b>
Tableau 4	Conditions thermique du cycle	<b>36</b>
Tableau 5	Répartition des clusters dans un graphique de discrimination allélique	<b>38</b>
Tableau 6	Répartition des patients par tranche d'âge	<b>39</b>
Tableau 7	Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T786C du gène <i>NOS3</i> dans la population patients et témoins	<b>51</b>

## **LISTE DES PHOTOGRAPHIES**

Photographie 1	Graphe de la discrimination allélique (l'allèle T et l'allèle C du gène <i>NOS3</i> )	<b>47</b>
Photographie 2	Courbe d'amplification d'un individu de génotype CC	<b>48</b>
Photographie 3	Courbe d'amplification d'un individu de génotype TT	<b>49</b>
Photographie 4	Courbe d'amplification d'un individu de génotype TC	<b>50</b>

A horizontal scroll with a light brown, textured background. The scroll is unrolled, with the top and bottom edges showing a slight shadow. The word "Introduction" is written in a black, elegant cursive font in the center of the scroll. The scroll has small circular details at the top and bottom corners, suggesting it is a rolled-up document.

# *Introduction*

## Introduction

---

La drépanocytose est une pathologie génétique, héréditaire à une transmission autosomique récessive. Causée par une mutation spécifique dans le gène de l'hémoglobine (Hb), appelée la mutation du gène de la  $\beta$ -globine qui provoque la polymérisation de l'Hb normale en HbS en réponse à une désoxygénation. Cette polymérisation entraîne une déformation des globules rouges (GR) en forme de faucille, ce qui altère leur structure et leur fonctionnement. Les conséquences de cette déformation sont multiples, comme la rigidité des GR qui va mener à une augmentation anormale de leur adhérence, ce qui peut conduire à une hyperviscosité sanguine. Ces altérations peuvent entraîner des complications graves telles que des crises vaso-occlusives et des infarctus (Mathie & Jenerett, 2015 ; Nouvelli & Gladwin, 2016).

La drépanocytose est parmi les maladies monogéniques les plus courantes dans le monde entier (Ebakisse, 2010). Il s'agit 312000 personnes atteintes de l'Hb SS naissent chaque année dans le monde, avec la majorité de ces naissances 236000 en Afrique sub-saharienne (Boutehloula, 2019). L'Algérie est l'un des pays méditerranéens, malheureusement, touché par cette maladie avec une proportion de 2 à 3% (Bellis *et al.*, 2021).

Le gène *NOS3* fait référence à la nitric oxide synthase, une enzyme qui catalyse la synthèse du monoxyde d'azote (NO), une molécule importante pour de nombreuses fonctions physiologiques, y compris la régulation de la vasodilatation et la modulation de la fonction plaquettaire. Les polymorphismes génétiques dans le gène *NOS3* peuvent affecter la fonction de l'enzyme et influencer divers aspects de la physiologie et de la santé. Certains de ces polymorphismes sont associés à un risque accru de certaines maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertension, la maladie coronarienne et les accidents vasculaires cérébraux. Parmi les polymorphismes les plus étudiés du gène *NOS3*, le polymorphisme de la région promotrice (T786C), le polymorphisme du codon 298 (G894T) et le polymorphisme du codon 27 (VNTR 27-bp) (Dias *et al.*, 2011) (Oliveira *et al.*, 2016).

Dans le contexte de la drépanocytose, le (NO) joue un rôle crucial car il peut aider à maintenir la vasodilatation et à améliorer le flux sanguin. Les personnes atteintes de la drépanocytose ont souvent des niveaux réduits de NO, ce qui contribue aux crises vaso-occlusives et à d'autres complications de la maladie. Certaines recherches suggèrent qu'une dysfonction de la production de NO, liée à une expression altérée de la *NOS3*, pourrait contribuer aux phénomènes vaso-occlusifs observés chez les patients atteints de la drépanocytose (Francis *et al.*, 2010 ; Oliveira *et al.*, 2016).



## Introduction

---

En Algérie, aucune étude antérieure ou en cours sur la corrélation entre la drépanocytose et le polymorphisme T786C du gène *NOS3*.

Par conséquent, le but de ce travail est de :

- étudier les paramètres épidémiologiques des patients atteints de la drépanocytose ;
- appliquer l'extraction d'ADN par le kit *Wizard® Genomic DNA Purification* ;
- apprendre la technique de la PCR en temps réel ;
- faire une exploration moléculaire du polymorphisme T786C du gène *NOS* en utilisant *Tests de Génotypage TaqMan® SNP*.
- analyser l'association du polymorphisme T786C du gène *NOS3* et la drépanocytose par les tests statistiques et analytiques.



*Etude*

*bibliographique*

## I. Hémoglobine humaine

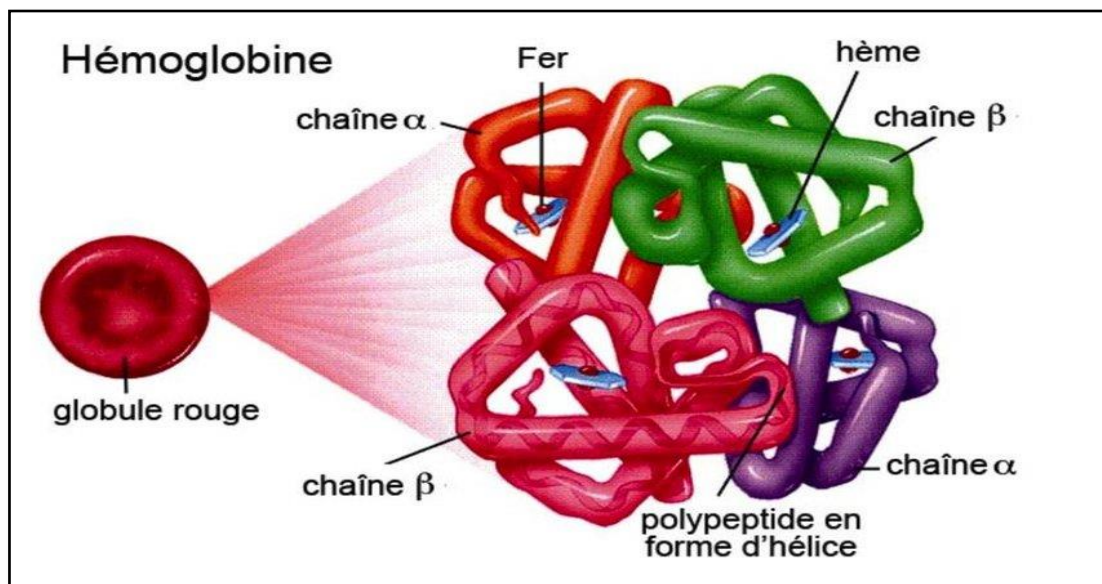
### 1. Définition

En 1862, le physiologiste allemand Hoppe-Seyler a créé le terme Hb pour désigner le pigment respiratoire, transportant l'oxygène, contenu dans les GR (Dahmani *et al.*, 2017).

L'Hb est un hétérotétramère chez tous les vertébrés du monde vivant. A chaque stade d'évolution de la vie, cette protéine voit son contenu modifié au niveau de la nature des différentes chaînes qu'elle porte. L'Hb représente 33% du poids du GR. Sa concentration moyenne est de 34 g/dL, et son poids moléculaire est de 64500 daltons (Wajcman & Kiger, 2002 ; Wajcman, 2005).

### 2. Structure de l'hémoglobine

La structure de l'Hb fut décrite pour la première fois en 1960 par Max Perutz et John Kendrew. L'Hb humaine est une protéine tétramérique de 64,5 kD constituée de quatre sous-unités identiques deux à deux et qui sont constitués, aux mêmes, de l'association d'une chaîne polypeptidique, la globine, et d'un groupement prosthétique, l'hème d'où son nom d'Hb (hème + globine) (**Figure 1**) (Baudin, 2016).



**Figure 1** : Structure de l'Hb humaine (Elkamah *et al.*, 2015)

Les sous-unités de type  $\alpha$  sont formées de 141 acides aminés et les sous-unités de type  $\beta$  de 146 acides aminés. Chaque sous-unité (ou globine) renferme un site actif de liaison de l'oxygène, l'hème, dans une poche hydrophobe. L'hème est constitué d'un atome de fer qui, à l'état réduit

## Etude Bibliographique

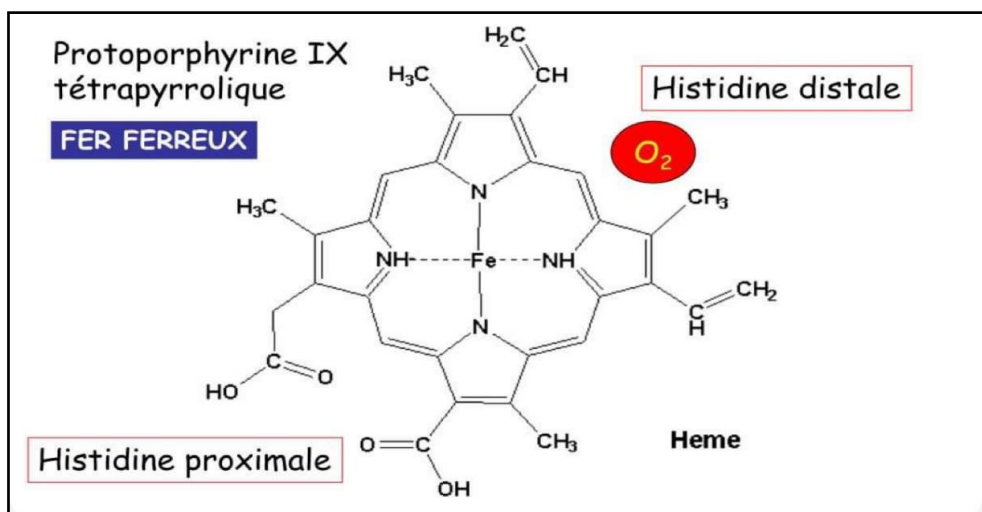
(Fe<sup>2+</sup>) capable de fixer l'O<sub>2</sub> au niveau pulmonaire et de le transporter jusqu'aux tissus. Chaque molécule d'Hb peut fixer quatre molécules d'O<sub>2</sub> (une par atome de fer) (Wajcman, 2005).

Il existe chez l'homme quatre variétés physiologiques d'Hb et de nombreuses formes pathologiques n'ayant pas toutes d'expressions cliniques.

- un type prédominant (97 à 98 %).
- Hb normale de l'adulte HbA  $\alpha_2\beta_2$  constituée de deux chaînes  $\alpha$  et deux chaînes  $\beta$ .
- un type mineur, Hb mineure de l'adulte HbA<sub>2</sub>  $\alpha_2\delta_2$  2 à 3 % de l'Hb totale.
- l'Hb fœtale HbF  $\alpha_2\gamma_2$  (Le Gal, 2010).

### 2.1. Hème

L'hème constitue la partie non protéique de l'Hb, il est formé d'une structure aromatique et d'un atome de fer. C'est une ferro-protoporphyrine résultant de l'association d'une partie organique (porphyrine : structure aromatique, constituée de quatre noyaux pyrrol) et d'un atome de fer ferreux à l'état réduit (Fe<sup>++</sup>) pouvant réversiblement fixer un atome d'oxygène, l'atome de fer est lié par six valences (hexacoordiné). Quatre d'entre elles fixent le fer sur les quatre atomes d'azote de la porphyrine. Une valence du fer est liée à un des azotes d'une histidine de l'hélice F (His proximale), et la dernière à une histidine de l'hélice E (His distale) (**Figure 2**) (Wajcman, 2005).



**Figure 2 :** Structure de l'hème (Keohane *et al.*, 2015) .

### 2.2. Globine

La globine est la partie protéique de l'Hb il est composé de quatre chaînes polypeptidiques qui sont similaires deux à deux. Ces monomères sont assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie (Couque *et al.*, 2013).

### 2.3. Liaisons entre les sous-unités de l'hémoglobine

La cohérence entre les quatre chaînes de globine est assurée par des liaisons à faible énergie permettant l'établissement de la structure quaternaire de la molécule d'Hb. Les liaisons entre sous-unités du même dimère ( $\alpha 1 - \text{non } \alpha 1$  ou  $\alpha 2 - \text{non } \alpha 2$ ) sont fortes. Les liaisons entre sous-unités de dimères différents ( $\alpha 1 - \text{non } \alpha 2$  ou  $\alpha 2 - \text{non } \alpha 1$ ) sont faibles. Sur chaque globine, il y a une poche hydrophobe où se fixe l'hème. Au centre, se fixe la molécule de 2,3-diphosphoglycérate à l'état désoxygéné. Cette molécule issue de la glycolyse, régule l'affinité de l'Hb pour l'oxygène, avec libération du 2,3-diphosphoglycérate et contraction de la poche centrale au cours de la fixation de l'oxygène sur les molécules d'hème (Christine, 2003).

Dans l'Hb adulte, les liaisons  $\alpha 1 - \beta 2$  et  $\alpha 2 - \beta 1$  sont faibles, coulissantes et relativement peu nombreuses (contacts entre 19 acide amine) ce qui permet la contraction et la relaxation d'Hb lors de l'oxygénation et la désoxygénation. Alors que les liaisons  $\alpha 1 - \beta 1$  et  $\alpha 2 - \beta 2$  sont plus fortes et rigides (35 acide amine) (Wajcman, 2005).

## 3. Rôle et fonction de l'hémoglobine

L'Hb assure le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. Une molécule d'oxygène se fixe par atome de fer et 1 g d'Hb peut transporter au maximum 1,34 ml d'oxygène lorsque la saturation est totale, soit environ 20 ml d'oxygène pour 100 ml de sang.

L'Hb peut aussi se combiner aux substances suivantes : Dioxyde de carbone, L'hydrogène ( $H^+$ ), Le monoxyde de carbone (CO) et NO.

Les GR, constitués pour 33 % de leur poids par l'Hb, sont à l'origine du pouvoir oxyphorique du sang. Ainsi chez l'homme, avec un taux normal de 14 à 15 g/dl d'Hb, la capacité de transport d'un décilitre de sang est d'environ 20 ml d'oxygène. Ce même volume de plasma ne peut transporter sous forme dissoute que 0,5 ml d'oxygène. Il est impératif de pouvoir libérer facilement une fraction importante de cet oxygène au niveau des tissus pour créer un gradient de  $pO_2$  (Shimdit, 2019).

### 4. Biosynthèse de l'hémoglobine

L'Hb est une molécule dont la production est dépendante de deux gènes autosomiques. En effet la production de l'hème est dépendante de la disponibilité de certains substrats (fer, pyridoxine ou vitamine B6, vitamine B12, acide ascorbique ou vitamine C, acide folique, cuivre) s'effectue à partir de la glycine et de l'acide succinique.

Environ 300 millions de molécules d'Hb sont synthétisées de façon journalière (Labbé & Elion, 2005).

- Les chaînes de globine sont synthétisées dans les érythroblastes, issus de cellules souches hématopoïétiques.
- La molécule d'hème est synthétisée dans la mitochondrie, puis le cytosol, à partir d'acides aminés (porphyrino-synthèse).
- dans la dernière étape, l'atome de fer se lie par coordination métallique sur les molécules de protoporphyrine lié à chromosome sexuel X.
- Les quatre chaînes s'associent dans le cytosol pour former la molécule d'Hb prête à lier du dioxygène.

Les Hb sont catabolisées dans le système réticulo-histiocytaire après lyse des hématies vieilles (en moyenne après 120 jours) dans la rate, le foie et la moelle osseuse. Les macrophages du foie, en particulier, vont libérer de l'Hb qui va perdre ses molécules d'hème subissant des oxydations transformant les porphyrines en bilirubine dont une partie sera conjuguée (glucuroconjugaison) pour une élimination biliaire (Labbé & Elion, 2005).

### 5. Gènes de l'hémoglobine

Dans l'espèce humaine, plusieurs Hb se succèdent au cours de la vie et, à tout moment, il en existe plusieurs simultanément. Deux types de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont présentes lors de la vie embryonnaire :

- la chaîne zeta  $\zeta$  (la première à apparaître)
- la chaîne  $\alpha$  proprement dite
- la chaîne epsilon  $\epsilon$  (spécifique à la vie embryonnaire)
- des chaînes gamma  $\gamma$  qui deviendront majoritaires chez le fœtus

Six mois après la naissance le profil hémoglobinique de l'adulte est atteint l'HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) représente alors plus de 95 % de la totalité des Hb. Il existe un constituant mineur, l'HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ ), exprimé à un taux d'environ 2,5 % dont la synthèse débute dans la période néonatale. L'HbF quant à elle, n'existe plus qu'à l'état de traces inférieures à 1 %

Les gènes de globine comportent trois exons séparées par deux introns. Il existe également des zones non codantes situées en 3' et 5' du gène. Les gènes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\zeta$  diffèrent considérablement par la taille des introns.

Un promoteur est situé en 5' de la région transcrite du gène. Cette zone, impliqué dans la fixation de l'ARN polymérase comporte la séquence ATA qui se situe à une trentaine de nucléotides du site codant pour la coiffe, la séquence " CCAAT...", localisée entre les nucléotides -70 à -80, et une séquence plus variable, " CACC...", située entre les nucléotides -80 et -100 le gène  $\gamma$  possède entre les séquences -170 et -190 une région de séquence GATA fixant des facteur de régulation érythroïde spécifique. Il existe également des séquences activatrices (enhancers) et inhibitrices (silencers) régulant le niveau d'expression des gènes au cour de l'évolution. La séquence AATAA, en 3' serait le signal de terminaison pour la polymérase ou nu site de reconnaissance pour la poly-adénylation. Des séquences de spécificité tissulaire, appelées LCR (*Locus Control Région*) sont situées en 5' à distance du complexe  $\beta$  et  $\alpha$  Elles permettent une expression efficace et coordonnée des gènes qu'elles contrôlent (Couque *et al.*, 2016).

### 5.1. Groupe des gènes de type $\alpha$

Ces gènes sont localisés sur des chromosomes différents. Par ailleurs, quelques Hb anormales provenant de gènes de fusion (exemple :  $\delta\beta$ ) ont apporté de précieux renseignements sur l'organisation séquentielle des gènes de globine sur le chromosome. Il est localisé sur le chromosome 16 dans la région distale entre 16p12 et 16p ter. Il comprend, de 3' à 5' (sur une petite séquence de DNA de 35Kb) :

- deux gènes de structure  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , fonctionnels dès la vie embryonnaire
- un gène de structure  $\zeta$  permettant la formation des chaînes  $\zeta$  (qui remplacent les chaînes  $\alpha$  au cours des premiers semaines de la vie embryonnaire).

Chez un sujet normal, les gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont dupliqués. Il existe donc quatre gènes de structure  $\alpha$  pour une paire de chromosomes. En revanche, les gènes  $\alpha 2$  sont trois fois plus exprimés que les gènes  $\alpha 1$ . De plus, il existe des séquences assez similaires à celles des gènes mais ne codant pour aucune chaine polypeptidique et de fait appelées pseudo-gènes ( $\Psi\zeta$ ,  $\Psi\alpha 1$ ,  $\Psi\alpha 2$  et  $\Psi\beta$ ) en 3' de la famille des gènes  $\alpha$ , il existe un gène  $\theta$  qui pourrait être actif dans les tissus érythroïdes primitifs de l'embryon (Hardison, 2012).

### 5.2. Groupe des gènes de types $\beta$

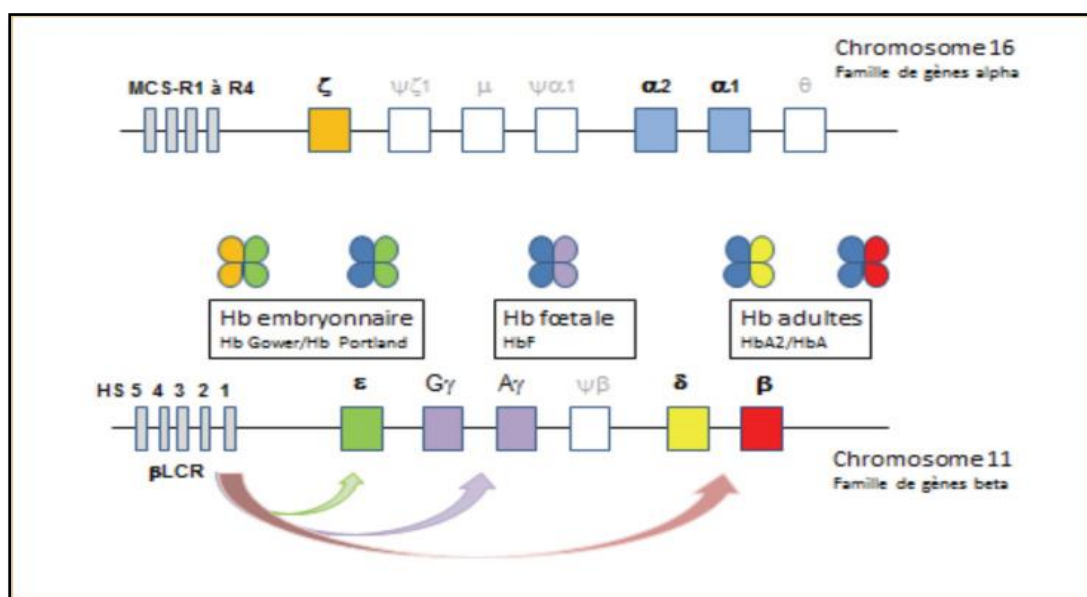
## Etude Bibliographique

Il est localisé sur le bras court du chromosome 11 dans la région 11 p125 p 128 (dans un fragment d'ADN de 60 Kb) et il comprend de 3' vers 5' :

- un gène  $\beta$ , dont l'expression débute à la fin du premier trimestre de gestation ;
- un gène  $\delta$ , fonctionnel après la naissance ;
- deux gènes  $\gamma A$  et  $\gamma G$  qui diffèrent par la variation d'un acide aminé en position 136 de la chaîne fœtale (glycine et alanine) ;
- un gène  $\epsilon$  embryonnaire.

Le gène  $\beta$  n'est pas dupliqué, contrairement aux gènes  $\alpha$ . Les lésions qui touchent les gènes  $\beta$  s'expriment :

- pour 50% de l'Hb totale si un seul gène est atteint.
- pour 100% de l'Hb totale si aucun des deux gènes n'est fonctionnel (**Figure 3**) (Hardison, 2012).



