



HAL
open science

La place des gènes non globine dans la modulation du syndrome drépanocytaire

Leila Chaouch

► **To cite this version:**

Leila Chaouch. La place des gènes non globine dans la modulation du syndrome drépanocytaire. Hématologie. Université de Tunis El Manar (Tunisie), 2012. Français. NNT : . tel-03540224

HAL Id: tel-03540224

<https://theses.hal.science/tel-03540224v1>

Submitted on 23 Jan 2022

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

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

UNIVERSITE DE



Laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire

THESE DE DOCTORAT DE BIOLOGIE

Présentée par

Leila Chaouch épouse Trigui






Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'université de Tunis el Manar

La place des gènes non globine dans la modulation du syndrome drépanocytaire

Soutenue le 29 décembre 2012

Devant les membres du Jury :

-  Pr. Salem Abbas : Directeur de Thèse
-  Pr. Mohamed Makni : Président
-  Pr. Fethi Guemira : Examineur
-  Pr. Abderraouf Ghanem : Rapporteur
-  Pr. Amel Gaied : Rapporteur

Année Universitaire : 2012/2013

Résumé

Pour l'OMS, l'UNESCO et l'ONU, la drépanocytose occupe le quatrième rang dans leurs priorités de santé publique mondiale (derrière le cancer, le virus du VIH et le paludisme). En Tunisie la drépanocytose est la 2ème hémoglobinopathie après la β -thalassémie, représentant ainsi un vrai problème de santé publique. La fréquence moyenne du trait drépanocytaire dans notre pays est de 1.89%. La drépanocytose constitue un exemple historique de monomorphisme moléculaire. Le fait que la mutation causale soit toujours la même alors que la gravité de la maladie est variable, suggère une modulation génétique multifactorielle. Nous avons choisi de rechercher, par l'approche de gènes candidats, certains gènes modificateurs qui pourraient expliquer certaines caractéristiques phénotypiques de la maladie. Le but de la thèse présentée est l'étude de la prédisposition génétique des patients atteints de la drépanocytose à moduler la gravité de la maladie afin d'améliorer l'espérance de vie, la morbidité et la qualité de vie des patients. Pour cela des polymorphismes touchant des gènes candidats ont fait l'objet d'exploration moléculaire afin de chercher d'éventuelle corrélations phénotype/génotype. Le premier chapitre a concerné l'uridine diphosphoglucuronosyltransférase (*UGT1A1*) impliqué dans la conjugaison de la bilirubine, un pigment résultant de la dégradation de l'hème. On a ciblé un polymorphisme fonctionnel, il s'agit d'une insertion d'une paire de base au niveau de la TATA box du promoteur qui entraîne une diminution de l'activité enzymatique et par conséquent une hyperbilirubinémie. Cette hyperbilirubinémie est un facteur de risque pour le développement de lithiase biliaire pigmentaire qui est une complication fréquente chez les drépanocytaires. Le deuxième chapitre a concerné des gènes codant pour des chimiokines comme *RANTES* et son récepteur *DARC* qui sont impliqués dans la polymérisation des globules rouges et par conséquent la survenue des crises vaso-occlusives. *CCL2* et son récepteur *CCR2* impliquées dans le contexte pro inflammatoire de la drépanocytose. Le troisième chapitre s'intéresse à l'étude d'association entre polymorphismes génétiques et le taux de l'hémoglobine F. L'étude s'est orientée vers un gène *BCL11A* considéré comme répresseur de l'expression des gènes γ -globine dans les érythroblastes et aussi à la partie intergénique *HBS1L-MYP (HMIP)* impliquée dans la variation des taux de l'HbF. Nos résultats ont montré que les génotypes ayant l'allèle (TA)₇ à l'état homozygote ou hétérozygote sont associés à une hyperbilirubinémie et à la formation des calculs biliaires. Au niveau allélique, (TA)₇ présentent un facteur de risque pour la lithogénèse chez les drépanocytaires à l'âge pédiatrique et adulte ainsi que chez des patients non drépanocytaires mais présentant des lithiases. Le variant (TA)₈ est associé significativement à la lithogénèse chez les drépanocytaires pédiatriques ainsi que chez les patients non drépanocytaires. Concernant le deuxième chapitre, aucune association significative n'a été retrouvée entre les chimiokines: *RANTES*, *DARC* et *CCR2* et les complications étudiées. Par ailleurs, nos résultats ont montré une association significative entre le polymorphisme *CCL2-2518A/G* et la survenue des crises vaso-occlusives et les infections chez les drépanocytaires. Il faut noter qu'il s'agit d'une nouvelle association jamais décrite auparavant dans la littérature. Dans le troisième chapitre, nos résultats ont montré une association significative entre les rs 11886868 et rs 4671393 du gène *BCL11A* et la variation du taux de l'HbF chez les drépanocytaires. Association non trouvée pour les rs 4895441 et rs 9399137 de la partie intergénique *HMIP*. En conclusion, nos résultats concordent avec la littérature pour certains polymorphismes étudiés et pas pour d'autres. La thèse présentée attire l'attention des cliniciens à quelques variants génétiques qui semblent être des marqueurs génétiques pour certaines complications de la drépanocytose et par conséquent à trouver des solutions qui pourraient atténuer les complications de la maladie chez les patients drépanocytaires.

Dédicaces

Je dédie cette thèse à tous ceux qui travaillent dans la recherche scientifique afin de donner espoir aux malades et d'améliorer leurs prise en charge.

Je tiens à dédier cet humble travail à ma famille et à tous ceux que j'aime pour leurs encouragements, leurs soutiens et à ceux qui ont veillé à ce que ce travail soit à la hauteur.

*À mon très cher père **Ali Chaouch** qui n'a cessé de croire en moi et de me pousser vers le haut. Il était, il est et il restera mon idole et l'exemple à suivre dans toutes les étapes de ma vie. Qu'il trouve ici l'expression de tout mon amour de ma gratitude et de ma reconnaissance pour tous les sacrifices déployés pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleures conditions.*

*À ma très chère mère **Mounira Guemira** qui s'est dépensée pour moi sans compter. En reconnaissance de tous les sacrifices consentis à mon égard pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon amour éternel.*

*À mon très cher mari **Moey Trigui** la Lanterne qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour et qui a toujours été là pour moi. J'espère qu'il trouve dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*A la mémoire de mon beau père Mahmoud Trigui qui m'a donné un magnifique modèle de
labeur et de courage. Je te porterai toujours dans mon cœur.*

*A ma très chère belle mère Fadhila Ben Achour, pour ses encouragements et pour son soutien
dans les moments difficiles. Elle est ma belle étoile. Qu'elle trouve ici l'expression de tout mon amour.*

*A mes enfants, qu'ils sachent que la réussite est dans le travail et la persévérance.
A toi Skander pour ton précieux soutien et ta patience dans les moments difficiles. A toi
Selima malgré ton jeune âge tu m'as apporté beaucoup de soutien et de réconfort. Qu'ils trouvent ici
l'expression de mon amour éternel.*

*A ma sœur Asma, mon frère Khaled et mon beau frère Walid
J'espère atteindre le seuil de vos espérances. Que ce travail soit l'expression de ma profonde
Affection. Je vous remercie pour le soutien illimité et l'encouragement que vous m'avez accordé.*

*A mes belles sœurs Fatma et Mouna, mes beaux frères Nacef et Bedis, pour leur aide et leur
soutien dans la réalisation de ce travail. Je vous remercie pour les conseils et l'encouragement que vous
m'avez accordé.*

*A mes grand parents, feu Badreddine Chaouch, feu Mohamed Guemira, Zohra Ben
Simane et Mamia Gharbi pour leurs encouragements, leur affection et leurs amour. Qu'ils trouvent ici
l'expression de tout mon amour.*

*A mes oncles et tantes pour leurs encouragements et en particulier un grand merci à **Famina**
Guemira pour son aide dans la réalisation de cette thèse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amour.*

*A mes cousins, mes cousines, mes **neveux** et mes **nièces**. Meilleurs vœux de succès dans vos études.*

Remerciements

Je souhaite remercier le **Pr.Salem Abbes** chef du laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire à l'Institut Pasteur de Tunis de m'avoir accueillie au sein de son équipe et de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse. Je le remercie vivement pour m'avoir si bien encadrée.

Je remercie vivement le **Pr.Hechmi Louzir** directeur de l'Institut Pasteur de Tunis de m'avoir accueillie au sein de l'Institut et pour ses encouragements et son soutien.

Je remercie le **Pr.Fethi Guemira** Chef de service de Biologie Clinique à l'Institut Salah Azaiz de Tunis pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche et pour son soutien.

Je remercie le **Pr.agrégé Abderraouf Ghanem** Chef de service de Biochimie Clinique à l'Hôpital de Traumatologie et des Grands Brulés, Ben Arouss pour ses conseils et son soutien.

Je remercie **les membres du jury** pour avoir eu l'amabilité d'examiner ce travail de thèse et d'être membres du jury.

*J*e remercie le **Pr. Raouf Hafsia** du service d'Hématologie Clinique à l'Hôpital Aziza Othmena de Tunis pour sa précieuse participation dans la réalisation de ce travail.

*J*e remercie le **Pr.Agrégé Yossra Said** du service de Gastroenterologie à l'Hôpital Charles Nicolle de Tunis pour sa précieuse collaboration dans la réalisation de ce travail.

*M*es sincères remerciements vont à **Dr Ines Safra** Assistante hospitalo-universitaire et Chef de l'unité d'immunophénotypage des leucémies à l'Institut Pasteur de Tunis pour son soutien précieux et sa gentillesse.

*M*es sincères remerciements vont au **Pr.Agrégé Samia Mnif** Chef de service d'Hématologie à l'Institut Pasteur de Tunis pour ses conseils judicieux et son soutien précieux.

*J*e remercie **Mr Slah Ouerhani** Maître-assistant au laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire à l'Institut Pasteur de Tunis pour son aide précieuse en statistiques et pour m'avoir conseillée dans l'interprétation des résultats.

*M*es sincères remerciements vont à **Dr.Houda Hmida**, Pharmacienne Biologiste et chargée de recherches scientifiques à l'unité d'immunophénotypage des leucémies à

l'Institut Pasteur de Tunis pour sa précieuse collaboration et ses encouragements pour réaliser ce travail.

*J*e remercie chaleureusement **Mme Malika Ben Ahmed**, Pr. Agrégé au Laboratoire d'Immunologie à l'Institut Pasteur de Tunis pour sa précieuse collaboration dans la rédaction des articles et ses encouragements pour réaliser ce travail.

*J*e remercie vivement mon amie et collègue **Dr.Arij Ben Chaabene** pour ses encouragements et son soutien illimité.

*J*e remercie chaleureusement mes amies et collègues : **Dr Jihene Bouassida** et **Dr.Tassnim Mamoghli** pour leurs encouragements et leur collaboration dans la réalisation de cette thèse.

*J*e remercie sincèrement **Dr.Imene Moumni** et **Dr.Ikbel Ben Mansour** pour leurs encouragements et leur aide pour réaliser ce travail.

*M*es vifs remerciements vont à **Melle Imene Darraji** Technicien Supérieur chargée de travaux de recherche au laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire à l'Institut Pasteur de Tunis pour sa participation active dans la réalisation de cette thèse.

*J*e remercie particulièrement **Dorra Chaouachi** Technicien Supérieur au laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire à l'Institut Pasteur de Tunis pour son soutien quotidien et pour sa gentillesse.

*J*e remercie vivement **Mbarka Barmet** Technicien Supérieur au laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire à l'Institut Pasteur de Tunis pour son soutien morale et pour sa gentillesse.

*J*e remercie les membres de mon équipe Kais Douzi, Miniar Kalai, Manel Ben Jbara, Imene Boudrigua pour leurs collaborations dans la réalisation de cette thèse. Un grand merci à Miniar Kalai pour sa précieuse participation.

Liste des figures (Synthèse bibliographique)

Figure1 : Structure de l'hémoglobine.....	1
Figure2 : Evolution ontogénique de l'hémoglobine.....	2
Figure 3 : Représentation schématique de la Famille des gènes Alpha et Bêta globine.....	3
Figure 4 : Répartition géographique de l'allèle ou gène S dans le monde d'après Kéclard et al 2004.....	7
Figure 5 : Les haplotypes du groupe des gènes β globine dans la drépanocytose	8
Figure 6 : Physiopathologie de la vasoocclusion	13
Figure 7 : Polymérisation de l'hémoglobine S et falciformation des globules rouges.....	14
Figure 8 : Drépanocytes observés sur un frottis sanguin.....	17
Figure 9 : Test de solubilité.....	18
Figure 10 : Electrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose.....	19
Figure 11 : Détail d'une focalisation isoélectrique utilisée pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose.....	19
Figure 12 : Profil d'un individu normal.....	20
Figure 13 : Les différents gènes modificateurs impliqués dans les complications de la drépanocytose.....	23
Figure 14 : Métabolisme des xénobiotiques.....	23
Figure 15 : conjugaison de la bilirubine.....	24
Figure 16 : Localisation chromosomique du gène <i>UGT1A1</i>	25
Figure 17 : Gène d' <i>UGT1A1</i>	25
Figure 18 : Familles des chimiokines.....	31
Figure 19 : Les chémokines et leurs récepteurs.....	33

Figure 20 : Localisation du gène <i>RANTES</i> sur le chromosome 17.....	34
Figure 21 : Structure tridimensionnelle du <i>RANTES</i>	35
Figure 22 : Polymorphismes du gène <i>RANTES</i>	36
Figure 23 : Mesure de l'activité de la luciférase.....	36
Figure 24 : Effet de la chémokine <i>RANTES</i> sur l'activité de canal Gardos chez les globules rouges duffy positive et duffy négative.....	37
Figure 25 : Structure génétique de <i>DARC</i>	39
Figure 25 : Fixation des chémokines sur les globules rouges Duffy positive.....	39
Figure 27 : Localisation chromosomique du gène <i>CCL2</i>	42
Figure 28 : Organisation chromosomique du gène <i>CCL2</i>	42
Figure 29 : Structure 3D de <i>CCL2</i>	44
Figure 30 : Structure du récepteur <i>CCR2</i> avec ses deux isoformes <i>CCREA</i> et <i>CCR2B</i>	46
Figure 31 : Localisation chromosomique du gène <i>CCR2</i>	47
Figure 32 : Organisation structurale du gène <i>CCR2</i> et ses deux isoformes.....	47
Figure 33 : Localisation chromosomique de <i>BCL11A</i>	52
Figure 34 : Le gène <i>BCL11A</i> et ses différentes isoformes, telles qu'elles ont été mises en évidence dans les cellules lymphoïdes d'un syndrome malin.....	53
Figure 35 : Étude par immunoprécipitation de la fixation de la protéine <i>BCL11A</i> sur différents éléments du locus β -globine.....	56
Figure 36 : Localisation chromosomique de <i>HBS1L-MYB</i>	56
Figure37 : Organisation du chromosome 6 en 6q23, qui comporte 5 gènes qui n'ont pas tous la même orientation.....	57
Figure 38 : Vue d'ensemble de la région 6q23 et le locus <i>HMIP</i>	59

Liste des figures (Sujets et méthodes)

Figure 1 a : Profil d'un homozygote AA.....	63
Figure 1 b : Profil d'un homozygote SS.....	64
Figure 1 c : Profil d'un individu AS.....	64
Figure 2 : Différence entre dNTP et ddNTP.....	69
Figure 3 : Les étapes de la réaction de séquence.....	71
Figure 4 : Organigramme montrant la stratégie opératoire de l'étude de corrélation phénotype/génotype.....	83

Liste des figures (Résultats)

Figure 1 : Profil d'un homozygote AA.....	86
Figure 2 : Profil d'un homozygote SS.....	86
Figure 3 : Profil de migration des produits de PCR sur un gel d'agarose à 1%.....	87
Figure 4 : Site de restriction de BSU36I sur le gène β globine.....	88
Figure 5a : Profil théorique de migration des produits de digestion par BSU36I en marqueur de taille pb.....	88
Figure 5b : Profil de migration des produits de digestion sur un gel d'acrylamide à 8%. T : produits de PCR no digéré, 1,3 et 4 : hétérozygote (AT) ; 2et 5 : homozygote muté (AA).....	89
Figure 6 a : Emplacement des amorces au niveau de la TATA box.....	93

Figure 6 b : Profil de migration de l'amplicon attendu sur un gel d'agarose à 1%. M : marqueur de taille 100pb, 1-4 : sujets étudiés.....	94
Figure 7 : Séquençage du motif microsattelitaire A(TA) _n TAA présentant plusieurs génotypes.....	96
Figure 8 a : Schéma montrant le fragment du gène RANTES contenant les trois polymorphismes et amplifié par le couple d'amorce CCL5 F/CCL5 R.....	98
Figure 8 b : produits PCR de l'amplicon concerné par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	98
Figure 9 : Mise en évidence du polymorphisme -403G/A du gène RANTES par séquençage.....	99
Figure 10 : Mise en évidence du polymorphisme -28C/G du gène <i>RANTES</i> par séquençage (a) : homozygote sauvage (b) : hétérozygote.....	100
Figure 11 a : Schéma montrant la position de site MbolI chez les mutés sur le fragment amplifié IN1.1F-IN1.1R du gène <i>RANTES</i>	101
Figure 11 b : Schéma montrant le fragment amplifié par le couple d'amorce IN1.1 F/IN1.1 R du gène <i>RANTES</i> et contenant le polymorphisme IN1.1T/C.....	101
Figure 11 c : Profil de migration des produits de digestion par MbolI sur un gel de polyacrylamide à 8%.....	101
Figure 12 a : Schéma montrant le fragment du gène DARC contenant le polymorphisme -46T/C et amplifié par le couple d'amorce DARC F/DARC R.....	103
Figure 12 b : mise en évidence de la bande de 500pb contenant le polymorphisme DARC-46 T/C par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% : M : marqueur 100 pb 1, 2, 3,4 échantillon de patients.....	103
Figure 12 c : Mise en évidence du polymorphisme -46T/C du gène <i>DARC</i> par séquençage.....	104
Figure 13a : position des amorces au niveau du promoteur CCL2.....	105

Figure 13b : produits PCR visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	105
Figure 13c : Profil de migration des produits de digestion par PvuII de l'amplicon CCL2 sur un gel de polyacrylamide à 8%.....	106
Figure 14 a : Localisation de la mutation V64I sur l'exon 2 et emplacement des amorces et sites de BsaB1.....	107
Figure 14 b : Contrôle des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	107
Figure 14 c : produit de digestion par BsaB1.....	107
Figure 15 a : Emplacement des amorces et des polymorphismes sur le gène BCL11A.....	111
Figure 15 b : Migration des produits de PCR sur gel d'agarose.....	111
Figure 15 c : Mise en évidence du polymorphisme rs46711393 par séquençage.....	112
Figure 16 a : Amplicon contenant le rs11886868 migré sur gel d'agarose 1%.....	113
Figure 16 b : Mise en évidence du polymorphisme rs11886868 par séquençage.....	114
Figure 17 a : Emplacement des amorces et localisation des rs 4895441 et rs 9399137 dans la région inter génique HMIP.....	116
Figure 17 b : amplicon de 546 pb contenant le rs 4895441.....	116
Figure 17 c : amplicon de 317 pb contenant le rs 9399137.....	116
Figure 17 d : séquençage de la région contenant le rs 4895441.....	117
Figure 17 e : séquençage de la région contenant le rs93991375.....	118

Liste des tableaux
(Synthèse bibliographique)

Tableau 1 : Les différentes formes alléliques du gène UGT1A1.....	26
Tableau 2 : Différents polymorphismes du gène CCL2	43
Tableau 3 : Association des marqueurs génétiques de HMIP avec le taux de l'HbF dans différentes populations.....	58

Liste des tableaux
(Sujets et méthodes)

Tableau 1 : Les valeurs normales des paramètres de la NFS.....	62
Tableau 2 : Les réactifs de la réaction de séquence.....	72
Tableau 3 : Le programme de séquençage.....	73
Tableau 4 : La composition du mélange pour préparer un gel de polyacrylamide à 8%.....	75

Liste des tableaux
(Résultats)

Tableau1 : paramètres hématologiques obtenus.....	85
Tableau 2 : Répartition des drépanocytaires selon le taux de bilirubine totale.....	89
Tableau 3 : Distribution des patients selon la présentation clinique.....	92

Tableau 4 : Répartition et fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme A(TA) _n TAA chez les drépanocytaires.....	97
Tableau 5 : Répartition génotypique et allélique des polymorphismes -403GA, -28CG et INT1.1T/C chez les drépanocytaires.....	102
Tableau 6 : Répartition génotypique chez les drépanocytaires.....	104
Tableau 7 : Répartition génotypique et alléliques des polymorphismes CCL2 (-2518A/G) CCR2 (V64I).....	108
Tableau 8 : Répartition génotypique et allélique des polymorphismes RANTES, DARC, CCL2 et CCR2 selon la présence ou l'absence de l'infection chez les drépanocytaires.....	110
Tableau 9 : Répartition génotypique et allélique des rs46711393 et rs11886868.....	115
Tableau 10 : répartition allélique et génotypique des rs de HMIP.....	119
Tableau 11 : Répartition des génotypes en fonction du taux de bilirubine.....	121
Tableau 12 : Comparaison de la distribution génotypique et allélique entre les sujets sains et les sujets présentant des lithiases.....	122
Tableau 13 : comparaison génotypique et allélique entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou e l'absence de la lithiase biliaire.....	123
Tableau 14a : Comparaison génotypique et allélique entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou l'absence des CVO.....	124
Tableau 14 b : corrélation des différentes combinaisons génotypiques des cytokines avec les CVO.....	124
Tableau 15 a : Comparaison génotypique et allélique des polymorphismes de RANTES entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou l'absence de l'infection.....	125

Tableau 15 b : Comparaison génotypique et allélique des polymorphismes de <i>CCL2</i> et <i>CCR2</i> entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou l'absence de l'infection.....	126
Tableau 15 c : Corrélation des différentes combinaisons génotypiques des cytokines avec les infections.....	126
Tableau 16 : corrélation entre les polymorphismes BCL11A et l'expression de l'hémoglobine F.....	128
Tableau 17 : corrélation entre les polymorphismes BCL11A et l'expression de l'hémoglobine F.....	129
Tableau 18 : Récapitulation des résultats de la corrélation phénotype/génotype.....	130

Liste d'abréviations

- ADN: Acide désoxyribonucléique
- BDT: Big Dye Terminator.
- BCL11A: B cell lymphoma 11A
- BET: Bromure d'éthidium.
- BC: bilirubine conjuguée
- BNC: bilirubine non conjuguée
- BT: bilirubine totale
- CCL2: Chemokine ligand2
- CCR2: Chemokine receptor 2
- CI: intervalle de confiance
- CVO: crises vaso-occlusive
- DARC: Duffy Antigen Receptor Chemokine
- ddNTP: Dideoxynucléotides
- DNTP: Désoxynucléotide-5.-triphosphate
- DO: Densité Optique
- EDTA: Acide éthylène-Diamine-Tétra Acétique
- EMX: Enzymes du métabolisme des xénobiotiques
- FOG-1: Friend of Gata
- HbA: Hémoglobine A
- HbF: Hémoglobine F
- HbS: Hémoglobine S
- HMIP: partie intérgénique HBS1L-MYB.
- Inf : infection
- MCP-1: Monocyte Chemo-attractant Protein-1
- NuRD: nucleosome remodeling and histone deacetylase
- OR: odds ratio.

- p: indice de significativité
- RANTES: Regulated upon Activation, Normal T cell-Expressed and Secreted
- RR: risque relatif
- SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase
- SCA: Sickle Cell Anemia
- SNP: single nucleotide polymorphism
- TBE: Tris-borate-Acide Borique-EDTA
- TBP: TATA box binding protein
- TEMED: N, N, N, N'-tetraméthyléthylènediamine
- UGT1A1: uridine diphosphoglucuronozyl transférase

Partie : Synthèse Bibliographique

I. Les hémoglobines.....	1
1. Structure.....	1
2. Ontogenèse.....	1
3. Les gènes de globine.....	3
a) Les gènes de la famille Alpha.....	3
b) Les gènes de la famille Béta.....	3
II. Les hémoglobinopathies	4
1. Les thalassémies.....	4
2. Les variants de l'hémoglobine.....	4
III. La drépanocytose.....	5
1. Définition.....	5
2. Historique.....	5
3. Répartition géographique.....	6
4. Les haplotypes de la drépanocytose.....	8
5. Physiopathologie générale.....	9
a) Conséquences rhéologiques de la falciformation.....	10
b) Anomalies vasculaires chez les drépanocytaires.....	10
c) Processus inflammatoires et drépanocytose.....	10
d) La drépanocytose est une maladie systémique.....	11
6. Physiopathologie des principaux signes cliniques.....	11
a) Physiopathologie de l'anémie.....	11
b) Physiopathologie de la crise vaso-occlusive.....	13
c) Physiopathologie des infections.....	14
7. Clinique.....	15
a) La drépanocytose homozygote.....	15
b) La drépanocytose hétérozygote.....	17
8. Diagnostic.....	17
a) L'hémogramme.....	17

b) Frottis sanguin.....	17
c) Le test d'Emmel ou test de falciformation.....	18
d) Le test d'Itano ou test de solubilité.....	18
e) L'électrophorèse de l'hémoglobine.....	18
f) L'Isoélectrofocalisation électrique.....	19
g) Chromatographie (HPLC).....	20
(1) Principe.....	20
h) Diagnostic moléculaire de la drépanocytose.....	21
(1) PCR (Polymerase chain reaction).....	21
(2) Southern blot.....	21
IV. Modulation de l'expression clinique de la drépanocytose.....	21
1. Introduction	21
2. Modulation génique de la lithiase biliaire (UGT1A1).....	23
a) Définition de l'UGT1A1.....	23
b) La réaction de glucuronoconjugaison.....	24
c) La conjugaison de la bilirubine.....	24
d) Gène de l'UGT1A1.....	25
e) Polymorphismes de l'UGT1A1.....	25
f) Association des polymorphismes de l'UGT1A1 avec les maladies.....	28
(1) Association avec les hyperbilirubinémie congénitales.....	28
(2) Implication dans les lithiases pigmentaires.....	28
3. La modulation génique des crises vaso-occlusives et de l'infection chez le drépanocytaire.....	29
a) Introduction.....	29
b) Les chimiokines.....	30
c) Les récepteurs des chimiokines.....	32
d) Les chimiokines et leurs récepteurs dans les phénomènes inflammatoires.....	32
e) RANTES.....	34
(1) Définition.....	34
(2) Structure génomique.....	34
(3) Structure tridimensionnelle de la protéine.....	35
(4) Polymorphismes du gène RANTES.....	35

(5) RANTES et drépanocytose.....	37
f) DARC (duffy antigen receptor).....	38
(1) Définition et rôles.....	38
(2) La structure génique de DARC.....	38
(3) Polymorphismes de DARC.....	39
g) MCP-1/CCL2.....	40
(1) Définition.....	40
(2) Rôle de MC-P1/CCL2.....	40
(3) Structure génique de CCL2.....	41
(4) Les Polymorphismes du gène CCL2.....	43
(5) Structure protéique de CCL2.....	43
(6) Relation entre CCL2 et drépanocytose.....	44
h) CCR2.....	45
(1) Définition.....	45
(2) Rôles physiologiques de CCR2.....	45
(3) Structure protéique de CCR2.....	45
(4) Structure génique de CCR2.....	46
(5) Polymorphismes du gène CCR2.....	48
(6) Relation entre CCR2 et la drépanocytose.....	48
4. Modulation génique du taux de l'HbF chez le drépanocytaire.....	49
a) Introduction.....	49
b) BCL11A.....	52
(1) Définition.....	52
(2) Localisation cellulaire.....	52
(3) Structure génique de BCL11A.....	52
(4) Fonction.....	53
(5) BCL11A et drépanocytose.....	54
(6) Rôle de BCL11A sur la variation du taux de l'HbF.....	54
(7) Polymorphismes du gène de BCL11A et taux d'HbF.....	55

c) HBS1L-MYB.....	56
(1) Définition.....	56
(2) Structure génique.....	56
(3) Implication de HMIP dans la variabilité des taux de l'HbF.....	57
(4) Polymorphismes de HMIP et taux d'HbF.....	58

Partie sujets et méthodes

I. SUJETS.....	61
II. METHODES.....	61
A. Etude phénotypique.....	61
1. <u>Données hématologiques</u>	61
a) La NFS.....	61
b) Le frottis sanguin.....	62
2. <u>Profil hémoglobinique</u>	63
3. <u>Etude biochimique</u>	64
a) Dosage de la bilirubine.....	65
(1) Principe	65
(2) Prélèvement.....	65
(3) Technique.....	65
B. Etude moléculaire.....	65
1. Extraction de l'ADN génomique.....	65
2. Lavage des hématies.....	65
3. Lyse des globules rouges.....	65

4. Lyse des globules blancs.....	66
5. Précipitation des protéines.....	66
6. Précipitation de l'ADN.....	66
7. Lavage et séchage de la méduse d'ADN.....	66
8. Redissolution de l'ADN.....	67
9. Analyse quantitative et qualitative de l'ADN.....	67
a) Analyse quantitative.....	67
b) Analyse qualitative.....	68
10. Etude moléculaire des séquences d'intérêt.....	68
a) Données générales sur la PCR.....	68
(1) Le Principe.....	68
(2) Les composants de la réaction PCR.....	69
b) La réaction de séquençage.....	69
(1) Définition.....	69
(2) Principe.....	69
(3) Etapes de la réaction de séquence.....	70
(4) Protocole expérimental du séquençage.....	72
(a) Purification enzymatique du produit PCR.....	72
(b) Réaction de séquençage.....	72
(c) Précipitation à l'éthanol 80% de l'ADN à séquencer.....	73
c) Les électrophorèses.....	73
(1) Electrophorèse sur gel d'agarose.....	73
(2) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8%.....	74
d) Exploration des polymorphismes étudiés.....	75
(1) Etude du polymorphisme A(TA) _n TAA.....	75
(2) Etude des polymorphismes -403G/A et -28C/G du gène RANTES.....	75
(3) Etude du polymorphisme INT1.1T/C du gène RANTES.....	76
(4) Etude du polymorphisme -46T/C du gène DARC.....	77
(5) Etude du polymorphisme -2518A/G du gène CCL2.....	77
(6) Etude du polymorphisme V64I du gène CCR2.....	78
(7) Etude du polymorphisme rs 11886868 du gène BCL11A.....	78
(8) Etude du polymorphisme rs 4671393 du gène BCL11A.....	79
(9) Etude du polymorphisme rs 4895441 de la partie intergénique HMIP.....	79

(10) Etude du polymorphisme rs 9399137 de la partie intergénique HMIP.....	80
C. Analyses statistiques.....	81
1. Test Chi2.....	81
2. Test Fisher.....	81
3. Equilibre de Hardy-Weinberg.....	82
4. Etude de régression logistique.....	82
(a) Définition du modèle logistique.....	82

Partie : Résultats

Chapitre I : CARACTERISATION BIOLOGIQUE DES PATIENTS.....	84
I. Etude phénotypique.....	85
A. Données hématologiques.....	85
B. Etude de l'Hémoglobine.....	86
C. Caractérisation moléculaire de la mutation drépanocytaire.....	87
1. Amplification par PCR.....	87
2. Digestion enzymatique.....	88
D. Dosage de la bilirubine.....	89
Chapitre II : BASES MOLECULAIRES ASSOCIEES AUX COMPLICATIONS DREPANOCYTAIRES.....	91
I. Analyse des patients étudiés.....	92
1. Variations cliniques.....	92
II. Complication lithiasique.....	93
1. Description de l'échantillon.....	93
2. Mise en évidence du polymorphisme A(TA)nTAA du gène UGT1A1.....	93
III. Complications vasculaires.....	97
1. Polymorphismes du Gène RANTES.....	98
2. Polymorphismes du Gène DARC.....	102
3. Polymorphisme CCL2 (-2518A/G).....	105

4.Polymorphisme CCR2 (V64I).....	106
IV. Complications infectieuses.....	109
V.Modulation de la drépanocytose par l'Hb F.....	110
A.Cas de BCL11A.....	110
3. Recherche de la mutation A/G du rs 4671393.....	111
4. Recherche de la mutation C/T du rs11886868.....	113
5. Répartition génotypique et allélique des polymorphismes BCL11A.....	115
B. Cas de HMIP.....	115
Chapitre III:CORRELATION PHENOTYPE GENOTYPE.....	120
I. Complications drépanocytaires.....	121
1. Complication lithiasique.....	121
a) Association A(TA) _n TAA avec la lithiase non drépanocytaire.....	122
b) Association A(TA) _n TAA avec la lithiase drépanocytaire.....	123
2. Complications vasculaires.....	124
3. Complication infectieuses.....	125
II. Modération de la drépanocytose.....	127
1. Cas de BCL11A.....	127
2. Cas de HMIP.....	128
III.Conclusion générale.....	130

Partie : Discussion

I. Complications lithiasiques.....	131
II. Complications vasculaires et infectieuses.....	134
III.Expression de l'hémoglobine Fœtale.....	138

Partie : Perspectives

INTRODUCTION

Introduction

L'hémoglobine assure le transport de l'oxygène depuis la périphérie vers les tissus. Les hémoglobinopathies sont des anomalies héréditaires de l'hémoglobine et se subdivisent en deux groupes. Le premier correspond aux anomalies qualitatives de l'hémoglobine qui comprend la drépanocytose avec toutes ses formes homozygotes et hétérozygotes composites. Le deuxième groupe concerne les anomalies quantitatives de l'hémoglobine caractérisées par un défaut partiel ou total de synthèse de sous-unités de l'hémoglobine α et β représentées par les thalassémies.

Pour l'OMS, l'UNESCO et l'ONU, la drépanocytose occupe le quatrième rang dans leurs priorités de Santé Publique Mondiale (derrière le cancer, le virus du VIH et le paludisme). En Tunisie la drépanocytose est la 2ème hémoglobinopathie après la α -thalassémie, représentant ainsi un vrai problème de santé publique. La fréquence moyenne du trait drépanocytaire dans notre pays est de 1.89% (Fattoum, 2006).

La drépanocytose constitue un exemple historique de monomorphisme moléculaire. Le fait que la mutation causale soit toujours la même, alors que la gravité de la maladie est variable, suggère une modulation génétique multifactorielle. Nous avons choisi de rechercher, par l'approche de gènes candidats, certains gènes modificateurs qui pourraient expliquer certaines caractéristiques phénotypiques de la maladie. Cette approche nous paraît nécessaire dans le but de définir une stratégie préventive efficace susceptible d'harmoniser l'équilibre de la vie de nos patients. La physiopathologie des hémoglobinopathies est en effet complexe et non univoque. Dans la physiopathologie de la maladie drépanocytaire un facteur paraît essentiel : il s'agit du taux résiduel d'hémoglobine foetale qui empêche la polymérisation de l'hémoglobine S et la falciformation des globules rouges. La drépanocytose est caractérisée par une hémolyse chronique qui entraîne des complications diverses. Les complications qui menacent de façon aiguë le sujet drépanocytaire sont nombreuses et graves : les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent une complication gravissime de la maladie avec une lourde mortalité et morbidité. Les infections sont particulièrement fréquentes et expliquées par l'asplénie spontanée progressive, complète à l'âge de 6ans. Elles sont à type d'ostéomyélite à salmonelle, de pneumococcies, d'infections à *Haemophilus influenzae*, *Escherichia Coli*, ou

Mycoplasma Pneumonia. Les ostéonécroses, le syndrome thoracique aigu, la lithiase biliaire pigmentaire, les complications spléniques et les complications rénales sont observées aussi chez les malades avec un degré de gravité variable d'un individu à l'autre.

Toutes ces complications sont modulées par des gènes qui sont impliqués dans plusieurs mécanismes physiologiques comme le métabolisme des xénobiotiques qui sert à convertir via différents processus biochimiques les substances exogènes et endogènes lipophiles en substances hydrophiles facilement éliminées par l'organisme. Les protéines jouent un rôle au cours de l'inflammation comme les chimiokines et sont impliquées aussi dans l'adhésion cellulaire en relation avec la survenue de crises vaso-occlusives. Par ailleurs d'autres processus biologiques fondamentaux comme la croissance, le développement et la différenciation cellulaire sont impliqués.

Une meilleure compréhension des mécanismes génétiques de modulation des hémoglobinopathies permet l'amélioration de la prise en charge pédiatrique et ainsi une grande majorité des enfants auraient plus de chance à atteindre l'âge adulte. En effet, les hémoglobinopathies et en particulier la drépanocytose présentent un problème de santé publique dans plusieurs régions du monde et vu leur importance, les cliniciens portent un intérêt particulier à trouver des solutions qui pourraient atténuer les complications de la maladie chez les patients.