**Figure 3** : différents gènes de globines et les différentes Hb synthétisées (Couque *et al.*, 2016).

En conséquence, la plupart des lésions qui porte sur le gène  $\beta$  sont plus sévères que celles qui atteignent les gènes  $\alpha$ . Pour chacun des groupes de gènes ( $\alpha$  et  $\beta$ ), il est possible de mettre en évidence des pseudogènes qui représentent des analogies avec les gènes de groupe considéré mais qui ne sont pas fonctionnels. Des structures participent au contrôle de l'activité des gènes, comme les sites de reconnaissances de l'ARNm polymérase permettant la transcription ou des enzymes de clivage des introns et d'épissage des exons (Labie & Elion, 2005).



### 5.3 Régulation de gène d'hémoglobine

LCR est la séquence de site hypersensible 40 (HS) en amont du locus  $\beta$ -globine, sur le chromosome 11. Ce sont les zones de destruction nucléosomique dans lesquelles l'ADN est susceptible d'être digéré par l'ADNase I. Ces zones rendent la région accessible à la transcription et aux facteurs de remodelage de la chromatine (Labie & Elion, 2005). Il se compose de 5 sites hypersensibles à l'ADNase I (5'HS 1 à 5) qui constituent une région contrôlant l'expression des chaînes de  $\beta$ . Les HS 1 à 4 ne se forment que dans les cellules érythroïdes, alors que 5'HS5 se retrouve dans de multiples lignées de cellules, mais n'est pas constitutif (Labie & Elion 2005). Deux autres HS: HS6 et HS7, en amont de HS5. Sur le chromosome 16, un site unique, HS-40 contrôle l'expression des gènes de type  $\alpha$  (Bonello *et al.*, 2010).

Les gènes des chaînes de globine sont donc sous le contrôle de locus régulateurs situés à une grande distance (40-50000 pb) en amont de la partie 5' des gènes de globine.

Ces régulateurs permettent l'activation de la transcription de gènes en venant à proximité du promoteur des gènes de globine par un repliement de la chromatine qui forme des boucles. La liaison entre le régulateur et le promoteur des gènes de globine permet ensuite de recruter et d'activer l'ARN polymérase II pour transcrire l'ARNm indispensable à la synthèse des chaînes de globine. D'une autre manière, tout un groupe de protéines parviennent interagir avec le LCR et les séquences d'ADN des gènes de globine pour contrôler l'expression des gènes de la famille  $\beta$ , ce qui devient plus difficile à comprendre cette régulation (Labie & Elion, 2005).

## 6. Anomalies d'hémoglobine

Les différentes séquences d'Hb sont la conséquence de certaines anomalies liées à l'ADN. Il s'agit des hémoglobinopathies (polymorphisme des séquences d'ADN) et des thalassémies (anomalies de l'association des chaînes de globine) qui représentent un polymorphisme d'activité synthétique (Segbena *et al.*, 2002).

### 6.1. Hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont des maladies héréditaires génétiquement déterminées qui constituent un problème de santé publique dans de vastes parties du monde. Les hémoglobinopathies sont classiquement séparées en deux catégories :

- soit un défaut qualitatif avec production en quantité normale d'une Hb « anormale »
- soit un défaut quantitatif de production de l'Hb normale, ce qui correspond à une thalassémie.

La différence est physiopathologique plus que génétique car les mêmes anomalies moléculaires sont le plus souvent rencontrées dans les deux pathologies (Couque *et al.*, 2016).

Les affections génétiques peuvent être résumées de la sorte :

- production d'une Hb de structure anormale : Mutants ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) qui représentent les variantes de l'Hb.
- défaut de production d'une chaîne de globine  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\delta$  : Thalassémies (Couque *et al.*, 2016).

#### 6.1.1 Hémoglobine S

Cette anomalie est la plus fréquente, elle cause une maladie génétique nommée la drépanocytose (Schmidt, 2019) (Chapitre 2).

#### 6.1.2 Hémoglobine C

L'HbC est l'une des mutations d'Hb anormales les plus répandues dans le monde avec l'HbS et l'HbE. L'HbC est le deuxième plus répandu des hémoglobinopathies aux États-Unis et le troisième au monde. L'HbC est une variante structurelle de l'Hb émoglobine A normale (HbA) causée par une substitution des acides aminés de la lysine par l'acide glutamique en position six de la chaîne bêta de l'hémoglobine. (Schmidt, 2019).

L'HbC homozygote (CC) est caractérisée par un syndrome anémique modéré, une splénomégalie, une lithiase biliaire. Le taux d'Hb se situe entre 10 et 13 g/dL, il y a 100-200 G/L de réticulocytes, 50 à 90 % d'hématies en cible. A l'électrophorèse de l'Hb : HbC > 90 %, HbA2 absente, HbF 3 à 8 %. Elle ne justifie aucun traitement. Le double hétérozygotisme SC doit être considéré comme la drépanocytose homozygote SS, bien que la symptomatologie soit un peu moins sévère que chez les sujets SS. Parmi les complications, on note une perte progressive de la vision à l'âge adulte due à une rétinopathie. L'anémie est modérée, les réticulocytes = 100-200 G/L, il y a 30-50 % d'hématies en cible et de rares drépanocytes. A

l'électrophorèse de l'Hb : HbS 40-50 %, HbC 40-50 %, HbA absente ; HbF normale ou  $\pm$  augmentée (Schimdt & Randolph, 2019).

### 6.1.3 Hémoglobine E

C'est la seconde hémoglobinopathie dans le monde après l'hémoglobinopathie S. Elle s'observe en Asie du sud-est, en particulier en Thaïlande, au Cambodge, au Laos où 35 % de la population est atteinte. Au total, 30 à 50 millions de personnes sont porteuses. Elle est due au remplacement d'un acide glutamique par une lysine. Comme la drépanocytose, l'hémoglobinopathie E confère une certaine résistance au paludisme. L'HbE hétérozygote (AE) se caractérise par une microcytose sans anémie ou un pseudo polyglobulie microcytaire. Le taux d'Hb est normal. Il y a plus de 10 % d'hématies en cible. A l'électrophorèse de l'Hb : HbE 30-40 %, HbA 60-70 %. L'hémoglobinoïse E homozygote (EE) entraîne une microcytose avec anémie absente ou modérée. Le taux d'Hb est de 12 à 15 g/dL, il y a plus de 30 % de GR en cible. Le double hétérozygotisme HbE/ $\beta$  a un aspect de thalassémie majeure (Schimdt & Randolph, 2019).

## 6.2. Thalassémies

Les thalassémies constituent un groupe hétérogène d'anomalies moléculaires qui a en commun un défaut de synthèse d'une des chaînes de globine. Sur le plan physiopathologique, ces anomalies sont à l'origine d'un déséquilibre de synthèse avec accumulation de chaînes non appariées responsable de dysérythropoïèse. Les deux types d'anomalies les plus fréquentes sont les  $\alpha$  et  $\beta$  thalassémies (Couque *et al.*, 2016).

### 6.2.1. $\beta$ -Thalassémies

Les  $\beta$ -thalassémies, appelées aussi « maladies des globules rouges » se caractérisent par l'absence ou le défaut congénital de la synthèse de la chaîne  $\beta$  de l'Hb. Donc dans ce cas, les chaînes bêta de l'Hb sont produites en quantité insuffisante ou nulle, ce qui provoque une production insuffisante d'Hb globale. Seule la synthèse de l'HbA est entravée. Près de 200 allèles ont été décrits et elles touchent chaque année 200 000 enfants à la naissance (Higgs *et al.*, 2012).

### 6.2.2. $\alpha$ -Thalassémies

Les  $\alpha$ -thalassémies correspondent à un défaut de synthèse des chaînes  $\alpha$  de globine de l'Hb. Les  $\alpha$ -thalassémies sont dues dans la majorité des cas à des délétions, il s'agit de deux types de délétions : les délétions de type 1 qui entraînent la perte des deux gènes HBA1 et HBA2 sur le même chromosome, les délétions de type 2 qui entraînent une perte de la partie intergénique entre HBA1 et HBA2 (Couque *et al.*, 2016).

## II. Drépanocytose

### 1. Définition

La drépanocytose est une maladie génétique de l'Hb se transmettant sur un mode autosomique récessif. Elle résulte d'une mutation ponctuelle du 6<sup>e</sup> codon du gène  $\beta$ -globine. Cette mutation est responsable de la synthèse d'une Hb anormale, l'HbS, qui, à l'état désoxygéné, peut polymériser. Cette polymérisation des molécules d'Hb mutées dans les GR drépanocytaires est à l'origine d'une fragilisation et d'une perte de plasticité de ces hématies responsables de l'hémolyse et des phénomènes vaso-occlusifs (Mattioni *et al.*, 2016).

### 2. Historique

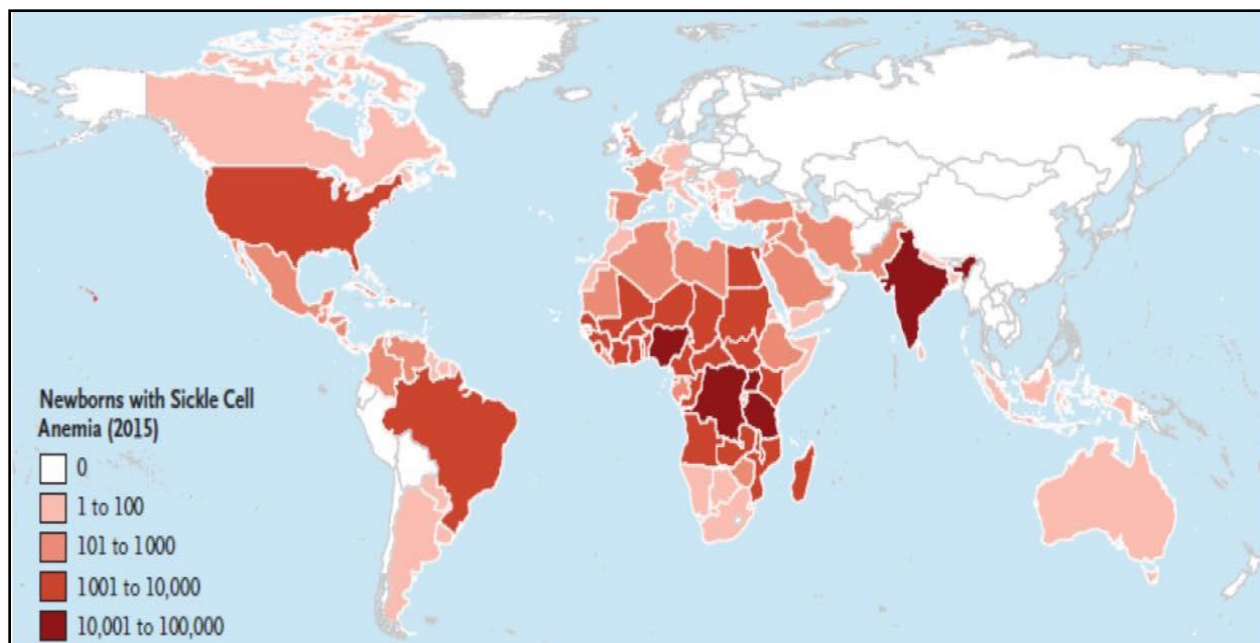
- En 1910 : la première description de la drépanocytose est faite par Herrick, médecin à Chicago. Il note, chez un patient Jamaïcain, la présence d'hématies déformées en faucilles.
- En 1917 : le caractère familial est évoqué par Emmel.
- En 1927 : Hahn et Gillespie montrent que la déformation en faucilles des hématies est en rapport avec la désoxygénation et l'hémoglobine.
- En 1933 : Diggs décrit deux tableaux cliniques différents : des enfants présentant des signes d'anémie sévère et leurs parents asymptomatiques, et les anomalies globulaires provoquées seulement in vitro. Il parle alors de « trait » drépanocytaire.
- En 1940 : Ham et Castle définit la viscosité sanguine chez le drépanocytaire qui augmente de manière significative en cas d'hypoxie.
- En 1947 : Neel décrit ces deux tableaux cliniques différents comme les formes homozygote et hétérozygotes d'une même anomalie transmise selon les lois mendéliennes.

- En 1949 : Linus Pauling et Harvey Itano, utilisant la nouvelle technique d'électrophorèse des protéines, découvrent la migration électrophorétique de l'Hb S chez des patients ayant la drépanocytose.
- Harris en 1950 : observe la formation d'un gel tactoïde par désoxygénation de l'HbS concentrée et Perutz met en évidence une diminution de la solubilité de la désoxyghémoglobine.
- En 1956 : Vernon Ingram montre que l'Hb S ne diffère de l'Hb A que par un acide aminé en position 6, l'acide glutamique remplacé par la valine. C'est la première maladie génétique dont la structure moléculaire est connue (Owonom & Chiabi, 2004).

### 3. Epidémiologie

Jusqu'à la première moitié du XXe siècle, les anomalies de l'Hb se limitaient pratiquement aux zones impaludées et aux pays qui ont connu, au cours des siècles derniers, un important afflux d'esclaves d'origine africaine. Dans ces pays, les sujets homozygotes mouraient dans la petite enfance, alors que les hétérozygotes survivaient tout en bénéficiant d'un avantage sélectif (Bardakdjman et Wajcman, 2004).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2005), la drépanocytose est classée au 4<sup>e</sup> rang des maladies prioritaires de l'OMS après le paludisme, le VIH et la tuberculose. Elle s'observe dans le monde entier avec une prévalence accrue en Afrique. Cette pathologie affectant plus de 300000 nouveau-nés chaque année (**Figur 4**) (Diakité *et al.*, 2010 ; Banza *et al.*, 2019).



**Figure 4** : Répartition mondiale de la fréquence de l'allèle HbS de la drépanocytose (Piel *et al.*, 2017).

#### 4. Classification des syndromes drépanocytaires majeurs (SDM)

L'état homozygote est la forme la plus fréquente de cette maladie mais d'autres allèles des gènes  $\beta$  de l'Hb peuvent s'associer à l'HbS et induire un syndrome drépanocytaire majeur (SDM) ((Nicoleau *et al.*, 2023).

##### 4.1. Drépanocytose homozygote (malade, individu SS)

Lorsque les deux gènes  $\beta$  portent la mutation S, les deux gènes  $\beta$  s'expriment à égalité, l'un de provenance paternelle, l'autre d'origine maternelle (Balédant, 2016). Cette forme génétique de la maladie est très riche en symptômes et très polymorphe par son mode de début et par les complications qui marquent son évolution. Les premiers symptômes cliniques apparaissent chez le nourrisson, mais très rarement avant six mois lorsque l'HbS qui devient prédominante va remplacer l'Hb fœtale. Les premiers symptômes peuvent être représentés par un accident aigu (crise douloureuse, crise brutale de déglobulisation) ou par une complication infectieuse ou thrombotique grave (Tchokoteu, 2004).

##### 4.2. Drépanocytose hétérozygote (porteur sain, individu AS)

Lorsque l'un des deux gènes  $\beta$  porte la mutation S et l'autre celle à l'origine de l'HbC ( $\beta^6$  glylys). Les sujets porteurs sains AS sont susceptibles de transmettre le gène C à leur descendance

(Balédant, 2016). Les individus présentant une drépanocytose hétérozygote, également connus sous le nom de porteurs du trait drépanocytaire ou porteurs sains AS, ont hérité d'un gène normal A de la  $\beta$ -globine d'un de leurs parents et d'un gène drépanocytaire S de l'autre. Cette combinaison génétique fait en sorte qu'ils portent le trait de la drépanocytose, mais n'en souffrent généralement pas dans leur état de santé quotidien. Dans la plupart des cas, les individus hétérozygotes AS sont asymptomatiques ne s'associe généralement pas à des manifestations cliniques. En raison de la présence suffisante d'HbA, les porteurs hétérozygotes d'HbS ont une capacité adéquate pour contrer la polymérisation dans des conditions de désoxygénation, ce qui réduit considérablement le risque de complications cliniques associées à la drépanocytose. Bien que ces individus soient asymptomatiques, certaines rares complications peuvent survenir. Par exemple, ils peuvent présenter des infarctus spléniques, d'ont l'incidence est favorisée par un séjour en altitude, ainsi que des épisodes d'hématuries dus à une nécrose papillaire. De plus, des crises passagères peuvent se produire chez ces individus en cas d'hypoxie, d'efforts physiques intenses ou de déshydratation (Bellouch, 2021).

### **5. Hémoglobinopathies associées à la drépanocytose**

Il s'agit de situations où les deux gènes  $\beta$  de la globine présentent des mutations différentes. Cette diversité de mutations entre les deux globines peut entraîner une gamme de symptômes cliniques dont la gravité varie selon les cas (Noetzli *et al.*, 2012).

#### **5.1. Hétérozygote composite SC**

Le syndrome drépanocytaire composite SC représente 20% à 30% des SDM. Elle constitue une entité autonome de la drépanocytose homozygote et résulte de l'association de deux gènes  $\beta$  mutés de la globine, le gène S et le gène C chez un même patient.

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 par rapport à la forme homozygote SS. Ainsi, leur espoir de vie est supérieure de 20 ans à celle des drépanocytaires homozygotes (Biaz *et al.*, 2017).

### 5.2. Hétérozygote composite S $\beta$ -thalassémique (S $\beta$ )

C'est le 3<sup>e</sup> cas de SDM reconnu plus fréquemment. Il associe à deux mutations à la fois ; quantitative ( $\beta$ -thalassémique) et qualitative (HbS). Il y a deux génotypes qui présentent des symptômes bien différents.

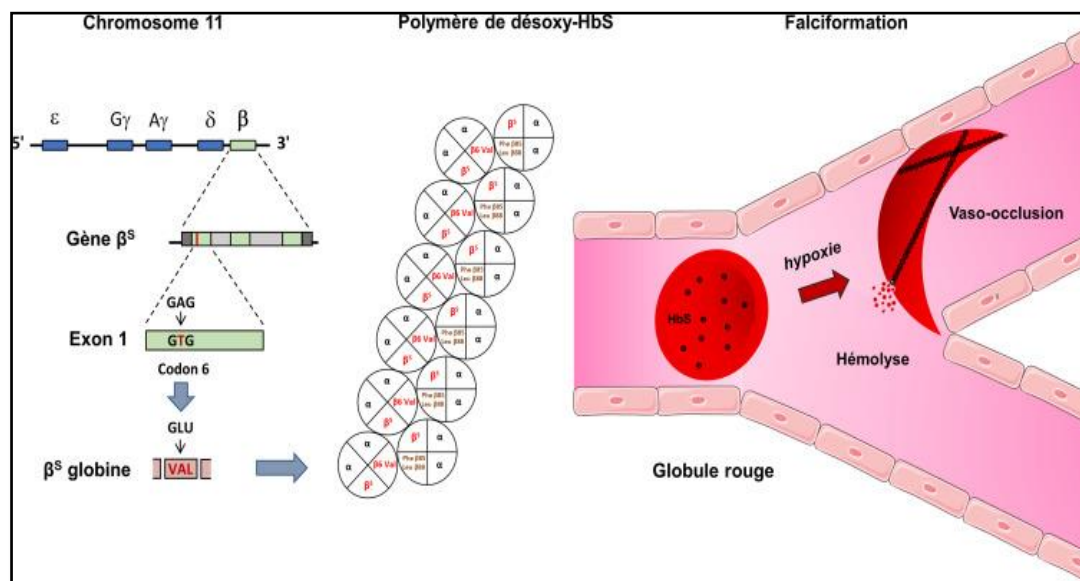
- Le génotype S $\beta$  correspond à une absence de la chaîne  $\beta$ , ce qui entraîne l'absence d'HbA. Les symptômes et la gravité sont similaires à ceux de l'homozygote SS.
- Le génotype S $\beta$ <sup>+</sup> se caractérise par la présence d'un taux variable d'HbA, estimé entre 3 et 25% (Giroto & Bégué, 2004).

## 6. Physiopathologie

La drépanocytose est liée à l'inversion d'une paire de base (A=T → T=A). Le sixième codon de la chaîne  $\beta$  de la globine [GAA] devient [GTA]. En conséquence, le sixième acide aminé (acide glutamique, chargé négativement) est remplacé par une valine, hydrophobe. Un site hydrophobe est donc présent sur l'extérieur de la chaîne  $\beta$  de l'HbS. Celui-ci contracte une liaison hydrophobe avec la phénylalanine en position 85 et avec la leucine en position 88, qui s'externalisent dans la désoxyhémoglobine. Il se crée donc un polymère d'HbS qui déforme le GB et entraîne la crise vaso-occlusive au pôle veineux du capillaire.

La polymérisation de l'HbS concerne essentiellement les patients drépanocytaires homozygotes, les doubles hétérozygotes SC et les drépano-thalassémiques. Elle est déclenchée par l'hypoxie, la déshydratation, l'acidose et l'infection. La survenue de crises nombreuses et répétitives rend la polymérisation irréversible en raison des lésions oxydatives membrano-érythrocytaires qui s'installent à moyen et à long terme. Par ailleurs les données physiopathologiques actuelles pour la drépanocytose rendent compte de la grande complexité des mécanismes de la vaso-occlusion faisant intervenir en plus de l'hyperadhérence érythrocytaire d'autres facteurs, notamment la vasculopathie liée à l'activation chroniques des cellules endothéliales, l'hyperadhésion et l'activation leucocytaires mais aussi la thrombophilie et la vasoconstriction dues à la perturbation du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) graisseux incriminés dans le syndrome thoracique aigu a été aussi soulevée comme mécanisme de stimulation d'expression érythrocytaires et endothéliales de ces molécules d'adhésions notamment les intégrines VLA-4 et CD36 (**Figure 5**) (Serraj *et al.*, 2012).





**Figure 5** : Physiopathologie de la drépanocytose (Allali *et al.*, 2024)

## 7. Complication

### 7.1. Crise douloureuse vaso-occlusive

La crise douloureuse vaso-occlusive (CVO) est la première complication aiguë de la drépanocytose par sa fréquence et son retentissement sur la vie des malades. Elle intéresse les os longs, le bassin, le rachis, les côtes. Plusieurs territoires peuvent être atteints simultanément. Des signes inflammatoires locaux et des signes généraux peuvent accompagner la douleur (Giro, 2021).

### 7.2. Anémie aigue

La durée de vie moyenne des drépanocytes est courte en raison de l'hémolyse chronique, ce qui entraîne une érythropoïèse active pour compenser la destruction accélérée des GR. Chaque patient a un niveau d'Hb de base qui lui est propre, résultant de l'équilibre entre l'hémolyse et la production de GR. Ce niveau d'Hb varie généralement entre 6 et 11g/dl et reste relativement stable chez un même patient en l'absence de complications. Pendant une CVO, qui est une complication courante de la drépanocytose, le taux d'Hb n'est généralement pas significativement modifié. Cela signifie que la CVO n'a pas un effet direct sur le niveau d'Hb dans la circulation sanguine (Mongardon *et al.*, 2015).

### **7.3. Infections**

Les infections représentent une des complications les plus fréquentes. Elles émaillent tout le cours de la vie du drépanocytaire et peuvent mettre en péril sa vie, en particulier les nourrissons et les plus jeunes enfants. Cette grande susceptibilité à l'infection s'observe principalement chez les sujets drépanocytaires homozygotes, mais aussi, bien qu'à un moindre degré, chez les malades atteints de bêta-thalasso-drépanocytose ou de double hétérozygote SC. Classiquement, les infections à germes encapsulés (Pneumocoque, Haemophilus, Méningocoque) et salmonelles mineures favorisés par l'asplénie fonctionnelle doivent être évoquées. Il faut redouter les infections liées aux soins (Staphylocoques et Entérobactéries) (Barry *et al.*, 2019).

### **7.4. Syndrome thoracique aiguë (STA)**

Le syndrome thoracique aiguë se manifeste par la fièvre, des symptômes respiratoires comme la toux et une respiration rapide, ainsi que des douleurs thoraciques. Il est souvent accompagné d'une opacité pulmonaire visible à la radiographie. Ainsi les infections sont observées chez environ un tiers des patients et une embolie graisseuse dans la moitié des cas. Chez les adultes, le risque de décès est 9 fois plus élevé que chez les enfants.

Le bilan biologique est caractérisé par une baisse de l'Hb d'environ 0,5g/dl, une augmentation du nombre de globules blancs et de la température corporelle. Le STA est causé par des problèmes de circulation sanguine dans les petits vaisseaux des poumons (Giroit *et al.*, 2003)

### **7.5. Priapisme**

Le priapisme est en effet une complication sérieuse chez les patients drépanocytaires mâles. Il se caractérise par une érection prolongée et douloureuse, et il est particulièrement préoccupant car il peut menacer la fonction érectile à long terme. Cette condition affecte principalement les individus atteints de la drépanocytose de type SS et SC, et elle survient chez environ 40 % des garçons drépanocytaires, souvent dès l'enfance (Tchamago, 2006 ; Whyte *et al.*, 2021).

## **8. Diagnostic**

Le diagnostic de la drépanocytose peut être réalisé à partir d'un prélèvement sanguin effectué au moins trois mois après une transfusion. Les principaux éléments diagnostiques comprennent :

- analyse de l'hémogramme : elle révèle une anémie de gravité variable, caractérisée par des globules rouges normochromes et normocytaires, parfois de taille augmentée (macrocytose), avec une réponse régénérative marquée (nombre élevé de réticulocytes).
- observation du frottis sanguin au microscope : les GR en forme de faucille sont facilement identifiables, de même que des variations de taille (anisocytose), de forme (poïkilocytose), la présence de corps de Jolly et parfois des GR immatures (érythroblastose).

Utilisation de techniques spéciales : la méthode de référence est l'isoélectrofocalisation, qui permet de distinguer les différentes formes d'Hb en fonction de leur point isoélectrique. Elle est complétée par l'électrophorèse en citrate d'agar à pH acide. Le test de solubilité démontre la tendance de l'HbS à se polymériser *in vitro*. La chromatographie liquide de haute pression est une méthode précise pour séparer et quantifier les différentes fractions d'Hb, y compris les variants pathologiques (Bonnet, 2019).

### **9. Prise en charge des patients atteints de la drépanocytose**

La prise en charge débute par la détermination du génotype du SDM homozygotie SS, hétérozygotie composite SC ou S- $\beta$ -thalassémie, pour les trois syndromes drépanocytaires les plus fréquemment rencontrés. Chacune de ces formes a ses spécificités : la plus sévère est l'homozygotie SS (complications aiguës fréquentes, anémie profonde, espérance de vie diminuée), alors que les formes SC et S- $\beta$ -thalassémie sont d'expression différente (Habibi *et al.*, 2015).

Les grands principes de la prise en charge sont :

- l'importance du dépistage précoce néonatal
- la couverture par une antibiothérapie préventive pendant l'enfance et des vaccins spécifiques est indispensable pour prévenir les infections
- le support transfusionnel est très souvent nécessaire à certaines périodes de la vie d'un patient drépanocytaire, avec des fréquences très variables selon les individus.
- la prise en charge et la prévention des crises douloureuses sont capitales. Ces crises sont des expériences effroyables et beaucoup de malades, particulièrement des enfants, vivent dans la terreur de leur récurrence.
- l'hydroxyurée (médicament prescrit pour le traitement de certains troubles sanguins) peut beaucoup améliorer les conditions de vie de nombreux patients. Ses possibles effets secondaires réservent son usage aux services spécialisés.

- d'autres abordos thérapeutiques tels que la greffe de moelle ne sont proposés que dans des centres spécialisés.
- le conseil génétique doit être une information donnée clairement et répétée autant de fois qu'il le faut, dans le souci d'éclairer sans imposer ni juger (Tursz *et al.*, 2006).

### III. Génétique de la drépanocytose

#### 1. Transmission de la drépanocytose

La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire due à une mutation unique et ponctuelle. Cette maladie héréditaire de l'Hb est transmise de façon autosomique récessive, c'est-à-dire elle atteint les filles et les garçons. Elle s'exprime lorsque les deux chromosomes transmis par les parents aux enfants sont porteurs du gène de la maladie. Ainsi, les deux gènes  $\beta$ -globine s'expriment à égalité, l'un de provenance paternelle, l'autre d'origine maternelle. Lorsqu'un seul chromosome est porteur du gène de l'HbS (transmis par la mère ou par le père), la maladie est dite hétérozygote, le porteur est sain. Lorsque les deux chromosomes sont porteurs du gène (transmis par la mère et par le père), la maladie est dite homozygote, le porteur est malade. (Balédent, 2016).

Il s'agit 3 génotypes :

- AA = homozygote normal,
- AS = hétérozygote porteur sain,
- SS = homozygote drépanocytaire malade.

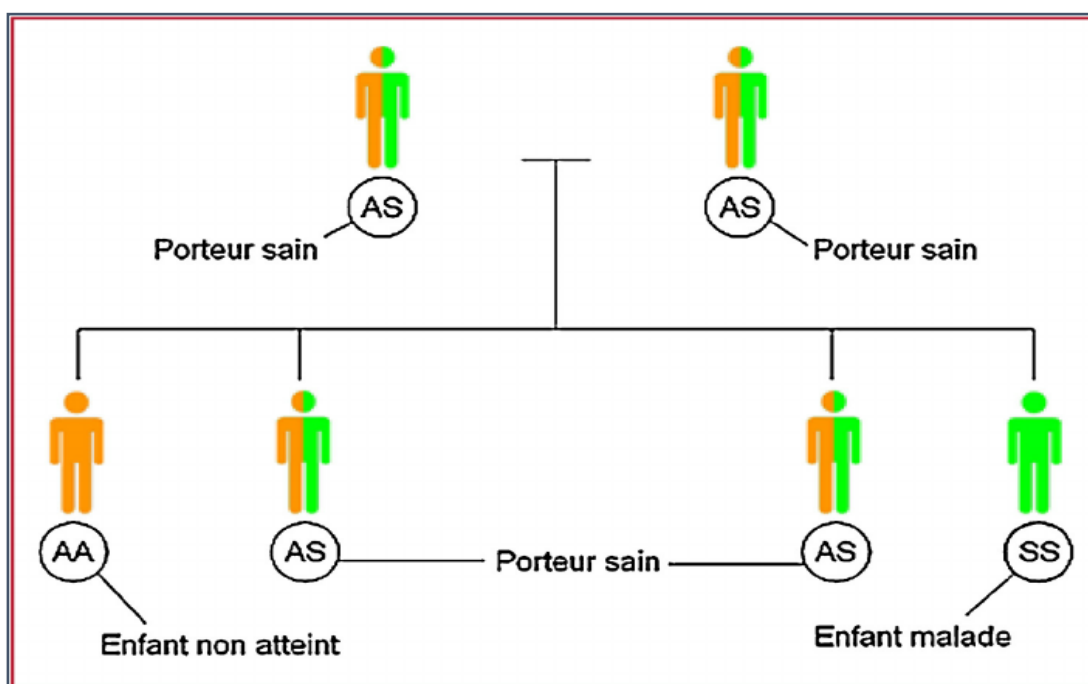
Il est donc possible de prévoir le risque d'atteinte des enfants en fonction du génotype des parents (**Tableau 1**).

**Tableau 1** : Risques de transmission de la drépanocytose (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

Pour qu'un enfant soit malade, il faut que les deux parents soient transmetteurs, c'est-à-dire porteurs du gène de la drépanocytose.

- Si les deux parents ne portent aucun gène drépanocytaire (AA/AA), le risque est nul, les enfants seront tous AA.
- Si les deux parents sont hétérozygotes (AS/AS), le risque de transmission du gène est de 75% (risque AS = 50% et risque SS = 25%).
- Si l'un des parents est normal AA et l'autre homozygote SS (AA/SS), le risque de transmission est de 100 %, tous les enfants seront AS.
- Si l'un des parents est hétérozygote et l'autre parent homozygote (AS/SS), le risque de transmission du gène est de 100 % (risque SS = 50% et risque AS = 50%).
- Si les deux parents sont homozygotes (SS/SS), le risque de transmission est de 100 %, tous les enfants seront homozygotes SS (**Figure 6**) (Balédent ,2016).



**Figure 6** : Schéma de transmission de la drépanocytose (Richard *et al.*, 2014)

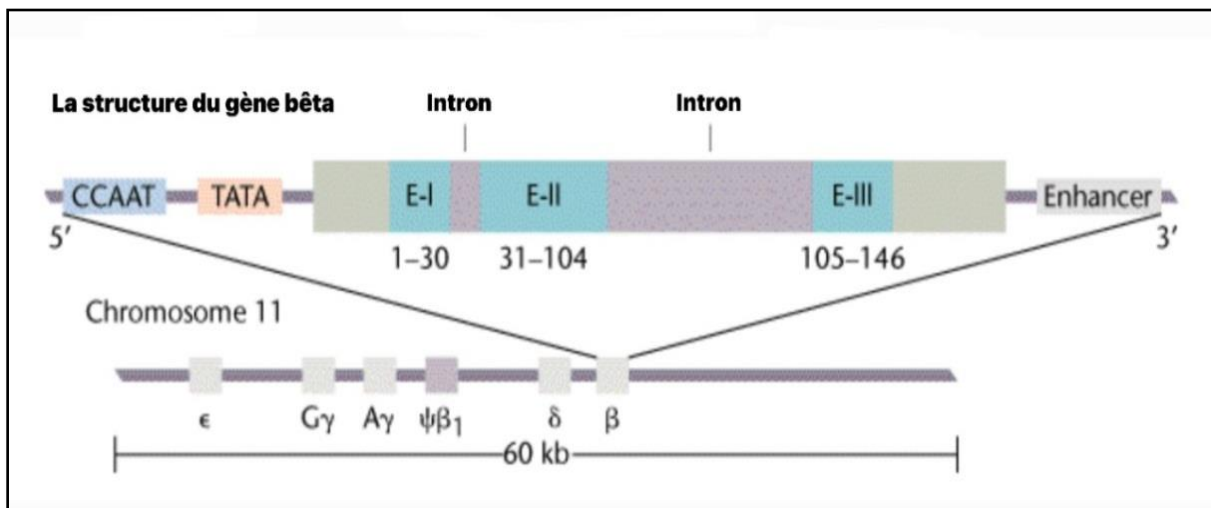
## 2. Détection de la drépanocytose par analyse génétique

### 2.1. Principe de la détection

Le gène  $\beta$ -globine est un située sur le chromosome 11p15.5 qui contient 3 exons (séquences codantes) séparés par 2 introns (séquences non codantes). Les gènes du locus de la  $\beta$ -globine sont disposés séquentiellement de 5' à 3'. La séquence de la  $\beta$ -globine est la suivante : en

## Etude Bibliographique

commençant par le gène exprimé au cours du développement embryonnaire (les 12 premières semaines après la conception) appelé epsilon, gamma, delta et bêta. Il y a deux copies du gène gamma sur chaque chromosome 11. Les autres sont présents en un seul exemplaire. Par conséquent, chaque cellule possède deux gènes de *bêta-globine*, un sur chacun des deux chromosomes 11 de la cellule (Elion *et al.*, 2016) ( **Figure 7**).



**Figure 7** : Structure du gène de la  $\beta$ -globine (Luizon *et al.*, 2018)

La substitution d'une adénine par une thymine dans la séquence de nucléotides du gène de la  $\beta$ -globine entraîne une modification de la séquence protéique dans laquelle un acide glutamique est remplacé par une valine. La mutation présente dans le gène  $\beta$ -globine est responsable de la formation d'une protéine d'Hb anormale appelé HbS. La mutation responsable de la maladie est située au niveau d'une séquence reconnue par l'enzyme de restriction BsuI. L'ADN muté ne peut plus être coupé par l'enzyme à cet endroit (**Figure 8**) (El Barjaji *et al.*, 2004).

<b>Séquence reconnue par l'enzyme</b>	<b>: CCTNAGG</b>	(N: A,C,G ou T)
<b>ADN normal</b>	<b>: CCTGAGG</b>	→ Reconnu et clivé par l'enzyme BsuI
<b>ADN muté</b>	<b>: CCTGTGG</b>	→ Non reconnu et donc non clivé par l'enzyme BsuI

**Figure 8** : Principe de la détection (El Barjaji *et al.*, 2004)

### 3. Gène *NOS3*

#### 3.1. Structure du gène *NOS3*

Le gène *NOS3* est situé dans la région 7q35-7q36 du chromosome 7 chez l'homme. Ce gène est présent en une seule copie dans le génome humain haploïde et contient 21-22 kb, 25 introns et 26 exons, qui codent un ARNm de 4052 nucléotides (Peraira *et al.*, 2007). Ce gène contient une région promotrice présentant des sites de liaison de facteurs de transcription tels que GATA, NF-1 et AP-1, ainsi que les domaines de régulation positive (PRD) I et II (Oliveira *et al.*, 2016) (Figure 10).

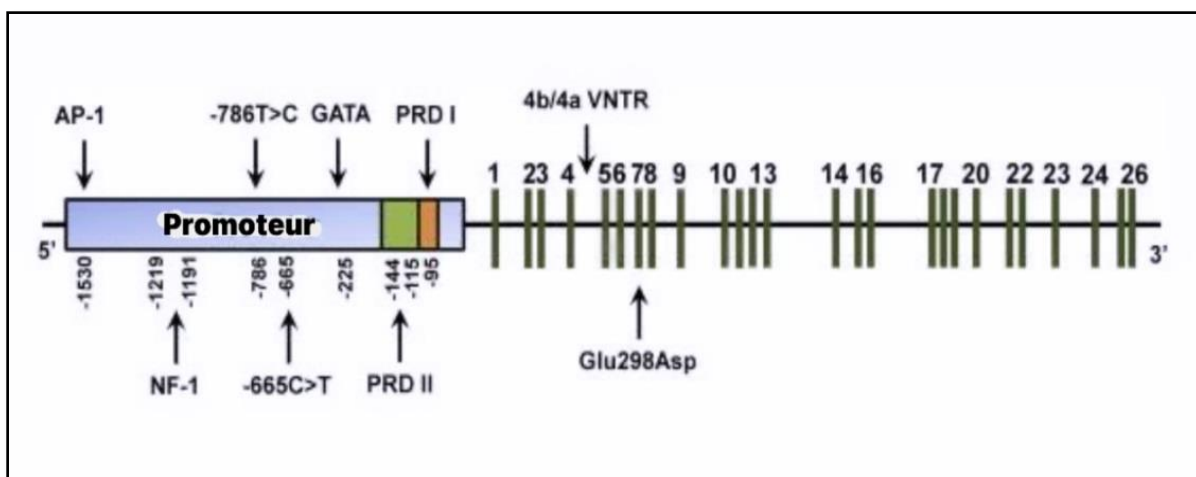


Figure 10 : Structure du gène *NOS3* (Gustavo *et al.*, 2016)

#### 3.2. Produit du gène *NOS*

*NOS3* est une enzyme dimérique dont l'expression et l'activité sont régulées au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel responsable de la production d'une petite molécule, l'oxyde nitrique (NO), codée par le gène *NOS3*. La *NOS3* est principalement exprimée dans le tissu endothélial qui tapisse le système circulatoire et le cœur, où elle joue un rôle clé dans la régulation de la production de NO (Oliveira *et al.*, 2016). L'enzyme agit comme un homodimère et se trouve dans la membrane cellulaire, le cytoplasme et l'appareil de Golgi. L'enzyme utilise 5 cofacteurs :

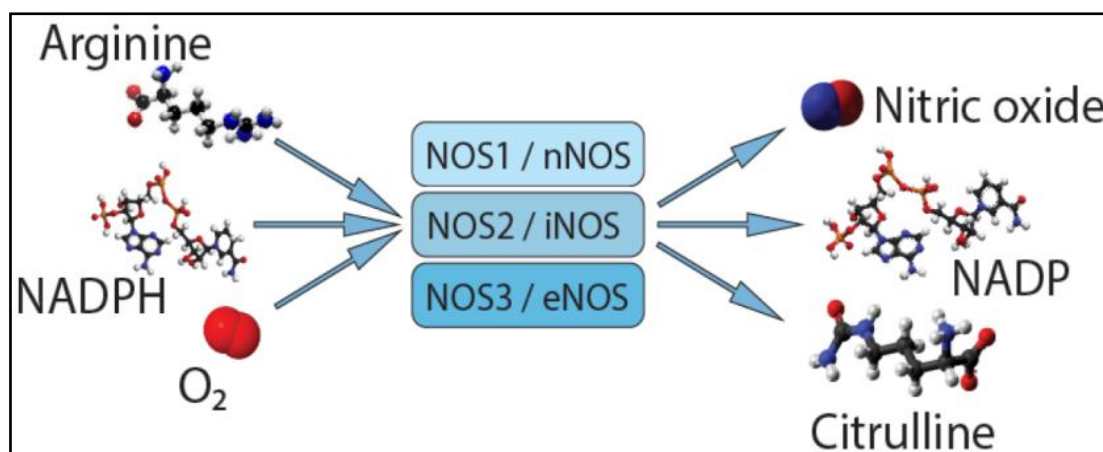
- Un hème
- FAD (flavine adénine dinucléotide)
- FMN (flavine mononucléotide)
- BH4 (cofacteur tétrahydrobioptérine)
- NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate)

L'enzyme *NOS* possède 3 isoformes :



- nNOS ou NOS de type I (oxyde nitrique synthase neuronale)
- iNOS ou NOS de type II (oxyde nitrique synthase inducible)
- eNOS ou NOS de type III (oxyde nitrique synthase endothéliale). (Dias *et al.*, 2011).

L'enzyme catalyse la conversion de la L-arginine en oxyde nitrique. La synthèse s'effectue en deux réactions. Dans un premier temps, l'enzyme agit comme une arginine hydroxylase. Dans la seconde réaction, elle agit en tant qu'hydroxyarginine monooxygénase. Dans cette réaction, il y a un transfert net de cinq électrons, dont quatre sont nécessaires pour réduire l'O<sub>2</sub> du NADPH et de l'arginine. Dans la première réaction, le NADPH assigne deux électrons qui oxydent l'azote du groupe guanidine de l'arginine. Dans la deuxième étape, le NADPH fournit un électron et la N-hydroxyarginine subit une oxydation de trois électrons pour former de la citrulline et du monoxyde d'azote (**Figure 11**) (Qian & Fulton, 2013).



**Figure 11** : Synthèse de l'oxyde nitrique (NO) (Mattila *et al.*, 2014)

Le NO joue de nombreux rôles protecteurs dans le système cardiovasculaire lorsqu'il est produit correctement. Agissant comme un vasodilatateur, le NO, lorsqu'il est sécrété, se diffuse à travers la surface d'un vaisseau sanguin dans le tissu musculaire lisse qui l'entoure, provoquant son relâchement. En outre, le NO inhibe également la formation de caillots dans les vaisseaux sanguins en empêchant les plaquettes, les petites cellules présentes dans le sang qui forment les caillots, de se fixer et empêche également les cellules immunitaires d'adhérer aux parois des vaisseaux sanguins (Francis *et al.*, 2010).

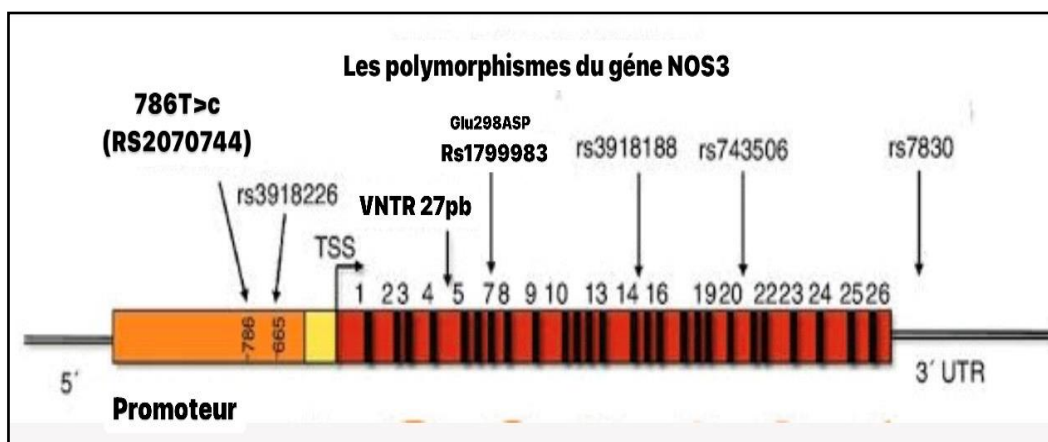
### 3.3 Polymorphismes du gène *NOS3*

Le gène *NOS3*, présente un certain nombre de sites polymorphes, notamment des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP), des répétitions en tandem à nombre variable



(VNTR), des microsatellites et des insertions/délétions. Certains polymorphismes de la *NOS3* ont des effets fonctionnels sur l'expression ou l'activité de la *NOS3*, affectant ainsi la formation de NO. Il est intéressant de noter que de nombreuses études ont évalué les effets des polymorphismes fonctionnels de la *NOS3* sur la susceptibilité aux maladies et la réponse aux médicaments (Leonardo *et al.*, 2015).

Trois polymorphismes principaux du gène *NOS3* ont été étudiés dans différentes maladies et se sont avérés associés à la néphropathie diabétique dans différentes études 16,17 : 894G>T ou Glu298Asp (rs1799983), répétition de 27 pb dans l'intron 4 (VNTR), variantes 4b/a, et -786 T>C. (Dellamea *et al.*, 2014) (**Figure 12**).