La thèse présentée porte sur l'étude de la prédisposition génétique des patients atteints de la drépanocytose à moduler la gravité de la maladie afin d'améliorer l'espérance de vie, la morbidité et la qualité de vie des patients. Pour cela des polymorphismes touchant des gènes candidats ont fait l'objet d'exploration moléculaire afin de chercher d'éventuelles corrélations phénotype/génotype. Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressées au gène de l'uridine diphosphoglucuronosyltransférase (*UGT1A1*) impliqué dans la conjugaison de la bilirubine, un pigment résultant de la dégradation de l'hème. L'étude a concerné une insertion d'une paire de base au niveau de la TATA box du promoteur qui entraîne une diminution de l'activité enzymatique et par conséquent une hyperbilirubinémie. Cette hyperbilirubinémie est un facteur de risque pour le développement de lithiase biliaire pigmentaire qui est une complication fréquente chez les drépanocytaires et les thalassémiques. D'autres gènes sont explorés comme *RANTES* et son récepteur *DARC* qui sont impliqués dans la polymérisation des globules rouges et par la suite la survenue des crises vasoocclusives. *CCL2* et son récepteur *CCR2* qui jouent un rôle important en attirant les monocytes aux sites d'inflammation sont impliqués dans la sclérose, les maladies rénales. Par ailleurs, on s'est intéressé à

l'étude de l'association entre polymorphismes génétiques et le taux de l'hémoglobine F. L'étude s'est orientée vers un gène *BCL11A* considéré comme répresseur de l'expression des gènes γ -globine dans les érythroblastes et aussi à la partie intergénique *HBS1L-MYP* (*HMIP*) impliquée dans la variation des taux de l'HbF.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les hémoglobines

Structure

L'hémoglobine est une hétéroprotéine hémique constituée de quatre chaînes de globine identiques deux à deux et de quatre molécules d'hème contenant chacun un atome de fer à l'état ferreux (Fe^{++}) apte à l'oxygénation (Figure1). Il s'agit d'une protéine intra érythrocytaire qui transporte l'oxygène des poumons vers les tissus et facilite également l'élimination du gaz carbonique. Les principales chaînes de globine sont désignées par les symboles α , β , δ et γ . Durant la vie embryonnaire deux autres chaînes ϵ et ζ sont synthétisées.

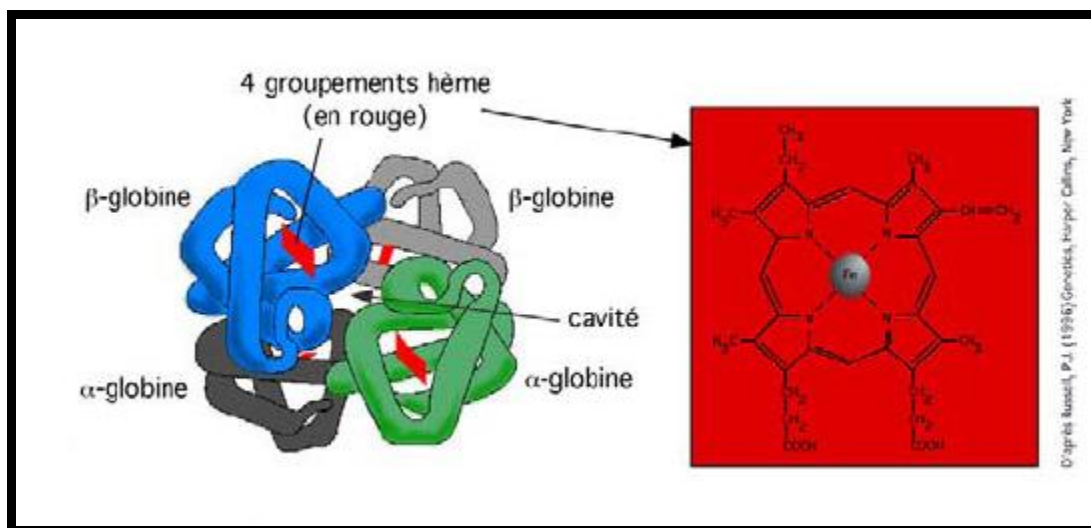


Figure1 : Structure de l'hémoglobine (F. Bernaudin 2006).

Ontogenèse

Les diverses sous-unités de globine permettent de réaliser les hémoglobines spécifiques :

De la vie embryonnaire :

Hb Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$)

Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$)

Hb Portland ($\zeta 2 \gamma 2$)

De la vie fœtale :

HbF ($\alpha 2 \gamma 2$)

L'hémoglobine fœtale, détectable à partir de la 5^{ème} semaine de la vie intra utérine est le principal constituant hémoglobinique de cette période de la vie. Son taux atteint 90% entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine et reste à peu près constant jusqu'à la naissance. La sous-unité fœtale γ est en fait constituée par un mélange en proportions variables de deux espèces moléculaires très voisines, produits de deux gènes distincts, les chaînes A γ et G γ qui ne diffèrent que par la nature du résidu en position 136 : Alanine dans le premier cas, glycolle dans le second.

De l'adulte :

HbA1 ou A : ($\alpha 2 \beta 2$)=95.5 à 97%.

HbA2 ($\alpha 2 \delta 2$)=2 à 3.5%

HbF ($\alpha 2 \gamma 2$) <1% et reste limitée à une population cellulaire restreinte, les cellules F. Ces cellules dont le nombre semble génétiquement déterminé, représentent 1 à 7% de l'ensemble des érythrocytes (Wajemann 2000) (Figure 2).

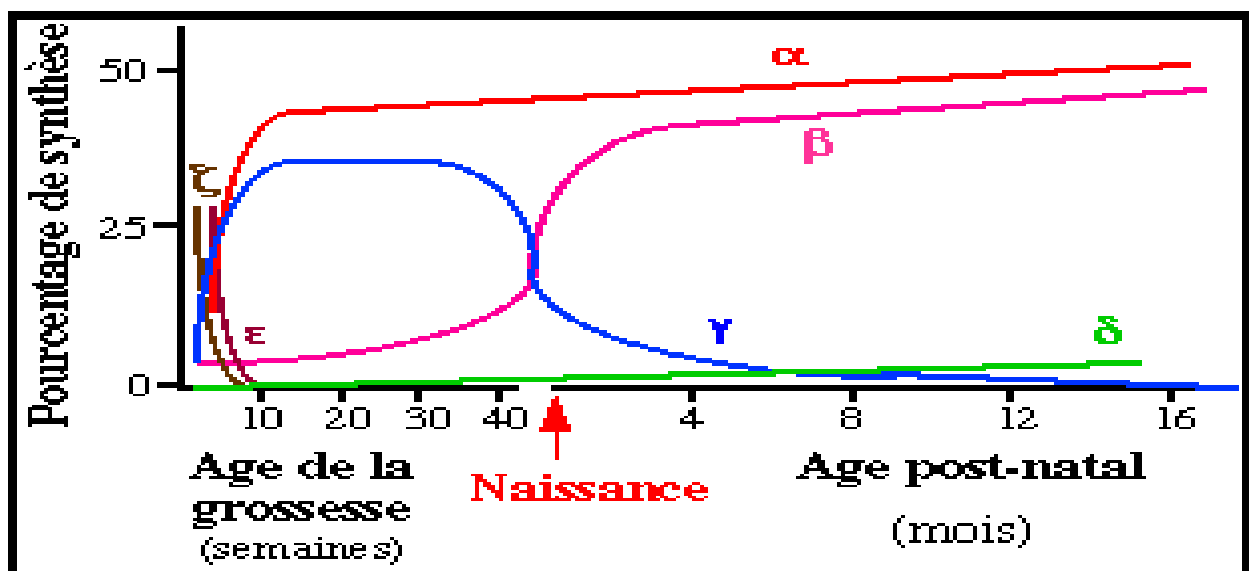


Figure2 : évolution ontogénique de l'Hémoglobine. (http://didac.free/5791_124/index.htm).

Les gènes de globine

Les globines sont des protéines dont la synthèse dépend de gènes regroupés en deux familles: les gènes de type α (chromosome 16) et les gènes de type β (chromosome 11) (Figure 3).

Les gènes de la famille Alpha

Ils sont situés sur le bras court du chromosome 16 (Deisseroth et al, 1977) couvrant une région de 26 Kb, ils constituent une famille de 3 gènes : α_1 , α_2 , ζ et des pseudos gènes non fonctionnels : $\Psi\zeta_1$, $\Psi\alpha_2$, $\Psi\alpha_1$ (Orkin et al, 1978) et un gène θ_1 (Marks et al, 1986).

Les gènes de la famille Bêta

Ils sont localisés sur le bras court du chromosome 11 (Gusella et al, 1979) et constituent une famille de 5 gènes: ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$ et β et un pseudogène bêta non fonctionnel $\Psi\beta$, regroupés sur un fragment d'ADN d'environ 50 Kb.

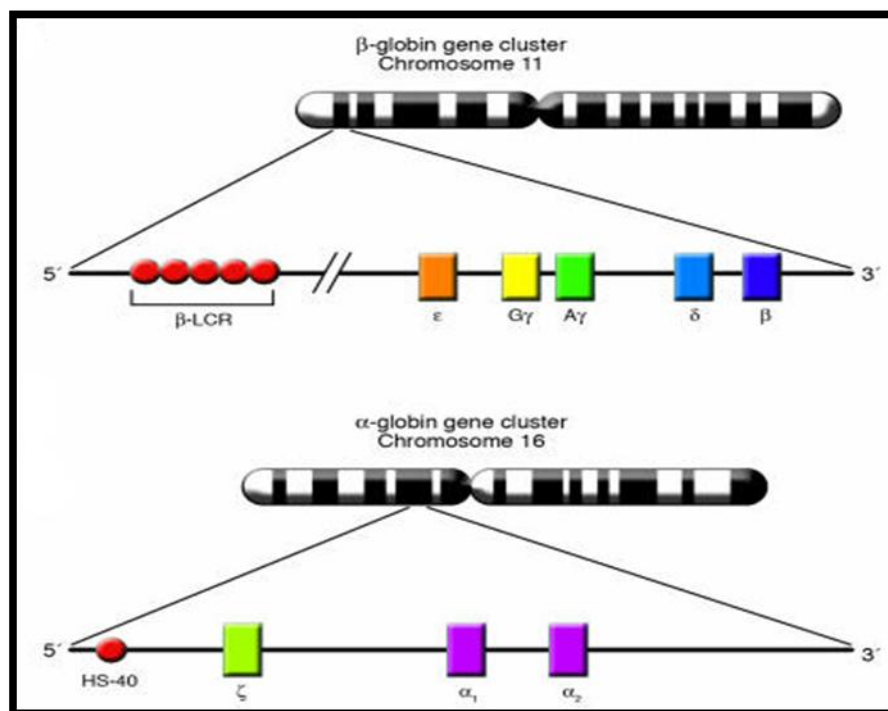


Figure 3 : Représentation schématique de la Famille des gènes Alpha et Bêta globine (Frenette et Atweh, 2007)

Les hémoglobinopathies

Les hémoglobinopathies sont des maladies génétiques dans lesquelles il existe une anomalie héréditaires de l'hémoglobine. Elles peuvent être classées en deux grands groupes :

Les anomalies quantitatives de la production d'une des chaînes de globine constituent le groupe des thalassémies.

Les anomalies qualitatives ou structurales résultent de la production en quantité normale d'une chaîne de globine de structure anormale, ce sont les variants de l'hémoglobine.

Les thalassémies :

Dans ce cas il existe une inhibition partielle ou totale de la synthèse de certaines chaînes polypeptidique de l'hémoglobine. Quand la diminution de la synthèse affecte les chaînes β (β thalassémie), le mécanisme compensateur est représenté par une synthèse accrue des chaînes γ et δ , d'où augmentation des HbF et HbA₂. Quand les perturbations affectent les chaînes α (α thalassémie), la compensation ne peut se faire que par l'apparition des tétramères à un seul type de chaîne : HbH (β_4) et Hb Bart's (γ_4) qui n'existent pas chez le sujet normal.

Les variants de l'hémoglobine :

On cite dans ce groupe la drépanocytose ou HbS (β_6 Glu \rightarrow Val), l'HbC (β_6 Glu \rightarrow Lys), l'HbO Arab (β_{121} Gly \rightarrow Lys) et l'HbE (β_{26} Glu \rightarrow Lys). L'anomalie structurale est la substitution d'un seul acide aminé des chaînes β de l'HbA par un autre AA. Les hémoglobines de type D, G, P etc...peuvent s'accompagner ou nom d'une symptomatologie clinique.

La drépanocytose :

Définition :

La drépanocytose ou anémie falciforme est une maladie autosomale récessive due à une mutation unique, ponctuelle, du gène β globine situé sur le chromosome 11 (11p11-5). La mutation du sixième codon (GAG-GTG) entraîne le remplacement de l'acide glutamique 6 par de la valine (Glu6Val).

En fait, il existe pour la maladie drépanocytaire, différents génotypes dont trois sont prédominant : HbS/HbS, HbS/HbC et HbS/ β thalassémie et représentent les syndromes majeurs. Les sujets hétérozygotes HbA/HbS sont des porteurs sains.

La drépanocytose se présente comme une anémie hémolytique chronique émaillée par des complications dominée par des crises douloureuses vasoocclusives.

Historique

La drépanocytose est décrite pour la première fois en 1910 aux Etats Unis par le médecin de Chicago James Herrick, qui a remarqué la présence des globules rouges déformés en forme de "faucille" dans le sang de l'un de ses étudiants originaire de la Grenade (Herrick, 1910).

En 1927, Hahn et Gillespie constatent que la diminution de niveau d'oxygène joue un rôle important sur la falciformation des globules rouges, qui est généralement réversible en cas d'apport d'oxygène (Hahn et Gillespie, 1927).

En 1947, Neel définit le traît drépanocytaire à partir de l'existence de descendance malades, homozygotes SS, issus de parents sains (Neel, 1949).

En 1949, Pauling et al mettent en évidence une différence de migration électrophorétique entre l'hémoglobine normale adulte « A » et l'hémoglobine drépanocytaire « S » (le S venant de Sickle signifiant faucille), qui est plus lente (Pauling et al, 1949).

En 1959, Ingram démontre par la technique du "fingerprint" que la différence entre l'hémoglobine A et l'hémoglobine S est due à la substitution de l'acide glutamique en position 6 sur la chaîne β globine par une valine (Ingram, 1959).

Dans les années soixante, cette substitution est expliquée par le remplacement d'une adénine par une thymine sur le codon 6 (GAG > GTG) du gène β globine, localisé sur le chromosome 11.

Au début des années 70, des tests de dépistage sont lancés aux USA. La population américaine d'origine africaine est en effet très touchée.

En **1978**, Tom Maniatis isole le gène de la bêta globine (Maniatis et al, 1978).

En **1995**, l'hydroxyurée devient le premier et le seul médicament permettant de prévenir les complications dues à la maladie suite à une étude multicentrique réalisée par Charache S et al. (Charache S et al, 1995).

Répartition géographique

On estime jusqu'à 300000 nouveaux nés drépanocytaires dans le monde chaque année. Ce nombre important montre que la drépanocytose représente un problème de santé publique dans plusieurs régions du monde. (Rapport de l'OMS 2006).

La drépanocytose ne concerne plus exclusivement les populations noires d'Afrique. L'effet des mouvements de migration d'origine africaine et antillaise dans les capitales européennes, et le continent américain ainsi que l'accroissement du métissage, augmente l'expansion de cette maladie à l'échelle mondiale. La fréquence du gène S est estimée à 10% dans les pays d'immigration des populations noires. Exemples: Amérique, Europe, Grande-Bretagne, Caraïbes et certains pays d'Amérique du Sud comme le Brésil ou la Colombie (Motulsky, 1973; Serjeant, 1989). Chez les non africains, la drépanocytose persiste dans le sud de l'Italie (en Sicile), la Grèce, l'Albanie, la Turquie, le nord d'Israël et dans tout le Moyen-Orient.

La nature et la distribution géographique des différents haplotypes β S au Portugal suggèrent que le trait falciforme a été importé deux fois, entre les 8ème et 12ème siècles, du bassin méditerranéen (associé à l'haplotype Bénin), et, après le 15ème siècle, d'Afrique noire sur une route atlantique (haplotypes Sénégal et Bantou; Lavinha et al., 1992). Des foyers existent en Arabie Saoudite, au Yémen et en Inde (région de Punjab) parmi les tribus les plus anciennement installées. Il est absent de l'Ouest de l'Asie, de la Nouvelle Zélande et de l'Australie (Serjeant, 1989).

Pour l'Afrique, la "ceinture drépanocytaire" commence à l'embouchure du fleuve Sénégal, couvre toute l'Afrique occidentale, l'Afrique équatoriale et orientale, jusqu'au

canal du Mozambique, depuis le sud du Soudan jusqu'au Zambèze. Elle atteint Madagascar (Chippaux et al, 1976).

La drépanocytose est très fréquente en Afrique subsaharienne avec une fréquence de l'allèle S estimé à 30-40% de la population; en Afrique du Nord et Afrique du Sud seulement 1 à 2%. La carte géographique de l'Afrique noire montre trois zones à risque avec des fréquences particulièrement élevées: Afrique Centrale (Gabon, République démocratique du Congo, Angola), les deux autres, en Afrique de l'Ouest (Sénégal et Bénin). Le gène S est présent dans 10-20% de la population en Afrique blanche (Serjeant, 1989). En Afrique Centrale, la littérature rapporte des enquêtes réalisées par Vandepitte et al. (1963), ils estiment la fréquence du génotype AS à 25% en milieu urbain, à 28% en milieu rural. Selon Lambotte-Legrand et al. (1951), un enfant sur 64 (1,6%) serait drépanocytaire SS. Elle est particulièrement élevée dans les régions d'Afrique Centrale où la malaria est endémique (Figure 4).

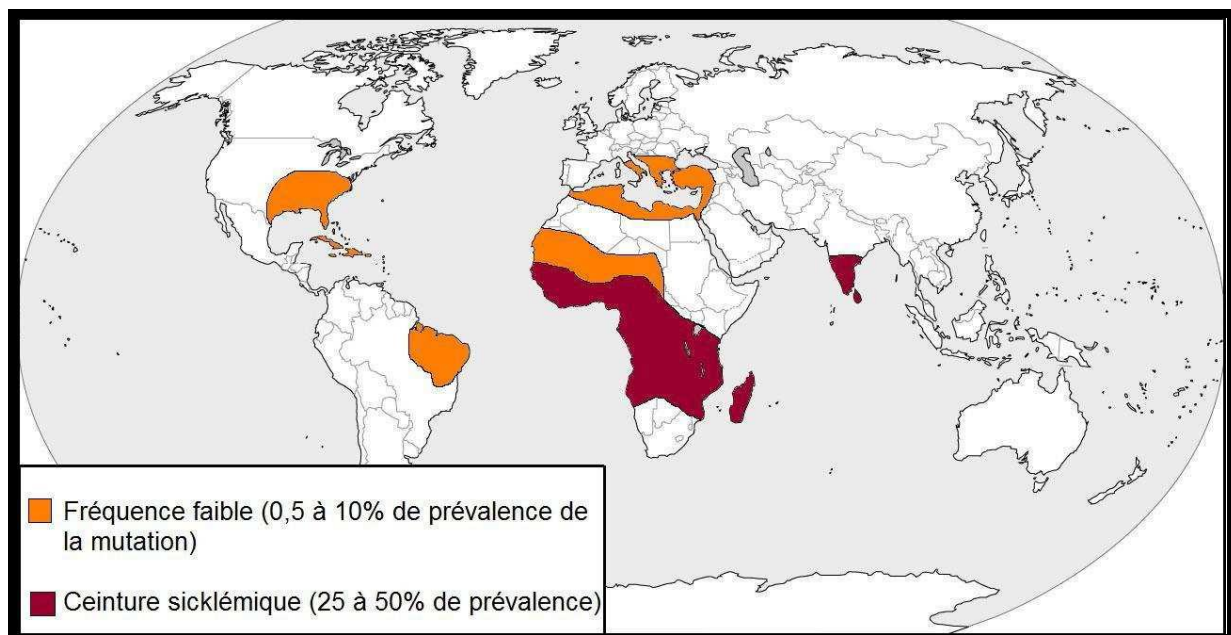


Figure 4 : Répartition géographique de l'allèle ou gène S dans le monde d'après Kéclard et al 2004.

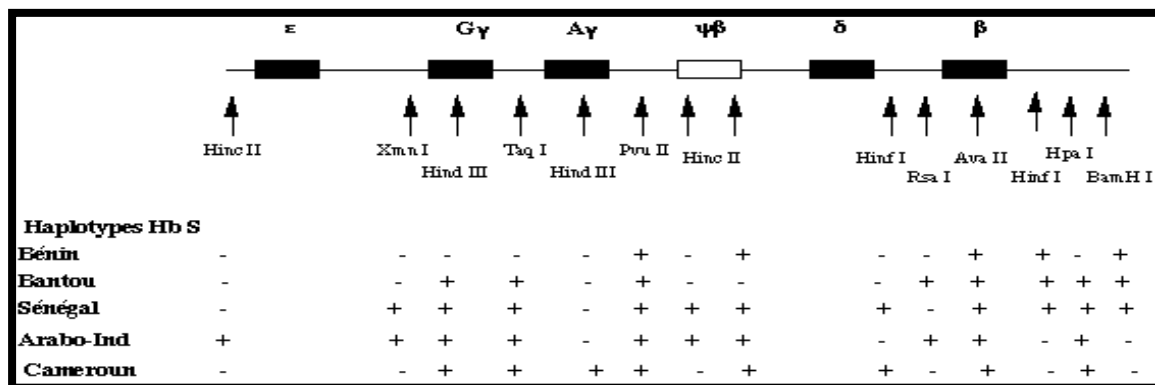
En Tunisie, la fréquence moyenne du trait drépanocytaire est de 1.89%. Les foyers d'endémie drépanocytaire ont été décrits dans le Nord-Ouest tunisien où la

fréquence des hétérozygotes est estimée à 6% (Fattoum S et al 2006). La région de Bizerte (Nord Tunisien) est particulièrement touchée par la drépanocytose.

Les haplotypes de la drépanocytose

Des variations de la séquence nucléotidique, sans conséquence pathologique directe, sont fréquentes. Elles sont désignées sous le terme de polymorphisme. Lorsque ces modifications portent sur des sites reconnus très spécifiquement par certaines endonucléases (enzymes de restriction) elles sont faciles à mettre en évidence par les méthodes de cartographie génique (polymorphisme de taille des fragments de restriction). L'association de plusieurs de ces polymorphismes définit un haplotype. L'un des résultats les plus intéressants des études des polymorphismes de l'environnement du gène drépanocytaire a été l'observation d'un déséquilibre de liaison : les polymorphismes ne sont pas distribués au hasard, mais forment un petit nombre d'haplotypes bien définis. La mutation drépanocytaire a été trouvée habituellement associée à 5 haplotypes désignées d'après leur épicerentre. Ce sont les haplotypes : Sénégal, Bénin, Cameroun, Bantou et Arabo-indien (Bachir, 2000 ; Elion, 2005). (Figure 5).

Figure 5: Les haplotypes du groupe des gènes β globine dans la drépanocytose (Bachir, 2000). Les signes + ou - indiquent la présence ou l'absence du site de restriction pour l'enzyme



considérée.

La physiopathologie générale

Une mutation unique GAG \longrightarrow GTG au niveau du 6^{ème} codon de l'exon1 du gène β globine entraîne le remplacement (en position 6 de la chaîne β globine) de l'acide

glutamique, chargé négativement, par la valine, acide aminé neutre et hydrophobe. L'hémoglobine A devient l'hémoglobine S. La présence d'un site hydrophobe (la valine) crée un pontage entre deux molécules d'hémoglobine voisines. Celui-ci s'établit entre la leucine 88 et la phénylalanine 85 d'une chaîne α d'une molécule et la valine 6 de la chaîne β de la molécule voisine d'où la création cristalline en fibres. C'est le phénomène de polymérisation de l'hémoglobine qui ne s'effectue qu'à basse pression en oxygène. Elle est très sensible à des variations minimales de la température, du pH, de la force ionique intra corpusculaire ainsi que de la concentration du 2,3 DPG et de la concentration intra globulaire de l'HbS.

La formation de ces fibres intracellulaires entraîne une modification de forme du globule rouge qui prend un aspect en faucille : c'est le phénomène de falciformation. Plusieurs cycles de falciformation déforment le GR d'une façon définitive pour donner des drépanocytes irréversibles ou l'on note souvent une concentration d'hémoglobine supérieure à 40g/dl.

Ces altérations membranaires du GR entraînent :

- Une libération de microvésicules.
- Une déshydratation associée à des anomalies de transport ionique membranaire impliquant le canal Gardos, activé par le calcium intracellulaire et le co transport K^+/Cl^- .
- L'apparition d'un microenvironnement oxydant associant la libération de Fe^{+++} et la création d'un cycle d'autooxydation de l'Hb S avec retentissement sur les autres protéines du GR.

Une perte de l'asymétrie des phospholipides membranaires avec externalisation de la phosphatidyl sérine qui joue un rôle significatif dans leur reconnaissance par les macrophages et leur élimination prématurée, l'apoptose cellulaire et l'activation de la coagulation (Carlo Brugnera et al 2006).

La maladie prend alors une autre dimension rhéologique et vasculaire.

Conséquences rhéologiques de la falciformation

La diminution de la déformabilité du drépanocyte entraîne systématiquement une augmentation de la viscosité du sang. Déformabilité du GR et viscosité du sang sont deux phénomènes très dépendants de l'hématocrite. L'hématocrite bas (20 à 25%) observé chez les drépanocytaires homozygotes atténue l'effet de ces anomalies.

Anomalies vasculaires chez les drépanocytaires

Au niveau de la microcirculation, les cellules drépanocytaires adhèrent à l'endothélium vasculaire. Ce phénomène d'adhésion est d'autant plus important que le flux sanguin est turbulent. L'adhérence maximale s'observe dans les vaisseaux de 7 à 10µm de diamètre. Elle provoque un ralentissement circulatoire et induit la falciformation et la vasoocclusion. Certaines molécules protéiques ont été impliquées dans les phénomènes d'adhérence.

- Au niveau des cellules jeunes réticulocytaires on rencontre des molécules pro adhésives telles que l'intégrine VLA.4 et la glycoprotéine CD36.
- Au niveau des cellules endothéliales les partenaires sont CD36 et après activation la protéine VCAM-1.

L'interaction VLA.4 \longleftrightarrow VCAM-1 est directe, alors que celle qui se fait entre les deux molécules CD36, fait intervenir un pontage par la thrombospondine plasmatique.

Processus inflammatoire et drépanocytose

La drépanocytose est une maladie inflammatoire, objectivée par la présence de nombreux indicateurs de l'inflammation tels que l'augmentation du nombre de leucocytes, du taux plasmatique de la protéine C réactive, des cytokines, des cellules sanguines activées (monocytes, neutrophiles, plaquettes) ainsi que des cellules endothéliales. Cette réponse inflammatoire existe à l'état basal et exacerbée lors des crises vasoocclusives.

L'augmentation et l'activation des leucocytes favorisent leur adhérence les uns aux autres, aux drépanocytes, aux plaquettes et à l'endothélium vasculaire. Les cellules endothéliales sont aussi activées par l'hypoxie, les infections et les cytokines proinflammatoires (TNF α , IL1, IL6).

Cette double activation endothéliale et leucocytaire conduit à une expression beaucoup plus importante des molécules adhésives : Intégrines, Sélectine et ICAM qui contribuent davantage à l'obstruction de la lumière des vaisseaux. D'un autre côté, les stimuli inflammatoires et hypoxiques activent non seulement l'adhérence des drépanocytes, mais aussi leur déshydratation. En effet les GR possèdent un récepteur pouvant fixer avec une forte affinité une famille de médiateurs de l'inflammation : les chimiokines (IL8 et RANTES). Ces récepteurs érythrocytaires, appelés DARC (Duffy Antigen Receptor for chemokines) sont les antigènes du groupe sanguin 'Duffy'.

La drépanocytose est une maladie systémique

Les phénomènes d'adhésion des GR à l'endothélium vasculaire peuvent potentiellement intéresser tous les organes vascularisés et aboutir à des crises vasoocclusives multiples et disparates, d'intensité et de fréquence variable qui, par le temps, peuvent se compliquer d'insuffisance d'organes.

Physiopathologie des principaux signes cliniques

Physiopathologie de l'anémie :

La polymérisation de la désoxy HbS déforme le GR et le fragilise, ce qui cause une hémolyse et une anémie (anémie hémolytique). Le drépanocytaire homozygote présente un taux d'hémoglobine entre 6 et 10g/dl avec une réticulocytose de 5 à 15%. Cette anémie est relativement bien tolérée devant l'accélération du débit circulatoire et surtout la diminution de l'affinité de l'hémoglobine S pour l'oxygène.

L'augmentation de la production médullaire entraîne un déficit en acide folique qui nécessite une supplémentation orale pour éviter l'anémie mégaloblastiques. L'hyperhémolyse est à l'origine d'un ictère à bilirubine non conjuguée qui peut se compliquer par une lithiase biliaire pigmentaire constatée chez 30% des malades avant 20 ans.

L'anémie chez le drépanocytaire peut être aggravée par :

- Une diminution de la réticulocytose suite à une inflammation.
- Une carence en folate

- Un déficit en fer
- Des crises d'érythroblastopénie imputables le plus souvent au parvovirus B19 survenant surtout dans l'enfance.
- Un syndrome de séquestration splénique, syndrome fréquent qui se traduit par une anémie aiguë chez le petit enfant.

Physiopathologie de la crise vasoocclusive

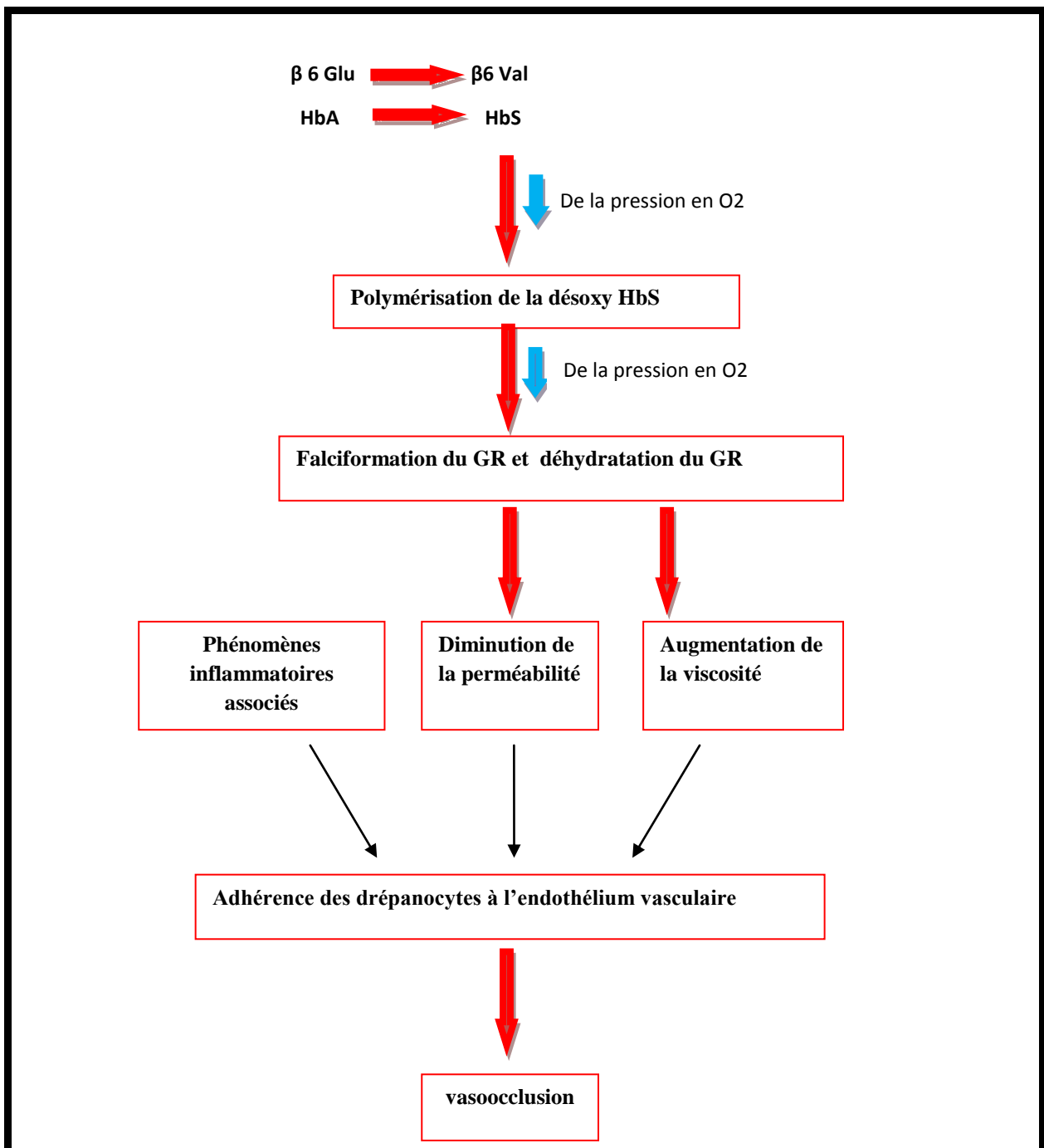


Figure6 : Physiopathologie de la vasoocclusion

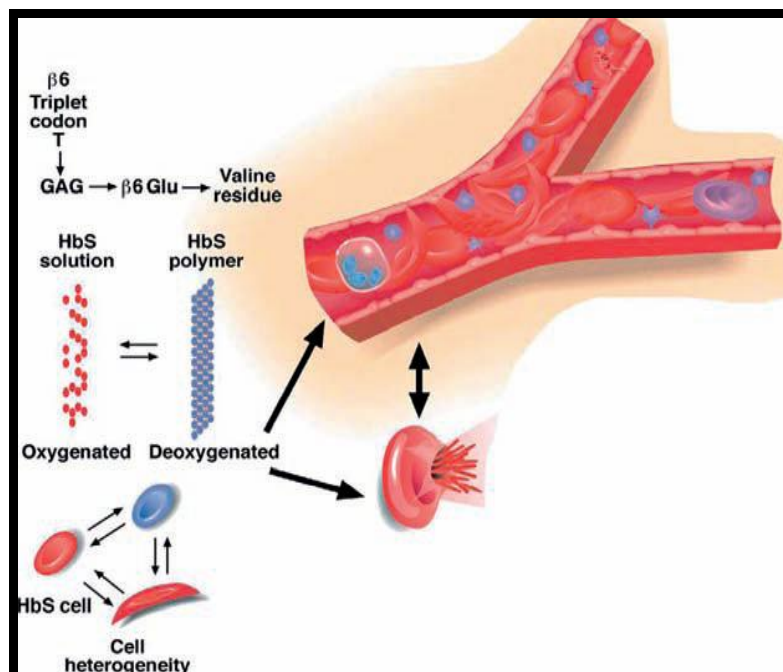


Figure 7 : Polymérisation de l'hémoglobine S et falciformation des globules rouges (Schmugge, 2008).

La falciformation des hématies ainsi que leur déshydratation aboutissent à des cellules peu déformables. Le recrutement de ces cellules constitue le facteur principal des accidents vasoocclusifs, favorisés par l'augmentation de la viscosité sanguine et la majoration de l'adhésion aux parois vasculaires, ce qui ralentit la fluidité du sang au niveau de la microcirculation des territoires vasculaires intéressés et engendre un défaut de perfusion des tissus qui en dépendent. Le caractère rapide ou progressif de l'anomalie de la circulation est à l'origine de complications vasoocclusives aiguës ou chroniques (Figur7).

Physiopathologie des infections

La sensibilité aux infections est variable selon les germes en cause et les types d'infection. C'est ainsi que chez tous les drépanocytaires splénectomisés, il existe un

risque d'infections graves à type de septicémies ou de méningites à streptocoque pneumoniae et à l'hémophilus influenza.

Un autre mécanisme est incriminé dans la survenue des infections. C'est ainsi qu'à l'occasion d'une bactériémie, le germe, survenant dans une zone non ou mal vascularisée (suite à la vasoocclusion), va se développer et être à l'origine de l'infection telle qu'une ostéomyélite par exemple, incriminant des salmonelles dits mineurs, des staphylocoques, des colibacilles...

Clinique

a) La drépanocytose homozygote

Elle se présente sous la forme d'une anémie hémolytique chronique et permanente (Hb entre 6 et 8g/dl) avec un ictère à prédominance de bilirubine non conjuguée, un retard pondéral, un retard pubertaire, une hépatomégalie inconstante et une splénomégalie qui peut persister chez l'enfant. Des anomalies radiologiques à type d'épaississement des os de la voûte du crâne et une ostéoporose avec des vertèbres en H.