**Figure 12** : Localisation des polymorphismes du gène *NOS3* (Luizon *et al.*, 2018).

### 3.3.1. Polymorphisme GLU298ASP (RS1799983)

Le polymorphisme 894G>T, localisé dans l'exon 7, consiste en un changement de l'acide glutamique en acide aspartique (Glu298Asp). Le changement du glutamate (E) par l'acide aspartique (D) affecte le domaine de l'enzyme oxydase, qui est le site de liaison pour le BH4 et l'acide aminé L-arginine. Ce changement entraîne une variation de l'enzyme, la rendant plus sensible au clivage protéolytique en position D238-P239. Elle génère une forme plus courte de l'enzyme et entraîne donc une production moindre de NO (Dias *et al.*, 2011). Ce polymorphisme a été principalement associé à différentes maladies cardiovasculaires, telles que la maladie coronarienne, l'athérosclérose, le spasme coronarien l'Alzheimer, l'hypertension induite par la grossesse, le cancer de la vessie, le cancer de la prostate, la néphropathie diabétique (Szabo, 2013).

### **3.3.2. Polymorphisme 4 B/A (VNTR DANS L'INTRON 4)**

Ce polymorphisme est composé de 27 pb, caractérisées par l'allèle "a" qui contient 4 modifications répétées (délétion/polymorphisme) et l'allèle "b" qui consiste en 5 modifications (poussées/sauvages).

Des études récentes suggèrent que ce polymorphisme peut réguler l'expression de ce gène par la production d'un petit ARN interférent (ARNi) de 27 nucléotides, diminuant l'expression du gène et/ou la synthèse de la protéine (zhang *et al.*, 2008).

### **3.3.3. Polymorphisme 786 T>C (RS2070744)**

Ce polymorphisme, situé dans la région flanquante 5', a été associé à une diminution de l'expression du gène *NOS3*, car il réduit le taux de transcription du gène de 50 %. Il peut se lier à la protéine de la réplication A1 ; cette protéine participe à plusieurs processus cellulaires comme la transcription (Casas *et al.*, 2006).

Le polymorphisme T867 du gène *NOS3* implique une substitution d'une base nucléotidique dans la séquence d'ADN, remplaçant la thymine (T) par une autre base (par exemple, cytosine, C) à la position 867 du gène. Cette variation peut affecter la fonction ou l'expression de l'enzyme NOS3, ce qui peut avoir des implications sur la régulation de la pression artérielle, la vasodilatation, la coagulation sanguine et d'autres processus physiologiques contrôlés par le NO. Des études ont examiné l'association entre le polymorphisme T867 du gène *NOS3* et diverses conditions médicales, notamment les maladies cardiovasculaires, l'hypertension, la dysfonction endothéliale, et d'autres troubles liés à la circulation sanguine (Casas *et al.*, 2006).

## **4. Conseil génétique et le diagnostic prénatal**

Le dépistage prénatal est crucial pour les couples à risque de transmettre des maladies génétiques à leur enfant. Traditionnellement, il implique des procédures invasives telles que des prélèvements placentaires ou des amniocentèses, réalisées généralement entre la 12<sup>e</sup> et la 16<sup>e</sup> semaine de grossesse. Cependant, de nouvelles avancées technologiques ont permis le développement de méthodes non invasives de diagnostic prénatal (Touboul *et al.*, 2008).

Une de ces avancées est l'approche de diagnostic prénatal non invasif basée sur une simple prise de sang de la mère. Cette méthode permet de détecter des mutations génétiques spécifiques présentes dans l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel. Ce test est particulièrement prometteur car il pourrait être disponible dès la 8<sup>e</sup> semaine de grossesse, offrant ainsi un dépistage plus précoce et moins invasif (Touboul *et al.*, 2008).

## Etude Bibliographique

---

Pour garantir l'efficacité et la fiabilité des conseils génétiques délivrés dans le cadre du diagnostic prénatal, il est essentiel d'obtenir une caractérisation précise des génotypes des deux parents. Cela signifie qu'il ne faut pas se contenter d'informations partielles, et il peut être nécessaire de réexaminer la caractérisation moléculaire du couple si des doutes persistent. Dans les cas où l'accès à la caractérisation génétique du père est impossible, les informations épidémiologiques de la région d'origine du père peuvent être prises en compte pour éclairer le processus de conseil génétique. En résumé, les progrès dans le domaine du diagnostic prénatal offrent aux couples à risque de nouvelles options moins invasives et plus précoces pour détecter les maladies génétiques chez leur futur enfant. Cependant, pour garantir des conseils génétiques précis, une caractérisation rigoureuse des génotypes des parents est essentielle, et des considérations supplémentaires peuvent être nécessaires dans les cas où des informations génétiques complètes ne sont pas disponibles (Galactéros, 2021).

A horizontal scroll with a light brown, textured background. The word "Methodologie" is written in a black, elegant cursive font across the center of the scroll. The scroll has small circular details at the top and bottom corners, suggesting it is unrolled.

# *Methodologie*

## 1. Type d'étude

Notre étude est transversale de type cas-témoins et avait pour but de rechercher d'éventuelle corrélation entre le polymorphisme T786C du gène *NOS3* et la drépanocytose.

Les participants de notre étude sont des patients atteints de la drépanocytose qui ont été sélectionnés parmi les consultants du service d'hématologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Benbadis - Constantine, durant la période de 21 décembre 2023 au 3 janvier 2024.

L'étude moléculaire a été réalisée à l'échelle du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), durant la période de 27 février au 13 mars 2024, elle consiste en une extraction d'ADN au niveau du laboratoire de chimie, ainsi la réaction de la polymérisation en chaîne du polymorphisme T786C du gène *NOS3* s'est pratiquée dans le laboratoire de biologie moléculaire du même centre.

## 2. Population d'étude

L'étude enferme deux populations distinctes : le groupe des témoins et le groupe des patients.

### 2.1. Groupe des témoins

Les témoins sont recrutés à partir d'une population supposée saine, leurs âges s'échelonnent de 27 à 47 ans, leurs ADN constituent un pool stocké au sein du laboratoire de biologie et génétique moléculaire.

Nous avons recruté 23 témoins des deux sexes (10 hommes et 13 femmes) qui n'ont pas des antécédents de drépanocytose dans leurs familles.

### 2.2. Groupe des patients

Dans cette étude, nous avons inclus un total de 10 patients répondants au seul critère d'inclusion d'avoir une drépanocytose de la forme homozygote SS confirmé par un médecin clinicien.

Nous avons exclu de cette prospection les patients présentant les caractères suivants :

- sujets difficiles à piquer,
- hétérozygote composite SC
- sujets refusant de faire le prélèvement et de participer à l'étude.

Tous nos patients, après lecture et explications exhaustives, ont signé un consentement éclairé nous autorisant à l'utilisation de leurs données clinico-biologiques et de leur matériel génétique (ADN) pour la réalisation de l'étude moléculaire (**Annexe I**).

## 3. Méthodologie

### 3.1. Collecte des données

Toutes les patients, après explication et lecture, ont accepté l'utilisation de leurs données clinique, biologique et génétique dans le cadre de cette étude. Ces individus ont répondu également au questionnaire visant à recueillir les données cliniques et biologiques en rapport avec le dysfonctionnement étudié tels que (les antécédents familiaux, le mode de vie ...). Un exemple de questionnaire est présenté en **Annexe II**.

### 3.2. Prélèvements sanguins et conservation

Le prélèvement sanguin a été effectué pour chaque patient en respectant des conditions légales strictes et stériles. Le sang a été prélevé par ponction veineuse. Il a été recueilli dans des tubes vacutainer EDTA d'une quantité de 5 ml, ce dernier est un type de tube utilisé pour la collecte et la conservation des échantillons de sang ; EDTA, ou éthylène diamine tétraacétique, un anticoagulant présent dans le tube, qui empêche la coagulation du sang en se liant au calcium. Le tube Vacutainer EDTA est généralement utilisé pour les tests hématologiques et moléculaires. Son rôle est donc de maintenir le sang dans un état liquide, sans coagulation, afin de faciliter les analyses ultérieures en laboratoire.

Les échantillons prélevés ont été conservés à une température de -20°C. Ainsi chaque tube est étiqueté avec le nom, le prénom et le numéro successif de tube d'ADN selon le registre du laboratoire. Ces informations essentielles pour assurer l'identification correcte de chaque sujet.

## 4. Etude moléculaire

### 4.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN contenu dans les cellules. Il existe de nombreux protocoles d'extraction, celui utilisé dans notre étude est la méthode d'extraction par le kit *Wizard® Genomic DNA Purification* du Promega (A1125). Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN.

Nous avons appliqué le protocole suivant :

- ajouter 900µl de solution de lyse cellulaire dans un tube stérile de 1,5 ml.
- agiter doucement le tube de sang jusqu'à ce qu'il soit complètement mélangé, puis transférer 300 µl du sang dans le tube contenant la solution de lyse puis inverser le tube 5-6 fois pour le mélanger

## Méthodologie

---

- incuber le mélange pendant 10 min à température ambiante (inverser le tube 2- 3 fois une fois pendant l'incubation) pour la lyse des GR.
- centrifuger le tube à 13000-16000 xg pendant 20 secondes à température ambiante.
- retirer et jeter le surnageant sans perturber le culot blanc visible, donc environ 10 à 20µl de liquide résiduel resteront dans le tube de 1,5 ml.
  - ❖ Nos échantillons du sang ont été congelés, donc il faut répéter les étapes précédentes jusqu'à ce que le culot soit blanc.
- vortexer le tube vigoureusement (10-20 secondes) pour remettre les globules blancs en suspension.
- ajouter 300 µl d'une solution de lyse nucléique dans le tube contenant les globules blancs en suspension.
- pipeter la solution 5-6 fois pour lyser les globules blancs et avoir une solution très visqueuse. Si des touffes de cellules sont visibles après le mélange, incuber la solution à 37°C jusqu'à ce que les touffes soient perturbées. Si les amas sont encore visible après une heure, ajouter 100ul de solution de lyse nucléique et répéter l'incubation.
  - ❖ facultatif: Ajouter 1,5 µl d'une solution RNase au lysat nucléique, et mélanger l'échantillon en inversant le tube 2 à 5 fois, puis incuber le mélange à 37°C pendant 15 min et faire un refroidissement à température ambiante.
- ajouter 100 µl de solution de précipitation protéique au lysat nucléique, et vortexer vigoureusement pendant 10-20 secondes. Des petits grumeaux de protéines peuvent être visibles après le vortex.
- centrifuger à 13000-16000 xg pendant 3 min à température ambiante, une pastille de protéine brune foncée devrait être visible.
- Transférer le surnageant dans un tube à 1,5 µl contenant 300 µl d'Isopropanol (à température ambiante).
- mélanger doucement la solution par inversion jusqu'à ce que les brins d'ADN ressemblant à du fil blanc formant une masse visible.
- centrifuger à 13000-16000 xg pendant 1 min donc l'ADN sera visible sous la forme d'une petite pastille blanche.
- décanter le surnageant et ajouter à l'ADN un volume de l'éthanol à 70 % (à température ambiante). Inverser doucement le tube plusieurs fois pour laver le culot d'ADN et les côtés de tube.
- centrifuger à 13000-16000 xg pendant 1 min.

- aspirer soigneusement l'éthanol à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une pipette de séquençage.
- Inverser le tube sur un papier absorbant propre et sécher à l'air le culot pendant 10-15 min.
- ajouter 100  $\mu$ L d'une solution de réhydratation d'ADN dans le tube (tube eppendorf) et réhydrater l'ADN en incubant à 65<sup>0</sup> C pendant 1 heure.
- conserver l'ADN entre 2 et 8<sup>0</sup> C.

### 4.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN

L'ADN est quantifié par spectrophotométrie, profitant de sa propriété d'absorber la lumière ultraviolette. Cette absorption est maximale à 260 nm. La présence de contaminants peut être évaluée en calculant des "ratios". Le ratio A260/280 est utilisé pour estimer la pureté de l'ADN. Les protéines absorbent également à 280 nm, donc un ratio d'environ 1,8 est indicatif d'un ADN pur. L'absorption à 230 nm renseigne sur la contamination par d'autres substances. Les hydrates de carbone, les peptides, les phénols et les composés aromatiques absorbent à cette longueur d'onde.

Un ratio A260/A230 d'environ 2,2 est caractéristique d'un échantillon pur. Le dosage d'ADN au laboratoire est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre Nano Drop 8000. Il suffit d'y déposer 2  $\mu$ l d'ADN extrait pour en déterminer la concentration et la pureté, représentées par une courbe.

### 4.3. Génotypage du gène *NOS3* par *TaqMan*<sup>®</sup> *SNP*

Pour la mise en évidence du polymorphisme T786C du gène *NOS3*, nous avons utilisé la technique de PCR en temps réel.

#### 4.3.1. Principe de la PCR en temps réel par *TaqMan*

La technologie de PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant. Le principe de cette technique repose sur la fonction exonucléase 5'→3' de la *Taq* polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique d'un morceau interne à la séquence amplifiée. Elle est marquée en 5' par un fluorophore appelé 'reporter' et en 3' par un autre type de fluorophore appelé 'quencher'.



## Méthodologie

---

L'émission du reporter est atténué ou 'quenché' (éteint) par la proximité du quencher. Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléase de la taq, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter sera augmentée. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore reporter est proportionnel au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

### 4.3.2. Principales réactifs

**Le premier réactif :** *TaqMan® Genotyping PCR Master Mix* qui contient :

- ADN polymérase AmpliTaq Gold®, ultra pure (UP).
- Tésoxyribonucléotides triphosphates (dNTP).
- référence passive ROX™.
- tampon avec des composants optimisés pour des clusters de fluorescence à point final étroit, une discrimination allélique reproductible et une stabilité sur paillasse

**Le deuxième réactif :** *TaqMan® SNP Genotyping Assay* qui contient :

- deux amorces pour amplifier la séquence polymorphe d'intérêts
- deux sondes TaqMan® MGB pour distinguer les deux allèles

**Les sondes :** chaque sonde *TaqMan* MGB contient :

- un colorant rapporteur aux 5' extrémités de chaque sonde

Le premier colorant colorant VIC® est relié à l'extrémité 5' de la sonde de l'allèle 1.

Le colorant FAM™ est relié à l'extrémité 5' de la sonde de l'allèle 2.

- MGB et reli à l'extrémité 3' de chaque sonde.

Cette modification augmente la température de fusion (T<sub>m</sub>) pour une longueur de sonde donnée, ce qui permet de concevoir des sondes plus courtes.

- un extincteur (quencher) non fluorescent (NFQ) à l'extrémité 3' de chaque sonde.

### 4.3.3. Mécanisme de la PCR en temps réel

Pendant la PCR, les étapes suivantes se produisent :

1. chaque sonde TaqMan MGB se raccorde spécifiquement à sa séquence complémentaire entre les sites des deux amorces (forward et reverse).

2. lorsque la sonde oligonucléotidique est intacte, la proximité du colorant rapporteur avec le colorant extincteur (quencher) entraîne l'extinction de la fluorescence du rapporteur principalement par transfert d'énergie de type *Froster*.

## Méthodologie

3. l'ADN polymérase *AmpliTaq Gold*® étend les amorces liées à l'ADN matrice.
4. l'ADN polymérase *AmpliTaq Gold* ne clive que les sondes hybridées à la séquence cible.
5. le clivage sépare le colorant rapporteur du colorant extincteur (quencher), ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence du rapporteur.
6. l'augmentation du signal de fluorescence se produit lorsque les sondes qui ont hybridé à la séquence complémentaire sont clivés. Ainsi, le signal de fluorescence général par amplification PCR indique quels-allèles sont présents dans l'échantillon (**Annexe III**).

### 4.3.4. Protocole de la PCR en temps réel

#### 4.3.4.1. Directives procédurales

- Conservez les produits de *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* congelés et à l'abri de la lumière jusqu'à leurs utilisations. Une exposition excessive à la lumière peut affecter les sondes fluorescentes.
- Ne pas effectuer plus de 10 cycles de décongélation- congélation des produits *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays*
- Pour assurer une analyse optimale du génotypage par les produits *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays*, préparer une plaque de réaction optique contenant les éléments suivants pour chaque essai (**Tableau 2**)

**Tableau 2:** Types de réactions recommandés pour chaque essai

Type de réaction	Composant
Les échantillons à testés	Échantillons d'ADN avec génotype inconnu au polymorphisme d'intérêt
Contrôle négatif	Eau distillée UltraPure™ sans DNase.
Contrôle positif (facultatif)	Échantillon d'ADN avec génotype connu au polymorphisme d'intérêt

#### 4.3.4.2. Préparation des réactifs de la PCR et les échantillons de l'ADN

##### 4.3.4.2.1. Dilution et aliquotage des produits *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays*

- Diluer les produits *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* (40 X) à une concentration de 20X dans un tampon TE1X (10 mM tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8,0, eau ultra pure filtré et stérile).
- Vortex, puis centrifuger le mélange
- Stocker plusieurs aliquotes des produits *TaqMan*® *SNP Genotyping Assays* à une température entre -15 à -25 °C dans l'obscurité.

## 4.3.4.2.2. Dilution des échantillons d'ADN

- Remettre en suspension les échantillons d'ADN décongelés par vortex, puis centrifuger brièvement les tubes d'ADN.
- Diluer chaque échantillon d'ADN, dans une solution de réhydratation de l'ADN à une concentration de 10ng/μl.
- Faire une deuxième dilution de l'ADN à une concentration de 1ng/μl dans l'eau distillée *UltraPure™ sans DNase (DNase-Free Water)* pour assurer une quantité d'ADN entre 1 à 10 ng par puit (exemple: le volume total est de 30μl=3μl d'ADN +27μl de *DNase free water*).

## 4.3.4.2.3. Préparation du mix réactionnel

Avant chaque exécution PCR :

- remettre en suspension une aliquote de produits *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (20 X) par vortex, puis centrifugez brièvement le tube.
- calculer le volume nécessaire pour chaque réactifs selon le nombre des réactions à faire (= le nombre des échantillons à testés + le nombre des contrôles positifs et négatifs + 10% de volume surplus).
- combiner les composants suivants pour le nombre de réactions requises (**Tableau 3**)
- vortexer brièvement le mix.
- centrifuger brièvement pour amener le mix de réaction au fond du tube et éliminer les bulles d'air.

**Tableau 3:** Mix de réactions

Composant	Volume (réaction de 12 μl)	Volume pour 31 échantillons + 2NTC+2 PTC+ 10%
2X TaqMan® Master Mix	6 μl	231 μl
TaqMan® SNP Genotyping Assays (20 X)	0.6 μl	23,1μl
Volume total par puits	6.6 μl	6.6 μl

## Méthodologie

### 4.3.4.2.4. Préparer la plaque de réaction

**A-** Ajouter le volume approprié de mix de réaction (6.6 µl) à chaque puits de la plaque de réaction (MicroAmpMC à 96 puits).

**B.** Ajouter le volume d'échantillon d'ADN approprié (5,4µl) ou l'ADN des contrôles positifs dans chaque puits.

**C.** Fermer la plaque avec un film adhésif, vortexer la plaque pour bien mélanger l'ADN avec le mix réactionnel, puis centrifuger brièvement pour apporter le mélange de réaction au fond du puits et éliminer les bulles d'air.

### 4.3.4.3. Déroulement des cycles de la PCR en temps réel

Le déroulement des cycles de la PCR a été assuré par un thermocycleur (*Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*) et les conditions d'amplification étaient présentées dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Conditions thermique du cycle

Étape	Tests de génotypage SNP TaqMan® prédéfinis et personnalisés		
	Température	Durée	Cycles
<b>Activation par polymérase</b>	95°C	10 minutes	HOLD
<b>Dénaturation</b>	95 °C	15 minutes	40
<b>Hybridation/Elongation</b>	60 °C	1 minute	

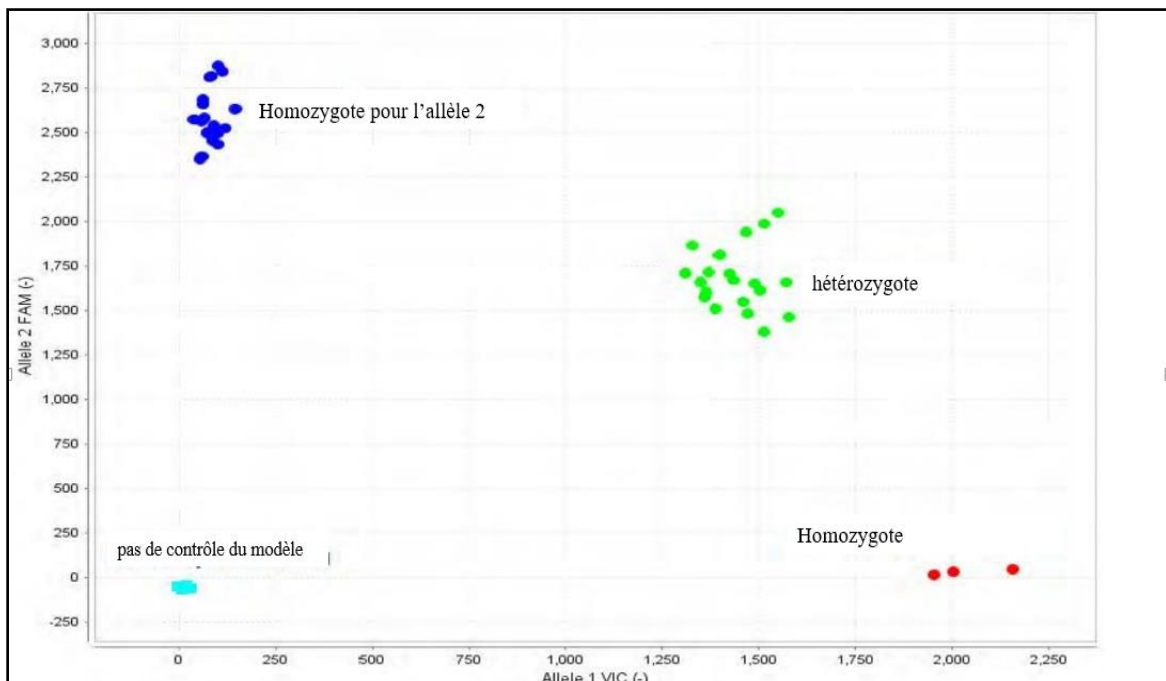
### 4.3.4.4. Effectuer la lecture et l'analyse de la plaque post-PCR

Pour analyser les données de discrimination allélique ou de génotypage, il faut suivre les étapes suivantes :

- créez un document ou un fichier d'expérience post-PCR
- effectuer une lecture de plaque post-PCR sur l'instrument de la PCR en temps réel.
- analyser les données expérimentales en utilisant le Logiciel **SDS v2.0.6**
- effectuer l'identification des allèles automatiques ou manuels. Voir «Tracés de discrimination alléliques» pour plus d'information
- convertir l'identification des allèles en génotypes.

## 4.3.4.5. Graphique de discrimination allélique

Le logiciel de l'instrument de la PCR en temps réel trace les résultats des données de discrimination allélique comme un tracé de l'allèle 1 (colorant VIC™) par rapport à l'allèle 2 (colorant FAM™). Le graphique de la discrimination allélique (DA), également connu sous le nom de graphe de cluster ou de nuage de points, chaque point sur le graphe représente un échantillon ainsi qu'un individu. Un graphe DA typique montre des clusters homozygotes, un cluster hétérozygote, et le contrôle négatif. Les points de chaque cluster sont regroupés étroitement et chaque cluster bien loin des autres clusters (**Figure 13**) (**Tableau 5**).



**Figure 13** : Discrimination allélique typique

## Méthodologie

**Tableau 5** : Répartition de clusters dans un graphique de discrimination allélique

Contenu des échantillons	Emplacement dans le tracé AD
Allèle 1 (homozygote), marqué au colorant <b>VIC™</b>	coin inférieur droit
Allèle 2 (homozygote), marqué au colorant <b>FAM™</b>	coin supérieur gauche
Allèles 1 et 2 (hétérozygote)	Approximativement au milieu de graphe, entre les clusters de l'allèle 1 et allèle 2
Contrôle Négatif	le coin inférieur gauche
Non déterminé	N'importe où en dehors des régions décrites ci-dessus
pas d'amplification	Avec le cluster NTC dans le coin inférieur gauche


### 5. Etude statistique analytique

Les calculs statistiques de tous les échantillons obtenus ainsi que de tous les paramètres considérés ont été obtenus par le logiciel *MedCalc software Ltd* version 22.023. L'étude statistique est basée sur l'évaluation d'un odds ratio (OR) et des *p-value*.

L'intensité de l'association entre le polymorphisme et la présence de la MC est calculée comme suit :  $OR = \frac{A * D}{B * C}$   
L'OR représente une mesure d'association épidémiologique entre un facteur et une maladie, en particulier lorsque la maladie est rare parmi la population (prévalence < 5 %)

#### Le choix de la *p-value*

Le seuil critique est évalué à 0,05 (risque  $\alpha$ ). Si la valeur de *p-value* calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.



*Résultats*

*et*

*discussion*

### I. Caractéristiques principales des patients

#### 1. Âge

Dans notre étude, l'âge moyen de nos patients est de  $30 \pm 5,17$  ans avec des extrêmes allant de 22 ans et 39 ans. La tranche d'âge des 30 à 34 ans était la plus représentée et regroupait 40 % des patients, alors que la tranche d'âge des 25 à 29 ans ne représente que 10 % de la population (Tableau 6).

**Tableau 6:** Répartition des patients par tranche d'âge

Tranche d'âge	Effectif (n)	Pourcentage (%)
[20-24]	3	30
[25-29]	1	10
[30-34]	4	40
[35-39]	2	20

Il semble que la moyenne d'âge des patients atteints de la drépanocytose varie considérablement selon les populations étudiées. Les résultats que nous avons obtenus se situent dans une fourchette similaire à ceux observés dans les populations gabonaise et togolaise, qui présentent des moyennes d'âge autour de 30 ans ( $30,4 \pm 7,8$  dans la population gabonaise et  $29,1 \pm 11,2$  dans la population togolaise) (Igala *et al.*, 2022 ; Maneh *et al.*, 2024).

Cependant, il y a des écarts significatifs avec d'autres populations, comme celle du Maroc, où la moyenne d'âge est beaucoup plus jeune, aux alentours de 13 ans ( $13,22 \pm 16,36$  ans) (Dahmani *et al.*, 2016). De même, la population mauritanienne semble avoir une moyenne d'âge plus élevée, autour de 24 ans (Laghdaf *et al.*, 2022) .

Nous avons comparé les tranches d'âge de notre cohorte qui est de 30 à 34 ans, avec celles trouvées dans les études menées par Igala et al sur la population gabonaise, Diop et al sur la population sénégalaise, ainsi que Maneh et al sur la population togolaise. Dans l'étude menée par Igala et al, les tranches d'âge retrouvées sont de 25 à 29 ans, ce qui est inférieur à notre cohorte. Dans l'étude de Maneh et al, les tranches d'âge de 20 à 30 ans, avec un chevauchement partiel de notre cohorte, mais notre population couvre une gamme plus large. Tandis que dans l'étude de Diop et al, les tranches d'âge sont de 20 à 29 ans avec une partie de notre échantillon également incluse dans cette fourchette (Diop *et al.*, 2003 ; Igala *et al.*, 2022 ; Maneh *et al.*, 2024).

Il semble donc que notre cohorte soit légèrement plus âgée que celles des études comparatives, avec une tranche d'âge allant jusqu'à 34 ans, tandis que les autres études ont des tranches d'âge



## Résultats et Discussion

---

inférieures, allant jusqu'à 29 ou 30 ans. Les différences dans les moyennes d'âge des patients atteints de drépanocytose entre différentes populations peuvent être influencées par plusieurs facteurs, comme les fréquences de la mutation de drépanocytose qui peuvent varier selon les populations, ce qui peut influencer l'âge moyen auquel les individus présentent des symptômes et sont diagnostiqués.

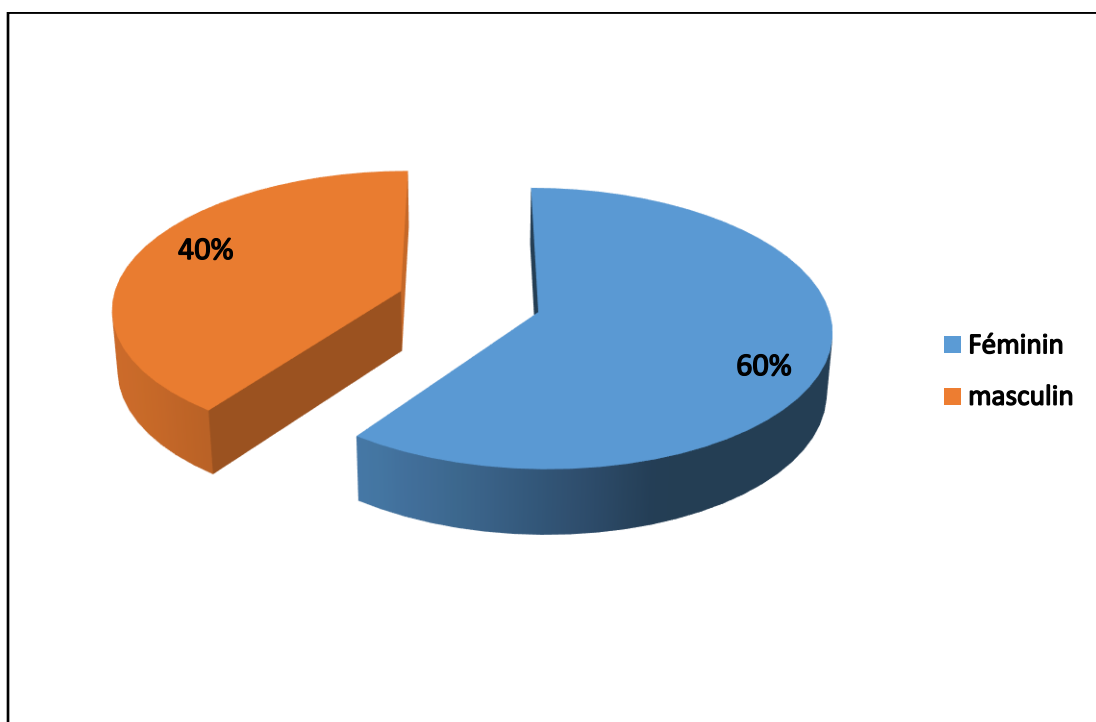
Les variations dans les pratiques de dépistage de la drépanocytose ainsi que l'accès aux soins de santé peuvent jouer un rôle majeur dans la détection précoce de la maladie. Dans certaines régions où les programmes de dépistage sont moins répandus ou l'accès aux soins de santé est limité, les patients peuvent être diagnostiqués à un âge plus avancé.

Les conditions environnementales telles que le climat, l'altitude et la prévalence des infections peuvent également avoir un impact sur la santé des patients atteints de drépanocytose. Par exemple, les patients vivant dans des régions où les infections sont plus fréquentes peuvent développer des complications plus tôt dans la vie.

Les différences dans la disponibilité des traitements et dans la gestion de la drépanocytose peuvent également influencer l'âge auquel les patients sont diagnostiqués et la manière dont la maladie progresse. Des programmes de dépistage et des soins médicaux appropriés peuvent permettre une détection précoce et une meilleure gestion de la maladie, ce qui pourrait retarder l'apparition des symptômes graves (Frédéric *et al.*, 2019).

### 2. Sexe et sexe-ratio

Nos résultats confirment que cette pathologie peut toucher approximativement les deux sexes. Le nombre des patients de sexe masculin est de 4 cas ce qui représente 40 % de l'ensemble des cas (10 cas), ce nombre est relativement inférieur au nombre de malades de sexe féminin 6 cas qui est représenté 60% de l'ensemble des cas (**Figure 14**).



**Figure 14:** Répartition des patients selon le sexe

Dans notre série, nous notons une légère prédominance féminine soit un sex-ratio de 1,5 (6 F/4 H). Cela suggère que le genre n'influence pas significativement la susceptibilité à la drépanocytose, car le caractère est hérité génétiquement et indépendamment du sexe.

Étant donné que la drépanocytose n'est pas un trouble lié à l'X, donc les variations des résultats d'une étude à l'autre pourraient être attribuées à des biais de recrutement ou de taille d'échantillon.

Dans l'ensemble, ces répartitions entre les deux sexes concordent avec celles signalées dans d'autres régions, comme les études menées en République Démocratique du Congo (Dokéias *et al.*, 2011 ; Shongo *et al.*, 2015), qui ont révélé une prédominance féminine avec des rapports entre les deux sexes (H/F) de 0,8 et 0,9, respectivement. Cependant, deux études distinctes menées à Dakar (Diagne *et al.*, 2000) et au Centre National de Référence pour la drépanocytose au Niger (Mounkaila, 2015) ont révélé une légère prédominance masculine avec des rapports sexuels de 1,02 et 1,2, respectivement. D'autres chercheurs, comme Than *et al.* n'ont observé aucune prédilection pour le genre (Than *et al.*, 2008).

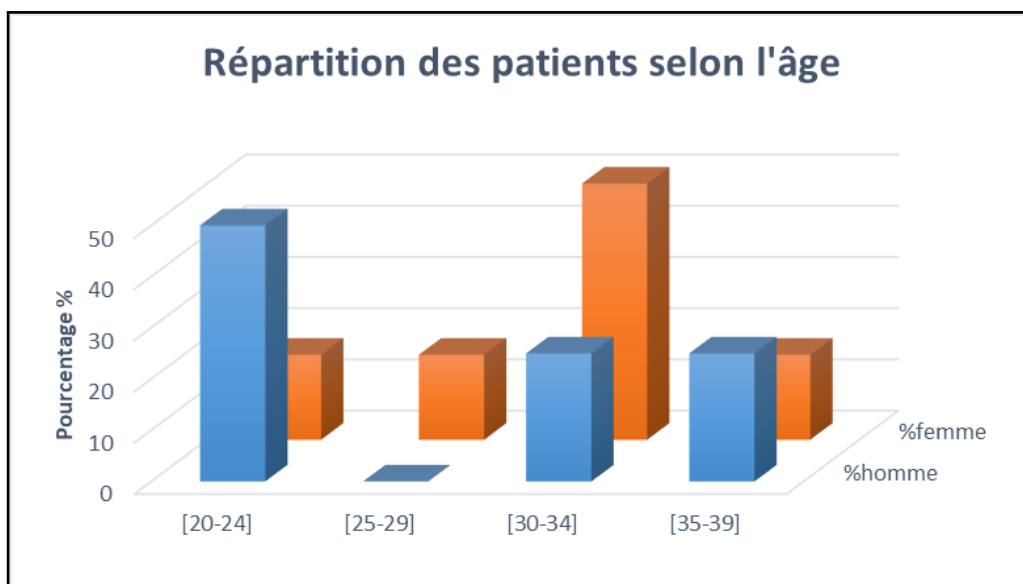
Dans la littérature, l'étude de Kueviakoe *et al.* (2019) menée au Togo a révélé un sex ratio H/F de 0,81, suggérant une légère prédominance masculine dans leur échantillon. En revanche, l'étude de Tolo *et al.* (2010) en Côte d'Ivoire a montré un sex ratio plus élevé, à 1,28, mettant

## Résultats et Discussion

en évidence une nette prédominance masculine. Ces différences soulignent l'importance des contextes sociaux, culturels et démographiques dans la composition des échantillons. Elles peuvent être influencées par divers facteurs tels que les migrations.

### 3. Age et sexe-ratio

Dans notre étude constituée d'une majorité de femmes composant 60 % de l'échantillon et d'hommes qui représente les 40 % restants, le sexe masculin affiche un âge moyen de 28,25 ans, concentrant principalement leur présence dans la tranche d'âge de (20 à 24 ans). En revanche, le sexe féminin présente un âge moyen de 31,1 ans, avec une prédominance dans la tranche d'âge de (30 à 34 ans), également à hauteur de 50 % (**Figure 15**).



**Figure 15** : Répartition des patients selon l'âge et le sexe

Dans notre étude portant sur la drépanocytose, nous avons constaté que l'âge moyen des femmes atteintes de cette maladie est de 31,1 ans, tandis que celui des hommes est légèrement inférieur à 28,25 ans. En comparaison avec les résultats de Diop et al (2003) sur la population sénégalaise, nous observons que dans notre échantillon, les hommes atteints de drépanocytose sont plus âgés en moyenne que ceux de la population sénégalaise (27 ans), avec une différence d'environ 1,25 ans. De même, les femmes dans notre échantillon ont un âge moyen similaire à celui de la population sénégalaise (28,4 ans).

Par ailleurs, lorsque nous comparons nos résultats avec ceux de l'étude menée par Kueviakoe et al sur la population togolaise, nous constatons que l'âge moyen des hommes dans notre

## Résultats et Discussion

---

échantillon est légèrement inférieur à celui des hommes togolais atteints de drépanocytose ( $31,29 \pm 11,12$  ans), tandis que l'âge moyen des femmes dans notre échantillon est également légèrement inférieur à celui des femmes togolaises ( $32 \pm 10,55$  ans) (Kueviakoe *et al.*, 2019).

Dans notre étude, nous avons repéré des tranches d'âge spécifiques chez les hommes et les femmes, avec une concentration significative des hommes âgés de 20 à 24 ans et des femmes âgées de 30 à 34 ans. En comparaison, les résultats de l'étude menée par Dzone et al sur la population congolaise révèlent des tranches d'âge différentes, Dans cette étude, les individus âgés de 10 à 19 ans étaient plus représentés, indépendamment du sexe. Cette différence dans la distribution des tranches d'âge entre notre cohorte et celle de l'étude congolaise suggère des variations potentielles dans la prévalence et la manifestation de la drépanocytose dans différentes populations et groupes d'âge (Dzone *et al.*, 2020).

L'observation des différences d'âge moyen entre les hommes et les femmes atteints de drépanocytose dans notre étude soulève des questions intéressantes sur les facteurs sous-jacents à ces variations. Selon la littérature plusieurs causes potentielles peuvent contribuer à ces différences :

**Hétérogénéité génétique :** la drépanocytose est une maladie génétique complexe résultant de mutations dans le gène de l'Hb. Les variations génétiques entre les individus, ainsi que les différences dans les haplotypes drépanocytaires, peuvent influencer l'âge de manifestation de la maladie et sa progression chez les hommes et les femmes.

**Hormones sexuelles :** les hormones sexuelles, telles que les œstrogènes chez les femmes et la testostérone chez les hommes, peuvent avoir un impact sur la pathogenèse de la drépanocytose. Par exemple, les œstrogènes peuvent avoir des effets protecteurs sur la fonction endothéliale, tandis que la testostérone peut aggraver la dysfonction vasculaire chez les hommes. Ces différences hormonales peuvent influencer l'âge de début et la progression de la maladie chez les hommes et les femmes.

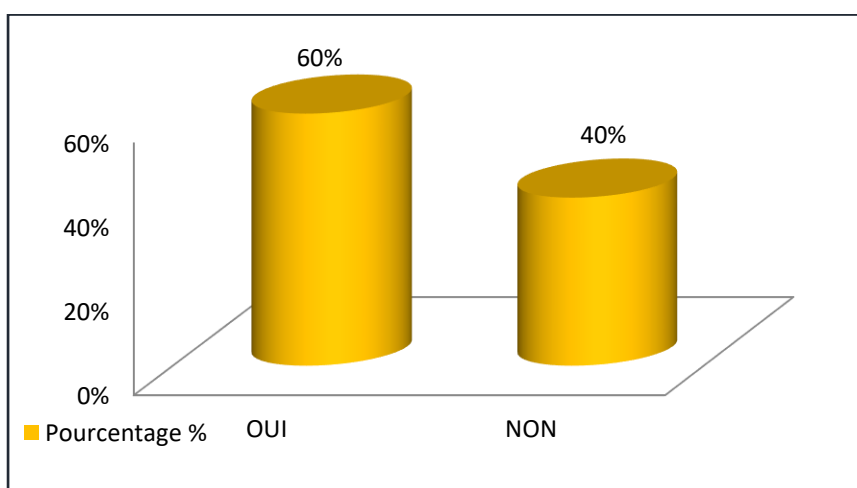
**Facteurs socio-économiques :** les disparités socio-économiques peuvent également jouer un rôle dans les différences d'âge moyen entre les hommes et les femmes atteints de drépanocytose. Par exemple, l'accès inégal aux soins de santé, aux médicaments et aux ressources socio-économiques peut influencer la gravité de la maladie et l'âge auquel les patients sont diagnostiqués et reçoivent un traitement.

## Résultats et Discussion

Interactions génotype-environnement : les interactions complexes entre les facteurs génétiques et environnementaux peuvent également contribuer aux variations d'âge moyen entre les hommes et les femmes atteints de drépanocytose. Les différences dans les expositions environnementales, telles que le stress oxydatif, l'inflammation chronique et l'adhésion cellulaire, peuvent moduler la progression de la maladie de manière différentielle selon le sexe (Oudin-dogliani *et al.*, 2019).

### 4. Consanguinité

La répartition des patients selon la notion de la consanguinité révèle que 60 % des patients sont issues d'un mariage consanguin, alors que 40 % des patients sont issus d'un mariage aléatoire (Figure 16).



**Figure 16 :** Répartition des patients selon la consanguinité

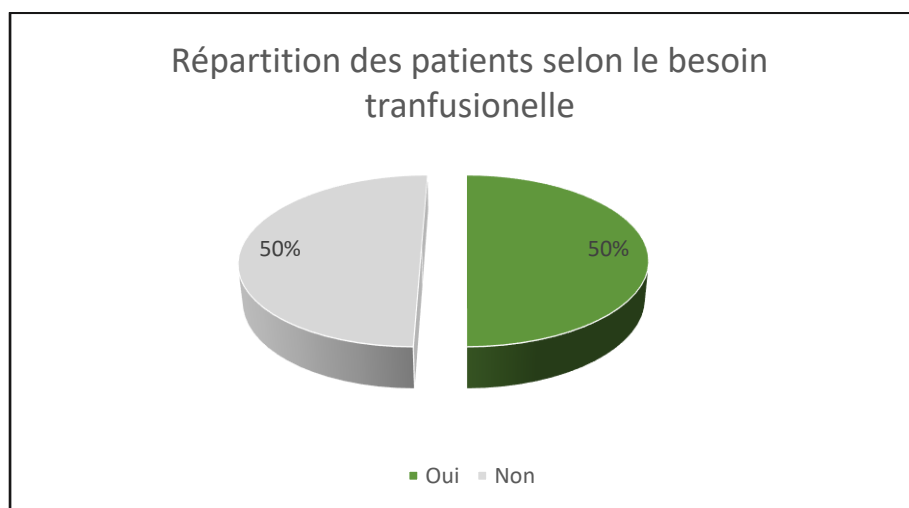
En comparant nos résultats avec plusieurs études antérieures menées sur des populations africaines, des tendances similaires sont observés, bien que les taux spécifiques de consanguinité varient. Les recherches antérieures, notamment celles menées au Sénégal et au Mali, ont rapporté des pourcentages de consanguinité allant de 45 % à 77,8 % pour les premiers degrés. L'étude de Bioro *et al* réalisée au Sénégal, a révélé une consanguinité parentale de 50 %, dont 46,7 % concernaient le premier degré. Diakité *et al* étudiant la population malienne, ont trouvé une consanguinité du premier degré de 77,8 %. De même, Seck *et al*, ont constaté que 51,3 % des patients étaient issus de mariages consanguins, tandis que Bah *et al* ont rapporté que 51,43 % des patients provenaient de mariages consanguins dans leur étude portant sur la

## Résultats et Discussion

population malienne. Enfin, l'étude de Belala et al réalisée au Maroc a trouvé que 45 % des patients étaient issus de mariages consanguins, tandis que 55 % provenaient de mariages non consanguins. Ces constatations soulignent l'importance de poursuivre les recherches dans ce domaine pour mieux comprendre les impacts de la consanguinité sur la santé et élaborer des stratégies de santé publique appropriées pour ces communautés (Belala *et al.*, 2016 ; Bioro *et al.*, 2016 ; Diakité *et al.*, 2019 ; Bah *et al.*, 2021 ; Seck *et al.*, 2021).