Cette symptomatologie est le plus souvent émaillée de complications aiguës à type de crises vasoocclusives qui peuvent intéresser tous les territoires de l'organisme :

- ❖ Crises douloureuses à répétition, surtout au niveau des os longs, des vertèbres, des côtes et du sternum qui dure de 4 à 5 jours et des crises abdominales avec iléus réflexe durant 2 à 3 jours.
- ❖ Infections
 - ✓ Anémies de causes infectieuses (bactérienne surtout) ou par aplasie médullaire (érythroblastopénie due au parvovirus B19).
 - ✓ Accidents vasoocclusifs : infarctus osseux, ostéomyélite aiguë due à des salmonelles, des pneumocoques, au staphylocoque auréus et des déficits neurologiques. Chez l'enfant drépanocytaire les accidents vasculaires cérébraux (ischémiques ou hémorragiques) représentent une complication

redoutable. Chez l'adolescent, 10% des drépanocytaires présentent un infarctus cérébral avant l'âge de 20 ans.

- ✓ Des syndromes thoraciques aigus.
- ✓ Un priapisme ischémique aigu qui représente une urgence.
- ✓ Des épistaxis abondantes.

Les complications chroniques se voient chez les adolescents et les adultes :

- ✓ Ulcères de jambe (au niveau des chevilles).
- ✓ Ostéonécrose des têtes fémorales et humérales.
- ✓ Arthrite aseptique (au niveau des genoux).
- ✓ Rétinopathies prolifératives.
- ✓ Lithiase biliaire pigmentaire asymptomatique dans la moitié des cas et mise en évidence par échographie abdominale.
- ✓ Atteinte rénale : Diminution de la concentration maximale des urines, responsable de déshydratation, hématurie, insuffisance rénale aiguë, insuffisance rénale chronique révélée par une protéinurie, à rechercher systématiquement.
- ✓ Cardiomégalie liée à l'anémie chronique.
- ✓ Hypertension artérielle pulmonaire.
- ✓ Hépatomégalie liée en partie à la surcharge en fer de moins en moins observée par les traitements chélateurs du fer.
- ✓ Carence en vitamine D chez l'enfant et l'adulte.
- ✓ Hypoacousie.

- ✓ Et toujours le risque de complications vas-occlusives aiguës (os long et os plat).

b) La drépanocytose hétérozygote

Elle est en général asymptomatique. Si elle est symptomatique, il faut rechercher une autre anomalie associée, par exemple un déficit en G6PD ou en pyruvate kinase. Il faut faire attention à l'hypoxie qui est un facteur aggravant.

Diagnostic

Le diagnostic de drépanocytose repose dans tous les cas sur l'identification formelle de l'HbS.

Ce diagnostic biologique repose sur plusieurs techniques, qui sont :

L'hémogramme

Elle précise l'importance de l'anémie qui est variable, le taux d'hémoglobine variant en moyenne de 6 à 10 g/dl. L'anémie est typiquement normochrome normocytaire et régénérative (taux de réticulocytes élevé).

Frottis sanguin

L'examen du frottis sanguin permet de mettre en évidence la présence d'hématies en forme de faucille (drépanocytes).

Chez un sujet hétérozygote, l'hémogramme est normal, pas de drépanocytes sur le frottis sanguin. **(Figure8)**

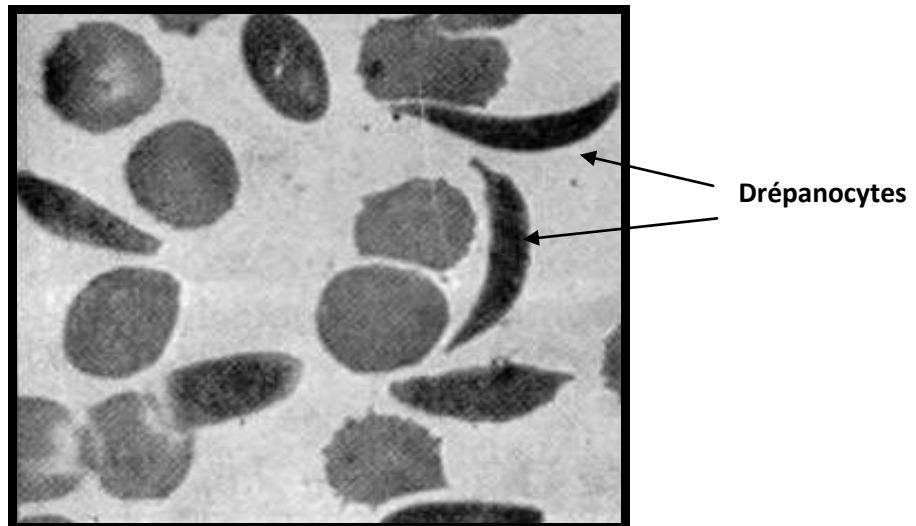


Figure 8 : Drépanocytes observés sur un frottis sanguin (Tchamago, 2006)

Le test d'EMMEL ou test de falciformation

Il permet de mettre en évidence la falciformation en cas de la présence d'hémoglobine S dans le sang testé, soit par ajout de méta bisulfite de sodium au sang du malade, soit par la création des conditions d'hypoxie. Ce test est négatif si la forme des globules rouges reste ronde et il est positif si les globules rouges deviennent en forme de faucille.

Ce test, lorsqu'il est positif, ne permet pas de savoir s'il s'agit d'une forme hétérozygote ou symptomatique.

Le test d'ITANO ou test de solubilité

Il Consiste à utiliser un réducteur (méta bisulfite), afin de désoxygéner le sang et d'entraîner la formation d'hémoglobine anormale (HbS). Il repose sur la faible solubilité de l'hémoglobine S lorsqu'elle est désoxygénée par action d'hydrosulfite de sodium en présence d'une solution de phosphate (Wajeman et Galactaros 2001).

(Figure 9).

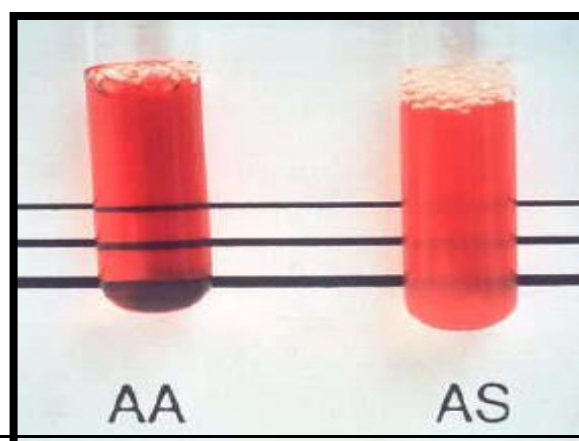


Figure 9 : Test de solubilité. (Wajeman et Galactaros 2001)

L'électrophorèse de l'hémoglobine

Elle permet de séparer les différentes hémoglobines selon leur charge électrique et leur poids moléculaire, sur acétate de cellulose à pH alcalin ou sur citrate agar à pH acide (l'électrophorèse à pH acide permet de distinguer entre les hémoglobines qui migrent au même niveau à pH alcalin comme les hémoglobines C, E et O Arab) et de différencier les formes homozygotes des formes hétérozygotes.

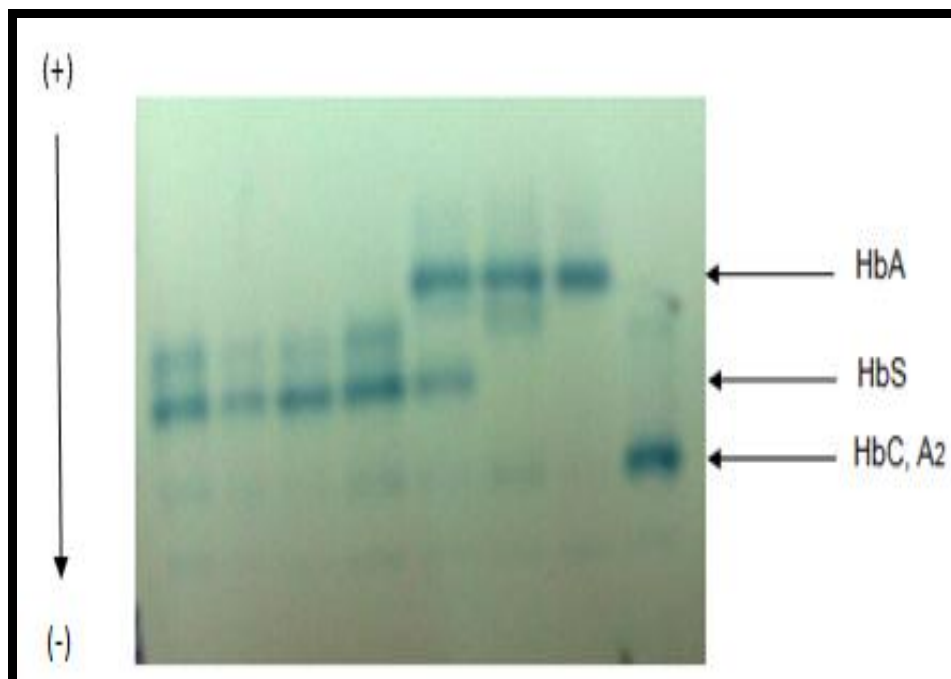


Figure 10 : Electrophorèse de l'hémoglobine sur acétate de cellulose.

L'isofocalisation électrique

C'est une variante électrophorétique, hautement résolutive. Elle permet de séparer des hémoglobines de migration identiques et pH isoélectriques différent. C'est la méthode de référence pour le diagnostic néonatal des hémoglobinopathies (Tchamago, 2006 ; Bachir, 2000). (Figure 11)

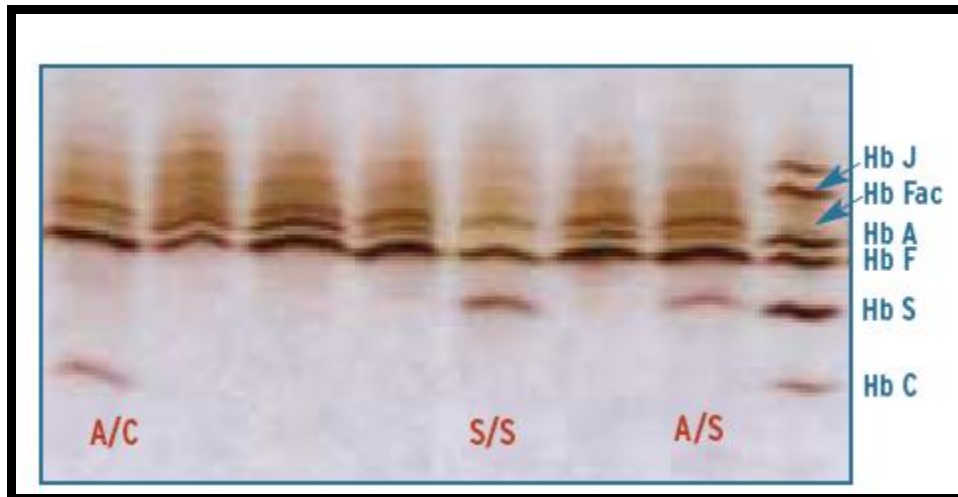


Figure 11 : Détail d'une focalisation isoélectrique utilisée pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose.

Plus de 90 échantillons sont analysés sur une même plaque. Chez le sujet homozygote, la seule hémoglobine adulte visible est l'HbS, et chez les hétérozygotes on observe des hémoglobines A/S et A/C. (Wajman 2004).

Chromatographie (HPLC)

Certains laboratoires optent pour l'utilisation d'une chromatographie (HPLC) afin de séparer les différentes fractions de l'hémoglobine.

Principe

La séparation des différentes fractions et des différents variants d'hémoglobine se fait par l'automate selon la charge dans une colonne poly-cationique échangeuse d'ions, en utilisant un Kit spécifique (Dual Kit-Program reorder Pack). L'élution de chaque hémoglobine est fonction de son affinité vis-à-vis de cette colonne. A l'aide d'un programme intégré spécifique, l'appareil informatisé nous donne un chromatogramme très détaillé précisant le type et les taux relatifs (pourcentage) de chaque hémoglobine, et ceci grâce à un photodétecteur (LED) de longueur d'onde $\lambda = 415\text{nm}$.

L'identification de chaque fraction d'hémoglobine (normale/ou anormale) se fait en se référant aux temps de rétention spécifique à chaque type d'hémoglobine (Siguret et al, 1997) (**Figure 12**).

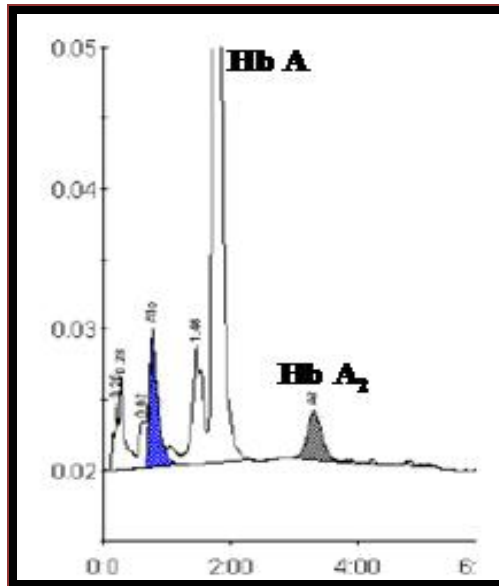


Figure 12 : Profil d'un individu normal

Diagnostic moléculaire de la drépanocytose

PCR (Polymerase chain reaction)

Il s'agit d'amplifier la séquence correspondant à la mutation et de soumettre l'amplicon à une digestion enzymatique (la mutation abolit un site reconnu par Dde I, Mnl I, Mst) ou bien d'utiliser des sondes spécifiques reconnaissant les séquences mutées et normales (Old, 2001).

Southern blot

Cette technique est utilisée dans le diagnostic anténatal de la drépanocytose. Il s'agit de digérer l'ADN du fœtus par des enzymes de restriction et de séparer les fragments par électrophorèse. Par la suite, ces fragments doivent être dénaturés pour séparer les deux brins d'ADN et les transférer sur un filtre de nylon avant d'être hybridés avec deux sondes différentes, l'une reconnaît la séquence mutée et l'autre reconnaît la séquence normale (Etienne et al, 2006).

Modulation de l'expression clinique de la drépanocytose

Introduction

La drépanocytose se manifeste cliniquement avec une très grande hétérogénéité. Elle varie de la mort dans la petite enfance à une vie presque normale, émaillée parfois de complications mineures. Cette variabilité est liée à des facteurs multiples

et intriqués qui interviennent dans les phénomènes vasoocclusifs et mettent en jeu des acteurs cellulaires et moléculaires dont l'activité découle en partie de facteurs génétiques autres que le gène morbide majeur βS et en partie de facteurs environnementaux. C'est ainsi qu'il a été proposé une modulation multigénique des complications de la drépanocytose et une approche, de type gène candidat, a été utilisée (Romana et al, 2009). En dehors des lithiases biliaires ou un seul gène modificateur, codant pour une enzyme intervenant dans la glucuronoconjugaison de la bilirubine, a été identifié, la survenue des autres complications de la drépanocytose semble dépendre de plusieurs loci.

Le premier niveau d'intervention de ces facteurs génétiques est sans aucun doute la polymérisation de l'HbS. En effet l'association de la drépanocytose à l'alpha-thalassémie diminue le phénomène de polymérisation par la diminution de la concentration intraglobulaire de l'HbS : D'un autre côté, l'augmentation de l'expression de l'HbF gène la polymérisation de l'HbS et la diminue. Outre le polymorphisme (SNP) XmnI C/T, à la position -158 en 5' du gène $G\gamma$ sur le chromosome 11 qui a été incriminé dans la régulation exercée en cis sur la production de l'HbF, des polymorphismes ont été recherchés en trans sur d'autres chromosomes :

Des travaux récents ont permis d'identifier d'autres loci impliqués dans le contrôle de l'expression de l'HbF (chromosomes 2, 6,8 et X) :

- Au niveau du chromosome 2, un locus impliqué dans la régulation quantitative de l'HbF (QTL) a été identifié au niveau du gène BCL11A, codant pour une protéine en doigt de zinc et normalement exprimée dans les précurseurs érythroïdes. Il rend compte de 15% de la variance observée.
- Au niveau du chromosome 6, un autre QTL avec trois polymorphismes différents a été mis en évidence dans une région située entre le gène HBS1L, de fonction inconnue et l'oncogène MYB.
- Enfin un contrôle du nombre de cellules F et donc de l'HbF a été mis en évidence Xp22.2 chez des individus normaux et chez les drépanocytaires, se traduisant par une différence significative de l'expression de l'HbF selon le sexe.

En ce qui concerne les accidents vasculaires cérébraux, on peut citer la mise en évidence de leur association avec plusieurs variants de la P sélectine, du TNF α ou du VCAM1 ou leurs participations aux mécanismes physiopathologiques de la drépanocytose a été largement documentée (Romana et al, 2009). De même qu'il a été retrouvé une association entre le gène de l'angiotensinogène et la survenue d'accidents vasculaires cérébraux (Romana et al, 2004).

L'identification des gènes BMP-6 ; TGFBR2 et TGFBR3 de la famille des Transforming Growth Factor β ou du gène KLOTTO (impliqué dans le métabolisme du monoxyde d'azote) a permis de les incriminer comme facteurs de risque des accidents vasculaires cérébraux, du priapisme ou encore dans l'ostéonécrose de la tête fémorale.

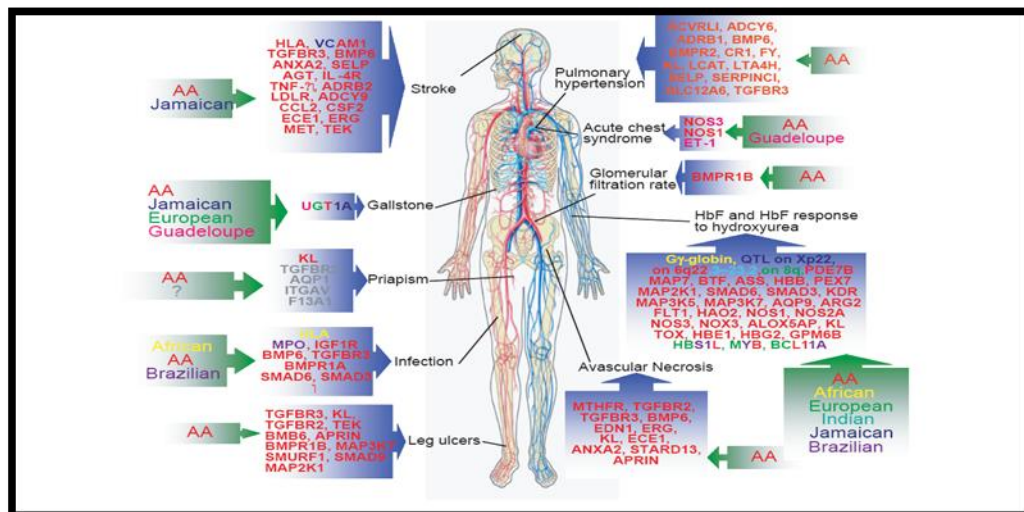


Figure 13 : Les différents gènes modificateurs impliqués dans les complications de la drépanocytose (Driss et al, 2009)

Modulation génique de la lithiase biliaire (*UGT1A1*)

Définition de l'*UGT1A1*

L'uridine diphosphoglucuronosyltransférase (*UGT1A1*) appartient à la famille des UGT1 composée d'enzymes de glucuroconjugaison. Ces enzymes appartiennent à la deuxième phase du métabolisme des xénobiotiques. (Figure 14)

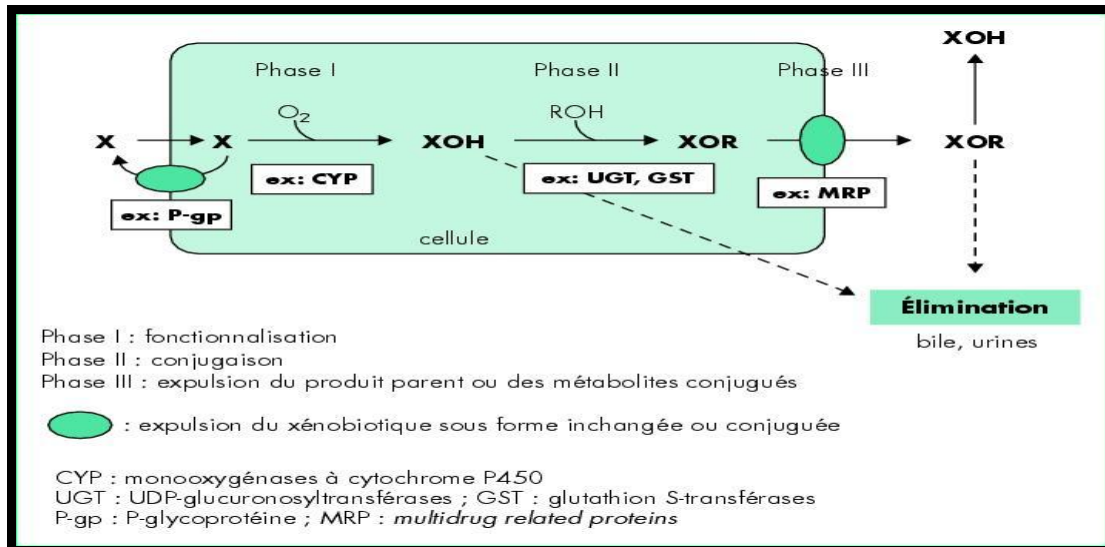


Figure 14: Métabolisme des xénobiotiques (Beaune and Lorient, 2000).

X: xénobiotique; **XOH**: forme oxydée; **XOR**: forme conjuguée. Les xénobiotiques peuvent pénétrer dans la cellule car ils sont généralement hydrophobes. Ils peuvent en être expulsés par des protéines comme la P-gp, produit du gène *mdr*. Ils peuvent ensuite être fonctionnalisés par des enzymes de phase I comme les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP) puis/ou être conjugués par des enzymes de phase II. Les produits de ce métabolisme peuvent ensuite être éliminés de la cellule soit directement, soit par des protéines dites de phase III comme *mrp*. Les produits finaux sont ensuite éliminés dans la bile ou les urines. Bien que des enzymes du métabolisme des xénobiotiques se retrouvent dans tous les tissus, l'essentiel de ce processus se déroule dans les hépatocytes.

La réaction de glucuronocojugaison

La glucuronocojugaison constitue 40 à 70% de l'élimination des xénobiotiques. Cette réaction est catalysée par la famille multigénique des UDP-glucuronosyl transférases (UGTs). Ces enzymes membranaires sont localisées au niveau de la lumière du réticulum endoplasmique des cellules de la majorité des tissus de l'organisme. Les UGTs catalysent le transfert d'un groupement glucuronide provenant du cofacteur acide uridinediphosphoglucuronique sur différents substrats possédant un groupement hydroxyle, carboxyle, amine ou thiol. Le produit obtenu est généralement hydrosoluble, moins toxique et peut être éliminé par la bile et l'urine.

La conjugaison de la bilirubine

UGT1A1 est l'isoforme majeur responsable de la glucuronidation de la bilirubine (figure15).

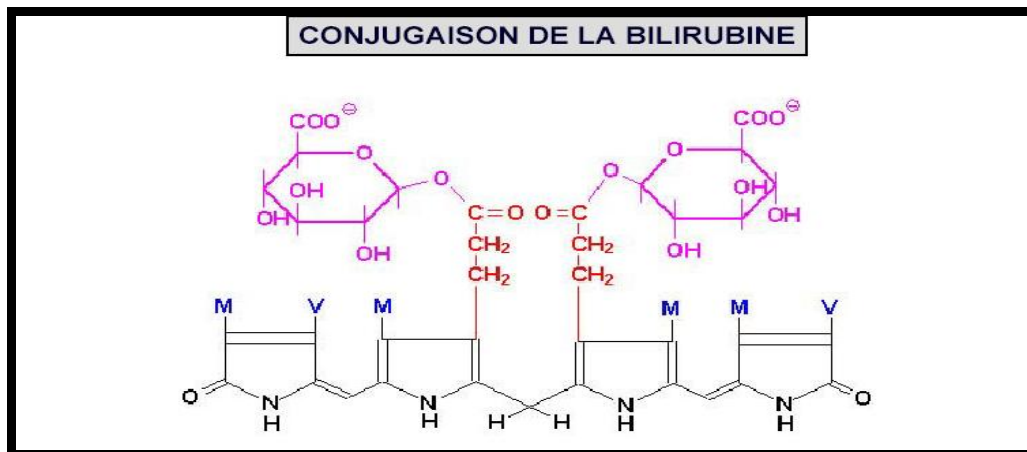


Figure 15: conjugaison de la bilirubine

Dans les hépatocytes, l'UDP glucuronosyl transférase (UGT1A1) ajoute 2 groupements d'acide glyconique à la bilirubine pour produire les conjugués diglucuronides (ou mono-) = acylglucuronides plus solubles dans l'eau.

L'augmentation de la solubilité aqueuse du tétrapyrrole facilite son excrétion biliaire avec les autres pigments biliaries.

Gène de UGT1A1

Le gène de l'*UGT1A1* est localisé sur le chromosome 2 en position q37.1 et il est composé de 5 exons et 4 introns. Le promoteur est caractérisé par la présence d'une boîte TATA de la forme A (TA)₆TAA (située à 22 nucléotides en amont de la coiffe du messenger).



Figure 16 : Localisation chromosomique du gène *UGT1A1*.

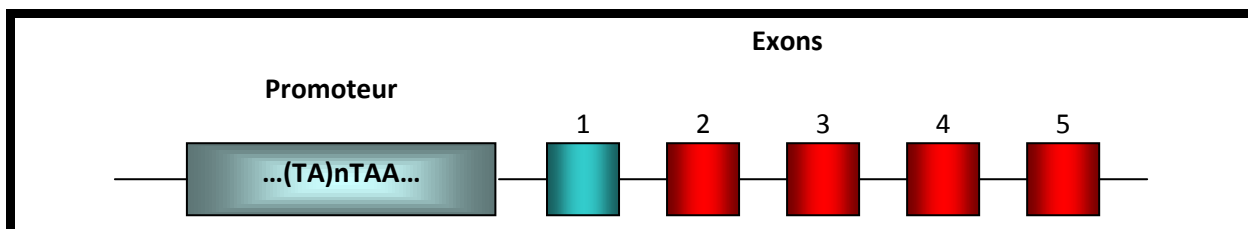


Figure 17: Gène d'*UGT1A1*.

Polymorphismes de l'UGT1A1

Plus de 60 mutations rares au niveau de l'UGT1A1 ont été identifiées et correspondent à des mutations ponctuelles, des délétions ou des insertions. Seulement, un petit nombre d'entre elles ont été trouvées dans la population générale avec une fréquence assez élevée (>1%) pour être classées comme polymorphisme. Outre la forme sauvage, 33 formes alléliques sont répertoriées au niveau du gène, ainsi que toutes les régions codantes, présentent plusieurs formes alléliques (tableau1).

Tableau 1 : Les différentes formes alléliques du gène UGT1A1.

(Tukey et al., 2000)- Del : délétion et Ins insertion.

Allèles	Mutation	Exon	Changement protéique
*1	Sauvage		
*2	879 del 13	2	Protéine tronquée
*3	1124 C par T	4	S375F
*4	1069C par T	3	Q357X
*5	991 C par T	2	Q331DEL44
*6	211G par A	1	G71R
*7	1456 T par G	5	Y486D
*8	625 C par T	1	R209W
*9	992 A par G	2	Q331R
*10	1021 C par T	3	R341X
*11	923 G par T	2	G308E
*12	524 T par A	1	L175Q

*13	508 del 3	1	F170DEL
*14	826 G par C	1	G276R
*15	529 T par C	1	C177R
*16	1070 A par G	3	Q357R
*17	1143 C par G	4	S381R
*18	1201 G par C	3	W335X
*19	1005 G par A	4	A401P
*20	1102 G par A	4	Frameshift
*21	1223 ins G	4	Frameshift
*22	875 C par T	2	A291V
*23	1282 A par G	4	K426EK437X
*24	1309 A par T	5	K437X
*25	840C par A	1	C280X
*26	973 del G	2	Frameshift
*27	686 C par A	1	P229Q
*28	A(TA)7TAA	Promoteur	Réduction de l'activité protéique
*29	1099 C par G	4	R367G
*30	444 T par G	1	L15R
*31	1609 CC par GT	4	P387R
*32	1006C par T	3	R336W

*33	A(TA)8TAA	Promoteur	Réduction de l'activité protéique
*34	A(TA)5TAA	Promoteur	Augmentation de l'activité protéique

f) Association des polymorphismes de l'UGT1A1 avec les maladies

Les polymorphismes particulièrement au niveau du promoteur et au niveau des exons 1, 2, 3,4 et 5 sont incriminés dans diverses pathologies.

Association avec les hyperbilirubinémies congénitales

L'UGT1A1 produit majeur du gène *UGT1* est surtout incriminé dans la glucuroconjugaison de la bilirubine, métabolite neurotoxique de l'hémoglobine.

Plusieurs variantes alléliques ont été associées à la diminution partielle ou totale de l'activité de l'enzyme UGT et entraînant de ce fait un défaut de conjugaison, voire de l'élimination de la bilirubine.

Cette bilirubine non conjuguée regagne le sang et entraîne une hyperbilirubinémie, cause de l'ictère (jaunisse) cutanéomuqueux. Ce type d'ictère est rencontré dans trois syndromes, à savoir l'ictère néonatal de Crigler et Najjar de type I et de type II et la maladie de Gilbert, beaucoup plus bénigne et qui se manifeste à l'adolescence.

Les polymorphismes de répétition au niveau du promoteur ainsi que le polymorphisme de substitution au niveau de l'exon 1 ont été incriminés.

La variation dans le nombre de répétitions du dinuclotide de la région TATA-box du promoteur de l'UGT1A1 A(TA)_nTAA a permis d'identifier quatre variants alléliques (n=5:UGT1A1*33; n=6: UGT1A1*1; n=7: UGT1A1*28 ET n=8:UGT1A1*34). Il a été constaté que l'augmentation du nombre de répétition dans le promoteur entraîne une diminution du taux de transcription de l'UGT1A1et inversement. Le polymorphisme A(TA)₇TAA(*28) est associé à la maladie de Gilbert. Il en est de même du polymorphisme G211A (*6) de l'exon1 mais uniquement pour la population asiatique.

Implication dans les lithiases pigmentaires

Plusieurs études ont rapporté l'implication du polymorphisme A(TA)_nTAA dans la lithogénèse chez des patients qui présentaient des hyperbilirubinémies (Krawczyk M et al, 2011). Les patients atteints des maladies du globule rouge sont les plus touchés. On cite la drépanocytose, les thalassémies, le déficit en glucose 6 phosphate et la sphérocytose. En effet, ce type de maladie cause une hémolyse chronique entraînant l'hyperbilirubinémie. Les cas de la drépanocytose et de la thalassémie sont les plus étudiés. Les lithiases biliaires pigmentaires se développent dès l'âge pédiatrique et on assiste même à des cholécystectomies précoces. Des études ont montré l'association des génotypes ayant l'allèle (TA)₇ à l'état homozygote ou hétérozygote avec le risque de lithogénèse chez les drépanocytaires et les thalassémiques (Galanello R *et al*, 2001; Passon RG *et al*, 2001 ; [Borgna-Pignatti C et al, 2003](#) ; Fertrin KY *et al*, 2003 ; Haverfield EV *et al*, 2005). Ces études ont proposé le variant (TA)₇ comme biomarqueur pour les lithiases biliaires pigmentaires. Une autre étude a rapporté l'implication du variant (TA)₈ insertion de deux paires de base dans la lithogénèse chez les enfants et les adultes drépanocytaires (Chaar V *et al*, 2005).

L'implication du variant (TA)₇ dans la formation des lithiases biliaires pigmentaires a été rapporté dans la population grécque chez des patients non atteints de maladies du globule rouge (Kitsiou-Tzeli S *et al*, 2003 ; Tse zou A *et al*, 2009).

La modulation génique des crises vaso-occlusives et de l'infection chez le drépanocytaire

Introduction

Les drépanocytaires sont plus sensibles aux pneumonies, à la grippe, mais aussi aux hépatites, aux infections urinaires et aux septicémies (Bagué et Castello-herberteau 2001). Les infections provoquent des complications propres à la drépanocytose telle que l'aggravation brutale de l'anémie et l'augmentation du risque de crises vasoocclusives, en favorisant la fièvre, l'hypoxie et la déshydratation, à l'origine de la falciformation et l'augmentation du risque d'occlusions vasculaires. L'infection est donc une affection très sévère de la drépanocytose, et peut être une cause non négligeable dans l'enfance (Booth et al 2010). Plusieurs études ont porté beaucoup

d'intérêt pour cette complication et surtout à l'aspect de modulations génétiques. Dans ce cadre, des travaux ont été rapportés sur l'implication des chimiokines dans cette complication (Adaywe et al 2006 ; Dossou-Yovo et al 2009).

Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire 6 et 14 KDa (Burteau et al, 2007), initialement caractérisés par leur capacité à induire la migration des leucocytes (Segerer S ; Zlotnika). Il existe actuellement plus de 44 chimiokines et 21 récepteurs de chimiokines décrits (Segerer S ; Nelson PJ).

La superfamille des chimiokines peut être subdivisée en quatre sous familles (C, CC, CX, CXC et CX3C), selon la position des deux premiers résidus de cystéines (C) compris dans un motif de 4 cystéines. Ces deux cystéines peuvent être séparées par 1 ou 3 acides aminés (désignés par X) (**Figure18**).

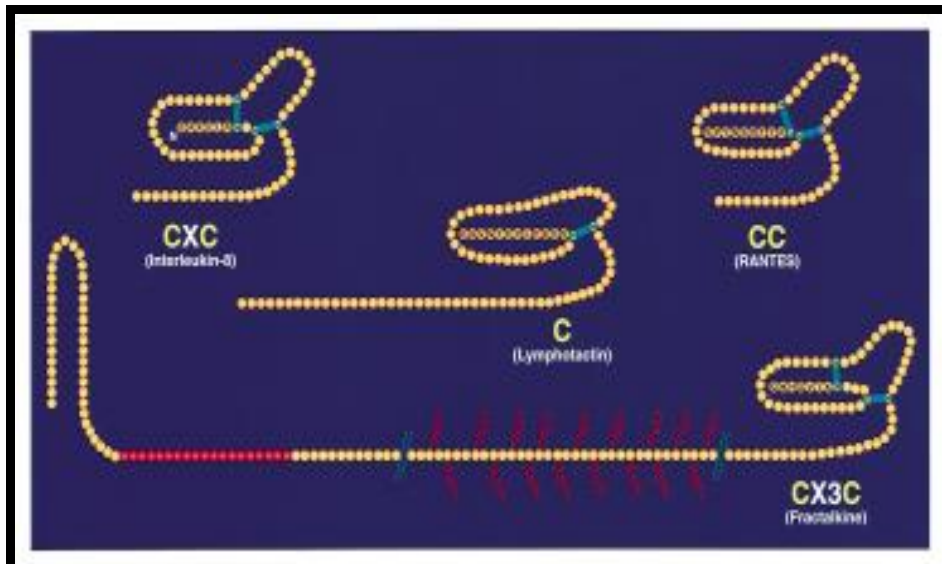
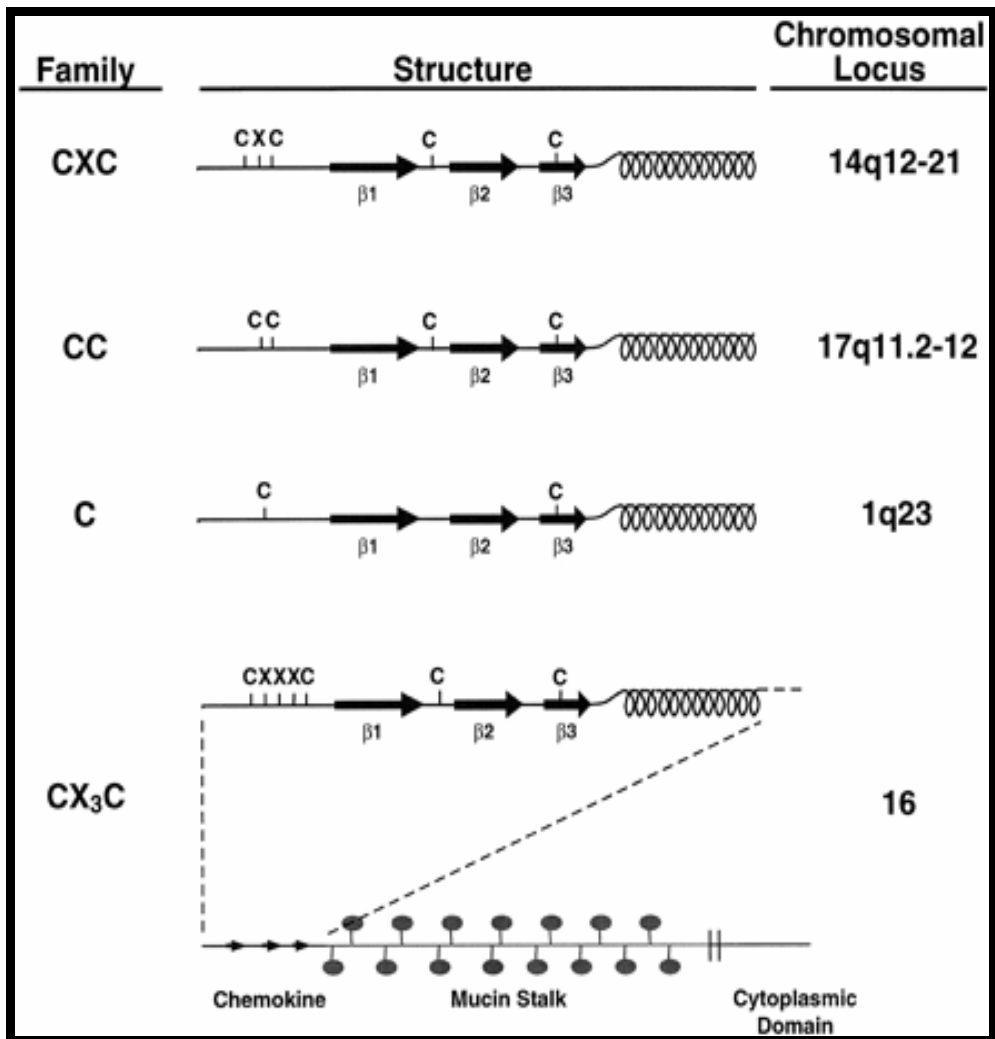


Figure 18 : Familles des chimiokines (Rollins, 1997).

La nomenclature officielle utilisée pour décrire les chimiokines est fondée sur la sous famille à laquelle elles appartiennent : par exemple la chimiokine MCP-1 est

dénommée CCL2 (pour CC chimiokine ligand 2 (Zoltanica A) ou la chimiokine RANTES dénommée CCL5. En ce qui concerne les chimiokines de type CXC, un sous groupe comprend un motif d'acides aminés supplémentaire, ELRCXC (acide glutamique-Leucine-Arginine-Cystéine-X-Cystéine). Ces chimiokines agissent généralement comme chimioattractant des neutrophiles, alors que le sous groupe CXC dépourvu de motif ELR, se lie sur des récepteurs différents et sont plus actives sur les lymphocytes. La sous famille des chimiokines C est constituée de deux membres : la lymphotactine α (XCL1) et la lymphotactine β (XCL2).

Enfin, un seul exemplaire de la sous famille CX3C est connu, il s'agit de la fractalkine qui interagit faiblement et directement avec les membranes cellulaires par l'intermédiaire d'un domaine mucine et joue à la fois le rôle de chimiokine et de molécule d'adhésion.

Certaines chimiokines jouent un rôle important dans les processus inflammatoires, alors que d'autres sont importantes dans le trafic normal des leucocytes vers les organes lymphoïdes (Rossi D et al, 2000 ; Zoltanica A et al, 2000 ; Murphy PM et al, 2000 ; Campbell J et al, 2000).

L'expression des chimiokines est induite en général par les stimuli proinflammatoires tels que le TNF α , I, II β , l'INF γ et le lipopolysaccharide (LPS). Les radicaux oxygénés libres augmentent l'expression des chimiokines et pourraient représenter un mécanisme commun de libération des chimiokines, après une agression.

Les récepteurs des chimiokines

L'action biologique des chimiokines est médiée par des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (10, 19 et 22). Ils appartiennent à la superfamille des GPCR (G Protein Coupled Receptor) car ils ont un motif DRYLAIV, au niveau de la deuxième boucle intracellulaire, participant à la fixation des protéines G impliquées dans la transduction du signal, suite à la fixation d'une chimiokine à son récepteur.

Les récepteurs des chimiokines sont dénommés selon la classe des chimiokines qui se lie à eux. La spécificité de ces récepteurs pour leur ligand n'est pas étroite : un récepteur donné peut reconnaître plusieurs chimiokines d'une même sous famille.

Les chimiokines du groupe CC et CXC peuvent aussi se fixer sur un autre type de récepteur appelé DARC (pour Duffy Antigen Receptor for Chemokines). Il a une structure à 7 domaines transmembranaires, typique des récepteurs couplés aux protéines G, sauf que le motif DRYLAIV est absent dans sa deuxième boucle intracellulaire et donc ce récepteur ne lie pas les protéines G et n'active pas leurs voies de signalisation.

Les chimiokines et leurs récepteurs dans les phénomènes inflammatoires

Toutes les chimiokines ainsi que leurs récepteurs qui interviennent dans les processus inflammatoires sont susceptibles de moduler l'expression clinique de la drépanocytose voire de toutes les maladies inflammatoires qu'elle qu'en soit l'origine.

A titre d'exemples :

Dans les pathologies rénales, incluant les lésions tubulo interstiellles ou les lésions glomérulaires, les chimiokines intéressées et intervenant à des degrés variables sont CCL2/MCP-1 ; CXCL8/IL8 ; CXCL10/IL10 et CCL5/RANTES. Il est en est de même de leurs récepteurs respectifs.

Dans les phénomènes d'athérosclérose :

Les deux chimiokines CCL2/MCP-1 et CXCL8/IL8, ainsi que leurs récepteurs respectifs interviennent d'une façon prépondérante dans le développement de l'athérosclérose.

Dans la drépanocytose :

Les chimiokines RANTES (CCL5) et MCP-1 (CCL2) ainsi que leurs récepteurs respectifs DARC et CCR2 ont été les plus incriminés dans les phénomènes inflammatoires associés à la drépanocytose. (Figure19)

contrôle les fonctions effectrices des éosinophiles telle que la polymérisation de l'actine.

Elle induit aussi la dégranulation des lymphocytes TCD8 cytotoxiques et favorise la différenciation des lymphocytes TCD4 auxiliaires vers un profil T helper.

Elle peut se fixer sur plusieurs récepteurs appartenant à la famille des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G : CCR1, CCR3, CCR4 et CCR5 exprimés sur les leucocytes, ainsi qu'au récepteur localisé à la surface des globules rouges, DARC (Proudfoot & Chvatchko, 1999 ; Benamar et al, 2008).

Structure génomique

Le gène de RANTES fut isolé en 1988 à partir des lymphocytes T stimulés. Il est de 8.8 Kb, localisé sur le chromosome 17q11.2-q12 et caractérisé par 3 exons et 2 introns (Russo-Marie et al, 1998)(Figure 20).

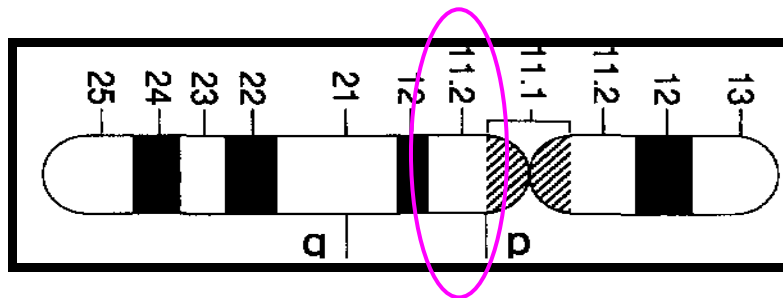


Figure 20 : Localisation du gène RANTES sur le chromosome 17 (Schalle, 1991)

Structure tridimensionnelle de la protéine

La protéine RANTES est formée par 68 acides aminés. Elle comprend une extrémité N-terminale flexible impliquée dans la liaison aux récepteurs, un feuillet constitué de trois brins β antiparallèles ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$), trois boucles (boucle N située après la région N-terminale, boucle 30s entre $\beta 1$ et $\beta 2$, boucle 40s entre $\beta 2$ et $\beta 3$) et une extrémité C-terminale en hélice α (Shaw et al, 2004).

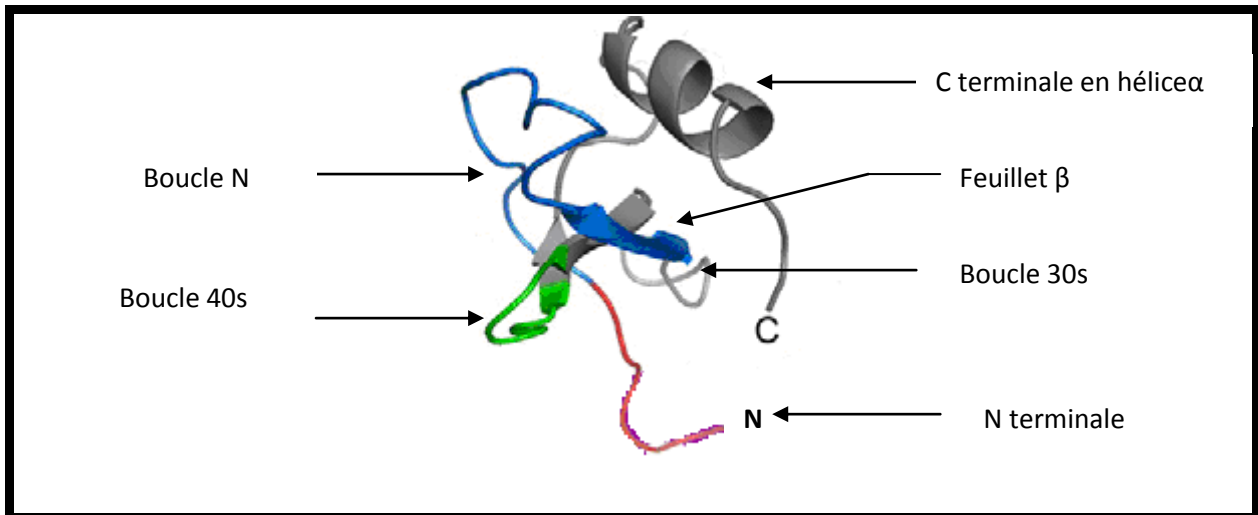


Figure 21 : Structure tridimensionnelle du RANTES (Vangelista et al, 2008)

A faible concentration la chémokine RANTES peut agir directement sur son récepteur sous forme monomérique ou bien dimérique, la dimérisation du RANTES se produit au niveau de l'extrémité N-terminale. Cependant, à forte concentration elle agit sous forme de multimère en interaction avec les GAGs. LA multimérisation se fait par une liaison entre les résidus Glu 66 Glu 26 chargés négativement, situant à la surface de la protéine RANTES, et des résidus chargés positivement, localisés sur d'autres molécules RANTES (Appay & Rowland-Jones, 2001).

Polymorphismes du gène RANTES

Il existe plusieurs sites polymorphes au niveau du gène RANTES, dont les plus fréquents sont -403G/A, -28C/G dans la région promotrice et IN1.1T/C dans l'intron 1 (Figure 24). Ces polymorphismes sont extensivement étudiés en relation avec plusieurs pathologies telles que : HIV et l'Asthme.

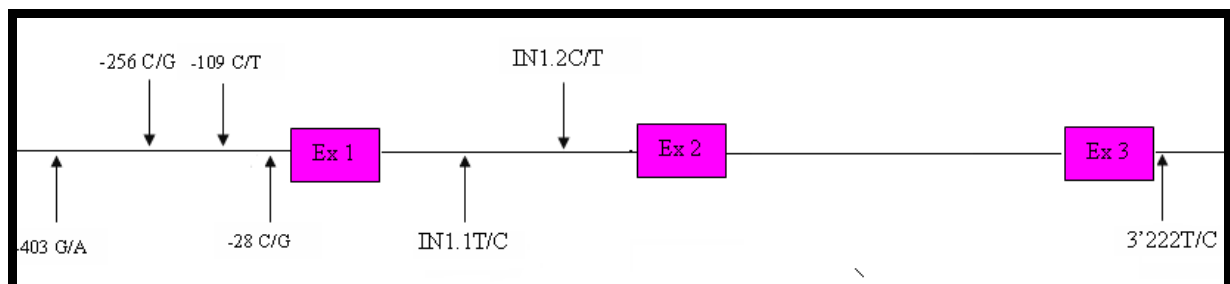


Figure 22 : Polymorphismes du gène RANTES

Dans le but d'identifier l'effet des polymorphismes -403G/A, -28C/G et IN1.1T/C sur l'expression du gène RANTES, une construction génétique faite, basée sur le clonage d'un gène rapporteur, tel que le gène codant pour la luciférase (enzyme contrôlant l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine provoquant l'émission d'un photon), dans un vecteur pGL3 transfecté dans une cellule U937, en plaçant le promoteur du gène RANTES en amont et le fragment intronique IN1.1T ou IN1.1C en aval de ce gène rapporteur. La mesure de l'activité montre que la mutation -403A et -28G augmentent l'activité du promoteur de RANTES par contre la mutation intronique IN1.1C diminue l'activité transcriptionnelle (An et al, 2002). (Figure 23)

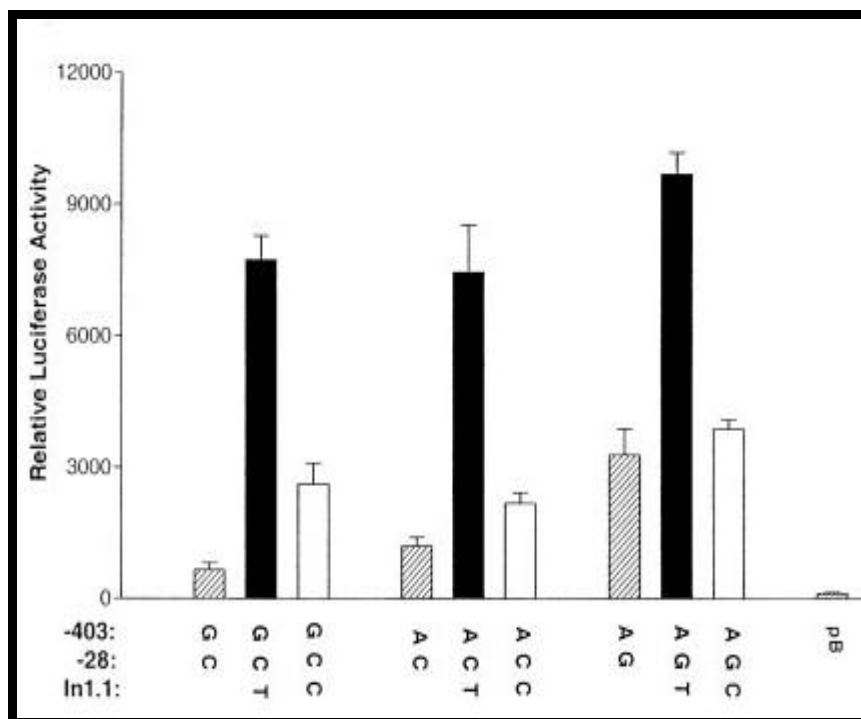


Figure 23 : Mesure de l'activité de la luciférase (An et al, 2002)

RANTES et drépanocytose

La drépanocytose est une maladie occasionnant plusieurs réactions inflammatoires. En effet de nombreux facteurs extraérythrocytaires comme les cellules endothéliales, les leucocytes et les molécules d'adhésion interviennent dans la physiopathologie de cette maladie.

Le contexte proinflammatoire de la drépanocytose peut entraîner la libération de certaines chémokines telle que RANTES, dont le rôle semble être important. En effet,

l'incubation des globules rouges en présence de RANTES entraîne la modification de la constante d'affinité intracellulaire de Ca^{2+} et l'augmentation de la vitesse maximale du canal Gardos, ce qui aboutit à une perte d'ions K^+ et de H_2O provoquant une déshydratation rapide et sévère, d'où la falciformation des érythrocytes et l'obstruction des microvaisseaux qui génèrent des crises vaso-occlusives. Cette observation est détectée chez les globules rouges duffy positifs (globules rouges exprimant le récepteur DARC) mais pas chez les globules rouges duffy négatifs (Rivera et al, 2002 ; Durpès et al, 2010). (Figure24).

Dans le présent travail, nous nous intéressons à certains polymorphismes du gène RANTES qui semblent être impliqués dans la modulation de la maladie drépanocytaire et pourraient être associés avec l'apparition de crise vaso-occlusive et l'infection. Un échantillon de drépanocytaires tunisiens sera étudié afin de tester l'association des polymorphismes du gène RANTES avec l'exemple de la maladie drépanocytaire.

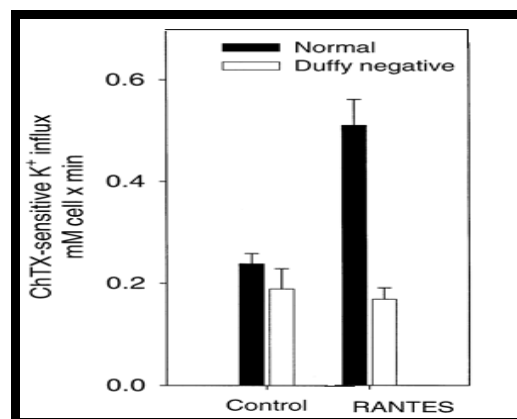


Figure 24 : Effet de la chémokine RANTES sur l'activité de canal Gardos chez les globules rouges duffy positive et duffy négative (Rivera et al, 2002)

DARC (duffy antigen receptor)

Définition et rôles

Les antigènes du groupe sanguin Duffy (Fy) présentent un double intérêt biologique. Tout d'abord ce récepteur a été reconnu comme le récepteur érythrocytaire de Plasmodium knowlesi et de plasmodium vivax, parasites de la malaria (Miller et al, 1975, Barnwell et al, 1989).

Ce n'est que par la suite qu'il a été montré que DARC représente aussi le récepteur pour une famille de polypeptide chimiotactique appartenant soit à la sous famille de type C-C (RANTES-MCP-1) soit à la sous famille de type CXC (IL8 et MGSA).

Ces propriétés confèrent aux antigènes Fy, un rôle potentiel dans la réponse inflammatoire et qui consiste à emprisonner les chimiokines circulantes et à limiter leur action tissulaire au site de production. Ils sont aussi impliqués dans le recrutement des leucocytes.

Le système duffy est composé de deux antigènes Fy^a et Fy^b, produits par deux allèles codominants Fy^{*A} et Fy^{*B} définissant quatre phénotypes Fy(a+b-); Fy (a+b+); Fy (a-b+) et Fy (a-b-).

Une étude menée chez les patients présentant les phénotypes Duffy positifs [Fy(a+b-); Fy (a+b+); Fy (a-b+)] ou Duffy négatif Fy (a-b-) (Dupres, Marie-Claude 2010) a montré que IL8 et RANTES favorisent, seulement chez les patients Duffy positifs, le déshydratation des globules rouges via l'activation du canal Gardos et l'adhérence des GR aux ligands VCAM1 et fibronectine via l'activation de l'intégrine VLA4 exprimée par les réticulocytes.

La structure génique de DARC

DARC est codé par un gène localisé sur le chromosome 1 en position.q22-1.q23 (**figure 25**)

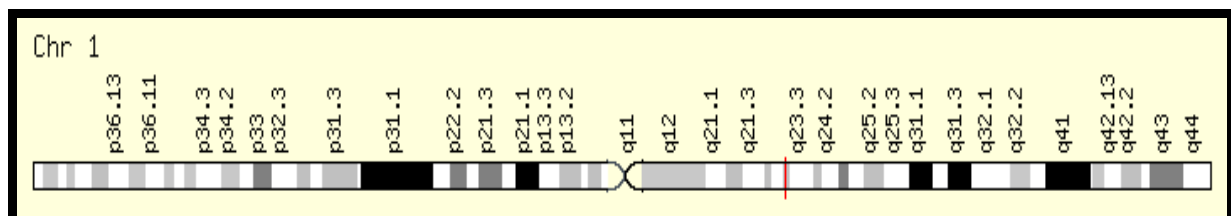


Figure 25 : Structure génétique de DARC (RefSeq DNA sequence: NC 000001.10 NT 004487.19).

Polymorphismes de DARC

La substitution de C/T à la position -33 décrite auparavant comme -46 par Tournamille *et al*, 1995a altère l'activité du promoteur dans les cellules érythroïdes en perturbant un site de liaison pour le facteur de transcription GATA1 érythroïdes entraînant un globule rouge duffy négatif (figure26) (Pogo et Chaudhuri, 2000).

Une délétion de 14 paires de bases (nucléotides 287-301) résulte en un décalage du cadre de lecture ce qui introduit un codon stop et produit une protéine tronquée.

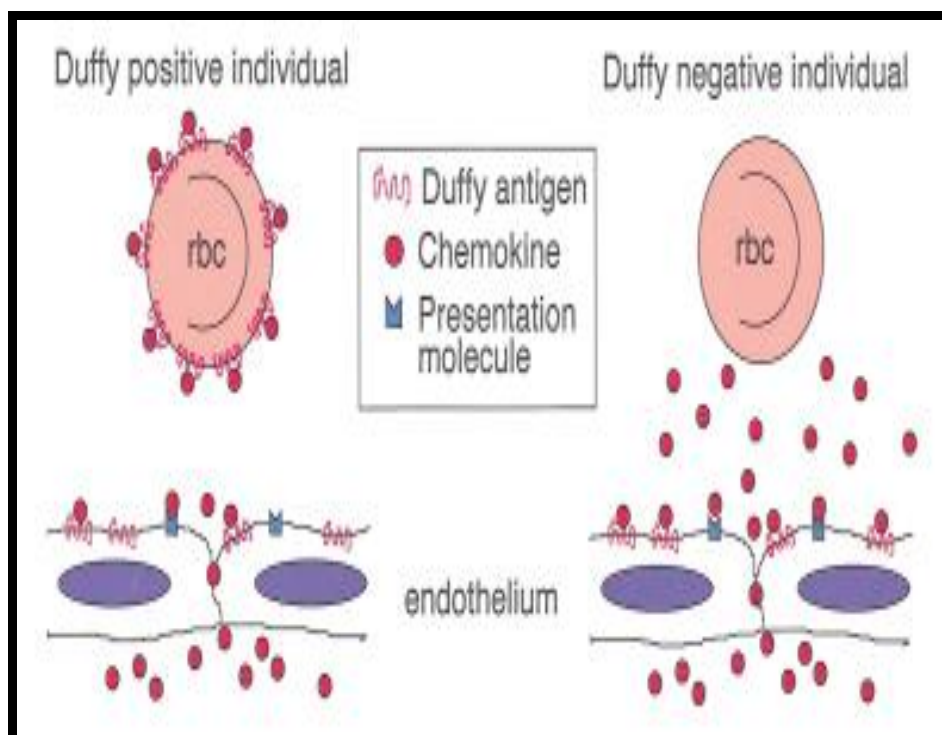


Figure 26 : Fixation des chémokines sur les globules rouges Duffy positive (Nickel et al, 1999).

g) MCP-1/CCL2

(1) Définition

MCP-1 ou « Monocyte Chemoattractant Protein » ou CCL2 (CC chemokine ligand 2) est une chimiokine de la famille CC (Matsushima et al.1989; Yoshimura et al., 1989b)., qui est produite par un grand nombre de cellules, telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules épithéliales, les kératinocytes et les cellules pulmonaires. Les inducteurs de cette chimiokine sont

nombreux et comprennent de nombreuses cytokines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4...), des bactéries (*Streptococcus*, *Mycobacterium*, *E. coli*), des composants bactériens (LPS, LTA...) (Graveline *et al.*, 2007 ; Tong *et al.*, 2003 ; Kohwiwattanagun *et al.*, 2007 ; Luo *et al.*, 2007 ; Von Aulock *et al.*, 2003) et des virus (Influenzae, protéine LMP1 du EBV) (Dessing *et al.*, 2007, Buettner *et al.*, 2007).

L'infection par *S. aureus* d'ostéoblastes ou de cellules endothéliales humaines entraîne une augmentation de la sécrétion de MCP-1 (Bost *et al.*, 2001 ; Tekstra *et al.*, 1999).

(2) Rôle de MCP-1/CCL2

Les rôles biologiques de MCP-1 sont nombreux selon le type cellulaire concerné. C'est une chimiokine pro-inflammatoire qui a la particularité de mobiliser le calcium intracellulaire des monocytes, des lymphocytes et des macrophages, tout en ayant un effet chimioattractant sur ces cellules. MCP-1 est le ligand de CCR2.

C'est un puissant chimioattractant qui n'est, dans les conditions normales, pas exprimé à forte concentration dans le système nerveux central (SNC). Son augmentation se fait cependant rapidement après un dommage, et ce, surtout au niveau des astrocytes, mais aussi au niveau des macrophages, de la microglie et des neurones (Kuziel *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). MCP-1 est capable d'attirer sur le lieu de l'inflammation les cellules exprimant le récepteur CCR2 (Kuziel *et al.*, 1997; Siebert *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002), ce qui comprend entre autres les monocytes, les lymphocytes T, les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules NK (Allavena *et al.*, 1994; Carr *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1995; Taub *et al.*, 1995a; Taub *et al.*, 1995b). MCP-1 est responsable de l'activation de son récepteur en le rendant sous la forme dimérique. (Zhang et Rollins, 1995). L'expression de MCP-1 dans la plupart des conditions inflammatoires est corrélée à l'infiltration de monocytes sur le site de l'inflammation (Tesch *et al.*, 1999). Les souris déficientes en MCP-1 ou en son récepteur CCR2 sont résistantes à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, à savoir que les leucocytes ne peuvent pénétrer dans le SNC. Le TNF_ joue un rôle critique dans cette maladie en induisant l'expression de MCP-1 par les cellules gliales associées à la BHE (Owens *et al.*, 2005).

MCP-1 joue un rôle aussi bien dans l'immunité innée qu'adaptative. C'est notamment un facteur important pour la différenciation des cellules Th0 en Th2 *in vitro*, via un mécanisme dépendant d'IL-4 (Huang *et al*, 2001a). *In vitro*, l'attachement des monocytes aux astrocytes (par le biais notamment des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1) conduit à une production de MCP-1 par les deux types cellulaires, cette augmentation de l'expression étant en partie médiée par les cytokines pro inflammatoires IL-1_α et TNF_α (Andjelkovic *et al*, 2000). L'interaction entre les cellules endothéliales et les monocytes conduit également à une augmentation de MCP-1 (ainsi que d'IL-8) qui est indépendante d'une réponse précoce d'IL-1 ou du TNF (Lukacs *et al*, 1995). Le TNF module l'expression de MCP-1, et ce, via les formes réactives de l'oxygène (FRO) (Chen *et al*, 2004). Il semble que MCP-1 lui-même puisse auto-réguler négativement sa synthèse et sa libération au niveau neuro-vasculaire (Ge *et al*, 2008).

MCP-1 est capable d'induire la production de MMP-9, une protéase impliquée dans les dommages tissulaires (Robinson *et al*, 2002).

Des travaux rapportent qu'une sur-expression de MCP-1 par les astrocytes empêche l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (Elhofy *et al*, 2005).

(3) Structure génique de CCL2

Le gène CCL2 est localisé sur le chromosome 17 au niveau de la position 17q11.2-q12 (Mehrabian *et al*, 1991) (**Figure 27**).

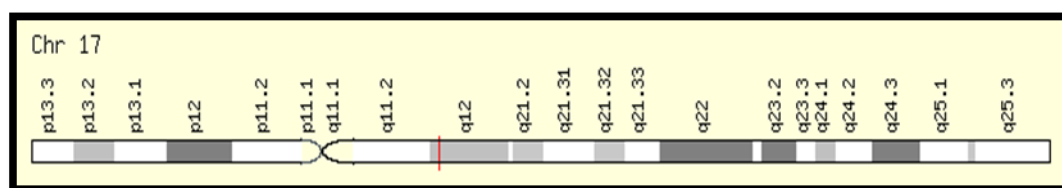


Figure 27 : Localisation chromosomique du gène CCL2

(URL=<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCL2&search=CCL2>)

Le gène CCL2 fait 1.93Kb et est composé de trois exons et deux introns et génère typiquement un seul transcrit d 'ARNm de 0.8 kb (Schall TJ, 1991; Oppenheim *et al*, 1991) (Figure 28).

Le premier et second intron paraissent être conservés dans cette famille et le premier intron sépare la séquence signal de la protéine mature. Le premier exon contient une séquence non-traduite en 5' et les nucléotides codant pour la séquence du peptide signal. Le second exon code pour la moitié N-terminale de la protéine mature, alors que le troisième exon code pour la partie C-terminale ainsi que la région non-traduite en 3' de la protéine (Schall.T.J., 1991).

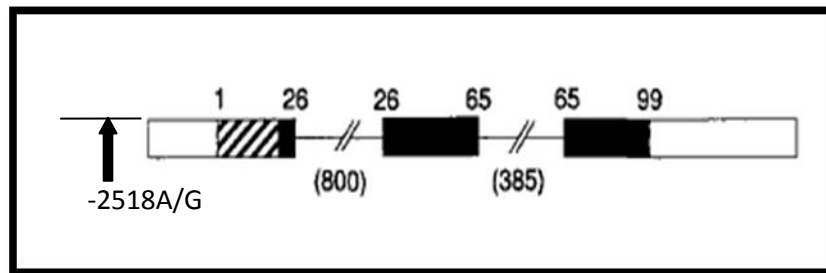





Figure 28 : Organisation chromosomique du gène CCL2 (Schall, 1991)

 Peptide signal de codage des nucléotides

 Exons avec espaces ouverts représentant les régions non traduites

 Nucléotides codant pour des protéines matures

(4) Les polymorphismes du gène CCL2

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés au niveau du gène CCL2 (**tableau 2**).

Tableau 2 : Différents polymorphismes du gène CCL2

rs4586	rs2857656	rs3917886	rs13306748	rs62054928
rs13900	rs2857657	rs3917887	rs13306749	rs71804933
rs1014542	rs3091332	rs3917888	rs13306750	rs74988151
rs1024611	rs3760396	rs3917904	rs28730833	rs75284178
rs2190972	rs3760397	rs11575010	rs34095515	rs75433364
rs2215182	rs3760398	rs11575011	rs36231142	rs76813041

rs2857655	rs3760399	rs11575012	rs41507946	rs79290195
-----------	-----------	------------	------------	------------

Dans notre étude on s'intéresse à l'étude du polymorphisme -2518 A/G (rs1024611) situé dans la région du site d'initiation de la transcription du gène CCL2 en position -2518. Ce polymorphisme induit une augmentation de l'expression de CCL2 en réponse à un stimulus inflammatoire (Rovin *et al*, 1999).

Dans la littérature, plusieurs pathologies ont été associées avec le gène CCL2 tel que ; l'athérosclérose et l'arthrite rhumatoïde.

(5) Structure protéique de CCL2

L'ADNc du MCP-1 humain code pour une protéine comprenant 99 acides aminés.

La protéine MCP-1 humaine est d'abord produite en tant que précurseur contenant une séquence signal de 23 acides aminés. Après clivage de ce peptide signal, une protéine mature de 76 acides aminés est sécrétée (Van Coillie *et al*, 1999; Deshmane *et al*, 2009).

La structure tridimensionnelle de CCL2 est composée d'une partie N-terminale non structurée avant la première cystéine, de trois brins β séparés par de petites boucles N et d'une partie C-terminale en forme d'hélice α après la dernière cystéine (Nagasawa 1999, Crump M. 1997). Cette structure est maintenue par deux ponts disulfures (Figure 29)

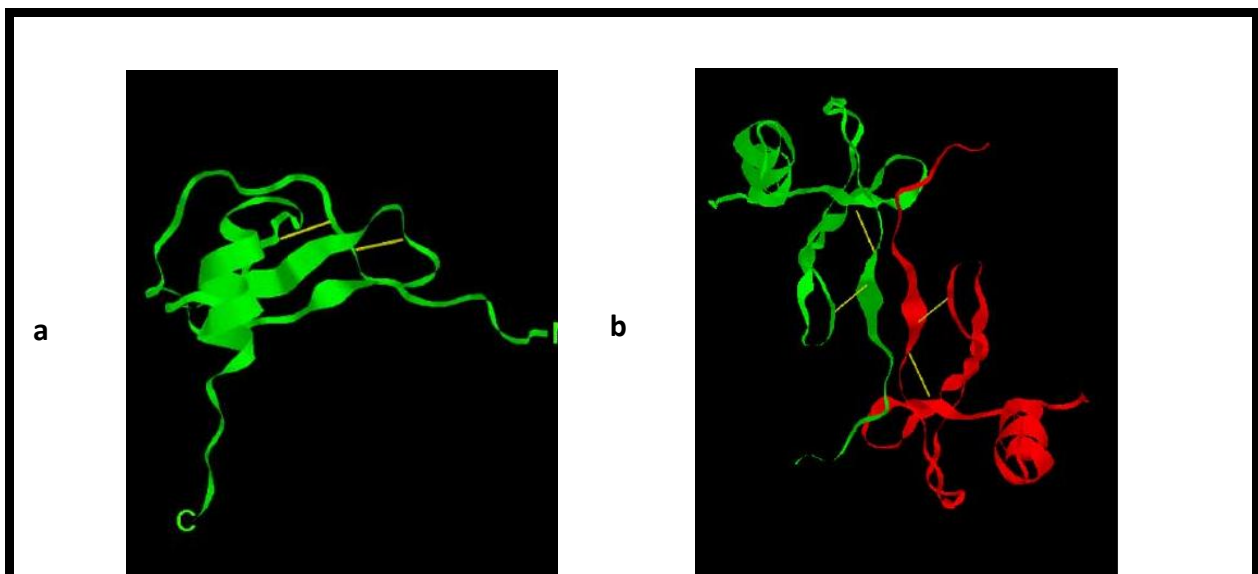


Figure 29 : Structure 3D de CCL2 (Handel et Domaille, 1996)

(6) Relation entre CCL2 et la drépanocytose

Le contexte proinflammatoire de la drépanocytose peut entraîner la libération de certaines chimiokines telle que CCL2, dont le rôle semble être important dans l'aggravation de la maladie. En effet, la chimiokine CCL2, est un facteur majeur de l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral dans une variété de conditions neuropathologiques associées à l'inflammation, y compris les accidents vasculaires cérébraux (Oliver *et al*, 2007). En outre, des études ont indiqué que CCL2 et son récepteur CCR2 pourraient avoir un rôle important dans la régulation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

De récentes études ont montré l'association entre le polymorphisme rs4586 du gène CCL2 et les AVC chez les drépanocytaires (Sebastiani *et al*, 2005; Driss *et al*, 2009).

Dans le présent travail, nous nous intéressons à un autre polymorphisme, situé au niveau du promoteur du gène CCL2 qui pourrait être impliqué lui aussi dans la modulation de la maladie drépanocytaire et pourrait être associé à l'apparition des accidents vasculaires cérébraux.

CCR2

Définition

Le récepteur aux chimiokines CCR2 est un membre de la famille des récepteurs aux CC-chimiokines qui lie les chimiokines CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 et CCL13 (Charo, 1999; Jiang *et al*, 1992). C'est un récepteur transmembranaire formé de 7 domaines et couplé à une protéine G (RCPG).

Rôles physiologiques de CCR2

CCR2 est exprimé par les lymphocytes T mémoires de façon inductible et sur les monocytes de façon constitutive. Il est aussi exprimé sur les macrophages et les

cellules dendritiques (Frade *et al*, 1997; Rabin *et al* 1999; Murphy *et al*, 2000). Ce récepteur joue un rôle important dans le recrutement de monocytes dans les lésions athérosclérotiques et dans l'hyperplasie intinale secondaire à une lésion artérielle (Boring *et al*, 1998 ; Charo & Taubman, 2004).

CCR2 (récepteur auquel CCL2 se lie préférentiellement) est exprimé de façon constitutive sur les neurones et les astrocytes dans plusieurs régions cérébrales y compris le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet suggérant que CCL2 et CCR2 jouent un important rôle physiologique et physiopathologique dans le SNC (Banisadr *et al*, 2002).

(3) Structure protéique de CCR2

Comme tous les autres RCPGs, CCR2 possède sept segments transmembranaires, trois boucles intracellulaires, trois boucles extracellulaires, un domaine N-terminal et un domaine C-terminal (Gether, 2000). Il possède deux cystéines conservées formant un pont disulfure entre les première et deuxième boucles extracellulaires et il possède aussi deux cystéines supplémentaires formant un second pont disulfure entre le domaine N-terminal et la troisième boucle extracellulaire (Figure 30). Ces deux ponts disulfure apparaissent nécessaires pour le repliement du récepteur, la liaison de leur ligand et/ou leur capacité à activer les cascades intracellulaires (Blanpain *et al*, 1999). De plus, CCR2 possède un segment amino-terminal riche en résidus acides et tyrosines sulfatées, une troisième boucle intracellulaire courte et basique et un motif DRYLAIVHA relativement conservé au niveau de la deuxième boucle intracellulaire. La spécificité de liaison de ligands à CCR2 est portée par les domaines extracellulaires et, plus particulièrement la deuxième boucle extracellulaire (Samson *et al.*, 1997).