### 5. Transfusion sanguin

Dans notre étude, 50 % des patients drépanocytaires nécessitent une perfusion sanguine, tandis que les 50 % restants n'ont pas besoin de cette intervention (**Figure 17**)



**Figure 17** : Répartition des patients selon le besoin transfusionnelle

La répartition des patients selon le besoin transfusionnelle souligne une diversité de besoins médicaux au sein de la population drépanocytaire et concorde avec les résultats d'une recherche menée par Gantet et al et al en 2014 sur la population française, qui a également abouti à cette répartition. Cependant, il convient de noter qu'une étude antérieure sur la population parisienne en 2004, menée par De montalembret, a révélé que 60 % des patients avaient besoin d'une transfusion. La différence entre les résultats de l'étude de Gantet et al en 2014 et ceux de l'étude de De montalembret en 2004 peut être attribuée à plusieurs facteurs. Tout d'abord, il est possible que les échantillons de population étudiés dans les deux recherches aient été différents. Par exemple, la population étudiée par De montalembret pourrait avoir des caractéristiques différentes de celle étudiée par Gantet et al à l'échelle nationale. De plus, les méthodologies de recherche utilisées peuvent également jouer un rôle crucial. Les critères de sélection des participants, les protocoles de collecte de données et les analyses statistiques peuvent varier

## Résultats et Discussion

---

d'une étude à l'autre, ce qui pourrait influencer les résultats obtenus. En outre, des changements dans la prise en charge médicale de la drépanocytose au fil du temps pourraient également expliquer les différences observées. Il est donc essentiel de considérer ces facteurs lors de l'interprétation des résultats et de reconnaître que des études ultérieures pourraient être nécessaires pour éclaircir davantage cette question (De montalembert, 2004 ; Gantet *et al.*, 2014).

Les transfusions sanguines sont souvent utilisées pour traiter les complications liées à l'anémie, telles que la douleur, les crises vaso-occlusives et les complications pulmonaires.

Cependant, tous les patients drépanocytaires ne nécessitent pas systématiquement des transfusions sanguines. La fréquence et la nécessité des transfusions peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs, notamment la gravité de la maladie, la présence de complications médicales, la réponse au traitement et d'autres considérations cliniques individuelles.

Il est également important de noter que les transfusions sanguines ne sont pas sans risques et peuvent être associées à des complications telles que la surcharge en fer, les réactions immunologiques et les infections transmises par le sang. Par conséquent, la décision d'initier ou de poursuivre des transfusions sanguines chez les patients drépanocytaires doit être soigneusement évaluée en tenant compte des avantages potentiels et des risques associés à cette intervention (Habibi & Pirenne, 2023).

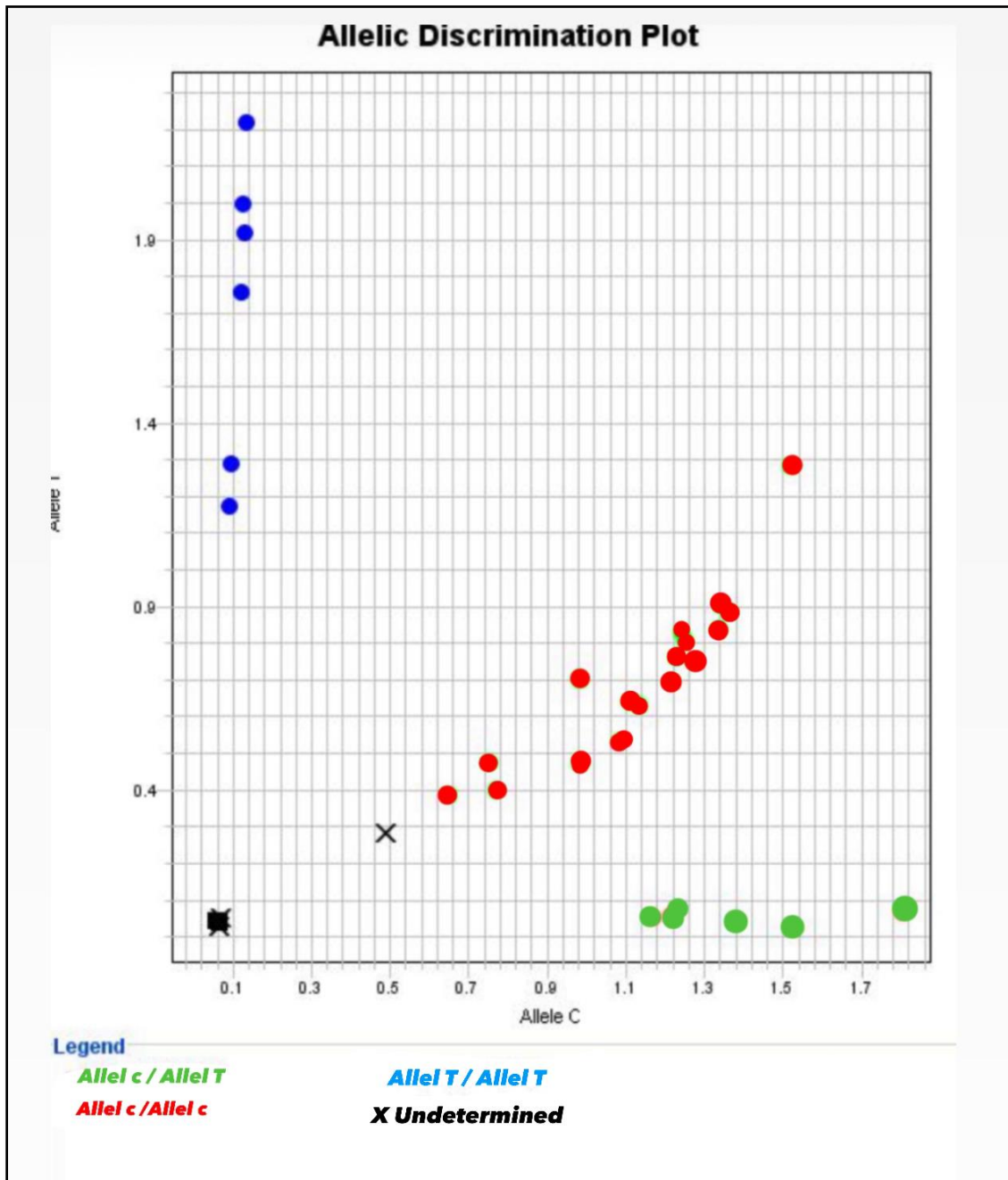
## II. Résultats de l'analyse moléculaire du polymorphisme T786C gène *NOS3*

La lecture des graphes de la discrimination allélique permet d'identifier trois génotypes (Photographie 1) :

L'homozygote CC : l'allèle 1 (colorant VIC™) marqué au colorant vert positionné sur le coin inférieur droit (Photographie 2).

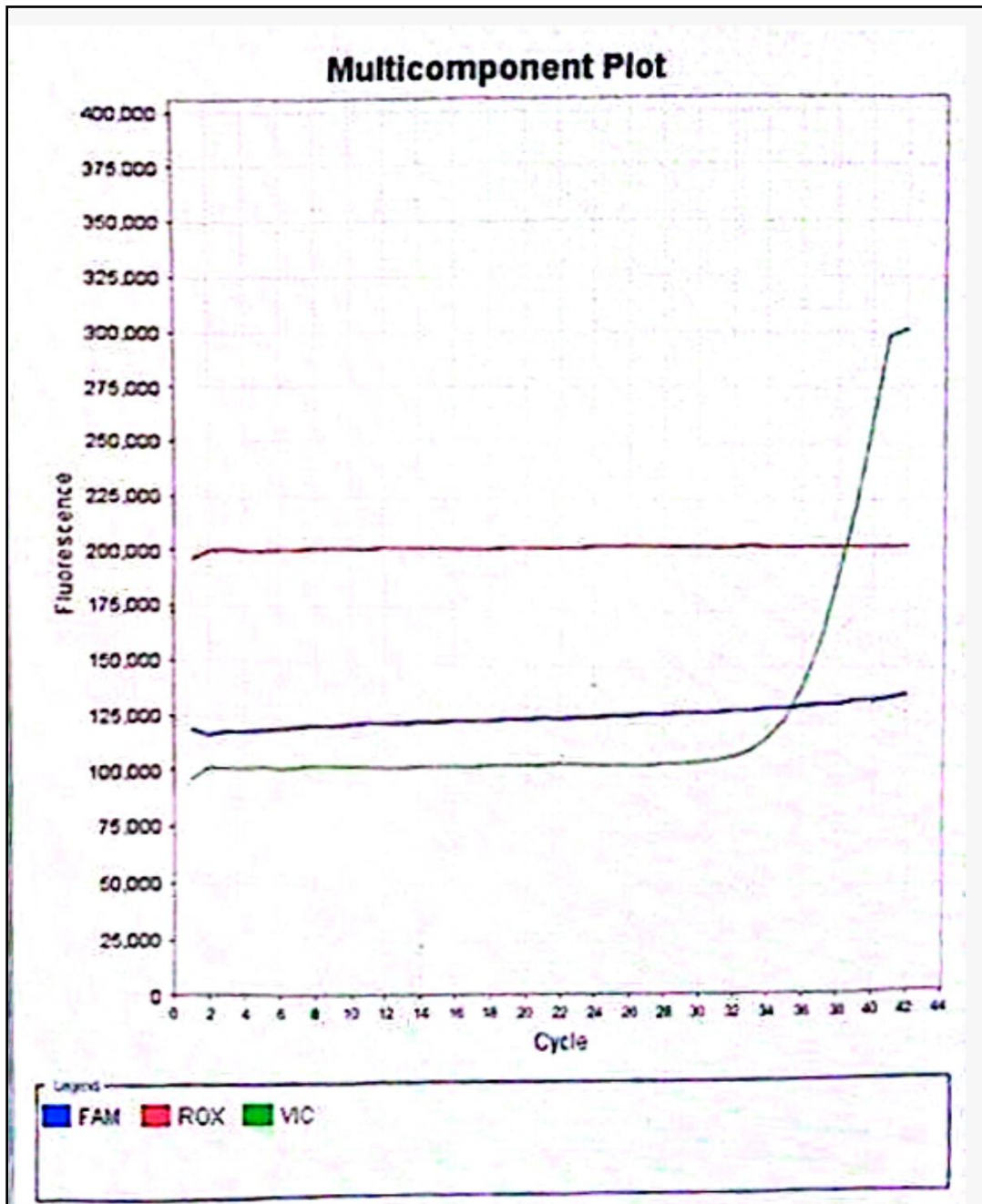
L'homozygote TT : l'allèle 2 (colorant FAM™) marqué au colorant bleu positionné sur le coin supérieur gauche (Photographie 3).

L'hétérozygote TC : approximativement au milieu du graphe, entre les clusters de l'allèle 1 et allèle 2, marquée avec la couleur rouge (Photographie 4).



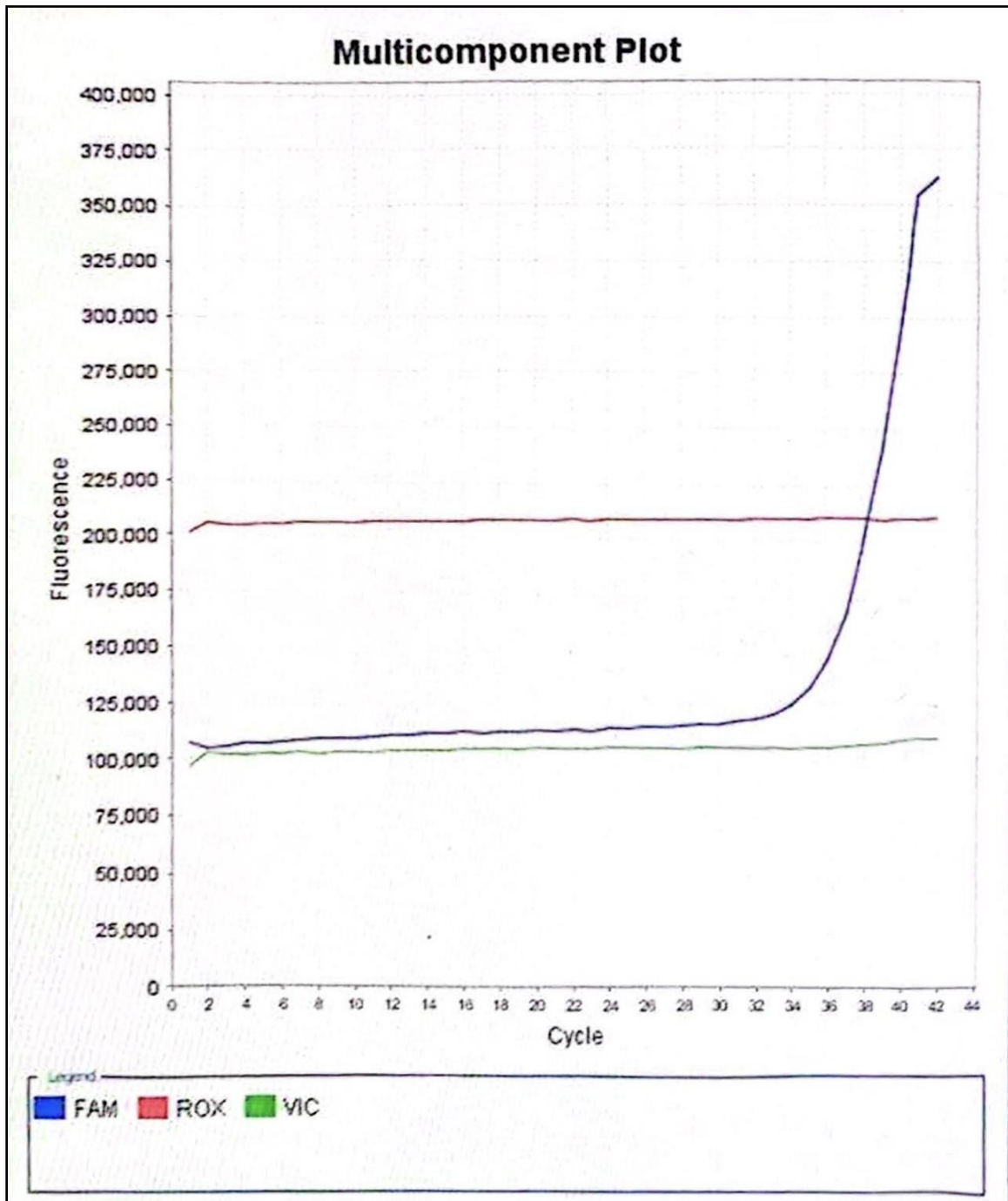
Photographie 1 : Graphe de la discrimination allélique (l'allèle T et l'allèle D du gène *NOS3*)



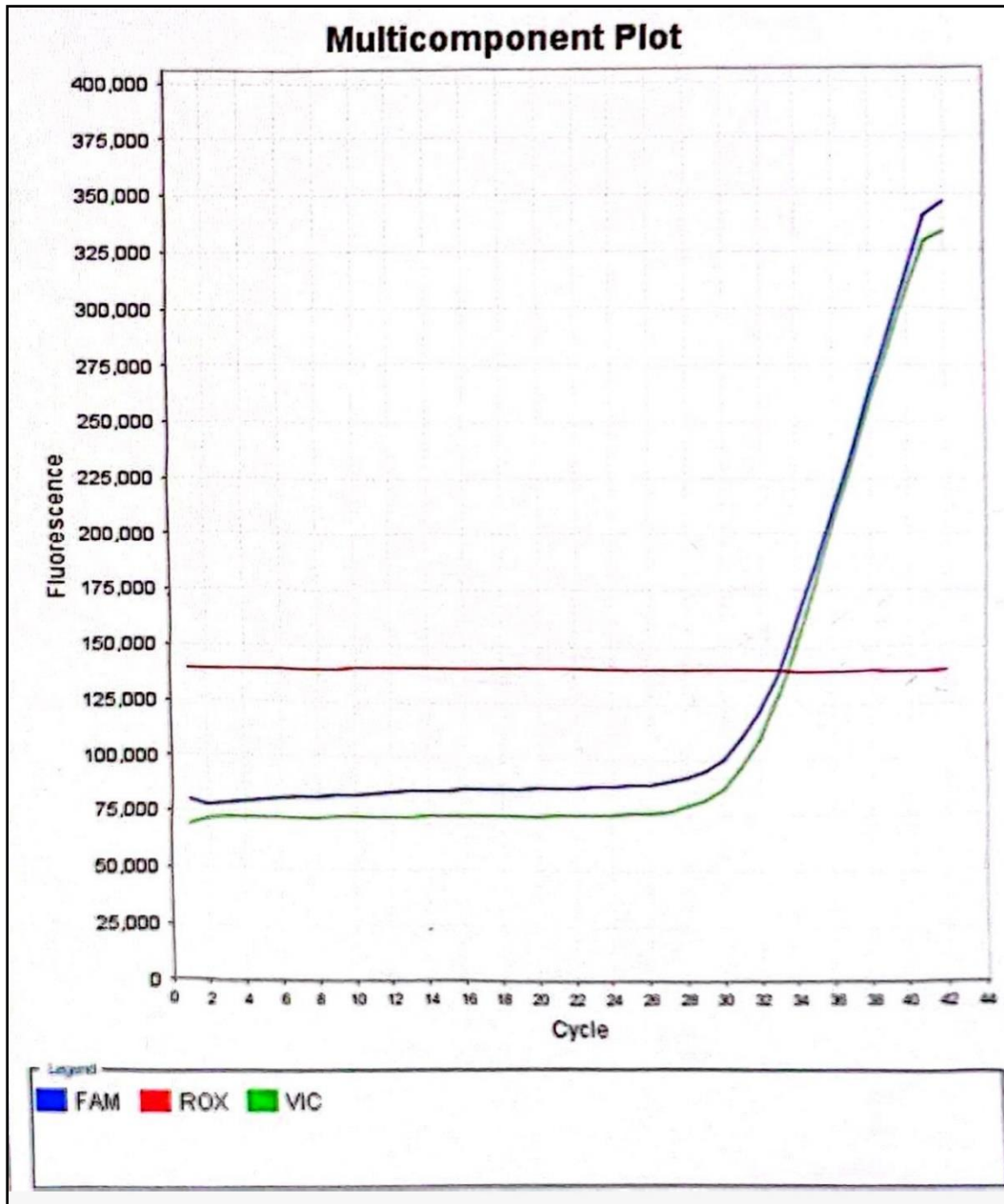


Photographie 2 : Courbe d'amplification d'un individu de génotype CC

## Résultats et Discussion



Photographie 3 : Courbe d'amplification d'un individu de génotype TT



Photographie 4 : Courbe d'amplification d'un individu de génotype TC

## Résultats et Discussion

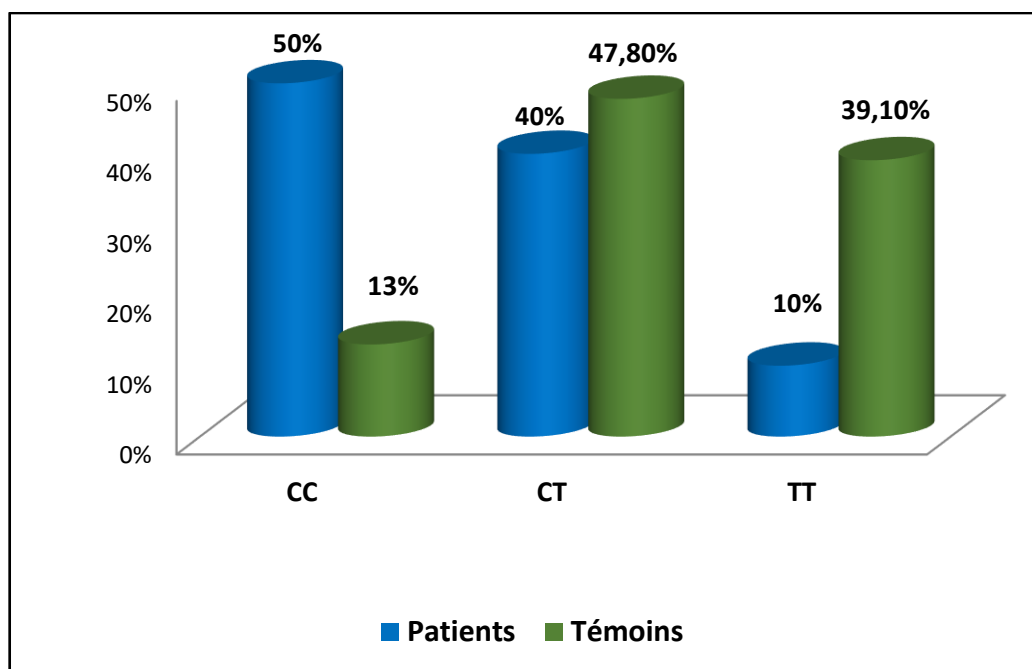
Nous avons calculé les fréquences génotypiques et alléliques dans la population drépanocytaire et la population témoins. Ensuite l'analyse statistique des données obtenues montre une association significative entre les deux groupes ( $p=0.0321$  pour CC versus TT+CT;  $p = 0,00009$  pour TT versus CC et  $p = 0.0096$  pour T versus C) (**Tableau 7**).

**Tableau 7:** Résultats de l'analyse statistique du polymorphisme T786C du gène *NOS3* dans la population patients et témoins

	<b>Patients</b> n %	<b>Témoins</b> n %	<b>OR</b>	<b>P-value</b>
<b>CC</b>	5 50%	3 13%	/	/
<b>CT</b>	4 40%	11 47,8%	4.5833 (0,7333-28,6469)	0.1035
<b>TT</b>	1 10%	9 39,1%	15,00 (1,2149-185,2069)	<b>0.0347</b>
<b>CC Vs TT+CT</b>	5 50%	20 86,9%	6,6667 (1,1763-37,7823)	<b>0.0321</b>
<b>TT Vs CC+CT</b>	9 90%	14 60,8%	0,1728 (1,0186-1,6062)	0.1227
<b>Allele C</b>	14 70%	17 36,95%	/	/
<b>Allele T</b>	6 30%	29 63,04%	4,7765 (1,4623-15,6022)	<b>0.0096</b>

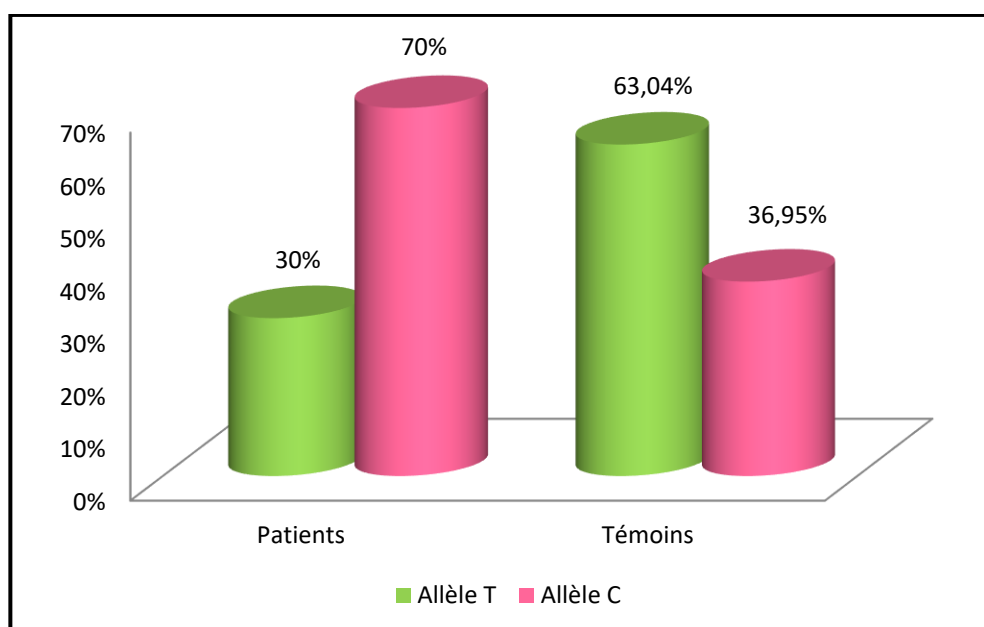
L'analyse des résultats révèle une répartition des fréquences génotypiques et alléliques hétérogène entre les patients et les témoins. En effet, le génotype homozygote CC est plus fréquent chez les patients (50 %) que chez les témoins (13 %). A l'opposé, le génotype de l'hétérozygote CT est relativement plus fréquent chez les témoins (47,8 %) que chez les patients (40 %). La fréquence du génotype TT est de 10 % chez les patients et de 39,1 % chez les témoins (**Figure 18**).