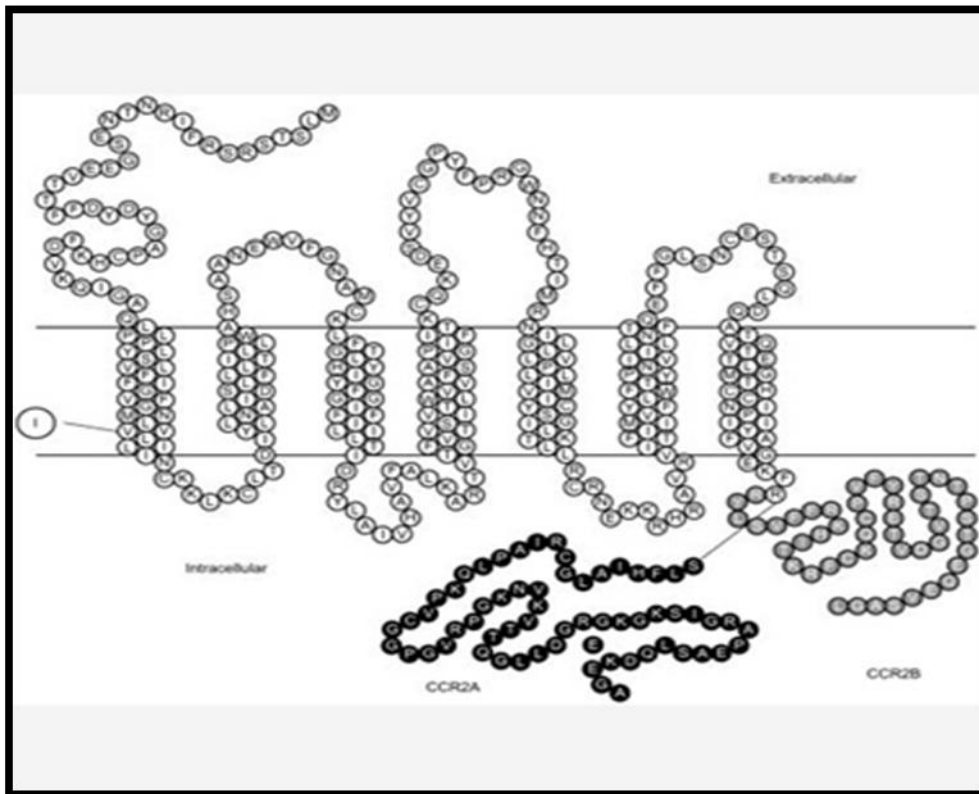


Figure 30: Structure du récepteur CCR2 avec ses deux isoformes CCREA et CCR2B (Nakayama et al, 2004)

(4) Structure génique de CCR2

Le gène CCR2 est localisé sur le chromosome 3p21.31 avec un cluster de récepteurs de gènes pour les chimiokines (Figure 31).

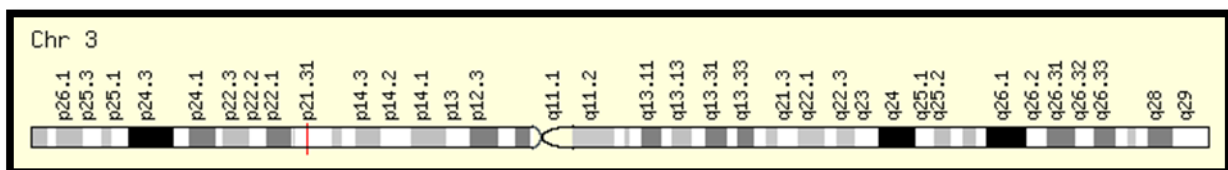


Figure 31 : Localisation chromosomique du gène CCR2 (URL=<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCR2&search=CCR2>)

Le gène CCR2 fait 7.18 Kb et est composé de 3 exons et 2 introns (le premier exon n'est pas transcrit). Le gène codant pour le récepteur CCR2 a été cloné en 1994 par le groupe du Dr. Charo (Charo *et al*, 1994); deux variants d'épissage alternatif de 360 résidus (CCR2a) et 374 résidus (CCR2b) qui se distinguent par la longueur de leur extrémité C-terminale (61 résidus pour le CCR2a et 47 résidus pour le CCR2b) (Wong *et al*, 1997) ont été isolés (Figure 32). Les deux variants diffèrent dans

certaines de leurs voies de signalisation et de leurs actions; par exemple la mobilisation de calcium n'est pas requise pour la chimiotaxie induite par CCR2a alors qu'elle l'est pour CCR2b (Cho *et al*, 2007). Avec quelques prédominances pour un variant ou l'autre. CCR2 est exprimé dans les monocytes, les lymphocytes T mémoire, lymphocytes B et dans les basophiles (Frade *et al*, 1997); et peut avoir une action pro inflammatoire ou anti-inflammatoire en fonction du type cellulaire sur lequel il est exprimé.

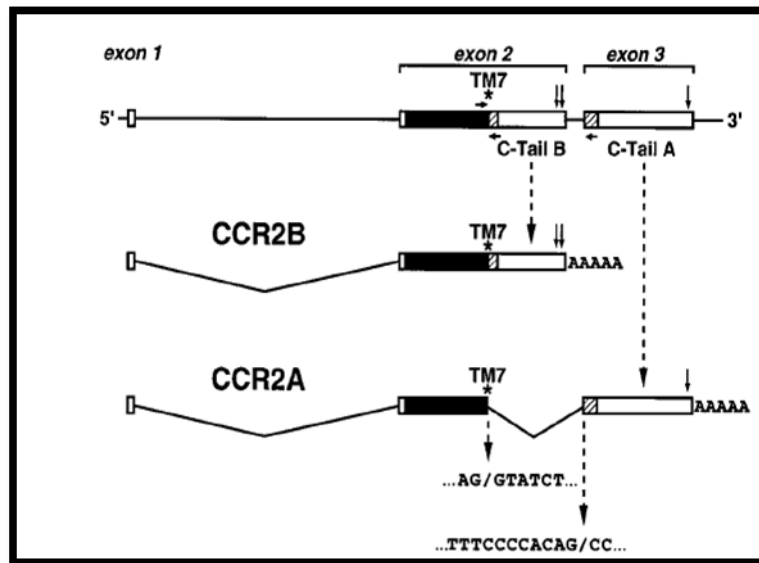


Figure 32 : Organisation structurale du gène CCR2 et ses deux isoformes (Wong *et al*, 1997)

(5) Polymorphismes du gène CCR2

Plusieurs sites polymorphes ont été identifiés au niveau du gène CCR2 aux positions nucléotidiques suivantes : -6928 G/T, -6752 A/G, 190 G/A, 840 C/T, 3000 A/G, 3547 T/C, 3610 A/G, 3671 C/G, 4385 T/A (Navratilova, 2006). Le plus étudié de tous c'est le polymorphisme 190 G/A (CCR2-V64I).

Une substitution de G vers A à la position 190 du gène CCR2 au niveau de l'exon 3 change l'acide aminé Valine (GTC) en isoleucine (ATC) au niveau du codon 64 (CCR2-V64I). La substitution de cet acide aminé conservateur prend place dans le premier domaine transmembranaire de CCR2A et CCR2B. Ce changement rend

CCR2A plus stable et augmente sa demi-vie mais n'affecte pas la stabilité de l'isoforme CCR2B (Nakayama et al, 2004). La mutation V64I entraîne la réduction de la liaison de MCP1 (CCL2) à son récepteur CCR2.

On rapporte dans la littérature que le polymorphisme CCR2-V64I ([rs1799864](#)) est associé avec plusieurs pathologies ; diminution du risque de progression du SIDA avec le variant CCR2-64I pour les individus affectés du VIH (Ioannidis et al, 2001), sclérose multiple (Miyagishi et al, 2003) et le développement du cancer de sein (Zafiroopoulos et al, 2004). Il est aussi associé avec l'augmentation du risque de l'athérosclérose carotidienne (Nyquist et al, 2009) et la réduction du risque de rejet de transplantation rénale (Ormani et al, 2008). K.F. (Narter et al. 2010) ont rapporté une association de V64I avec le cancer de la vessie, suggérant son rôle comme facteur de risque.

(6) Relation entre CCR2 et la drépanocytose

La vulnérabilité aux infections et la survenue de stroke sont deux caractéristiques de la maladie drépanocytaire. La susceptibilité aux agents infectieux est la conséquence d'un infléchissement prouvé de l'immunité du drépanocytaire.

Dans notre étude on va s'intéresser au polymorphisme CCR2-V64I, ce polymorphisme altère le recrutement des macrophages (Nakayama *et al*, 2004) et donc il pourrait mettre un peu de lumière sur la sensibilité accrue des drépanocytaires aux infections. D'un autre côté, Hoppe *et al*, 2004) se sont intéressés à rechercher des corrélations entre certaines polymorphismes touchant des molécules d'adhésions, de certaines cytokines et de leurs récepteurs et la survenue de stroke chez le drépanocytaire. Concernant CCR2-V64I, ils n'ont pas trouvé d'association significative avec la survenue de stroke chez le drépanocytaire.

A ce jour, aucune étude n'a confirmé le rôle de CCR2-V64I dans la complication drépanocytaire.

Modulation génique du taux de l'HbF chez le drépanocytaire

Introduction

Le taux d'hémoglobine fœtale, après l'âge de 4 ans, est inférieur à 0,6% de l'hémoglobine totale dans la population générale. Toutefois, chez 10 à 15 % des individus, ce taux est augmenté et se situe entre 0,8 et 5% (Thein et al, 2005). Cette condition n'entraîne aucun signe clinique ni biologique chez les sujets sains. Quand elle est associée à un défaut majeur de la chaîne bêta-globine, elle peut atténuer le phénotype puisque la chaîne fœtale, en s'associant avec la chaîne alpha-globine libre, diminue la proportion de chaînes libres et forme de l'Hb F qui vient corriger l'anémie. L'identification des déterminants génétiques contrôlant le taux d'HbF chez l'adulte est un champ de recherche très actif qui pourrait conduire à la caractérisation de marqueurs pronostiques individuels.

Certains facteurs génétiques modulant l'expression de l'HbF sont liés au locus bêta-globine mais l'existence de déterminants transmis de façon indépendante du locus bêta-globine a aussi été démontrée grâce à des études de ségrégation (Gianni et 1983, Giampaolo et al 1984, Martinez et al 1989).

Dans le locus bêta-globine, une substitution du promoteur du gène G-gamma-globine appelé polymorphisme XmnI (en raison du site de clivage créé pour cette enzyme de restriction) a été très étudié (Labie et al, 1985). Ce polymorphisme est retrouvé dans toutes les populations à une fréquence variable qui peut aller jusqu'à 35%. Des études ont montré qu'il est responsable pour un tiers des variations du taux d'Hb F retrouvés chez des adultes sains (Garner et al, 2000). L'effet de ce polymorphisme est surtout sensible dans les conditions de stress anémique observés chez le patient thalassémique ou drépanocytaire. On ne sait pas encore s'il a un effet direct ou s'il est simplement lié à un déterminant génétique situé ailleurs dans le locus.

Des études beaucoup plus récentes ont pu identifier plusieurs loci non liés au locus bêta-globine, ayant également une influence importante sur le taux d'Hb F.

Le premier de ces loci a été identifié en Xp22 chez des patients drépanocytaires comme étant lié à des taux d'HbF significativement plus élevés (Dover et al 1992 et Chang et al, 1995) mais aucun gène n'a pu être identifié dans la région et l'association n'a pas été confirmée par la suite dans d'autres études.

En revanche, un autre locus identifié à la même époque en 6q23 par analyse de liaison dans une très grande famille indienne (Thein et al 1994, Craig et al, 1996) s'est révélé être un des sites majeurs impliqués dans les variations du taux d'Hb F chez l'adulte. Ce QTL (pour Quantitative Trait Locus) serait responsable de 17% des variations du taux d'Hb F observés chez les adultes sains et a été validé dans une population européenne (Thein et al, 2007) ainsi que sur des individus porteurs d'un trait bêta-thalassémique (So et al, 2008). La région d'intérêt contient entre autres, le gène *HBS1L* codant pour un membre de la famille des GTP-binding protein et exprimé dans les précurseurs érythroïdes et *cMYB*, codant pour un proto-oncogène jouant un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Close et al, 2004). MYB intervient dans la cinétique de l'érythropoïèse en freinant la différenciation et en favorisant les étapes de prolifération (Jiang et al, 2006). Les SNPs impliqués dans la variation du taux d'HbF sont situés dans la région intergénique entre *HBS1L* et *cMYB*. Ils ont été bien caractérisés dans plusieurs échantillons de populations d'origines géographiques différentes; certains de ces haplotypes ont été retrouvés significativement lié à des taux élevés d'Hb F et à un niveau d'expression diminué de MYB (Thein et al, 2007). Une expression basse de MYB entraînerait une légère accélération de la différenciation et, par conséquent, une persistance d'hémoglobine foetale du fait d'un switch incomplet des gènes foetaux vers les gènes adultes comme on l'observe dans les situations de stress anémique (Stamatoyanopoulos 2005). On retrouve également, corrélé à une expression basse de MYB, un nombre diminué d'érythrocytes et un VGM plus important chez des sujets sains, renforçant l'hypothèse d'une réduction de la phase de différenciation (Menzel et al, 2007a). Les haplotypes favorisant la persistance d'Hb F pourraient également être liés à la variabilité de la réponse aux inducteurs de synthèse d'Hb F (Kuroyanagi et al, 2006, Jiang et al, 2006).

Un QTL en 8q, identifié également à partir de l'étude de liaison de la même grande famille indienne, serait significativement lié au polymorphisme XmnI du locus bêta-globine, suggérant une interaction entre le locus bêta-globine et un gène putatif en 8q (Garner et al, 2002). Cette étude a été validée sur d'autres populations (Garner et al, 2004) mais pour l'instant aucun gène n'a été impliqué d'un point de vue fonctionnel.

Enfin, très récemment, un QTL a été caractérisé en 2p15 (Menzel et al, 2007b) par une étude d'association pangénomique chez des sujets sains. Trois études ultérieures réalisées sur d'importantes cohortes de malades bêta-thalassémiques et drépanocytaires ainsi que de témoins, s'accordent pour montrer que plusieurs SNP du gène BCL11A, situé dans cette région et codant pour un facteur de prolifération cellulaire, sont liés de façon très significative à des taux d'HbF élevés chez des sujets de différentes origines géographiques (Uda et al, 2008, Sedgewick et al, 2008, Lettre et al, 2008). Contrairement à MYB, BCL11A n'aurait pas une action globale sur la cinétique de différenciation cellulaire mais un rôle direct sur la régulation des gènes de globine fœtale, ce qui pourrait en faire une cible thérapeutique (Sankaran et al, 2008). Ce rôle direct n'est cependant pas spécifique puisque BCL11A est aussi connu pour réguler la différenciation des lymphocytes (Liu et al, 2003).

BCL11A

Définition

BCL11A est une protéine en doigt de zinc. Protéine qui contient au moins un doigt de zinc. Un petit domaine fonctionnel plié qui nécessite une coordination d'un ou plusieurs ions de zinc afin de stabiliser sa structure.

Localisation cellulaire

Les gènes de la famille BCL11 sont principalement exprimés dans deux types cellulaires distincts, dans les cellules du système immunitaire et dans les cellules du cerveau. Par des expériences de Northern Blot, l'équipe de Satterwite a mis en évidence une forte expression de BCL11A dans les ganglions lymphatiques sains, dans le thymus et dans la moelle osseuse. Elle n'a pas trouvé d'expression dans les autres tissus humains. Elle retrouve également une forte expression de l'ARNm de BCL11A dans le cerveau fœtal et dans les leucémies B portant la translocation t(2;14)(p13;q32.3). Par des expériences d'hybridation *in situ*, elle a montré que BCL11A était exprimée uniquement dans les cellules B du centre germinatif et pas

dans les cellules du manteau des ganglions lymphatiques. Ceci suggère un rôle de cette protéine dans le développement des cellules B (Satterwhite E et al 2001).

Structure génique de BCL11A

Le gène BCL11A est localisé sur le chromosome 2 en 2p16.1. Saiki et al 2000.

(Figure 33)

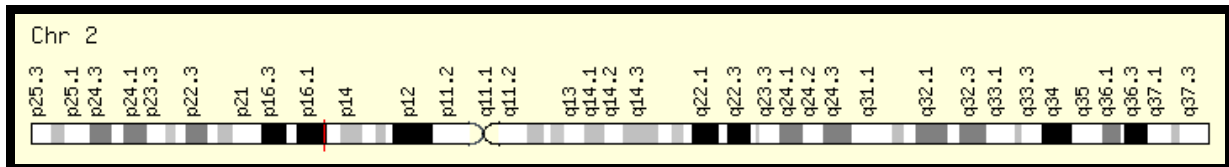


Figure 33 : Localisation chromosomique de BCL11A. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL11A>

Cinq variantes sont obtenues par épissage alternatif après la transcription aboutissant ainsi à cinq isoformes distincts (Figure 34).

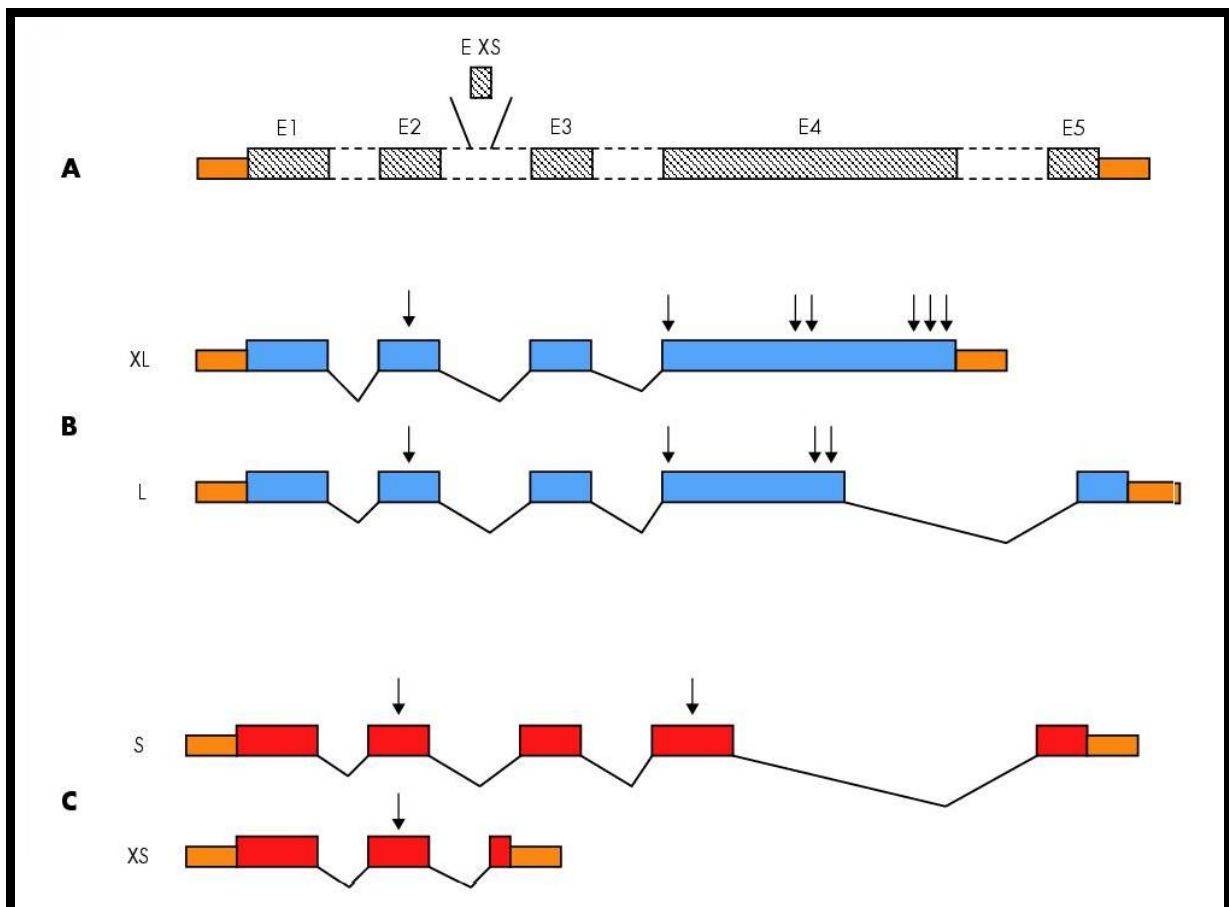


Figure 34 : Le gène BCL11A et ses différentes isoformes, telles qu'elles ont été mises en évidence dans les cellules lymphoïdes d'un syndrome malin. A) La structure du gène, comportant

5 exons et 4 introns ; les rectangles jaunes représentent les zones 5' et 3' non traduites. **B)** Figurées en bleu les 2 isoformes longues L et XL, ne correspondent pas à la même délétion, soit l'exon 5, soit une partie de l'exon 4. **C)** Figurées en rouge les 2 isoformes courtes identifiées dans des cellules jeunes. Dans la forme S il y'a une délétion presque complète de l'exon 4. Dans la forme XS toute la partie 3' est délétée. Un petit exon 3' correspond à une séquence partielle de l'intron 2 (noté, au niveau de la structure, comme EXS). Les signes ↓ correspondent à l'emplacement des doigts de zinc.

Fonction

BCL11A fonctionne comme un proto-oncogène des myéloïdes et des lymphocytes B. Peuvent jouer un rôle important dans la leucémogénèse et l'hématopoïèse. Un facteur essentiel dans la lymphopoïèse est requis pour la formation de cellules B dans le foie fœtal. Il peut fonctionner comme un modulateur de l'activité transcriptionnelle de la répression ARP1.

BCL11A et drépanocytose

L'augmentation du taux de l'HbF associée à un défaut majeur de la chaîne beta-globine peut atténuer le phénotype puisque la chaîne fœtale, en s'associant avec la chaîne alpha-globine libre, diminue la proportion de chaînes libres et forme de l'Hb F qui vient corriger l'anémie. L'identification des déterminants génétiques contrôlant le taux d'HbF chez l'adulte est un champ de recherche très actif qui pourrait conduire à la caractérisation de marqueurs pronostiques individuels. Certains facteurs génétiques modulant l'expression de l'HbF sont liés au locus bêta-globine, mais l'existence de déterminants transmis de façon indépendante du locus bêta-globine a aussi été démontrée grâce à des études de ségrégation (Gianni *et al* 1983, Giampaolo *et al* 1984, Martinez *et al* 1989).

Rôle de BCL11A sur la variation du taux de l'HbF

L'étude fonctionnelle a été poursuivie par un marquage à la biotine de BCL11A dans une lignée de cellules érythroleucémiques de souris, MEL, cellules n'exprimant que les globines adultes. Ce marquage permet la purification sur colonne d'avidine des complexes protéiques contenant BCL11A biotinylée. Un de ces complexes est le complexe répresseur NuRD (*nucleosome remodeling and histone deacetylase*) lié par la séquence amino-terminale ; un complexe BCL11B/NuRD a déjà été observé

dans des lymphocytes B et T (Cismastu VB et al 2005). BCL11A s'associe aussi avec la protéine de la matrice nucléaire matrine-3, ainsi qu'avec des peptides de GATA-1, principal facteur de transcription érythroïde, et son cofacteur FOG-1 (*Friend of Gata*). L'ensemble des données génétiques, développementales et biochimiques suggérait un rôle de *BCL11A* dans l'extinction des gènes g-globine, et les auteurs ont entrepris de tester cette hypothèse directement en modulant son taux dans des cellules érythroïdes primitives. De ce fait, l'introduction transitoire d'un ARN d'interférence (siARN) ciblant l'ARNm *BCL11A* à J0 de la culture, diminue la protéine de 40-45 % à J4 en même temps que le taux de l'ARN g globine s'élève (x 2,3) à J7 ; l'effet est moindre si le siARN est utilisé plus tardivement. En comparant par *microarrays* les gènes exprimés avant et à 7 jours après le traitement par siARN spécifique ou par un contrôle non spécifique, les auteurs ont exclu toute interférence de BCL11A avec le processus de différenciation des cellules, et montré une action du siARN *BCL11A* restreinte à la répression du gène g-globine. Une réduction plus durable de l'expression de *BCL11A* via l'expression permanente d'un ARN simple brin en épingle à cheveux (shARN) ciblant l'expression de *BCL11A* entraîne une élévation très supérieure du taux d'HbF à J7, qui peut être isolée par HPLC, alors qu'elle est indétectable dans la culture témoin. L'effet quantitatif comparé obtenu par siARN et shARN a permis aux auteurs de parler d'un effet de « rhéostat moléculaire » contrôlant l'extinction des gènes g-globine.

Polymorphismes du gène de BCL11A et taux d'HbF

En 2007 Menzel et al ont identifié un QTL situé en 2p15 par une étude d'association pangénomique chez des sujets sains. Trois études ultérieures réalisées sur d'importantes cohortes de malades beta thalassémiques et drépanocytaires ainsi que de témoins, s'accordent pour montrer que plusieurs SNPs du gène BCL11A, situé dans cette région et codant pour un facteur de prolifération cellulaire, sont liés de façon très significative à des taux d'HbF élevés chez des sujets de différentes origines géographiques (Uda *et al*, 2008, Sedgewick *et al*, 2008, Lettre *et al*, 2008). BCL11A n'aurait pas une action globale sur la cinétique de différenciation cellulaire mais un rôle direct sur la régulation des gènes de globine foetale, ce qui pourrait en faire une cible thérapeutique (Sankaran *et al*, 2008) (Figure 35). Une étude plus récente (Xu J *et al*, 2011) a montré que le répresseur BCL11A

est nécessaire *in vivo* pour bloquer l'expression de la γ -globine chez les animaux adultes. En effet, Xu et al ont montré que le blocage de BCL11A permet d'augmenter le taux d'hémoglobine foetale et corrige la drépanocytose chez la souris adulte. BCL11A sert de barrière à la réactivation de l'HbF par des agents inducteurs de HbF connus. Pour vérifier que BCL11A représente une cible thérapeutique potentielle, les auteurs montrent que l'inactivation de BCL11A dans des souris drépanocytaires corrige les défauts hématologiques et pathologiques associées à la drépanocytose, par une induction très forte d'HbF. Ainsi, l'interférence avec l'extinction de l'HbF, par la manipulation d'une protéine cible unique est suffisante pour corriger les symptômes de la drépanocytose. (Xu J *et al* 2011).

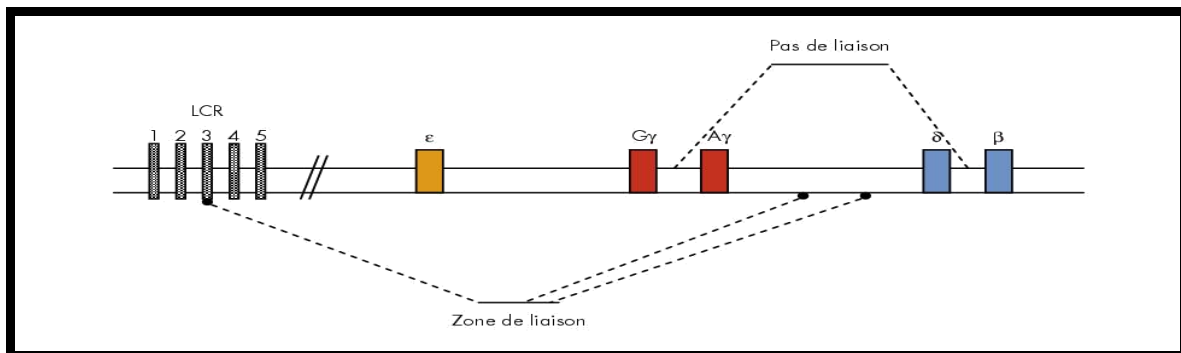


Figure 35 : Étude par immunoprécipitation de la fixation de la protéine BCL11A sur différents éléments du locus β -globine.

Aucune fixation n'est retrouvée au niveau des promoteurs γ -globine et β -globine. On observe, en revanche, une forte fixation au niveau du site HS3 du LCR, ainsi que dans une zone séparant gènes foetaux et gènes adultes, en aval du gène $A\gamma$ -globine, et en amont du gène δ -globine. Cette zone a été souvent suspectée d'inclure un (des) élément(s) régulateur(s) du switch.

HBS1L-MYB

Définition

Le gène *HBS1L* codant pour un membre de la famille des GTP-binding protein est exprimé dans les précurseurs érythroïdes, et *cMYB*, codant pour un proto-oncogène joue un rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Close *et al*, 2004). MYB intervient dans la cinétique de l'érythropoïèse en freinant la différenciation et en favorisant les étapes de prolifération (Jiang *et al*, 2006).

Structure génique

Les gènes qui codent pour HBS1L et cMYB sont localisés sur le chromosome 6 en q23.3. (Figure 36)

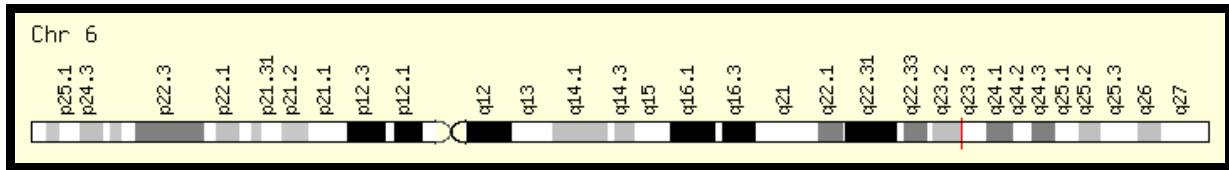


Figure 36 : Localisation chromosomique de HBS1L-MYB.

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBS1-MYB>.

La région intergénique HMIP commence à 188pb en amont de l'exon 1 du gène HBS1L et se termine à 45 Kb en amont du gène MYB et a une taille de 126 KB. (Figure 37).

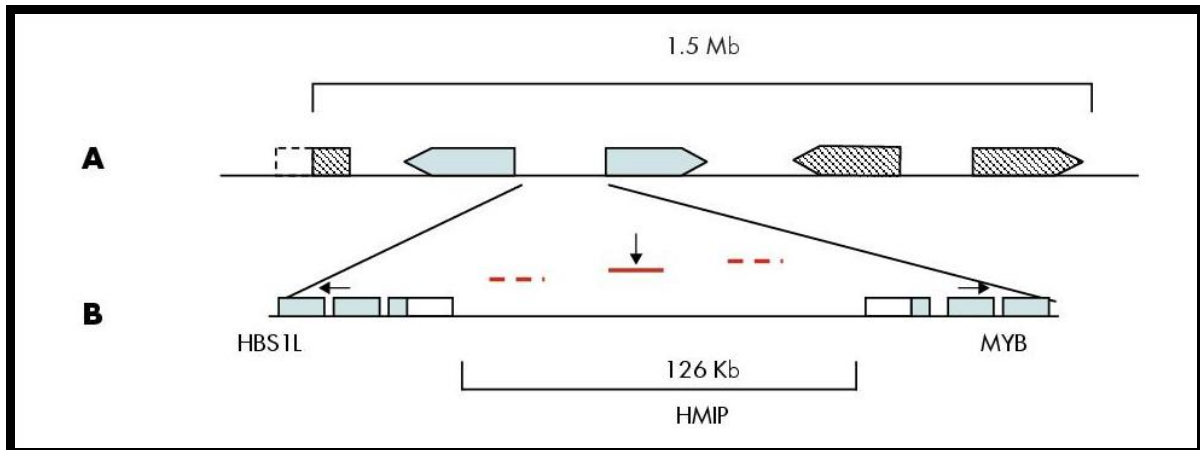


Figure37 : A) Organisation du chromosome 6 en 6q23, qui comporte 5 gènes qui n'ont pas tous la même orientation. B) Dans l'intervalle HBS1L-MYB, un intervalle a été localisé comme contenant le(s) élément(s) régulateur(s), et appelé HMIP. Dans cet intervalle des sites hypersensibles à la DNase I (marqués par une flèche ↓) ont été localisés.

Implication de HMIP dans la variabilité des taux de l'HbF

Des études récentes montrent que HMIP contient un locus de régulation distale qui témoigne de la présence de plusieurs signaux érythroïdes spécifiques de GATA-1. Ce locus coïncidait avec les sites DNaseI hypersensible, et la présence de transcrits intergéniques dans les cellules précurseurs érythroïdes (Wahlberg K et al 2009). Il est suggéré que les éléments régulateurs HMIP contrôlent l'expression MYB, qui à son tour influe sur la différenciation érythroïde, et indirectement, le contrôle des niveaux d'HbF. MYB est un gène de caractères quantitatifs (Jiang et al 2007); les

cellules précurseurs érythroïdes de personnes ayant un taux élevé de l'HbF et des niveaux plus élevés de cellules F ont moins l'expression MYB. MYB a été également associée à une numération érythrocytaire plus faible, mais aussi à un volume érythrocytaire et une numération plaquettaire plus élevée. En outre, la variabilité du génotype au HMIP a un impact pléiotropique sur plusieurs types de cellules du sang périphérique: le nombre et le volume des érythrocytes, la concentration en hémoglobine, la numération plaquettaire et monocyttaire chez les individus sains d'ascendance européenne (Menzel et al 2007).

Polymorphismes de HMIP et taux d'HbF

Une étude faite par Thein *et al* 1994 a identifié un locus situé en 6q23 par analyse de liaison dans une très grande famille indienne et s'est révélé être un des sites majeurs impliqués dans les variations du taux d'Hb F chez l'adulte. Ce QTL (pour Quantitative Trait Locus) serait responsable de 17% des variations du taux d'HbF observés chez les adultes sains et a été validé dans une population européenne (Thein *et al*, 2007) ainsi que sur des individus porteurs d'un trait béta-thalassémique (So *et al*, 2008) et sur des drépanocytaires (Lisa et al 2009). Les SNPs impliqués dans la variation du taux d'HbF sont situés dans la région intergénique entre *HBS1L* et *cMYB*. La région qui comprend les polymorphismes les plus associés est appelée HMIP2 (Figure39). Ces polymorphismes sont : rs9399137, rs28384513, rs4671393, rs4895440, rs9402686, rs11759553, rs6929404. Quatre d'entre eux ont été bien caractérisés dans plusieurs échantillons de populations d'origines géographiques différentes (Tableau3); certains des haplotypes ont été retrouvés significativement lié à des taux élevés d'Hb F et à un niveau d'expression diminué de *MYB* (Thein *et al*, 2007). Une expression basse de *MYB* entraînerait une légère accélération de la différenciation et, par conséquent, une persistance d'hémoglobine foetale du fait d'un switch incomplet des gènes foetaux vers les gènes adultes comme on l'observe dans les situations de stress anémique (Stamatoyanopoulos 2005). Les haplotypes favorisant la persistance d'Hb F pourraient également être liés à la variabilité de la réponse aux inducteurs de synthèse d'Hb F (Kuroyanagi *et al*, 2006, Jiang *et al*, 2006).

Tableau 3: Association des marqueurs génétiques de HMIP avec le taux de l'HbF dans différentes populations.

Marqueurs de HMIP-2	Européenne N=76	Afro-Caribéens N=174	Afro-Germain N=633	Groupe Jamaïcain N=811
	P	P	P	P
(rs9399137)	1.5×10^{-7}	0.005	0.002	9.2×10^{-4}
(rs11759553)	2.7×10^{-9}	0.122	0.001	3.5×10^{-4}
(rs4895440)	2.4×10^{-9}	0.650	0.005	0.012
(rs9402686)	5.6×10^{-9}	0.008	5.9×10^{-5}	1.1×10^{-4}

P : indice de significativité

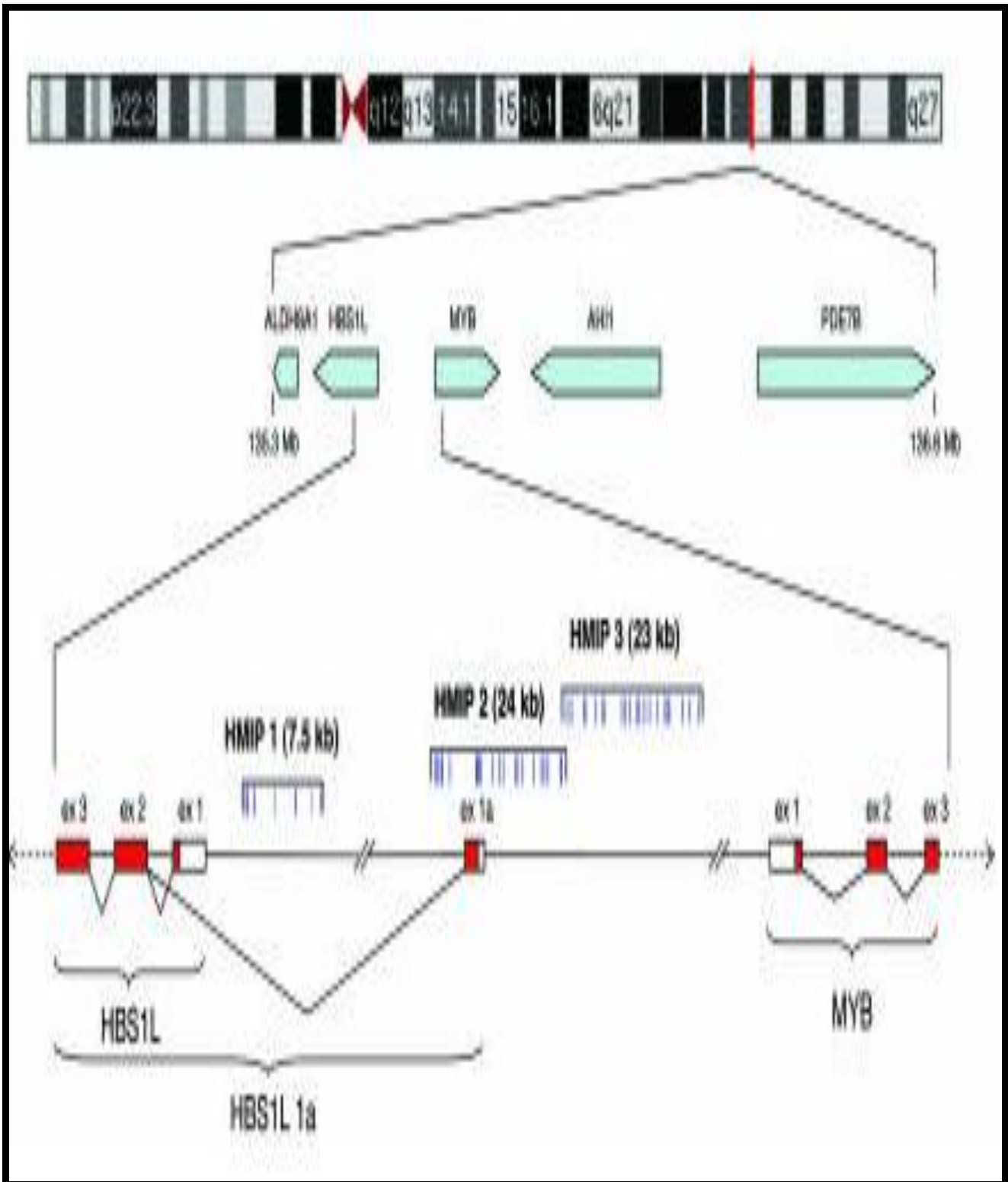


Figure 38 : Vue d'ensemble de la région 6q23 et le locus HMIP.

L'organisation génomique de l'intervalle de 1,5 Mb candidat et le segment de 126 kb couvrant des portions de HBS1L et MYB et la région intergénique sur 6q23 du chromosome.

Objectifs

Cibler des polymorphismes fonctionnels touchant des gènes candidats afin de chercher d'éventuelles corrélations phénotype/génotype chez les drépanocytaires.

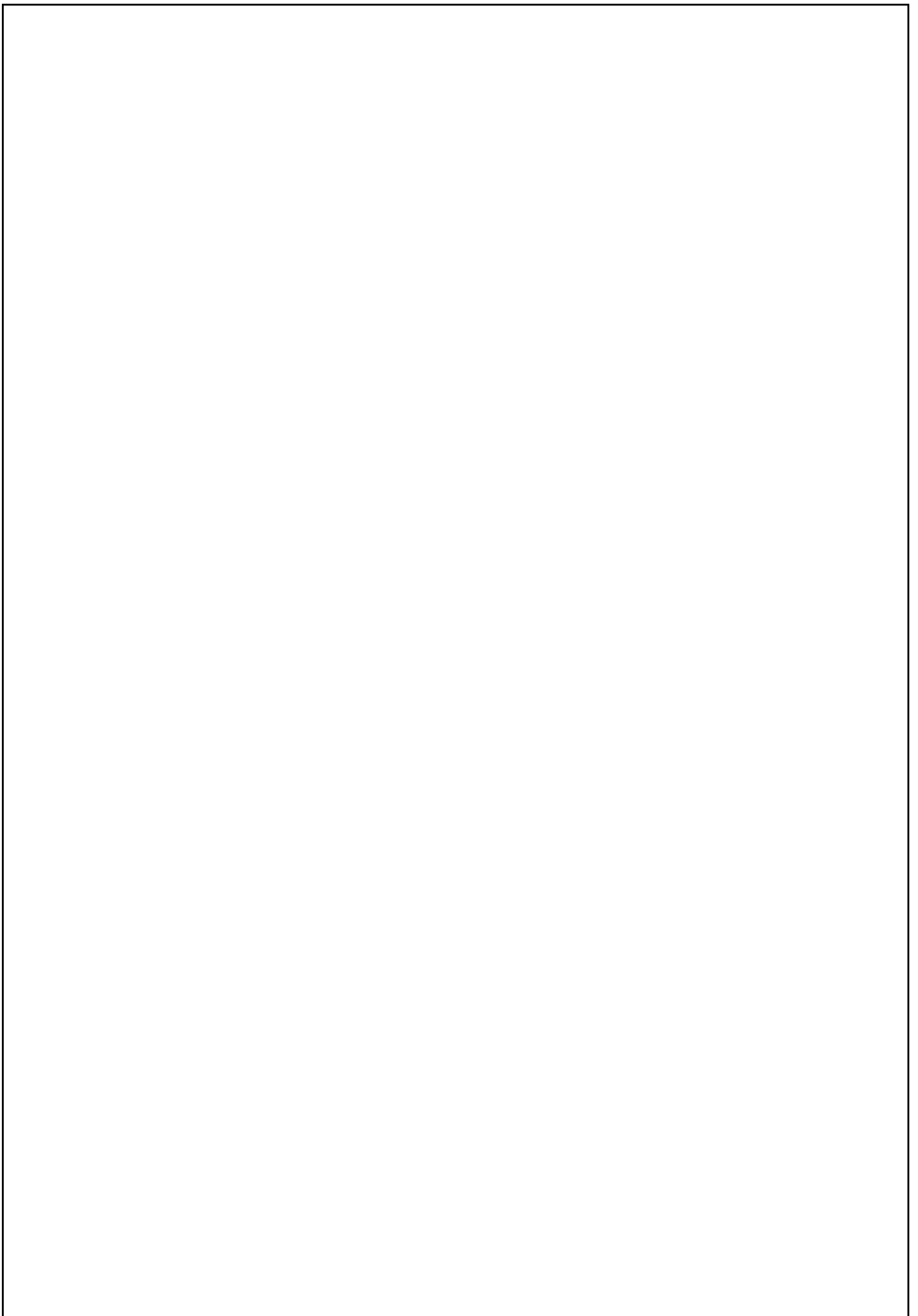
✚ Rôle du polymorphisme A(TA)_nTAA du gène *UGT1A1* dans la lithogénèse.

✚ Implication des polymorphismes -403G/A, -28G/C et INT1T/C du gène *RANTES* et -46T/C du gène *DARC* dans la survenue des crises vaso-occlusives et des infections.

✚ Implication des polymorphismes -2518G/A du gène *CCL2* et CCR2V64I dans la survenue des crises vaso-occlusives, les AVC et des infections.

✚ Rôle des polymorphismes rs11886868, rs46711393 du gène *BCL11A*, rs9399137, rs4895441 de la partie intergénique HMIP dans la variation du taux de l'HbF.

MATERIELS ET METHODES



I. SUJETS

Après consentement éclairé des patients ou leurs parents un prélèvement de 10ml de sang total sue EDTA a été effectué pour les sujets suivants :

- 141 jeunes lycéens considérés hématologiquement normaux.
- 175 drépanocytaires homozygotes parmi ceux qui nous sont adressés au laboratoire. L'analyse est réalisée au premier diagnostic et avant toute transfusion.
- 76 patients souffrant de lithiases biliaires diagnostiqués par échographie abdominale et avant cholécystectomie.

II. METHODES

Chaque patient étudié a bénéficié d'une étude phénotypique complète suivie d'une exploration moléculaire.

C. Etude phénotypique

Outre les données cliniques fournies par le clinicien, la caractérisation biologique du phénotype drépanocytaire comporte une série d'explorations hématologiques et biochimiques permettant de préciser le diagnostic et d'orienter l'étude moléculaire.

4. Données hématologiques

L'étude hématologique est basée essentiellement sur la numération et la formule sanguine (NFS) et le frottis sanguin.

a)La NFS

La NFS, est réalisée à l'aide d'un compteur automatique type Coulter S. Il donne à la fois le nombre de globules rouges (GR) et de globules blanc (GB), l'hématocrite(Ht), le volume globulaire moyen (VGM), la teneur corpusculaire moyenne en Hb (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en Hémoglobine (CCMH) ainsi que l'indice de distribution érythrocytaire.

Les paramètres de la NFS dont les valeurs normales son consignées dans le tableau 1 renseignent sur la nature et le type de l'anémie. Toutefois, les éléments les plus significatifs dans la drépanocytose sont l'Hb, le VGM, la TGMH et le taux de

réticulocytes. L'anémie est considérée quand le taux d'Hb est diminué. Elle est dite microcytaire hypochrome quand le VGM et le TGMH sont diminués. Chez le drépanocytaire l'anémie est le plus souvent normocytaire normochrome (VGM et TGMH normaux).

Tableau1 : les valeurs normales des paramètres de la NFS

Paramètre de la NFS	Valeurs normales	
	Chez la femme	Chez l'homme
GR	4-5.4 $10^6/mm^3$	4.5-6.2 $10^6/mm^3$
GB	4-10 $10^9/l$	4-10 $10^9/l$
Hb	12 - 16 g / 100 ml	13 à 18 g / 100 ml
Ht	37 à 46 %	40 à 52 %
VGM	80 à 100 mm ³	80 à 100 mm ³
TGMH	27 à 32 pg	27 à 32 pg
CCMH	32 à 36 g / 100 ml	32 à 36 g / 100 ml
Plaquettes	150 000 à 400 000 / mm ³	150 000 à 400 000 / mm ³
Leucocytes	4000 à 11 000 / mm ³	4000 1 000 / mm ³

b) Le frottis sanguin

Le frottis sanguin est réalisé manuellement utilisant la coloration classique au Giemsa (annexe1). Il permet de visualiser sous microscope la nature des hématies, leurs formes et leurs contenus. La mise en évidence des cellules falciformes et des réticulocytes a nécessité des préparations spécifiques (annexe 1). Chez le drépanocytaire les hématies sont

irrégulières. Outre les cellules falciformes, on peut observer une poikilocytose, anisocytose, schisocytose et plusieurs autres types de cellules anormales.

5. Profil hémoglobinique

En plus des données hématologiques, le diagnostic d'une drépanocytose repose essentiellement sur l'analyse de l'Hb par différentes méthodes selon les laboratoires. Dans notre travail le profil hémoglobinique des patients a été réalisé par séparation des fractions de l'Hémoglobine par HPLC. L'appareil est un automate (D-10 Bioarad) adapté à la séparation des fractions de l'Hb par chromatographie haute pression sur une colonne échangeuse de cations. Les fractions sont identifiées selon leur temps de rétention (figure 1 a, b et c). Afin d'avoir une garantie de résultat la fraction d'Hb fœtale a été dosée par la méthode de résistance à la dénaturation alcaline et la présence d'Hb S a été confirmée par le test de solubilité connu également sous le nom de test d'Itano (**annexes1**)

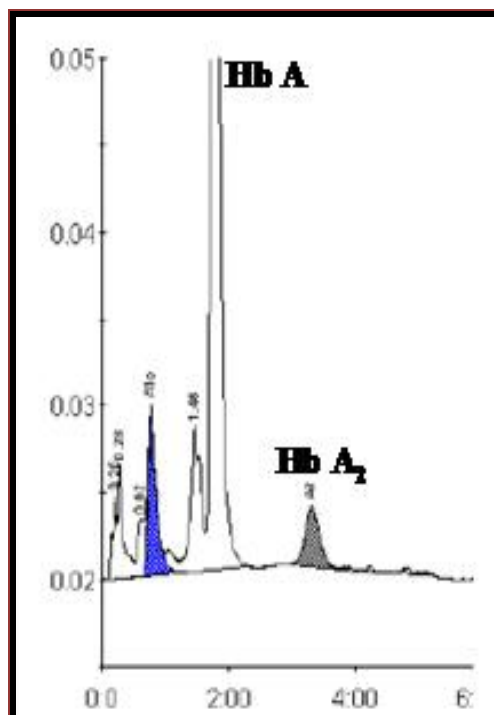


Figure1 a: Profil d'un homozygote AA

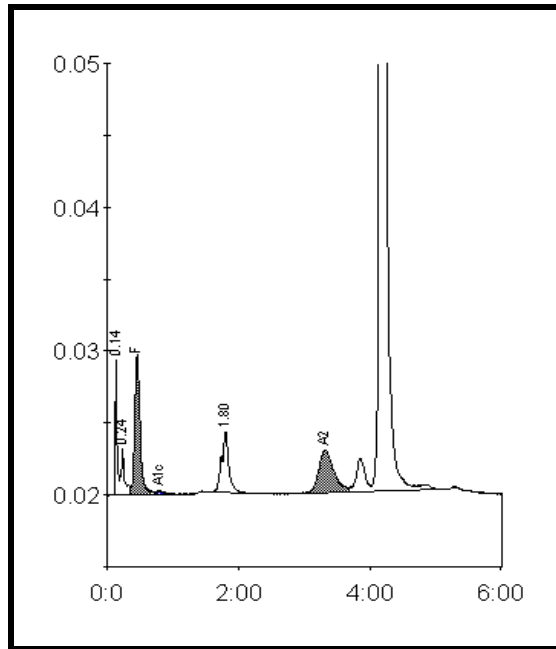


Figure 1b : Profil d'un homozygote SS.

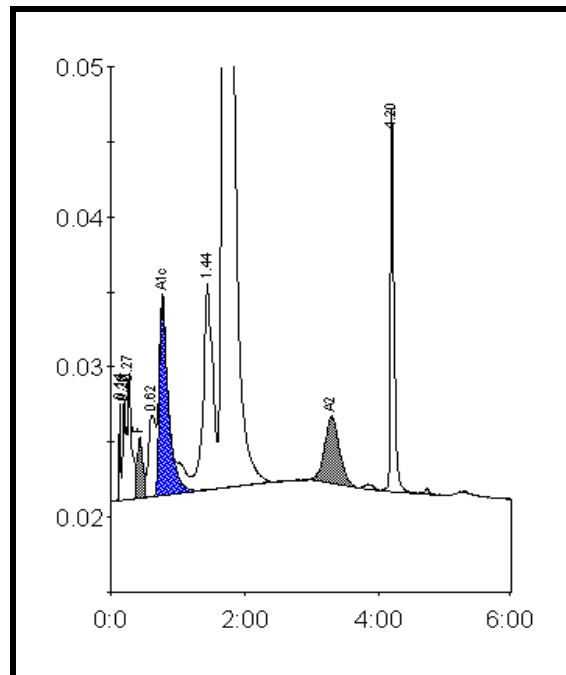


Figure 1c : Profil d'un homozygote AS

6. Etude biochimique

Outre les données hématologiques et électrophorétiques le phénotype est complété par l'évaluation du statut hémolytique basé essentiellement sur la valeur de la bilirubine sérique.

b) Dosage de la bilirubine

(1)Principe :

La bilirubine (sérique ou plasmatique) réagit avec l'acide sulfanilique diazoté pour former un composé coloré. Cette réaction est facilitée en présence de deux solvants : le diméthyl sulfoxyde et l'éthylène glycol. L'intensité de la coloration générée par la réaction est proportionnelle à la concentration de la bilirubine totale.

(2)Prélèvement :

Le dosage de la bilirubine a été effectué sur plasma du sang prélevé pour l'étude phénotypique et moléculaire. Tout prélèvement hémolysé est automatiquement remplacé par un nouvel échantillon.

(3)Technique :

La technique (annexe 1) est automatisée, le dosage est réalisé par un automate de biochimie Konelab 20. Les valeurs normales pour la bilirubine totale sont inférieures à $17\mu\text{mol/l}$.

Etude moléculaire

Extraction de l'ADN génomique

L'ADN est extrait à partir des leucocytes du sang périphérique prélevé sur EDTA .La méthode utilisée est celle de l'extraction au phénol/chloroforme qui renferme plusieurs étapes :

Lavage des hématies

Le lavage se fait avec l'eau physiologique 9‰ afin d'éliminer les débris cellulaires et les protéines plasmatiques, suivi d'une centrifugation à 4500 tr/10 min. Ensuite on procède à une élimination du surnageant. Cette étape est répétée 2 fois.

Lyse des globules rouges

La lyse des globules rouges se fait par choc osmotique à l'aide d'une solution hypotonique (SLR) et ceci a pour effet de détruire les globules rouges sans porter atteinte aux globules blancs dont la membrane est beaucoup plus résistante.

Sur le plan pratique, on ajoute 5 volumes de solution de lyse des globules rouges pour un volume globulaire lavé.

Ensuite, afin d'accélérer la lyse des globules rouges on procède à un choc thermique (incubation dans la glace pendant 10 min) suivi d'une centrifugation à 4500 tr/ 10 min pour séparer les globules blancs des débris des globules rouges. On obtient à la fin de cette opération un culot de globules blancs fixé au fond du tube et un surnageant qu'on élimine et qui contient l'hémoglobine et les débris cellulaires hématiques. On répète cette étape jusqu'à obtention d'un culot propre.

Lyse des globules blancs

Les globules blancs sont soit directement lysés, soit congelés à -20°C pour une utilisation ultérieure. On ajoute 1 ml de solution de lyse des blancs (SLB) et 60 µl de protéinase K (10µg/µl) afin d'éliminer les histones. Ensuite, on laisse incuber durant toute une nuit à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une solution visqueuse et homogène.

Précipitation des protéines

On utilise le phénol pour précipiter les protéines. On ajoute 2 volumes de phénol à la suspension de globules blancs.

Après, on réalise la centrifugation à 4500 tr/10 min et on obtient 3 phases : une phase aqueuse (surnageant), un culot représentant la phase organique contenant phénol et au milieu une interphase contenant les protéines. On récupère la phase aqueuse contenant l'ADN en faisant très attention à ne pas aspirer les protéines. Ensuite on ajoute 2 volumes de chloroforme et ceci afin d'éliminer le phénol et on centrifuge à 4500 tr/10 min. Suite à cette centrifugation, on obtient 2 phases ; une phase organique et une phase aqueuse. On récupère donc la phase aqueuse qui contient l'ADN.

Précipitation de l'ADN

Pour précipiter la méduse d'ADN, on ajoute de l'éthanol absolu à -20°C et on met dans la glace. On centrifuge à 4500 tr/10 min afin d'éliminer le phénol restant.

Lavage et séchage de la méduse d'ADN

Le lavage se fait avec l'éthanol 70% suivi d'une centrifugation à 4500 tr/10 min. Cette étape de lavage est à répéter 2 à 3 fois. Sécher tube ouvert à température ambiante pendant toute une nuit pour l'élimination de l'alcool.

Redissolution de l'ADN

On dissout l'ADN à l'aide de l'eau bidistillée ou bien à l'aide du Tris EDTA (T10E1).

Remarque : Selon la taille de la méduse on ajoute des volumes différents d'eau bidistillée:

- Petite méduse : 200 µl d'eau bidistillée.
- Méduse de taille moyenne : 250 à 300 µl d'eau bidistillée.
- Grande méduse : 350 à 600 µl d'eau bidistillée.

Analyse quantitative et qualitative de l'ADN :

Analyse quantitative

On réalise un dosage quantitatif à partir d'une solution d'ADN diluée à l'aide d'un spectrophotomètre :

- Dilution au 1/100 : 10 µl d'ADN + 990 µl d'eau distillée.
- Ou dilution au 1/200 : 5 µl d'ADN + 995 µl d'eau distillée.

Ensuite on mesure la DO à 260 nm par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.

Sachant qu'une unité de DO à 260 nm de l'ADN double brin correspond 50 ng/µl, la concentration de l'ADN est déterminée grâce à la formule suivante :

$$\text{Concentration en ng / } \mu\text{l} = \text{DO à 260 nm} * 50 * F$$

(F : Facteur de dilution)

Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280nm et à 230nm pour permettre l'estimation de la pureté de l'ADN.

La pureté de l'ADN est déterminée par le rapport R :

$$R = \text{DO 260} / \text{DO 280}$$

(R compris entre 1,8 et 2)

- Si $R < 1,8$ → Trop de protéines.

- Si $R > 2$ → Présence d'ARN.

La contamination de l'ADN par le phénol est estimée par le calcul du rapport :

DO 260/DO 230

$R < 1,8$ → Contamination par le phénol

Analyse qualitative

Il s'agit d'effectuer une électrophorèse de l'ADN sur un gel d'agarose 1% afin de vérifier la présence de l'ADN dissout et de contrôler sa qualité :

- Si on obtient une bande sous forme d'agrafe → ADN est de bonne qualité.
- Si on obtient des smears → ADN est dégradé.

Etude moléculaire des séquences d'intérêt

Données générales sur la PCR

Le Principe

La technique d'amplification génique in-vitro par PCR (Polymérase Chain Reaction) permet d'amplifier de façon exponentielle une séquence de nucléotides à étudier. Elle a été mise au point par Kary Mullis en 1983 et elle repose sur l'action de l'ADN polymérase thermostable (Taq polymérase) qui synthétise le brin complémentaire d'une séquence d'acide nucléique (ou matrice) par élongation d'une amorce. L'élongation se fait toujours dans le sens 5'-3', par incorporation de désoxyribonucléotides triphosphates libres (dNTP=dATP+dCTP+dTTP+dGTP) qui seront complémentaires à la séquence à étudier. L'ADN étant double brin, deux amorces seront utilisées, une par brin.

Les composants de la réaction PCR

La PCR s'effectue dans un volume réactionnel contenant de l'ADN génomique, des dNTP, des amorces sens et antisens, la Taq polymérase et une solution de tampon 10X de l'enzyme, en présence de chlorure de magnésium (MgCl₂).

La réaction de séquençage

Définition

Le séquençage de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides.

Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

Principe

Il repose sur le principe de la méthode enzymatique qui a été développée par Sanger en 1977 (Sanger & al, 1977).

Il est basé sur l'utilisation de didésoxyribonucléotides (ddNTP) au lieu des désoxyribonucléotidetriphosphate (dNTP) qui sont marqués par des fluorochromes de couleurs différentes (ddATP= vert, ddTTP=rouge, ddCTP=bleu et ddGTP=noir).

Les ddNTPs diffèrent des dNTPs par l'absence d'un groupement OH en position 3'. Ainsi lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête (**figure 2**).

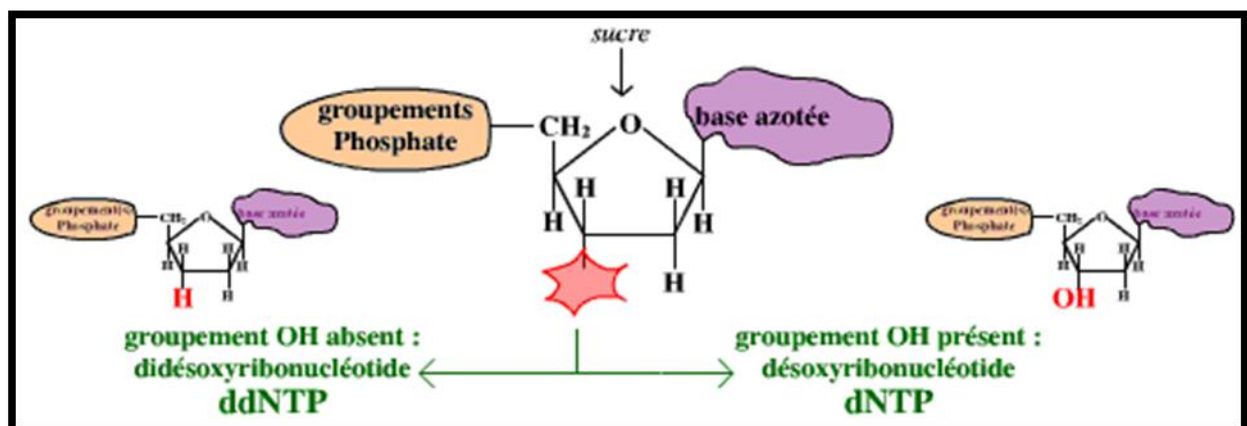


Figure 2 : Différence entre dNTP et ddNTP

- Le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase ADN dépendante est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'→3'.

- L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5' phosphate du dNTP suivant. La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Dans le milieu réactionnel il y'a compétition entre les dNTPs et les ddNTPs.

Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

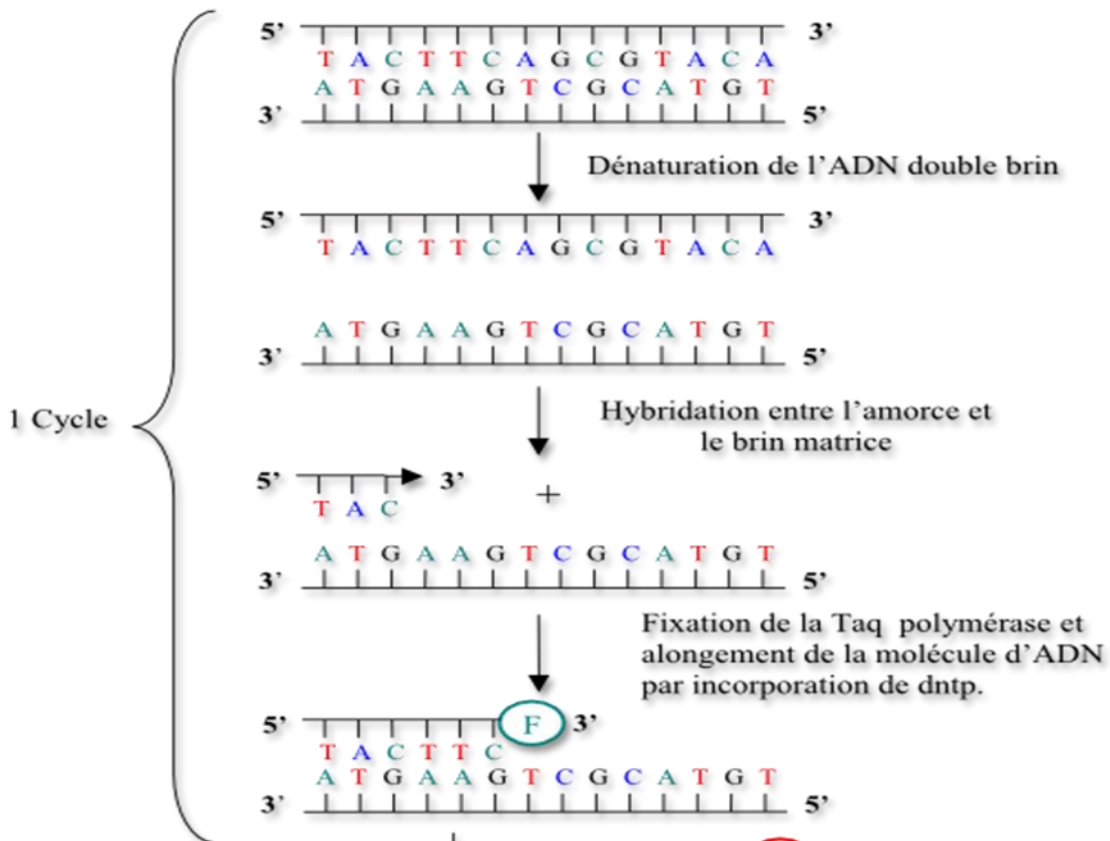
- L'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP spécifique.

Ici, chaque ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), marqué par un fluorochrome différent va avoir un spectre d'émission qui lui est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial.

Étapes de la réaction de séquence

Les étapes de la réaction de séquence sont résumées dans la figure ci-dessous (figure 3).

Étapes de la réaction de séquence



Le brin allongé se termine par incorporation d'un didéoxynucléotide marqué par un fluorochrome différent selon la base présente (A,T,C ou G).
 Au bout de 30 cycles on obtient un pool d'ADN simple brins de taille croissante.

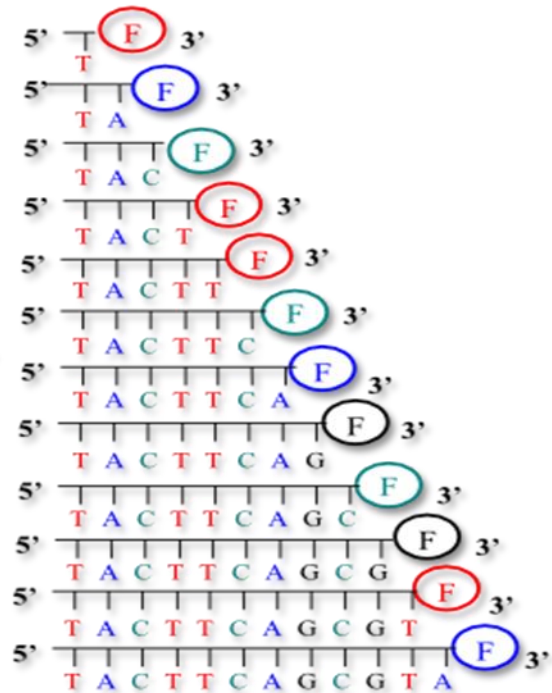


Figure 3: Les étapes de la réaction de séquence

Protocole expérimental du séquençage

Purification enzymatique du produit PCR

Cette étape consiste à éliminer l'excès d'amorce et de nucléotides triphosphates. On traite chaque 5µl de produit PCR par 0.5 unité d'exonucléase, 0.5 unités de SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) et 4 µl d'eau stérile.

La purification enzymatique est réalisée dans un thermocycleur Applied pendant une heure selon le programme suivant :

- Incubation à 37°C pendant 40 min → Dégradation des amorces et nucléotides non incorporés.
- Incubation à 80°C pendant 20 min → Inactivation des enzymes.

Réaction de séquençage

Le mélange réactionnel du séquençage, contient par tube réactionnel, les réactifs suivants à la quantité indiquée :

Tableau 2 : Les réactifs de la réaction de séquence

Réactifs	Volume (µl)
Big dye (3.1)*	1.5 µl
Tampon Big dye 5X	4 µl
Amorce F/R (20 picomoles/µl)	1µl
Produit PCR purifié	10µl
Eau sterile	3.5 µl
Total	20µl

* Nous utilisons la technologie Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems : ABI).

Ce mélange réactionnel est soumis à une succession de réactions thermiques cycliques selon le programme suivant :

Tableau 3 : Le programme de séquençage

Température	Durée	Cycles
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	25
60°C	4 min	

Précipitation à l'éthanol 80% de l'ADN à séquencer

Les produits de la réaction de séquençage sont précipités dans 80µl d'éthanol à 80% froid. Le mélange est par la suite incubé pendant 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière puis centrifugé à 4000 tr pendant 20 min afin de le débarrasser de l'éthanol.

Les produits obtenus sont ensuite injectés dans le séquenceur où ils seront séquencés puis traduits en chromatogrammes lisibles par le logiciel «Bio Edit » (Bio Edit Sequence Alignment Editor. V 7.0.5).

Les électrophorèses

L'électrophorèse est utilisée pour des fins analytiques ou préparatifs car elle permet la séparation et la purification des fragments de l'ADN. Les acides nucléiques sont des macromolécules polyanioniques uniformément chargés pouvant migrer dans un champ électrique. La charge globale de l'ADN est constante; lors de l'électrophorèse la vitesse de migration de la molécule d'ADN ne dépend alors que du nombre de paire de bases et de la concentration du gel.

Electrophorèse sur gel d'agarose

On a utilisé le gel d'agarose pour faire le contrôle qualitatif des ADN extraites et pour chaque contrôle de toutes les PCR réalisées. La concentration du gel d'agarose

utilisée pour contrôler les produits de PCR est de 1%. Le gel d'agarose est préparé comme suit:

Si la cuve est petite on pèse 0.5g dans 50 ml de TBE 1X ou bien 1g d'agarose dans 100ml de TBE1X si on passe à une cuve plus grande. Le mélange est chauffée jusqu'à la dissolution de l'agarose. On ajoute quelques gouttes de bromure d'éthidium (BET) comme agent intercalant. La solution est par la suite versée dans un moule approprié et laissée gélifier pendant quelques minutes. Une fois polymérisé, le gel est mis dans une cuve d'électrophorèse contenant le même tampon (TBE 1X). Le suivie de la migration de l'ADN se fait grâce au bleu de migration ayant une concentration de 6X. Après dépôt dans les puits, la migration est effectuée dans un champ électrique de l'ordre de 100 Volts et de 45 mA.

Une fois la migration est terminée (marquée par le front de bleu), le courant est arrêté et le gel est récupéré pour la révélation de l'ADN. On utilise un transilluminateur pour la révélation de l'ADN en plaçant le gel sur une plaque émettrice de la lumière ultraviolette. Une photo du gel est prise par une caméra connectée à un ordinateur en utilisant le logiciel Gel Doc analyzer.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8%

Dans notre travail on utilise le gel d'acrylamide pour contrôler les produits de digestion.

L'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide pour la séparation de petits fragments car leur résolution est plus grande que sur un gel d'agarose. La polymérisation du mélange acrylamide- bisacrylamide est initiée par l'addition de persulfate d'ammonium (PSA) à 10% et catalysée par le TEMED 100% (N, N, N, N tétraméthyléthylènediamine) (sigma). L'électrophorèse est conduite en tampon TBE 1X sous une tension comprise entre 120 et 160V avec un marqueur de poids moléculaire (**Tableau 4**). A la fin de la migration verticale, l'ADN est coloré dans une solution de BET à 1mg/1 ml pendant 20 min puis visualisé en lumière UV et photographié par la suite.

Tableau 4: La composition du mélange pour préparer un gel de polyacrylamide à 8%

Composants	Volume
Solution d'acrylamide 40%	9.6 ml
TBE 1X	38.4 ml
PSA 10%	240 µl
TEMED 100%	36µl

Exploration des polymorphismes étudiés

Etude du polymorphisme A(TA)_nTAA

L'étude du polymorphisme A(TA)_nTAA a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces (TA)F :TAACTTGGTGTATCGATTG GT et (TA)R:CTTTGCTCCTGCCAGAGGTT, 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 59°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR, purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI PRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues et traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Etude des polymorphismes -403G/A et -28C/G du gène RANTES

L'étude des polymorphismes -403G/A et -28C/G du gène RANTES a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces

CCL5F : CAGAGGACCCTCCTCAATAAAAC et CCL5R: CTCCCCAACATGAGTCCACAC, 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 62°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR ont une taille de 899pb. Ces derniers sont purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABI PRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues et traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Etude du polymorphisme INT1.1T/C du gène RANTES

L'étude du polymorphisme INT1.1T/C du gène RANTES a été réalisée par PCR/RFLP en utilisant l'enzyme de restriction MbolI.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 50µl contenant 200ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces INT1.1F: CACAAGAGGACTCATTCCA ACTCA et INT1.1R: CTGACTCATGCCTGTCAGC , 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 35 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 58°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR obtenus ont une taille de 343pb. Ces produits ont subi une digestion enzymatique par MbolI de concentration 10/µl , l'incubation est réalisée à 37°C pendant une nuit.

Les produits de digestion sont migrés sur un gel de polyacrylamide à 8 %. L'enzyme MbolI a un site de restriction chez les individus porteur de la mutation T/C, alors deux fragments de taille 225 et 118pb sont obtenus.

Etude du polymorphisme -46T/C du gène DARC

L'étude du polymorphisme -46T/C a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F : GATAGCTAGACACACCCAGACACC et R : TTGAGGTTGGATTTGGCTGGT, 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 59°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR, purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABIPRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues sont traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Etude du polymorphisme -2518A/G du gène CCL2

L'étude du polymorphisme -2518A/G du gène CCL2 a été réalisée par PCR/RFLP en utilisant l'enzyme de restriction PvuII.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 50µl contenant 200ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F: GCTCCGGGCCAGTATCT et R : GGCCATCTCACCTCATCTTCC , 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 35 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 62°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR obtenus ont une taille de 689pb. Ces produits ont subi une digestion enzymatique par PvuII de concentration 10/µl, l'incubation est réalisée à 37°C pendant une nuit.

Les produits de digestion sont migrés sur un gel de polyacrylamide à 8 %. L'enzyme PvuII n'a pas de site de restriction chez les individus porteur de la mutation A/G, alors deux fragments de taille 507 et 182pb sont obtenus chez les individus normaux pour cette mutation.