## Résultats et Discussion



**Figure 18** : Répartition des fréquences génotypiques dans notre population

De même que pour les fréquences génotypiques, les fréquences alléliques présentent une certaine disparité entre les deux groupes. En effet, l'allèle C est le plus fréquent chez le groupe des patients (70 %), alors que l'allèle T est le plus fréquent chez les témoins (63 %) (**Figure 19**).



**Figure 19** : Répartition des fréquences alléliques dans notre population

## Résultats et Discussion

---

En comparant nos résultats avec ceux de l'étude de Cheno et al (2020) menée sur la population brésilienne, Nous avons constaté une similarité dans les conclusions, malgré des différences dans les fréquences génotypiques et alléliques entre les populations étudiées. Par exemple, dans l'étude brésilienne, les fréquences alléliques de T et de C étaient de 63,04 % et 36,95 % chez les témoins respectivement, tandis que dans votre étude, elles étaient de 39,10 % et 60,90 % respectivement. Ces variations ethniques peuvent influencer les associations génétiques avec la drépanocytose et soulignent l'importance de considérer les contextes populationnels spécifiques dans la recherche génétique (Cheno *et al.*, 2020).

Dans notre étude les fréquences génotypiques chez les patients montrent une prévalence élevée du génotype CC par rapport aux témoins, ainsi qu'une augmentation significative de l'allèle C chez les patients. Cela est cohérent avec les conclusions de l'étude de Nishank et al menée sur une population indienne, qui a également trouvé une association significative entre le polymorphisme T786C du gène *NOS3* et la drépanocytose, avec une valeur de *p-value* de 0,02. Les fréquences génotypiques dans cette étude indiquent également des différences significatives entre les patients et les témoins, bien que les variations dans les fréquences génétiques entre les populations étudiées puissent être attribuées à des facteurs génétiques et environnementaux spécifiques à chaque population (Nishank *et al.*, 2013).

En contraste, l'étude de Sharan et al. réalisée sur la population afro-américaine n'a trouvé aucune association significative entre ce polymorphisme et la drépanocytose, avec une valeur de *p-value* de 0,08. De plus, les fréquences génotypiques chez les patients et les témoins dans cette étude montrent des différences significatives, mais pas dans la même direction que notre étude (Sharan *et al.*, 2004)

Cependant, des résultats contradictoires ont été observés dans d'autres études, telles que celle d'Armenis et al (2016) en Grèce, qui n'a pas trouvé d'association significative entre le polymorphisme T786C du gène *NOS3* et la drépanocytose malgré des fréquences génotypiques différentes entre les patients et les témoins. Des conclusions similaires ont été rapportées par Tanya et al (2014) pour la population africaine et par Yousri et al (2016) pour la population égyptienne (Tanya *et al.*, 2014; Armenis *et al.*, 2016 ;Yousri *et al.*, 2016)

Les résultats contradictoires observés dans d'autres études soulignent l'importance de prendre en compte les différences ethniques et environnementales dans l'étude de la drépanocytose. Par exemple, les variations dans les fréquences alléliques et génotypiques entre les populations brésilienne, grecque, indienne, africaine et égyptienne pourraient refléter des différences dans

## Résultats et Discussion

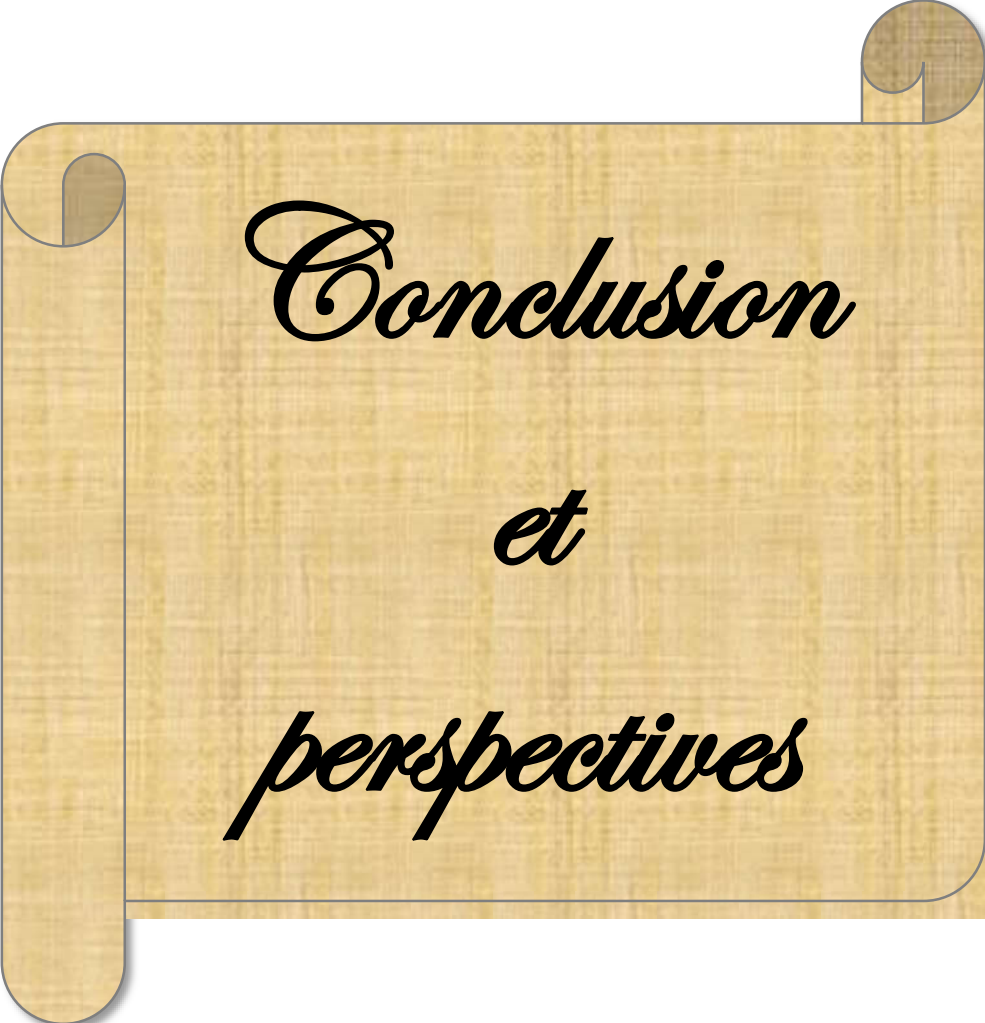
---

les profils de risque génétique et environnemental associés à la maladie. Ces différences soulignent également la nécessité d'une approche personnalisée dans la prévention et le traitement de la drépanocytose, en tenant compte des facteurs génétiques et environnementaux spécifiques à chaque individu.

En outre, des études fonctionnelles approfondies sont nécessaires pour élucider les mécanismes biologiques sous-jacents aux associations observées. Ainsi la collaboration entre chercheurs de différentes régions géographiques est nécessaire pour l'utilisation de techniques de séquençage de nouvelle génération qui peuvent permettre d'identifier de nouvelles variantes génétiques associées à la drépanocytose et de développer des stratégies de dépistage et de traitement plus efficaces et individualisées (Brousse *et al.*, 2019).

En conclusion, notre étude apporte une contribution précieuse à la recherche sur la génétique de la drépanocytose, mais elle soulève également de nouvelles questions qui nécessitent des investigations approfondies. En combinant des approches génétiques, fonctionnelles et épidémiologiques, nous pouvons espérer mieux comprendre cette maladie complexe et améliorer la prise en charge des patients atteints de drépanocytose.





*Conclusion*

*et*

*perspectives*



## Conclusion

---

La drépanocytose est une maladie génétique causée par une mutation du gène  $\beta$ -globine, conduisant à la production d'une forme anormale d'Hb. Cette Hb, lorsqu'elle est désoxygénée, peut polymériser, fragilisant les GR et provoquant une hémolyse et des obstructions vasculaires.

Le gène *NOS3*, qui code pour NOS, est lié à la drépanocytose à travers des études de polymorphismes génétiques, tels que le polymorphisme T786C. Cette relation réside dans le rôle de l'oxyde nitrique (NO) dans la pathophysiologie de la maladie. Le NO est un vasodilatateur important qui régule le tonus vasculaire et favorise la circulation sanguine normale.

Notre étude transversale de types cas-témoins (à propos de 10 patients et 23 témoins) avait pour but d'étudier la drépanocytose d'une part et de rechercher d'éventuelle association entre le polymorphisme T786C du gène *NOS3* d'autre part. Cela nous a permis de tirer quelque conclusion :

- un âge moyen de  $30 \pm 5,17$  ans avec des extrêmes allant de 22 ans et 39 ans. La tranche d'âge des 30-34 ans était la plus représentée et regroupait 75% des patients.
- une légère prédominance féminine soit un sex-ratio de 1,5 (6 F/4 H). Cela suggère que le genre n'influence pas significativement la susceptibilité à la drépanocytose, car le caractère est hérité génétiquement et indépendamment du sexe.
- 60 % des patients étaient issus de mariages consanguins.
- 50 % des patients drépanocytaires nécessitent une perfusion sanguine.

Concernant l'exploration génotypique du polymorphisme T786 du gène *NOS3*, nous avons révélé une association significative entre le polymorphisme génétique étudié et la drépanocytose, avec des valeurs de *p-value* inférieures à 0,05 pour les comparaisons CC versus TT+CT, TT versus CC, et T versus C. Les fréquences génotypiques montrent une prévalence plus élevée du génotype CC chez les patients par rapport aux témoins, ainsi qu'une augmentation significative de l'allèle C chez les patients.

Cependant, les résultats obtenus, laissent entrevoir de nombreuses perspectives, il serait donc intéressant de pouvoir continuer ce travail par :

- élargir la taille de l'échantillon afin d'augmenter la puissance statistique et de confirmer l'association du polymorphisme T786 du gène *NOS* de drépanocytose.
- étudier d'autres gènes impliqués dans la drépanocytose, comme : *BCL11A*, *GATA1*, *GATA2* et *KLF1* qui jouent un rôle important dans la synthèse de l'hémoglobine, en prenant en considération les facteurs environnementaux, géographiques et ethniques.



*Références*

*bibliographiques*

- Allali, S., Pinhas, Y., Maciel, T. T., Hermine, O. (2024).** Physiopathologie de la drépanocytose et perspectives thérapeutiques. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.* 208, 648-659.
- Armenis, I., Kalotychou, V., Tzanetea, R., Kollia, P., Kontogeorgiou, Z., nastasopoulou, D., Mantzorani, M., Samarkos, M., Konstantinos, P., Kostas, K., Rombos, I. (2017).** Prognostic value of T786C and G894T eNOS polymorphisms in sickle cell disease. *Nitric Oxide*, 62, 17-23.
- Bah, A. (2021).** Aspects épidémiocliniques de la drépanocytose chez l'enfant à l'hôpital Nianankoro Fomba de Ségou. *Mali Santé Publique.* 11, 101-106.
- Balédant, F., Girot, R. (2016).** Génétique et biologie de la drépanocytose. *Archive DEVSANTE.* 4,16
- Banza, M. I., Mulefu, J. P., Lire, L. I., N'dwala, Y. T. B., Tshiamala, I. B., Cabala, V. D. P. (2019).** Digestives diseases associated to sickle cell anemia in Lubumbashi: epidemiological and clinical aspects. *The Pan African Medical Journal.* 33, 253-253.
- Bardakdjian, J., Wajcman, H. (2004).** Epidémiologie de la drépanocytose, *La revue du praticien (Paris).* 54, 1531-1533.
- BARRY, I. K., Camara, E., Ondima, L. H. M., Dia, H. (2019).** Les Complications Infectieuses de la Drépanocytose Majeure au Service de Pédiatrie de l'Hôpital National Donka à Conakry (Guinée): à Propos de 34 Cas. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 20, 13-15.
- Baudin, B. (2016).** Les hémoglobines normales et pathologiques. *Revue Francophone des Laboratoires.* 2016, 27-34.
- Belala, A., Marc, I., Hajji, A., Belghyti, D., El Kharrim, K. (2016).** La drépanocytose chez les enfants hospitalisés au service de pédiatrie (CHR El Idriss de Kenitra, Maroc): à propos de 53 cas. *Eur Scientific Journal.* 12, 201-210.
- Bellis, G., & Parant, A. (2021).** La lutte contre les maladies génétiques dans les pays méditerranéens. Une approche des politiques de santé par la génétique des populations. Populations et crises en Méditerranée, *FrancoAngeli.* 1, 263-283.
- Beyeme, O. M., & Chiabi, A. (2004).** Epidémiologie de la drépanocytose. *Clinics in Mother and Child Health.* 1, 6-8.

**Biaz, A., Neji, M., Ajhoun, Y., Idrissi, S. E. M., Dami, A., Reda, K., Dami, A., Reda, K., Ouzzif, Zohra., Bouhsain, S. (2017).** Découverte fortuite d'une drépanocytose hétérozygote composite S/C. *The Pan African Medical Journal*. 27, 2-4.

**Boiro, D., Gueye, M., Thiongane, A., Ndongo, A. A., Houngbadji, M., Keita, Y., Dieng, Y.J., Basse, I., Benjloune, A., Ndiaye, O. (2016).** Drépanocytose chez l'enfant. Profils clinique et évolutif à propos de 138 cas suivis au Service de Pédiatrie de l'Hôpital Abass Ndao de Dakar. *Med. Afr. Noire*. 63, 326-332.

**Bonello-Palot, N., & Badens, C. (2010).** Bases moléculaires des syndromes thalassémiques et facteurs génétiques modulateurs de sévérité de la beta-thalassémie. *Revue méditerranéenne de génétique humaine*. 1, 1-10.

**Brousse, V., Arnaud, C., Lesprit, E., Quinet, B., Odièvre, M. H., Etienne-Julan, M., Guillaumat, C., Elana, G., Belloy, M., Garnier, N., Chamouine, A., Dumensil, C., De Montalembert, M., Pondarre, C., Bernaudin, F., Couque, N., Boutin, E., Bardakjian, J., Djennaoui, F., Ithier, G., Thuret, I. (2019).** Evaluation of outcomes and quality of care in children with sickle cell disease diagnosed by newborn screening: a real-world nation-wide study in France. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1594.

**Casas, J. P., Cavalleri, G. L., Bautista, L. E., Smeeth, L., Humphries, S. E., Hingorani, A. D. (2006).** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology*, 164, 921-935.

**Chenou, F., Albuquerque, D. M., Leonardo, D. P., Domingos, I. F., Bezerra, M. A. C., Araújo, A. S., Blotta, M. H. S. L., Costa, F. F., Sonati, M. F., Paula, E. V., Santos, M. N. N. (2020).** Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Gene Polymorphisms and Markers of Hemolysis, Inflammation and Endothelial Dysfunction in Brazilian Sickle Cell Anemia Patients. *Biochemical Genetics*. 58, 580-594.

**Couque, N., De Montalembert, M. (2013).** Diagnostic d'une hémoglobinopathie. *Feuillets de Biologie*, (LIV). 311, 5-18.

**Couque, N., Trawinski, E., Elion, J. (2016).** Génétique des maladies de l'hémoglobine. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2016, 49-60.

**Dahmani, F., Benkirane, S., Kouzih, J., Woumki, A., Mamad, H., Masrar, A. (2017).** Profil épidémiologique des hémoglobinopathies: étude transversale descriptive autour du cas index. *Pan African medical journal.* 27, 1-11.

**De Montalembert, M. (2004).** Transfusion sanguine et hémoglobinopathies. *Hématologie,* (10)6, 470-478.

**Dellamea, B. S., Leitão, C. B., Friedman, R., Canani, L. H. (2014).** Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetology & metabolic syndrome.* 6, 1-6.

**Diagne, I., Ndiaye, O., Moreira, C., Signate-Sy, H., Camara, B., Diouf, S., Diack-Mbaye, A., Ba, M., M, Sarr., Saw, D., Fall, M. (2000).** Les syndromes drépanocytaires majeurs en pédiatrie à Dakar (Sénégal). *Archives de Pédiatrie.* 7, 16-24.

**Diakité, A. A., Balilé, H., Konaté, I., Traoré, A., Traore, N. L., Dicko, F. T., Touré A., Diakité F.L., Togo, B., Sylla, M., Diallo, S. (2015).** Infections bactériennes invasives chez l'enfant drépanocytaire à Bamako, Mali. *Revue Malienne d'Infectiologie et de Microbiologie.* 5, 26-40.

**Diakité, A., Dembélé, A., Cissé, M., Kanté, M., Coulibaly, Y., Maïga, B., Diakité, FL., Issa, A., Doumbia, AK., Coulibay, O., Diallo, A., Togo, P., Sacko, K., Koanté, D., Sanogo., Traoré, I., Doumbia, A., Ahamadou, I., Coulibaly, YA., Dembélé, G., Dicko, F T., Togo, B Sylla, M. (2019).** Complications ostéoarticulaires de la drépanocytose au département de pédiatrie du CHU Gabriel Touré. *Health Sciences and Disease.* 20, 76-81.

**Dias, R. G., Negrao, C.E., Krieger, M.H. (2011).** Nitric oxide and the cardiovascular system: cell activation, vascular reactivity and genetic variant. *Arquivos brasileiros de cardiologia.* 96, 68-75.

**Diop, S., Mokono, S. O., Ndiaye, M., Fall, A. T., Thiam, D., Diakhaté, L. (2003).** La drépanocytose homozygote après l'âge de 20 ans: suivi d'une cohorte de 108 patients au CHU de Dakar. *La revue de médecine interne,* 24, 711-715.

**Dzon, H. O., Ngouoni, G. C., Diembi, S., Ocko, G., Tsierie-Tsoba, A., Odzili, F. I. (2020).** Prévalence de la Drépanocytose Homozygote au Cours de l'Activité Chirurgicale Otorhinolaryngologique à Brazzaville. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE,* 21,10.

**Ebakisse-Badassou, E. (2010).** L'Organisation internationale de lutte contre la drépanocytose (OILD) et la lutte contre la drépanocytose. *Médecine tropicale*. 70, 464.

**El Barjraji, F., Jazouli, N., NAJAR, M., De Leener, A., Mauen, S. (2004).** *Prinremps des sciences, Siences Biomédicales*.3, 1

**Elion, J., Laurance, S., Lapoumériou, C. (2010).** Physiopathologie de la drépanocytose : SPECIAL DREPANOCYTOSE. *Médecine tropicale*. 70, 454-458.

**El-Kamah, G. Y., Amr, K. S. (2015).** Thalassemia-from genotype to phenotype. *Inherited hemoglobin disorders*, 13-35.

**Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D. (2010).** cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacological reviews*, 62, 525-563.

**Gantet, A., Boënnec, M. L. C. (2021).** Étude transfusionnelle de la population drépanocytaire en Bourgogne Franche Comté. *Transfusion Clinique et Biologique*. 28, S94.

**Girot, R. (2022).** La drépanocytose, une maladie génétique de l'hémoglobine. *La revue de l'infirmière*. 71, 16-17.

**Girot, R., Bégué, P. (2004).** La drépanocytose chez l'enfant en 2004. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*. 188, 491-506.

**Habibi, A., Pirenne, F. (2023).** Les anémies aiguës et la stratégie transfusionnelle chez les drépanocytaires adultes: Acute anemias transfusion strategy in adult sickle cell patients. *La Revue de Médecine Interne*. 44, 4S12-4S17.

**Habibi, A., Arlet, J. B., Stankovic, K., Gellen-Dautremer, J., Ribeil, J. A., Bartolucci, P., & Lionnet, F. (2015).** Recommandations françaises de prise en charge de la drépanocytose de l'adulte: actualisation 2015. *La Revue de Médecine Interne*. 36, 5S3-5S84.

**Hardison, R. C. (2012).** Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2,1-18.

**Higgs, D. R., Engel, J. D., Stamatoyannopoulos, G. (2012).** Thalassaemia. *Lancet* (London, England). 379, 373-383.

**Keohane, E. M., Smith, L., Walenga, J. M. (2015).** *Rodak's hematology: clinical principles and application.* (5<sup>e</sup> èd). Elsevier Health Sciences.

**Kueviakoe, M. D. I., Padaro, E., Magnang, H., Mawussi, K., Womey, K. M. C., Layibo, Y., Agbétiafa K., Koudokpo ADN., Vovor, A. (2019).** Complications chroniques de la drépanocytose dans une population de 893 patients adultes suivis au CHU campus de Lomé. *European Scientific Journal April*, 15, 1857-7881.

**Labie, D., Elion, J. (2005).** Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie*. 2, 220-239.

**Laghdaf, S. M., N'Diaye Amadou Mamadou, M., Cheikh, M., Heinhane, M. M. (2022).** La Drépanocytose en Mauritanie : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques, à propos de 135 cas. *La Tunisie Médicale*. 100, 313-322.

**Le Gal, M., Jeanguiot, N. (2010).** *Comprendre une situation clinique par l'anatomie-physiologie : Pour faire le lien entre processus physiopathologiques et prise en charge du patient.* De Boeck Supérieur.

**Leonardo, D. P., Albuquerque, D. M., Lanaro, C., Baptista, L. C., Cecatti, J. G., Surita, F. G., Parpinelli, M. A., Costa, F. F., Franco-Penteado, C. F., Fertrin, K. Y., Costa, M. L. (2015).** Association of Nitric Oxide Synthase and Matrix Metalloprotease Single Nucleotide Polymorphisms with Preeclampsia and Its Complications. *PLOS ONE*. 10, 1-11.