Etude du polymorphisme V64I du gène CCR2

L'étude du polymorphisme V64I du gène CCR2 a été réalisée par PCR/RFLP en utilisant l'enzyme de restriction BsaBI.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 50µl contenant 200ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F: TTGTGGGCAACATGATGG et R : TGAAGAAGATTCCGCCAAAA , 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 38 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 57°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR obtenus ont une taille de 222pb. Ces produits ont subi une digestion enzymatique par BsaBI de concentration 10/µl, l'incubation est réalisée à 37°C pendant une nuit.

Les produits de digestion sont migrés sur un gel de polyacrylamide à 8 %. L'enzyme BsaBI a un site de restriction chez les individus porteur de la mutation G/A, alors deux fragments de taille 204 et 18pb sont obtenus.

Etude du polymorphisme rs 11886868 du gène BCL11A

L'étude du polymorphisme rs 11886868 a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F : CACTGAACCCCCACCTACCA et R : GCAGCCTGGAGGATGACAAA, 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une

dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 59°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR, purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABIPRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues sont traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Etude du polymorphisme rs 4671393 du gène BCL11A

L'étude du polymorphisme rs 4671393 a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F : ACCTCCCCCATTAGCAGCAT et R : CTCCACTCCCCGTACCTTCC , 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 59°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR, purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABIPRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues sont traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Etude du polymorphisme rs 4895441 de la partie intergénique HMIP

L'étude du polymorphisme rs 4895441 a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F : F :TCCCCGCTTGCAACATTTAG et R : GCCACAGCCCCTTAACTCCT, 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 59°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR, purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABIPRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues sont traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Etude du polymorphisme rs 9399137 de la partie intergénique HMIP

L'étude du polymorphisme rs 9399137 a été réalisée par PCR simplexe suivie d'une réaction de séquençage.

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 150ng d'ADN génomique, 0.2mM de dNTP, 5 pmol de chacune des amorces F : CATAAGCCTGGGGTGGGTTT et R : CCAGAAGCACTTTGGCAAGC , 1 unité de Taq DNA polymérase (invitrogène, 5U/µl) et 2.5µl de tampon 10X de PCR, en présence de 1µl MgCl₂ 50mM selon le programme de PCR suivant : une dénaturation initiale pendant 10mn à 94 suivi de 30 cycles comprenant 1mn de dénaturation, 1mn d'hybridation à 59°C et 1mn d'élongation à 72°C enfin une élongation finale pendant 10mn à 72°C. Les produits de PCR, purifiés par la méthode enzymatique à l'exonucléase I et Shrimp Alcaline Phosphatase (SAP) sont ensuite séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (ABIPRISM 310 DNA sequencer PE, Applied Biosystems, Foster City; USA). Les séquences sont obtenues sont traduites sous forme de chromatogramme lisible à l'aide du logiciel BioEdit.

Analyses statistiques

Test Chi2 (χ^2)

Le test χ^2 est une méthode qui permet d'estimer la probabilité d'observation simultanée d'une série d'écarts entre valeurs observées et valeurs attendues et elle nous indique si la différence observée dans la répartition des fréquences alléliques entre la population des malades et des témoins est significative ou non. Dans notre travail la recherche d'une éventuelle association entre les polymorphismes étudiés et la survenue de la complication est basée sur la comparaison des fréquences alléliques et/ou génotypiques d'une population des malades à celles d'une population prise comme témoins qui ne présentent pas la complication étudiée suivie de calcul de la valeur de l'odds ratio (OR). Le calcul de l'OR et de l'indice de significativité « p » sont réalisés par le logiciel compare 2 (version 1.02).

La valeur de χ^2 obtenue donne une probabilité p. Une valeur de p inférieur ou égale à 0.05 indique une association statistiquement significative. Pour chaque valeur de p significatif on a calculé la valeur de l'odds ratio (OR). Elle correspond à la recherche d'une association entre les allèles et/ou les génotypes et la survenue de la maladie.

- OR < 1 L'allèle (ou le génotype) possède un effet protecteur
- OR = 1 L'allèle (ou le génotype) est neutre
- OR > 1 L'allèle (ou le génotype) possède un effet aggravant

Test Fisher

Ce test est une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont petits. Le principe de ce test est de déterminer si la configuration observée dans le tableau de contingence est une situation extrême par rapport aux situations possibles compte tenu des distributions marginales. On a utilisé ce test dans la comparaison génotypique et allélique entre les malades en se basant sur le principe de la table de contingence. Ce test est utilisé quand cette table contient une valeur inférieure à 5. Le test est réalisé à l'aide du logiciel compare 2 (version 1.2). Une valeur de p inférieur ou égale à 0.05 indique une association statistiquement significative. Pour chaque valeur de p significatif on a calculé la valeur de l'odds ratio (OR) comme indiqué précédemment.

Equilibre de Hardy-Weinberg

Enoncé: Au cours des générations, la fréquence des génotypes reste constante d'une génération à l'autre s'il n'y a pas de sélection, si la population est grande, s'il n'y a ni mutation, ni migration et si les unions se font au hasard.

Dans notre cas le test d'équilibre de Hardy-Weinberg est réalisé par le logiciel Arlequin (Version 3.01). Si la population est en équilibre de Hardy-Weinberg, la formule suivante est vérifiée: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

p = fréquence dans la population de l'allèle A

q = fréquence dans la population de l'allèle a

$p + q = 1$ puisqu'il n'y a que 2 allèles.

J'ai utilisé ce test pour chaque polymorphisme étudié afin d'éliminer les biais de sélection. Quand la valeur de p est supérieure à 0.05 on dit que la population est en équilibre de Hardy-Weinberg et dans le cas contraire c'est-à-dire $p < 0.05$ on dit que la population n'est pas en équilibre de Hardy-Weinberg.

4. Etude de régression logistique

a) Définition du modèle logistique

Le modèle logistique peut s'appliquer dans toutes les études d'observation, directement aux enquêtes de cohorte ou aux enquêtes transversales où l'on peut connaître le risque de la maladie. On peut montrer toutefois qu'il peut s'appliquer également dans les enquêtes cas-témoins non appariées ou appariées. Le test de régression logistique a été réalisé à l'aide du logiciel SPSS. On a utilisé ce test pour la recherche d'une association entre les différentes combinaisons génotypiques des polymorphismes touchant RANTES, DARC, CCL2 et CCR2 trouvés dans notre population et les complications cliniques étudiées à savoir la vaso-occlusion et l'infection.

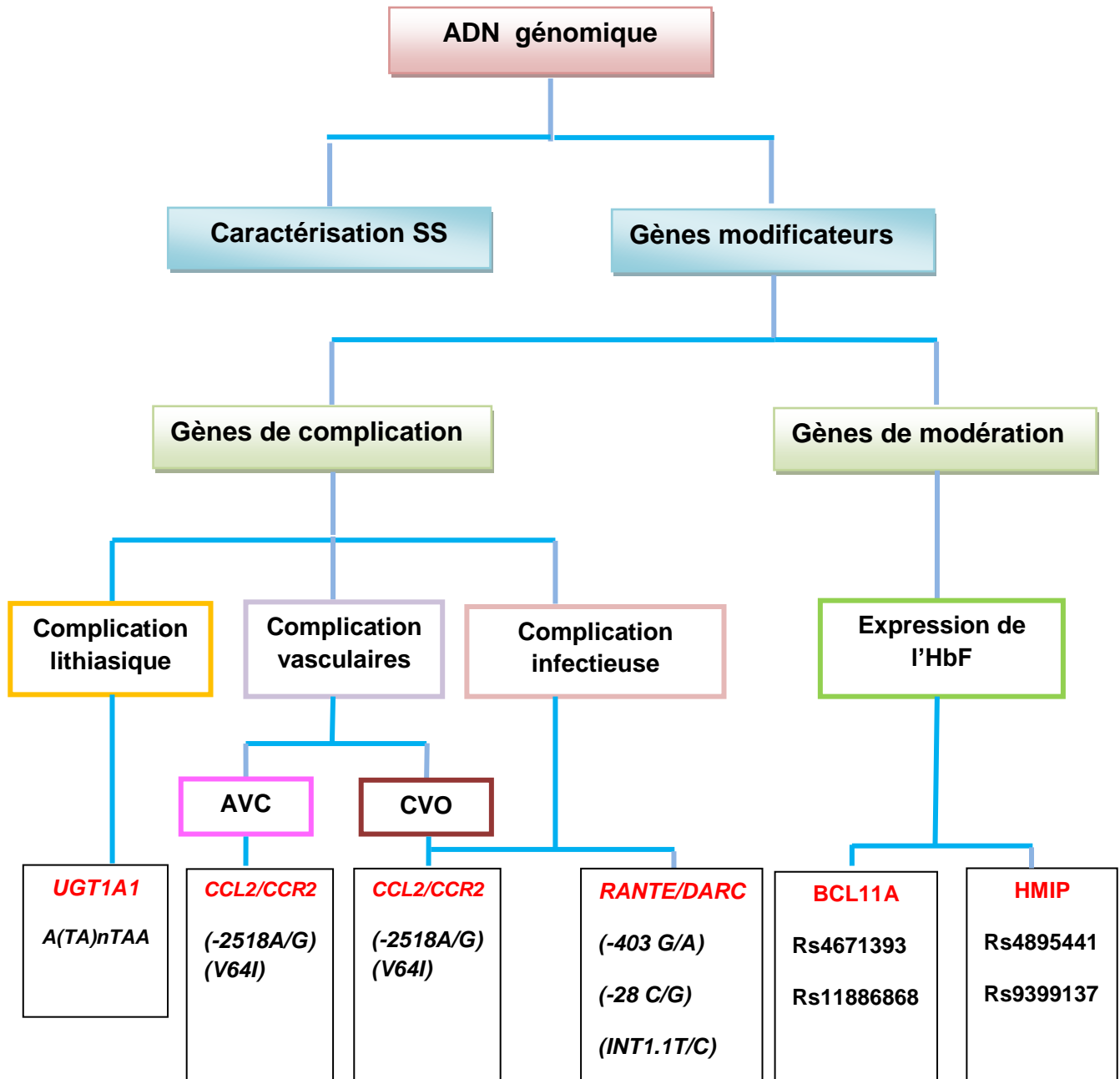
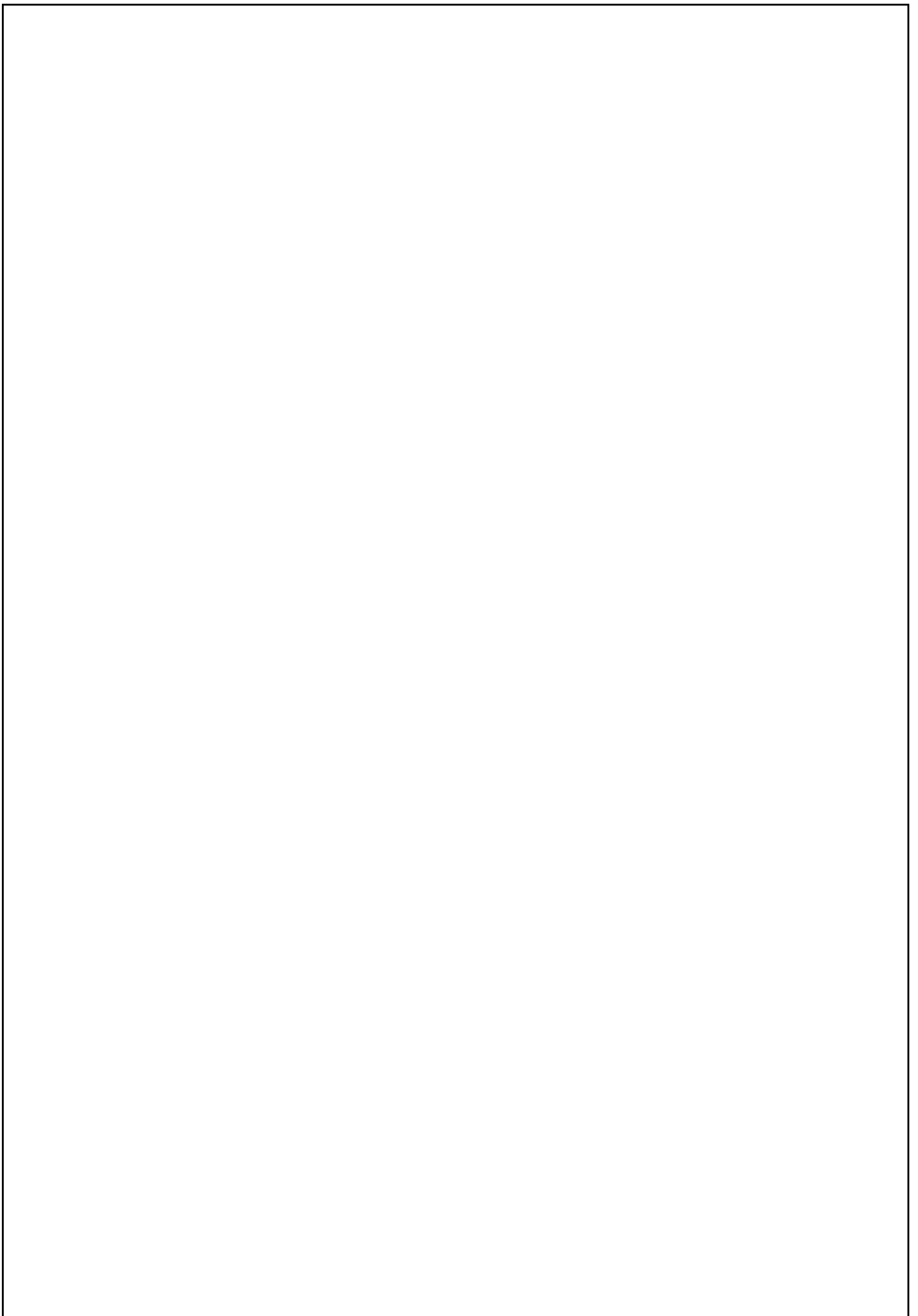


Figure 4 : Organigramme montrant la stratégie opératoire de l'étude de corrélation phénotype/génotype



RESULTATS

Chapitre I : *CARACTERISATION*
BIOLOGIQUE DES PATIENTS

II. Etude phénotypique

Notre travail a porté sur 175 Drépanocytaires homozygotes et 141 sujets normaux. Chaque sujet a fait l'objet d'une étude hématologique basée sur la numération et la formule sanguine, une étude de l'Hémoglobine incluant une séparation des fractions par HPLC et une confirmation de la fraction S par le test de solubilité et un dosage de la bilirubine sérique. Au besoin une caractérisation moléculaire de la mutation drépanocytaire a été entreprise.

A. Données hématologiques

Le tableau 1 ci dessous résume la moyenne des paramètres hématologiques obtenus.

Tableau1: paramètres hématologiques obtenus

	Drépanocytaires	Normaux
	N=175	N=141
Intervalle d' âge (ans)	9.5-40	19-21
Sex ratio (M/F)	70/105	55/86
Hb (g/dl)	8.2±0.1	12±0.9
GR(10¹²L)	3.29±0.9	2.89±1.02
VGM(fl)	82.7±0.9	74.2±1.3
CCMH(pg)	28.4±2.1	35.7±1.02
IDR(%)	14.4±0.5	5.29±1.02
Hb A(%)	Absente	97±0.1
HbS (%)	86±0.3	0
HbF(%)	11±0.1	0
HbA2	3±0.2	3±0.1

B. Etude de l'Hémoglobine

La figure 3 donne le profil d'un individu normal obtenu par HPLC. On observe deux pics important. Le premier correspond à l'HbA ayant un pourcentage égal à 97%, le deuxième pic représente l'HbA₂ ayant un pourcentage égal à 3%.

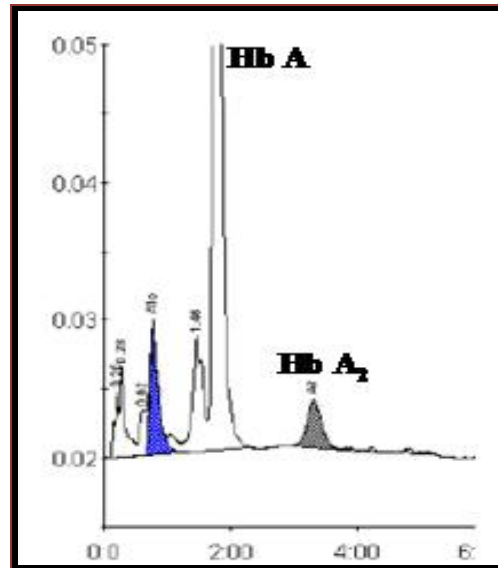


Figure 1 : Profil d'un homozygote AA

La figure 2 donne le profil type d'un drépanocytaire homozygote obtenu par HPLC. Bien que les taux d'Hb S peuvent varier d'un drépanocytaire à un autre le profil typique présente une fraction majeure d'Hb S dépassant les 2/3, deux fractions moins importante d'Hb A₂ et d'Hb F ;

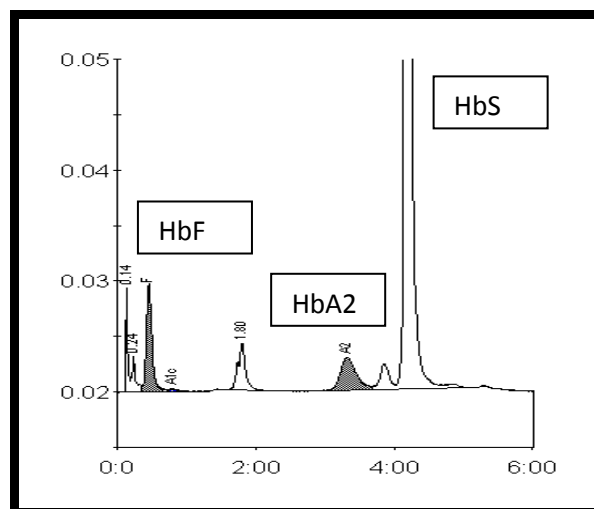


Figure 2 : Profil d'un homozygote SS

Les figures 1 et 2 présentent deux chromatogrammes obtenus avec HPLC (D10) : en ordonnée le pourcentage en Hb et en abscisse le temps de rétention pour chaque hémoglobine.

Dans certaines situations particulières (décès des parents ou difficulté d'exploration familiale) l'homozygotie drépanocytaire est confirmée par PCR/RFLP en utilisant l'enzyme de restriction BSU36I. L'amplification nous a permis d'observer un amplicon de taille égale à 839pb.

C. Caractérisation moléculaire de la mutation drépanocytaire

1. Amplification par PCR

L'amplification nous a permis d'observer un amplicon de taille égale à 739pb. Les produits de PCR sont migrés sur un gel d'agarose à 1% en présence d'un marqueur de taille 100pb (**figure 3**).

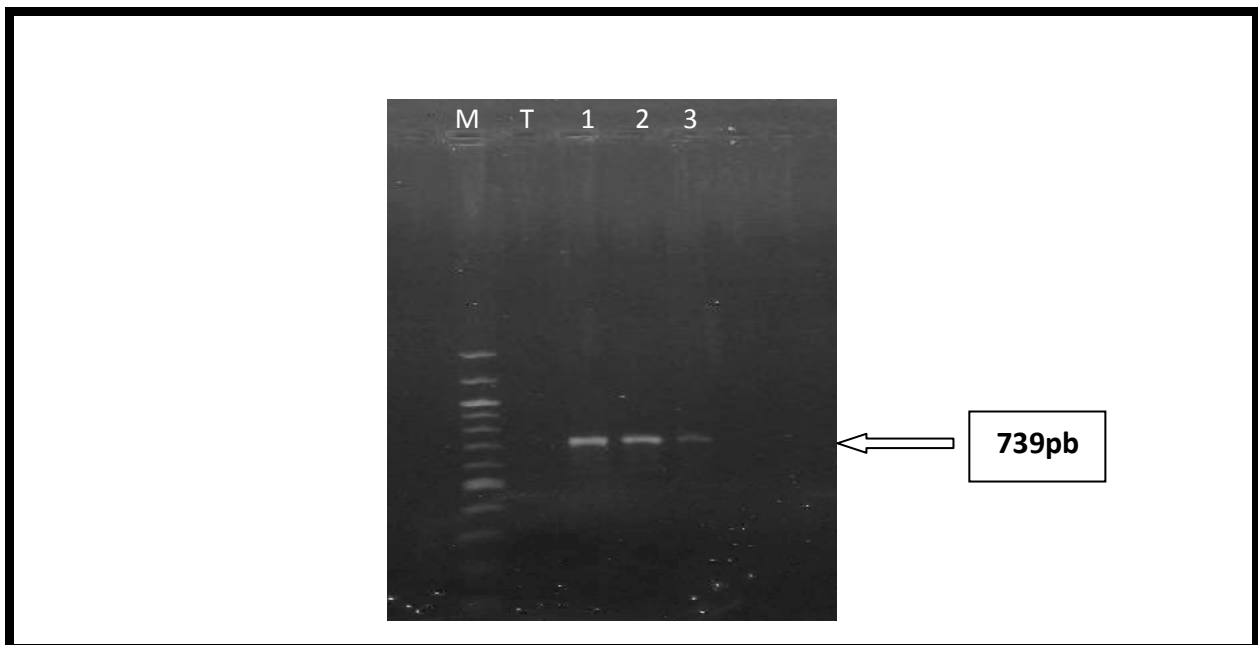


Figure 3 : Profil de migration des produits de PCR sur un gel d'agarose à 1%. M : marqueur de taille 100pb, T : témoin négatif, 1, 2 et 3 : sujets étudiés.

2. Digestion enzymatique

Les produits de PCR sont digérés par l'enzyme de restriction BSU36I. Dans le cas normal l'enzyme possède 3 sites obligatoires : 1, 2 et 3 générant 4 fragments de tailles respectives 196, 201, 88 et 254pb. La mutation drépanocytaire abolit le site 2 conduisant à une bande de 397 pb résultant de la fusion des bandes 196 et 201 (figure 4).

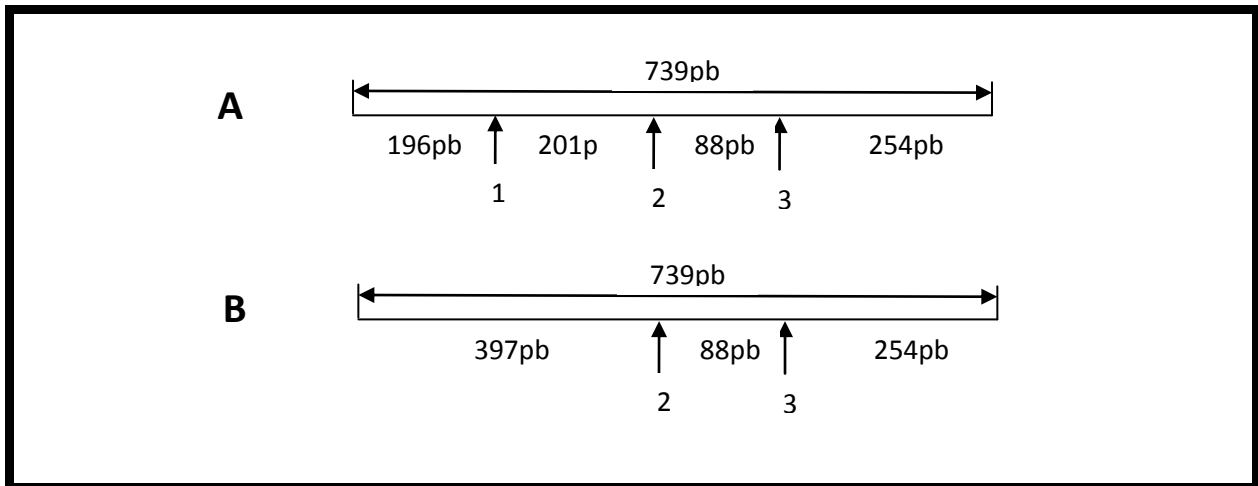


Figure 4 : site de restriction de BSU36I sur le gène β globine.

A : cas d'un individu normal, **B** : cas d'un drépanocytaire.

Les produits de digestion ainsi obtenus sont soumis à une migration sur gel de polyacrylamide à 8%, pendant trois heures à 120V, le gel est ensuite visualisé sous UV (figure 5a,b). Le résultat de la digestion enzymatique donne trois profils possibles comme c'est indiqué dans la figure suivante:

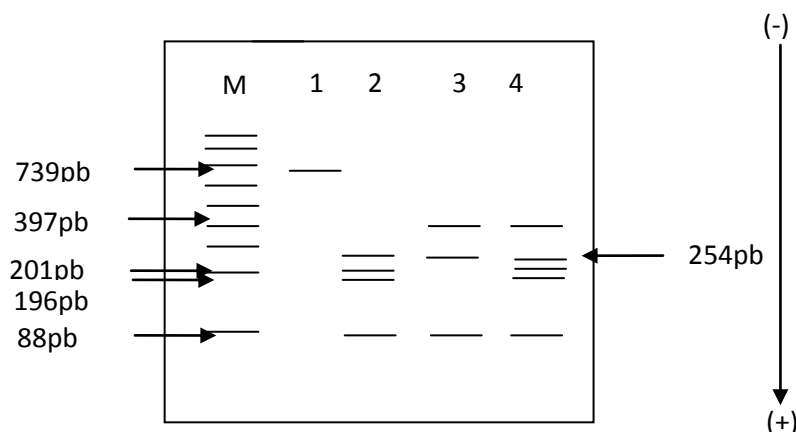


Figure5a : Profil théorique de migration des produits de digestion par Bsu36I en présence d'un marqueur de taille 100pb. Puits1 : Produit non digéré, puits 2 : Homozygote normal AA, puits3 : Homozygote muté TT et puits4 : Hétérozygote A/T.

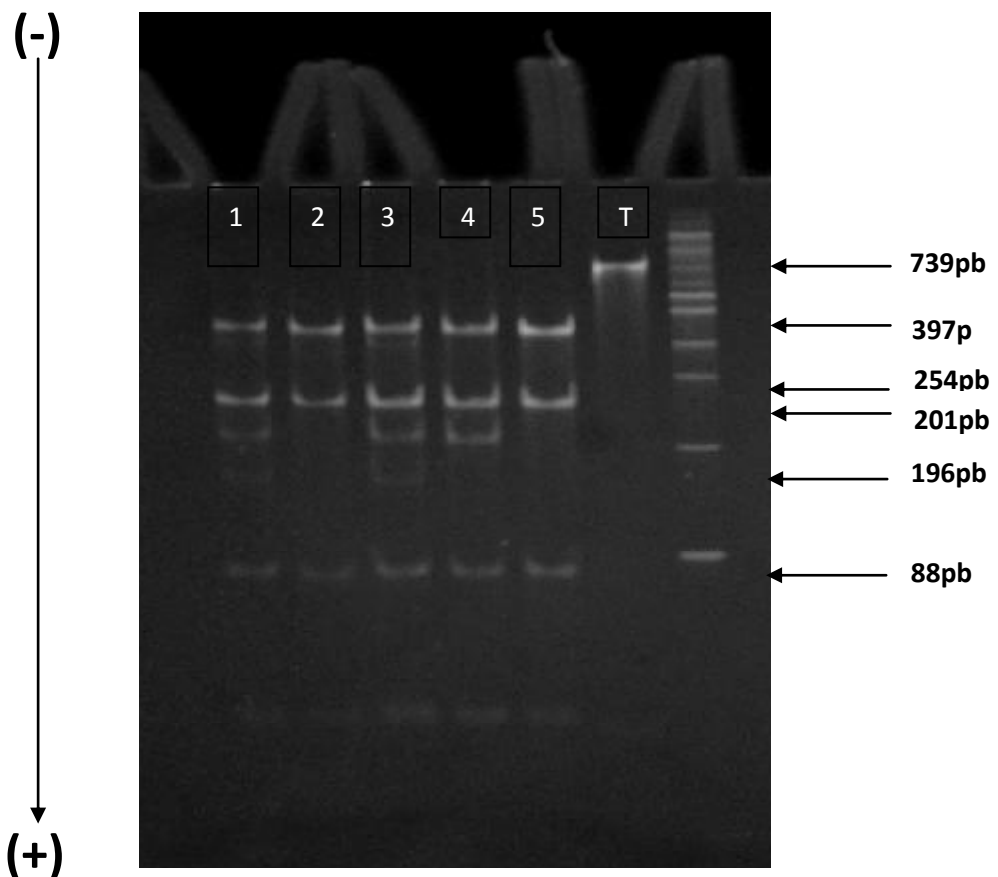


Figure 5 b : Profil de migration des produits de digestion sur un gel d'acrylamide à 8%. T: produit de PCR non digéré, 1, 3 et 4 : hétérozygote (AT) ; 2 et 5 : homozygote muté (AA)

D. Dosage de la bilirubine

La présence de bilirubine dans le sang renseigne sur la présence et l'ampleur de l'hémolyse. Quand des taux de bilirubine deviennent très élevés le risque de lithogénèse devient important. Ce paramètre biochimique a été dosé chez les drépanocytaires afin d'évaluer plus tard le risque de lithogénèse chez ces malades. Les taux de bilirubine sont subdivisés en trois groupes selon l'importance de l'hyperbilirubinémie observée. Le premier groupe correspond à une légère hyperbilirubinémie qui varie de 17 à 24 $\mu\text{mol/l}$, le deuxième groupe correspond à des valeurs d'hyperbilirubinémie plus importante allant de 25 à 35 $\mu\text{mol/l}$ et le troisième groupe correspond à une hyperbilirubinémie franche. **(Tableau 2)**

Tableau 2: Répartition des drépanocytaires selon le taux de bilirubine totale

	G1	G2	G3
Drépanocytaires	65	31	79
N=175			

Valeurs usuelles de la bilirubine totale : <17µmol/l. G1: [17 -24 µmol/l], G2: [25 -34 µmol/l] et G3 : [35 - 90 µmol/l]

**Chapitre II : BASES MOLECULAIRES
ASSOCIEES AUX COMPLICATIONS
DREPANOCYTAIRES**

Bien que la drépanocytose soit une maladie monogénique dont la mutation en cause est largement étudiée, le phénotype drépanocytaire présente une variabilité individuelle allant des formes compatibles avec une vie normale vers les situations où la gravité de la maladie devienne un vrai problème de santé. Les complications observées tout le long de la vie du drépanocytaire sont multiples dont certaines semblent être associées à des gènes épistatiques non globine ayant une influence plus ou moins directe sur la présentation de la maladie. Plusieurs complications sont décrites dans la littérature touchant toute la physiologie de l'individu, mais il reste toujours évident que certaines complications sont plus fréquentes que d'autres.

I. Analyse des patients étudiés

1. Variations cliniques

Dans notre travail, nous avons traité les complications les plus répandues selon les données cliniques et qui sont : la lithiase biliaire (LB), les complications vaso-occlusives (CVO), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les infections. Les informations cliniques sont relevées des dossiers médicaux. 150 patients avaient des données concernant la Lithiase Biliaire, mais seulement une centaine avait suffisamment de renseignements sur les autres complications. Le tableau 3 donne une répartition de notre échantillon selon le type de complication.

Tableau 3: Distribution des patients selon la présentation clinique.

	LB (N=175)	CVO (N=100)	AVC (N=100)	Inf (N=100)
Présence	97	83	19	33

LB : lithiase biliaire, **CVO** : crises vasoocclusives, **AVC** : accident vasculaire cérébral, **inf** : infection

Toutefois, certains autres drépanocytaires paraissent supporter leur maladie. Cette situation est principalement liée à une élévation de l'expression d'Hb F qui semble être modulée par des polymorphismes non β - globine ayant un rapport avec la synthèse d'Hb Foétale.

L'étude moléculaire a été réalisée en considérant chaque complication à part.

II. Complication lithiasique

1. Description de l'échantillon

Parmi les 175 drépanocytaires étudiés 97 présentaient une lithiase biliaire pigmentaire. Nous avons entrepris une exploration du promoteur du gène *UGT1A1* connu pour être impliqué dans les hyperbilirubinémie à l'origine de lithiases. Notre travail a comporté plusieurs étapes.

2. Mise en évidence du polymorphisme A(TA)_nTAA du gène *UGT1A1*

Le polymorphisme micosatellitaire A(TA)_nTAA est impliqué dans la régulation du métabolisme de la bilirubine . Il est situé au niveau de la « TATA box » du promoteur du gène *UGT1A1* et possède plusieurs variantes selon le nombre de répétition (TA). La mise en évidence de telles variantes a été réalisée par PCR/séquençage. Après amplification de la séquence contenant la TATA box, le contrôle de la PCR a été réalisé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. mettant en évidence un amplicon 500 pb (figure 6 a,b).

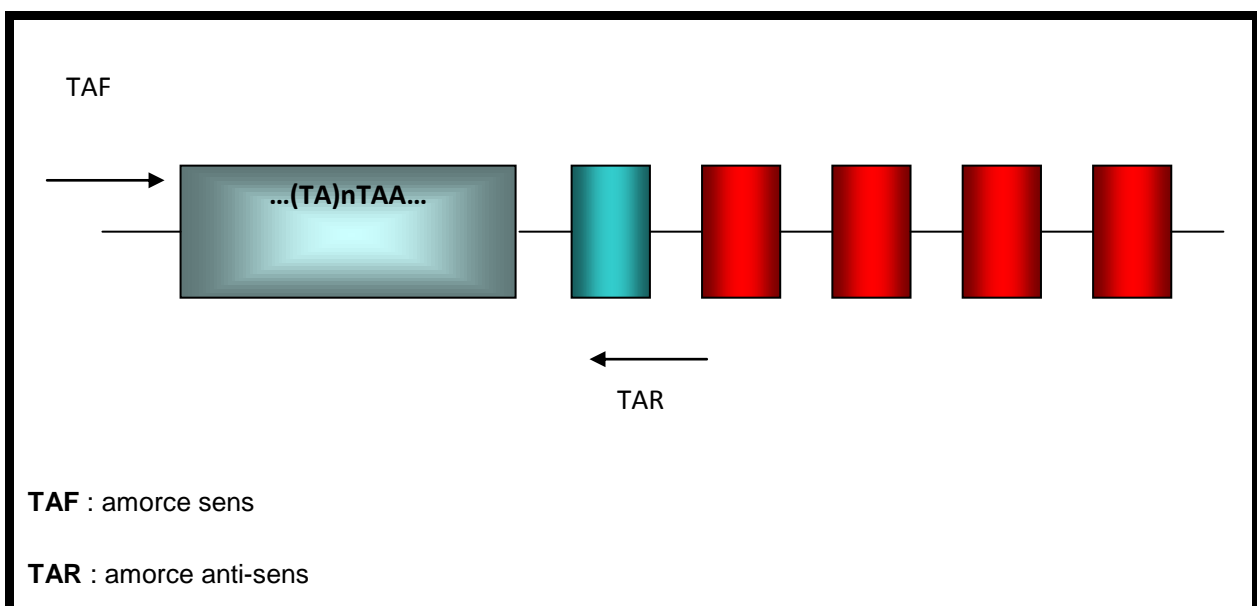


Figure 6 a : Emplacement des amorces au niveau de la TATA box.