**Luizon, M. R., Metzger, I. F., Lacchini, R., Tanus-Santos, J. E. (2012).** Endothelial nitric oxide synthase polymorphism rs3918226 associated with hypertension does not affect plasma nitrite levels in healthy subjects. *Hypertension*, 59, e52-e53.

**Luizon, M. R., Pereira, D. A., Tanus-Santos, J. E. (2018).** Pharmacogenetic relevance of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and gene interactions. *Pharmacogenomics*. 19, 1423-1435.

**Maneh, N., Tossa-Dossou, C. D., Amouzou, D., Magnang, H., Sogah, M. D., Vonor, K., Koffi.D.A., Kokou.M.A., Balo, K. P. (2024).** Knowledge of Togolese Sickle Cell Patients about Retinal Complications of Sickle Cell Disease. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*. 25, 103-107.

**Marielle, I., Ledaga Lentombo, L. E., Diop Lacombe, S., Kouegnigan Rerambiah, L., Helley Ondo, G. D., Iba Ba, J., Boguikouma, J. B. J. (2022).** Profil clinique, biologique et traitement des drépanocytaires régulièrement suivis au Centre Hospitalier Universitaire de Libreville. *Bull. méd. Owendo.* 20, 30-37.

**Matthie, N., Jenerette, C., McMillan, S. (2015).** Role of self-care in sickle cell disease. *Pain Management Nursing*, 16(3), 257-266.

**Mattila, J. T., & Thomas, A. C. (2014).** Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Frontiers in immunology.* 5, 1-5.

**Mattioni, S., Stojanovic, K. S., Girot, R., Lionnet, F. (2016).** La drépanocytose en France. *Revue francophone des laboratoires.* 2016, 61-66.

**Mongardon, N., Habibi, A., Vodovar, D., Cherait, C., Haouache, H., Galacteros., Dhonneur.G (2015).** Crise aiguë drépanocytaire, *Le Congrès* : 1-16.

**Nicoleau, M. L., Allain, P., Divialle-Doumbo, L., Alexis-Fardini, S., Étienne-Julan-Otto, M., Tressières, B., Tarer,V., Cordon,E., Petrat, M. (2023).** Syndromes drépanocytaires majeurs pédiatriques et troubles cognitifs. *Rev Neuropsychol.* 15(1), 63-72.

**Nishank, S. S., Singh, M. P. S. S., Yadav, R., Gupta, R. B., Gadge, V. S., Gwal, A. (2013).** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *Journal of human genetics.* 58, 775-779.

**Noetzli, L. J., Mittelman, S. D., Watanabe, R. M., Coates, T. D., Wood, J. C. 2012.** Pancreatic iron and glucose dysregulation in thalassemia major. *American journal of hematology.* 87, 155-160.

**Novelli, E. M., Gladwin, M. T. (2016).** Crises in sickle cell disease. *Chest.* 149(4), 1082-1093.

**Oliveira-Paula, G. H., Lacchini, R., Tanus-Santos, J. E. (2016).** Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene.* 575, 584-599.

**Oudin-Doglioni,D., Gay,M.C., Lehougre,M.P., Arlet,J.B., Galactérose,F. (2019).**Les représentation de la drépanocytose comme déterminants de l'observance thérapeutique. *Annales Médico-psychologiques.* 177(6), 517-525



- Pereira., Tiago,V., Rudnicki, M., Cheung, B. M., Baum, L., Yamada, Y., Oliveira., Alexandre, C., Bernard, M.Y., Polo,S.L., Krieger, J. E. (2007).** Three endothelial nitric oxide (NOS3) gene polymorphisms in hypertensive and normotensive individuals: meta-analysis of 53 studies reveals evidence of publication bias. *Journal of hypertension.* 25, 1763-1774.
- Piel, F. B., Patil, A. P., Howes, R. E., Nyangiri, O. A., Gething, P. W., Dewi, M., Temperly,W.,Williams,N.T., Weatherall,J.D., Hay, S. I. (2013).** Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *The Lancet.* 381,142-151
- Piel, F. B., Steinberg, M. H.,Rees, D. C. (2017).** Sickle cell disease. *New England Journal of Medicine.* 376(16), 1561-1573.
- Poitras, E., Houde, A. (2002).** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology.* 2, 2-11.
- Qian, J., & Fulton, D. (2013).** Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in physiology.* 4, 1-11.
- Richard, M., Mubiri, M. A., Bioy, A. (2014).** Repères psychologiques et développementaux chez le patient drépanocytaire. *Douleurs: Evaluation-Diagnostic-Traitement.* 15, 278-287.
- Schmidt, K. L., Randolph, T. R. (2019).** Development of a Microscopic Method to Identify Hemoglobin C Conditions for Use in Developing Countries. *American Society for Clinical Laboratory Science.* 32, 61-66.
- Schmidt, K. L., Randolph, T. R. (2019).** Development of a Microscopic Method to Identify Hemoglobin C Conditions for Use in Developing Countries. *American Society for Clinical Laboratory Science.* 32, 61-66.
- Seck, N., Bop, K., Mbacke, O., Diagne, I., Thiam, L., Aliou, A. N., Keïta, Y., Basse, I., Boiro, D., Sow, A. (2021).** Les Syndromes Drépanocytaires Majeurs Chez L'enfant et L'adolescent : Étude de la Cohorte du Centre Hospitalier Régional de Saint-Louis (Sénégal). *European Scientific Journal ESJ.* 17, 70-85.

**Segbena, A. Y., Kueviakoe, I., Messie, A. K., Napo-Koura, I. G., Vovor, A., David, M. (2002).** Les anomalies de l'hémoglobine au centre hospitalier universitaire de Lomé, Togo. *Med Trop.* 62, 51-54.

**Serraj, K., Mecili, M., Housni, B., Andrès, E. (2012).** Complications aiguës de la drépanocytose de l'adulte: de la physiopathologie au traitement. *Médecine thérapeutique.* 18, 239-250.

**Sharan, K., Surrey, S., Ballas, S., Borowski, M., Devoto, M., Wang, K. F., Sandler, E., Keller, M. (2004).** Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *British Journal of Haematology.* 124, 240-243.

**Shongo, M. Y. P., Mukuku, O., Mutombo, A. M., Lubala, T. K., Ilunga, P. M., Sombodi, W. U., Wembonyama, O. N Luboya, O. (2015).** Profil hématologique et nutritionnel du drépanocytaire homozygote SS âgé de 6 à 59 mois à Lubumbashi, République Démocratique du Congo. *Pan African Medical Journal.* 21,1.

**Szabo, G. V. (2013).** The role and importance of gene polymorphisms in the development of atherosclerosis. *Interventional medicine and applied science.* 5, 46-51.

**TaqMan, S. N. P. (2004).** Genotyping Assays—protocol. *Applied Biosystems. Part.* 43, 32-856.

**Tchokoteu, P. F. (2004).** La drepanocytose de l'enfant: aspects cliniques et prise en charge. *Clinics in Mother and Child Health.* 1, 21-29.

**Than, T. H. C., Mekinian, A., Godinaud, M., Rose, C. (2008).** Rétinopathie drépanocytaire chez les adultes de la région Nord-Pas-de-Calais. *Journal français d'ophtalmologie.* 31, 987-992.

**Tolo-Diebkilé, A., Koffi, K. G., Nanho, D. C., Sawadogo, D., Kouakou, B., Siransy-Bogui, L., Sékongo, Y.M., N'Dhatz, E., Ayémou, R., Sanogo, I. (2010).** Drépanocytose homozygote chez l'adulte ivoirien de plus de 21 ans. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé.* 20, 63-67.

**Touboul, C., Bachir, D., Pissard, S. (2008).** Le diagnostic prénatal de la drépanocytose. *MTP. Médecine thérapeutique pédiatrie.* 11, 12-16.

**Tursz, A., Cook, J., Fournier-Charrière, É., Tchernia, G. (2006).** Prendre en charge la drépanocytose. *Actualité et dossier en santé publique.* 57, 71-74.

**Wajcman, H. (2005).** Hémoglobines : structure et fonction. *EMC-Hématologie.* 2, 145-157.

**Wajcman, H., Kiger, L. (2002).** L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme : un motif structural unique, des fonctions multiples. *Comptes Rendus Biologies.* 325, 1159-1174.

**Whyte, N., Morrison-Blidgen, B., Asnani, M. (2021).** Priapism in sickle cell disease: an evaluation of the knowledge of an at risk population in Jamaica. *Sexual Medicine.* 9, 1-6.

**Yousry, S. M., Ellithy, H. N., Shahin, G. H. (2016).** Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of vasculopathy in sickle cell disease. *Hematology.* 21, 359-367.

**Zhang, M.X., Zhang, C., Shen, Y. H., Wang, J., Li, X.-N., Chen, L., Zhang, Y., Coselli, J. S., Wang, X. L. (2008).** Effect of 27nt Small RNA on Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression. *Molecular Biology of the Cell.* 19, 3997-4005.

A decorative scroll with a light brown, textured background. The scroll is unrolled, showing the word "Annexes" written in a black, elegant cursive font. The scroll has rounded corners and a small circular detail at the top right corner, suggesting a binding or a hole.

*Annexes*

## ANNEXE I : Fiche de consentement du patient

République Algérienne Démocratique et populaire  
EHS mère et enfant de SIDI MEBROUK  
Service de gynécologie obstétrique et de procréation médicale assistée  
PMA

### Fiche de consentement du patient

Dans le cadre de : Etude génétique de l'infertilité chez des couples

Je soussigné(e) :

Nom : ...../.....

Prénom : ...../.....

Déclare avoir puis connaissance des informations explicatives concernant cette étude  
j'accepte le prélèvement sous les conditions décrites en gardant tous mes droits stipulés par la  
moi d'éthique et de déontologie.

J'accepte ce type de recherche

Je m'oppose à ce type de recherche.

En cas de réponse affirmative, je souhaite que les résultats puissent m'être communiqués

Oui

Non

Signature du patient

Signature du chercheur

Signature du médecin

## ANNEXE II : Questionnaire

### Fiche de renseignements

**Nom :**

**Prénom :**

**Genre :** masculin  féminin :

**Date de naissance :**

**Adresse :**

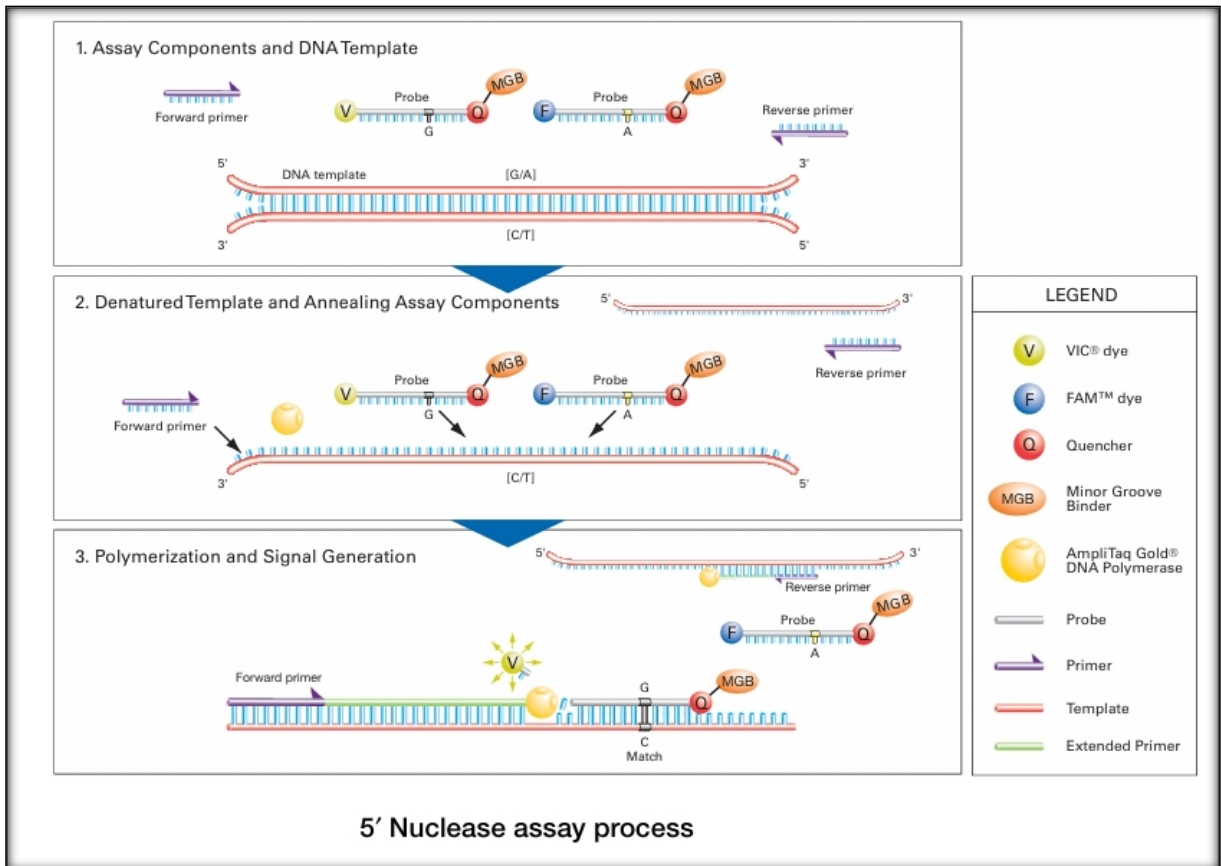
**Origine :**

**Enquête familiale :**

- Consanguinité : Oui  Non   
Degré de consanguinité :
- Nombre de la fratrie :
- Nombre d'enfants atteints
- Nombre d'antécédents familiaux :

**Besoin transfusionnelle :** Oui  Non

## ANNEXE III: 5' Nuclease assay process





*Résumés*



## Résumé

La drépanocytose est une anémie hémolytique congénitale douloureuse apparaitre avec une anomalie qualitative de l'hémoglobine qui constitue un véritable problème de santé publique avec 300000 nouveau-né chaque année. Cette maladie est héréditaire avec une transmission autosomique récessive causée par une mutation dans le gène du  $\beta$ -globine.

**Objectif :** notre travail est à double visée : réaliser une étude statistique avec des définitions des caractéristiques générales et cliniques de la population d'étude d'une part, et d'autre part rechercher d'éventuelles associations entre le polymorphisme T786C du gène *NOS3* et la drépanocytose dans l'Est algérienne.

**Méthodes :** 10 patients ont participé à cette étude, comparés à 23 témoins. Après extraction de l'ADN leucocytaire par le kit *Wizard® Genomic DNA Purification* du Promega (A1125). La séquence d'intérêt avait été amplifiée par PCR en temps réel en utilisant *Applied Bio System 7500*.

**Résultat :** les résultats de l'analyse indiquent une association significative entre les différents groupes de patients et de témoins, avec des valeurs de *p-value* révélatrices ( $p=0,0321$  pour CC versus TT+CT;  $p=0.00009$  pour TT versus CC;  $p=0.0096$  pour T versus C). Les fréquences génotypiques varient entre les groupes de témoins et de patients, montrant une prévalence du génotype CC chez les patients (50 %) par rapport aux témoins (13 %). Pour l'allèle C, sa fréquence est plus élevée chez les patients (70 %) que chez les témoins (36,95 %). L'âge moyen des patients est de 30 ans, avec une légère prédominance féminine (sex-ratio est 1,5). Ainsi la notion de consanguinité a été notée chez 50 % des cas. Même pourcentage a été noté chez les patients qui nécessitent une transfusion sanguine.

**Conclusion :** les tests statistiques effectués ont montré qu'il y a une association significative entre le polymorphisme T786C du gène *NOS* et la drépanocytose. Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre l'influence de ce polymorphisme sur la maladie et ses complications, ainsi que ses interactions avec d'autres facteurs génétiques et environnementaux.

## Abstract

Sickle cell anemia is a painful congenital hemolytic anemia with a qualitative Hb abnormality that constitutes a real public health problem, with 300,000 newborns each year. This disease is hereditary with an autosomal recessive transmission caused by a mutation in the *β-globin* gene.

**Aim:** The aim of our work is twofold: to carry out a statistical study with definitions of the general and clinical characteristics of the study population on the one hand, and on the other to investigate possible associations between the T786C polymorphism of the NOS3 gene and sickle cell disease in eastern Algeria.

**Methods:** 10 patients participated in this study, compared with 23 controls, after extraction of leukocyte DNA using Promega's Wizard® Genomic DNA Purification kit (A1125). The sequence of interest was amplified by real-time PCR using the Applied Bio System 7500.

**Result:** The results of the analysis indicate a significant association between the different groups of patients and controls, with revealing p-values ( $p=0.0321$  for CC versus TT+CT;  $p=0.00009$  for TT versus CC;  $p=0.0096$  for T versus C). Genotype frequencies varied between control and patient groups, showing a higher prevalence of the CC genotype in patients (50%) than in controls (13%). For the C allele, its frequency is higher in patients (70%) than in controls (36.95%). The average age of patients is 30, with a slight female predominance (sex ratio is 1.5). Consanguinity was noted in 50% of cases. The same percentage was noted in patients requiring blood transfusions.

**Conclusion:** statistical tests showed a significant association between the T786C polymorphism of the NOS gene and sickle cell disease. However, further studies are needed to understand the influence of this polymorphism on the disease and its complications, as well as its interactions with other genetic or environmental factors.

## الملخص

فقر الدم المنجلي هو فقر الدم الانحلالي الخلقى يصاحبه خلل نوعي في الهيموجلوبين. وهو مشكلة صحية عامة حقيقية حيث يصاب به 300,000 مولود جديد كل عام. هذا المرض الوراثي الجسمي المنتج ناتج عن طفرة في جين الغلوبين بيتا

الهدف: الهدف من عملنا ذو شقين: إجراء دراسة إحصائية مع تحديد الخصائص العامة والسرييرية للسكان الخاضعين للدراسة، مرض فقر الدم المنجلي في الجزائر *NOS3* لجين *T786C* والتحقق في الارتباطات المحتملة بين تعدد الأشكال

الطرق: شارك 10 مرضى في هذه الدراسة، مقارنةً بـ 23 مريضاً من الخاضعين للضبط، بعد استخراج الحمض النووي Wizard® Genomic DNA للكريات البيض باستخدام مجموعة تنقية الحمض النووي الجينومي من بروميجا تم تضخيم التسلسل محل الاهتمام عن طريق تفاعل البوليميراز المتسلسل في الوقت الحقيقي باستخدام نظام (A1125). أبلويد بيو سيستم 7500.

النتائج: تشير نتائج التحليل إلى وجود ارتباط كبير بين المجموعات المختلفة للمرضى والضوابط، مع الكشف عن قيم للنمط الجيني  $p=0.0096$ ؛  $CC$  مقابل  $TT$  للنمط الجيني  $p=0.00009$ ؛  $TT+CT$  مقابل  $CC$  للنمط الجيني  $p=0.0321$  تفاوتت ترددات النمط الجيني بين مجموعات المراقبة ومجموعات المرضى، مما يدل على انتشار أعلى (C مقابل T أعلى في المرضى (70%) C في المرضى (50%) مقارنةً بالضوابط (13%). كان تواتر الأليل  $CC$  للنمط الجيني مقارنةً بالضوابط (36.95%). كان متوسط عمر المرضى 30 عامًا، مع غلبة طفيفة للإناث (نسبة الجنس 1.5). لوحظ وجود صلة قرابة في 50% من الحالات ولوحظت نفس النسبة في المرضى الذين يحتاجون إلى نقل الدم

الخلاصة: أظهرت الاختبارات الإحصائية وجود ارتباط كبير بين تعدد الأشكال وداء فقر الدم *NOS* لجين *T786C* المنجلي. ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لفهم تأثير تعدد الأشكال هذا على المرض ومضاعفاته، وكذلك تفاعلاتها مع العوامل الوراثية أو البيئية الأخرى

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : Meghezzi Ghada Djamaa Randa
<b>Etude moléculaire du polymorphisme T786C du gène <i>NOS3</i> chez les patients atteints de la drépanocytose</b>	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique</b>	
<p><b>Résumé :</b> la drépanocytose est une anémie hémolytique congénitale douloureuse apparaitre avec une anomalie qualitative de l'hémoglobine qui constitue un véritable problème de santé publique avec 300000 nouveau-né chaque année. Cette maladie est héréditaire avec une transmission autosomique récessive causée par une mutation dans le gène du <math>\beta</math>-globine.</p> <p><b>Objectif :</b> notre travail est à double visée : réaliser une étude statistique avec des définitions des caractéristiques générales et cliniques de la population d'étude d'une part, et d'autre part rechercher d'éventuelles associations entre le polymorphisme T786C du gène <i>NOS3</i> et la drépanocytose dans l'Est algérienne.</p> <p><b>Méthodes :</b> 10 patients ont participé à cette étude, comparés à 23 témoins. Après extraction de l'ADN leucocytaire par le kit <i>Wizard® Genomic DNA Purification</i> du Promega (A1125). La séquence d'intérêt avait été amplifiée par PCR en temps réel en utilisant <i>Applied Bio System 7500</i>.</p> <p><b>Résultat :</b> les résultats de l'analyse indiquent une association significative entre les différents groupes de patients et de témoins, avec des valeurs de <i>p-value</i> révélatrices (<math>p=0,0321</math> pour CC versus TT+CT; <math>p=0.00009</math> pour TT versus CC; <math>p=0.0096</math> pour T versus C). Les fréquences génotypiques varient entre les groupes de témoins et de patients, montrant une prévalence du génotype CC chez les patients (50 %) par rapport aux témoins (13 %). Pour l'allèle C, sa fréquence est plus élevée chez les patients (70 %) que chez les témoins (36,95 %). L'âge moyen des patients est de 30 ans, avec une légère prédominance féminine (sex-ratio est 1,5). Ainsi la notion de consanguinité a été notée chez 50 % des cas. Même pourcentage a été noté chez les patients qui nécessitent une transfusion sanguine.</p> <p><b>Conclusion :</b> les tests statistiques effectués ont montré qu'il y a une association significative entre le polymorphisme T786C du gène <i>NOS</i> et la drépanocytose. Cependant, des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre l'influence de ce polymorphisme sur la maladie et ses complications, ainsi que ses interactions avec d'autres facteurs génétiques et environnementaux.</p>	
<b>Mots-clés :</b> Drépanocytose, gène <i>NOS3</i> , Polymorphisme T786C, PCR en temps réel	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT)	
<p><b>Président du jury :</b> SEMMAME Ouarda (MCA- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).  <b>Encadrant :</b> DAOUI Zineb (MCB- Université Mostefa Ben Boulaid, Batna 2).  <b>Examineur :</b> SEDRATI Khadija (MCA- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).</p>	