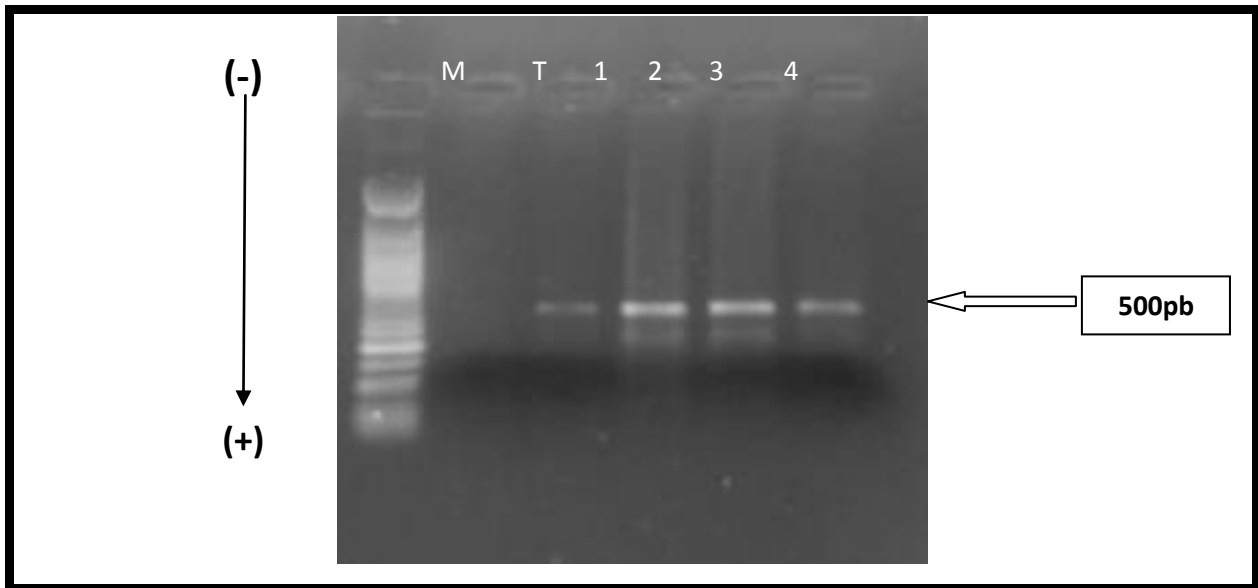
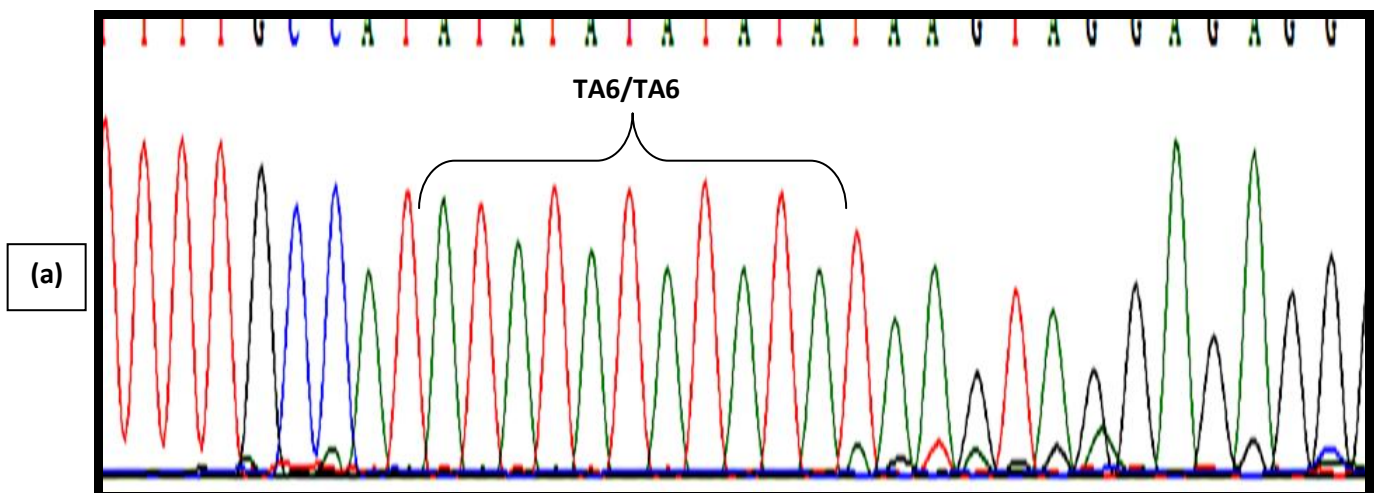
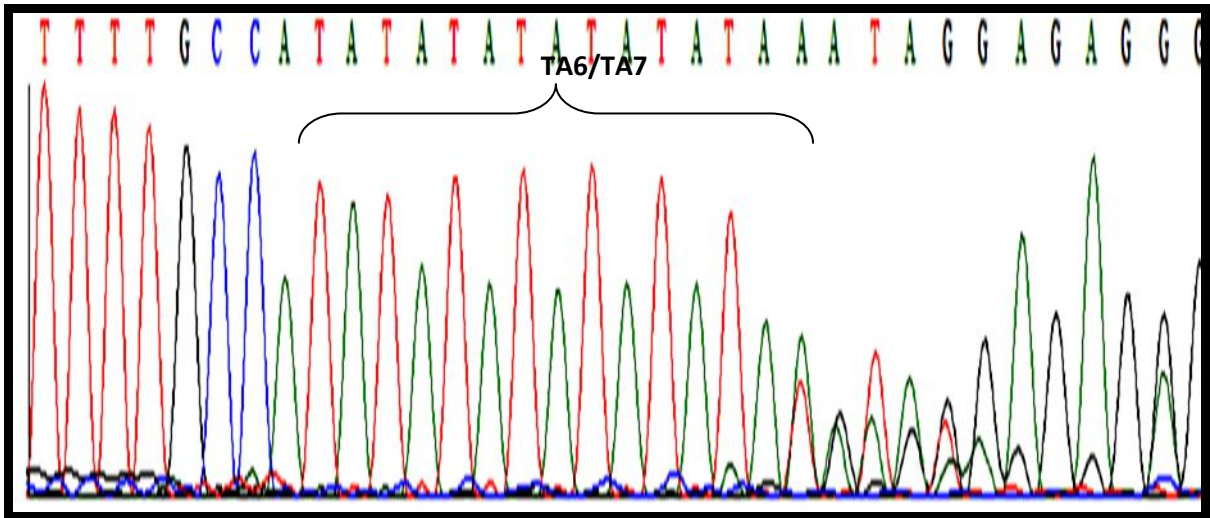


Figure 6 b : Profil de migration de l'amplicon attendu sur un gel d'agarose à 1%. M : marqueur de taille 100pb, 1-4 : sujets étudiés.

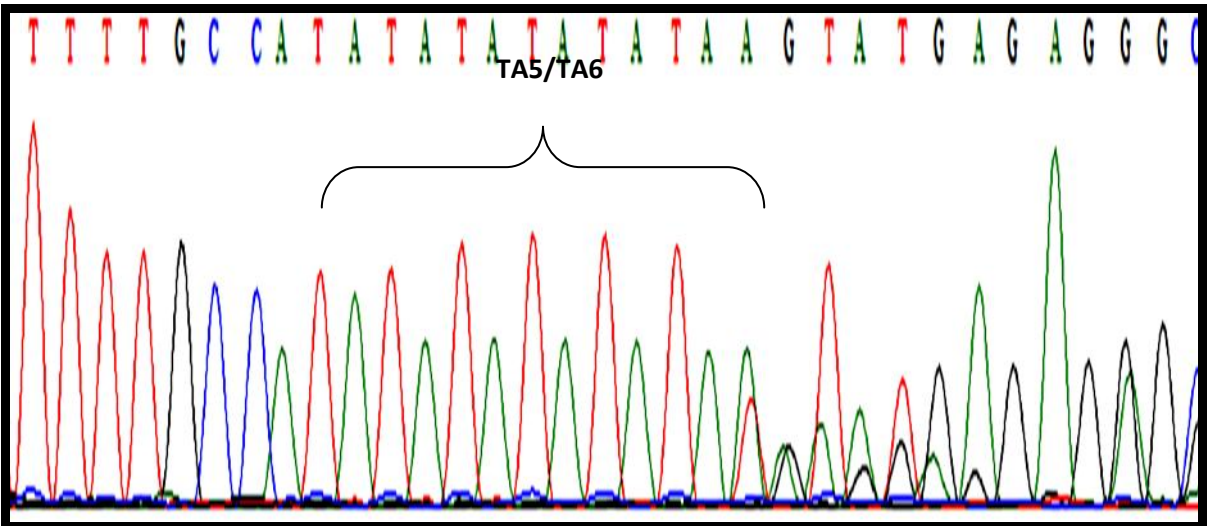
Le nombre de répétition (TA) du motif microsatellitaire A(TA)_nTAA chez les sujets étudiés a été réalisée par séquençage du fragment en question. Le résultat a révélé la présence de quatre variants: l'allèle normal. (TA)₆ et trois allèles anormaux : (TA)₅, (TA)₇ et (TA)₈. donnant lieu à sept génotypes différents : (TA)₆/(TA)₆, (TA)₆/(TA)₅, (TA)₅/(TA)₇, (TA)₆/(TA)₇, (TA)₇/(TA)₇, (TA)₇/(TA)₈ et (TA)₈/(TA)₈ dominé par le génotype normal. (TA)₆/(TA)₆ (**figure 7 et Le tableau 4**).



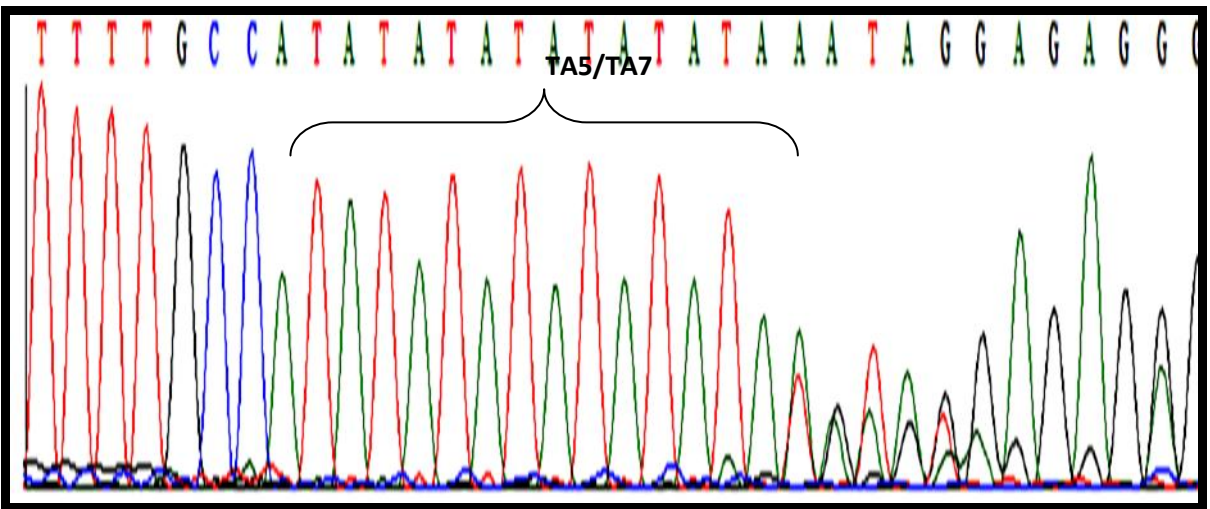
(b)



(c)



(d)



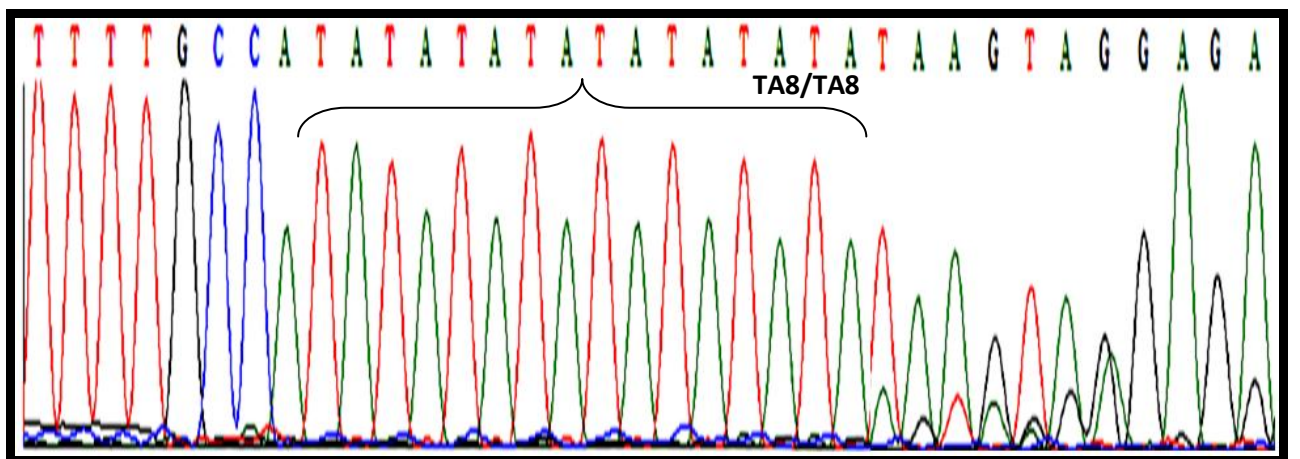
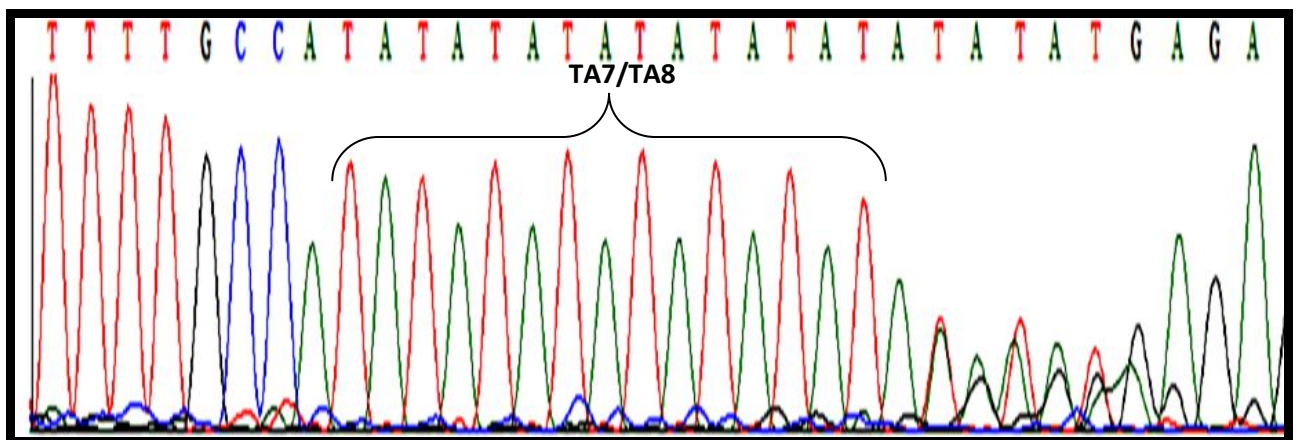
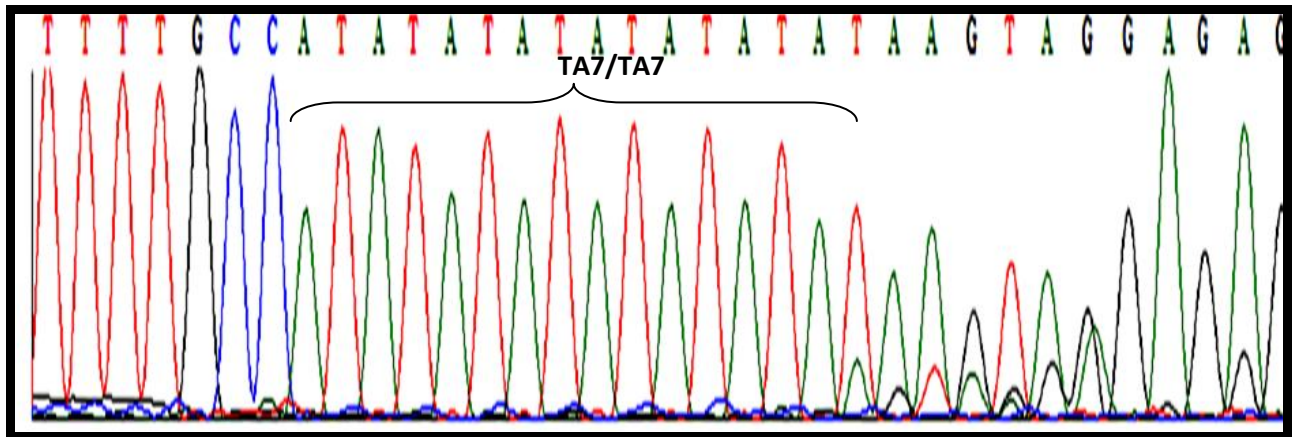


Figure 7: Séquençage du motif microsatellitaire A(TA)_nTAA présentant plusieurs génotypes

(a) : (TA)₆/(TA)₆, **(b)** : (TA)₆/(TA)₇, **(c)** : (TA)₅/(TA)₆, **(d)** : (TA)₅/(TA)₇, **(e)** : (TA)₇/(TA)₇, **(f)** : (TA)₇/(TA)₈,

(g) : (TA)₈/(TA)₈.

Tableau 4 : Répartition et fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme A(TA)_nTAA chez les drépanocytaires

Allèle		Génotypes	
2N=350		N=175	
Type	Fréquence	Type	Fréquence
(TA) ₆ (normal)	0.55	(TA) ₆ /(TA) ₆ (normal)	37.33%
(TA) ₅	0.013	(TA) ₅ /(TA) ₆	1.33%
(TA) ₇	0.40	(TA) ₆ /(TA) ₇	34%
(TA) ₈	0.016	(TA) ₇ /(TA) ₇	20.66%
		(TA) ₅ /(TA) ₇	1.33%
		(TA) ₇ /(TA) ₈	3.33%
		(TA) ₈ /(TA) ₈	0%

III. Complications vasculaires

Les deux complications vasculaires les plus répandues dans notre série sont les AVC et les CVO. En effet, 83 patients drépanocytaires ont des crises vasoocclusives et 19 ont des accidents vasculaires cérébraux. Deux couples de cytokine et leur récepteur connus pour être impliqués dans la physiopathologie vasculaire sont étudiés dans notre série. Il s'agit des couples RANTES/DARC d'une part et CCL2/CCR2 d'autre part. L'étude a concerné des polymorphismes fonctionnels touchant le gène *RANTES* (-403G/A -28C/G et IN1.1T/C), le gène *DARC* (-46T/C), le gène *CCL2* (-2518A/G) et le gène *CR2* (V64I au niveau de l'exon 2).

1. Polymorphismes du Gène *RANTES*

L'étude des polymorphismes -403G/A -28C/G a concerné 100 drépanocytaires. Elle est faite par PCR/Séquençage en amplifiant une séquence cible contenant les trois polymorphismes (**figure 8 a**). La taille de l'amplicon est égale à 899pb (**figure 8 b**).

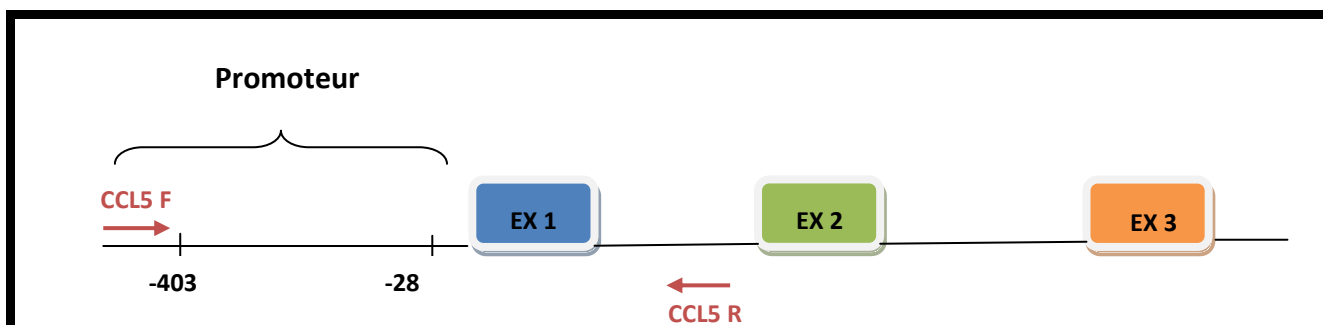


Figure 8 a : Schéma montrant le fragment du gène *RANTES* contenant les trois polymorphismes et amplifié par le couple d'amorce CCL5 F/CCL5 R

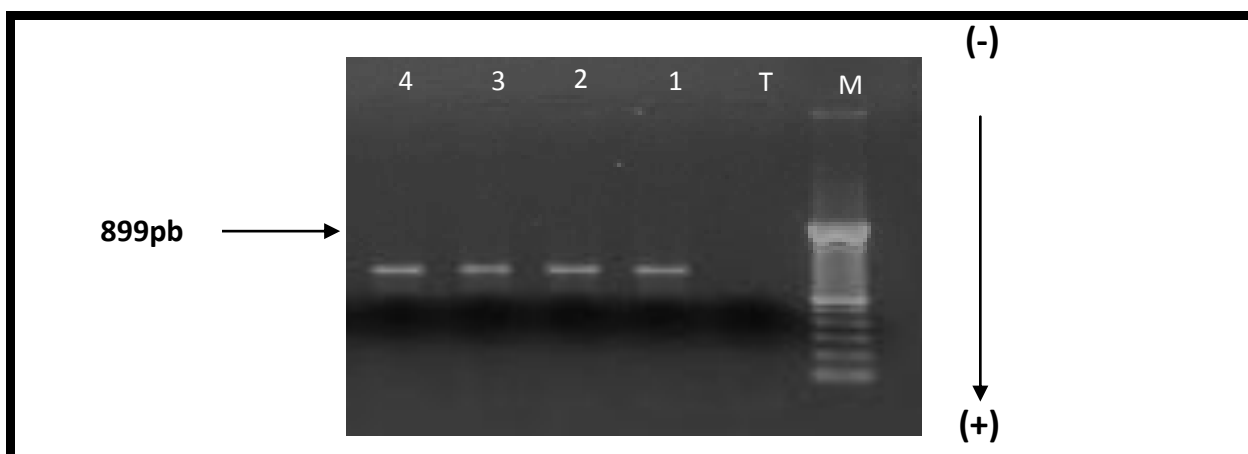


Figure 8 b : produits PCR de l'amplicon concerné par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% :

1-4 : sujets étudiés, T : témoin négatif et M : marqueur de taille 100 pb.

La recherche des polymorphismes a été réalisée par séquençage du fragment en question. La lecture a été initiée à partir des régions flanquantes de part et d'autre du polymorphisme recherché

Le polymorphisme -403G/A est une mutation ponctuelle localisée au niveau du promoteur du gène *RANTES* touchant la position -403. C'est une transition correspondant au remplacement d'une Guanine par une Adénine. L'exploration nucléotidique de la séquence d'intérêt a permis d'observer chez les sujets

homozygotes normaux (G/G) la présence d'un seul pic (G). Les sujets homozygotes mutés (A/A) ont présenté un seul pic (A). Cependant, les hétérozygotes GA présentait une superposition de deux pics (G et A) (**figure 9**).

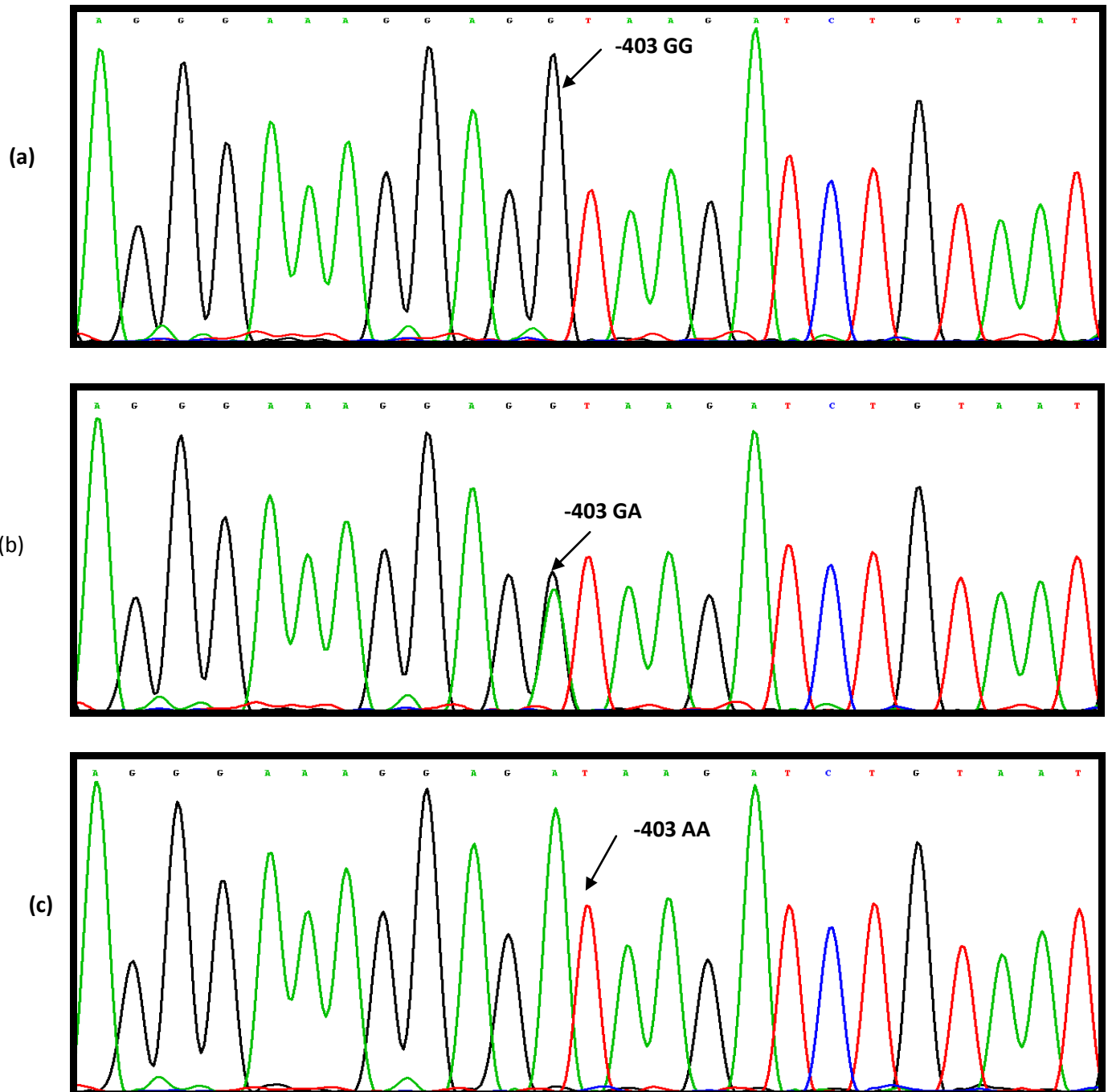


Figure 9 : Mise en évidence du polymorphisme -403G/A du gène RANTES par séquençage

(a) : séquence de l'allèle homozygote sauvage (b) : séquence de l'allèle hétérozygote, (c) : séquence de l'allèle homozygote muté

Le polymorphisme -28C/G est également une mutation ponctuelle du promoteur qui touche la position -28. C'est une transversion correspondant au remplacement d'une Cytosine par une Guanine. La séquence chez Les homozygotes normaux CC est définie par la présence d'un seul pic (C). La superposition de deux pics (C et G) caractérise l'hétérozygote CG. Nous n'avons pas observé d'homozygotes mutés CC dans notre échantillon (**figure 10**).

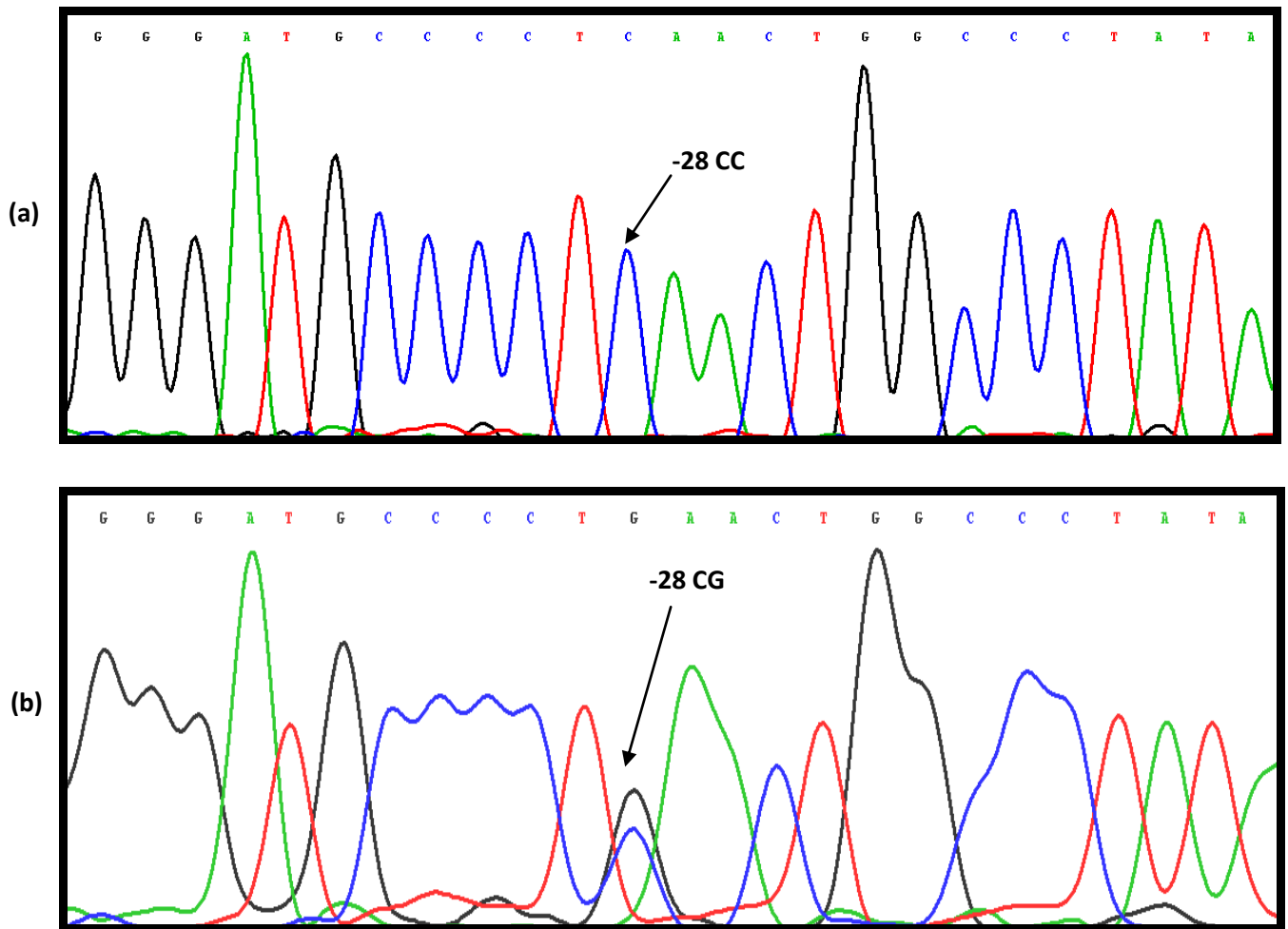


Figure 10 : Mise en évidence du polymorphisme -28C/G du gène *RANTES* par séquençage (a) : homozygote sauvage (b) : hétérozygote

Le polymorphisme IN1.1T/C est une mutation ponctuelle intronique touchant le premier intron du gène *RANTES* en position 168923. C'est une transition correspondant au remplacement d'une thymine par une cytosine. Elle a été identifiée par PCR/RFLP après amplification d'un fragment de 343 pb suivie d'une digestion enzymatique par MbolI. La séquence amplifiée est délimitée par le couple d'amorce IN1.1 F/IN1.1R La présence de la transition T/C crée un site de restriction

supplémentaire pour l'enzyme, qui se traduit par la division de la bande normale de en deux fragments de tailles respectives 225 et 118 pb (figure 11 a, b et c).

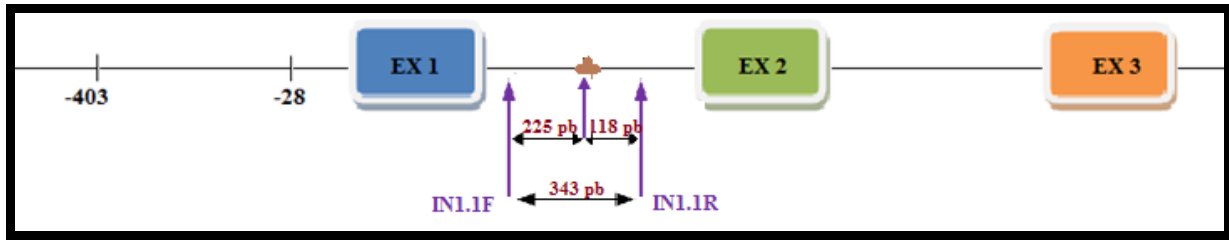


Figure 11 a: Schéma montrant la position de site MbolI chez les mutés sur le fragment amplifié IN1.1F-IN1.1R du gène *RANTES*

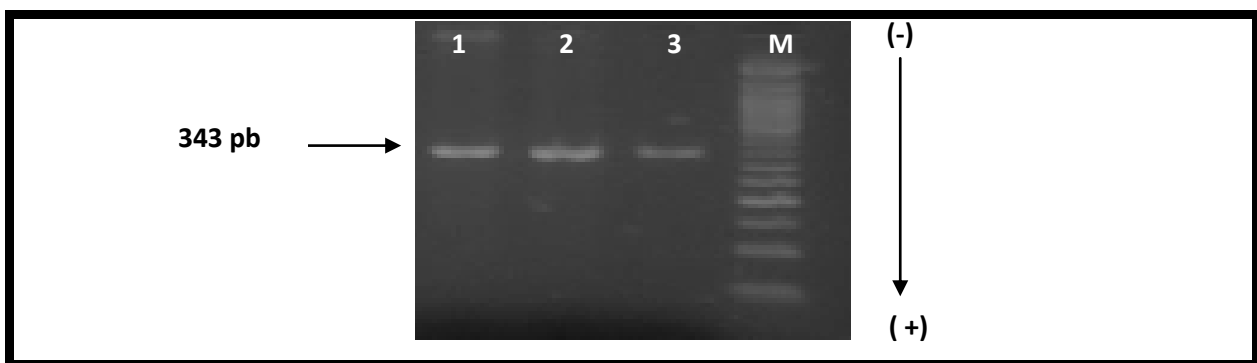


Figure 11 b: Schéma montrant le fragment amplifié par le couple d'amorce IN1.1 F/IN1.1 R du gène *RANTES* et contenant le polymorphisme IN1.1T/C : Pistes 1-3 : sujets étudiés, et M : marqueur de taille 50 pb.

Les produits de digestion ainsi obtenus sont soumis à une migration sur gel de polyacrylamide à 8%, pendant trois heures à 120V, le gel est ensuite visualisé sous UV. Les résultats des digestions enzymatiques montrent la présence des trois génotypes: TT, TC et CC (figure 11c).

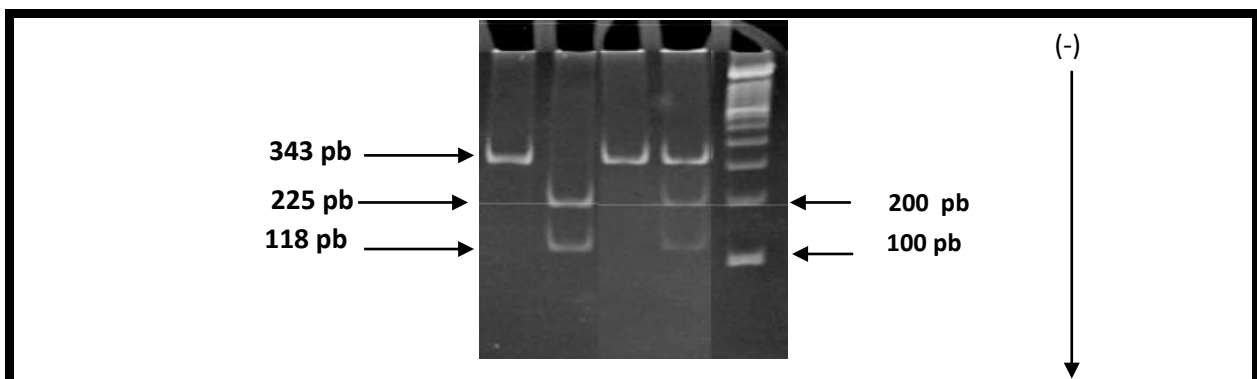


Figure 11 c: Profil de migration des produits de digestion par MbolI sur un gel de polyacrylamide à 8% : 1 : produit de PCR non digéré, 2 homozygote muté CC, 3 : homozygote normal TT, 4 hétérozygote TC et M : marqueur de taille de 100 pb.

8 géotypes différents sont observés pour les trois polymorphismes étudiés avec une prédominance du géotype normal pour chacun d'entre à savoir GG (pour le -403), CC (pour le -28) et TT (pour INT1.1) (tableau 5)

Tableau 5 : Répartition géotypique et allélique des polymorphismes -403G/A, -28C/G et INT1.1T/C chez les drépanocytaires

	Polymorphismes	Nombre	Fréquence
-403G/A			
Allèles	G	168	0.80
	A	39	0.20
Géotypes	GG	68	68%
	GA	25	25%
	AA	7	7%
-28C/G			
Allèles	C	189	0.99
	G	1	0.01
Géotypes	CC	99	99%
	CG	1	1%
	GG	0	0%
INT1T/C			
Allèles	T	174	0.87
	C	26	0.13
Géotypes	TT	79	79%
	TC	16	16%
	CC	5	5%

2. Polymorphismes du Gène *DARC*

Le polymorphisme *DARC* -46 T/C a été exploré par PCR/Séquençage en amplifiant un fragment de 500pb. Le séquençage de ce fragment a permis d'observer un seul profil homozygote normal TT chez tous les patients. (**Figure 12 a, b et c**)

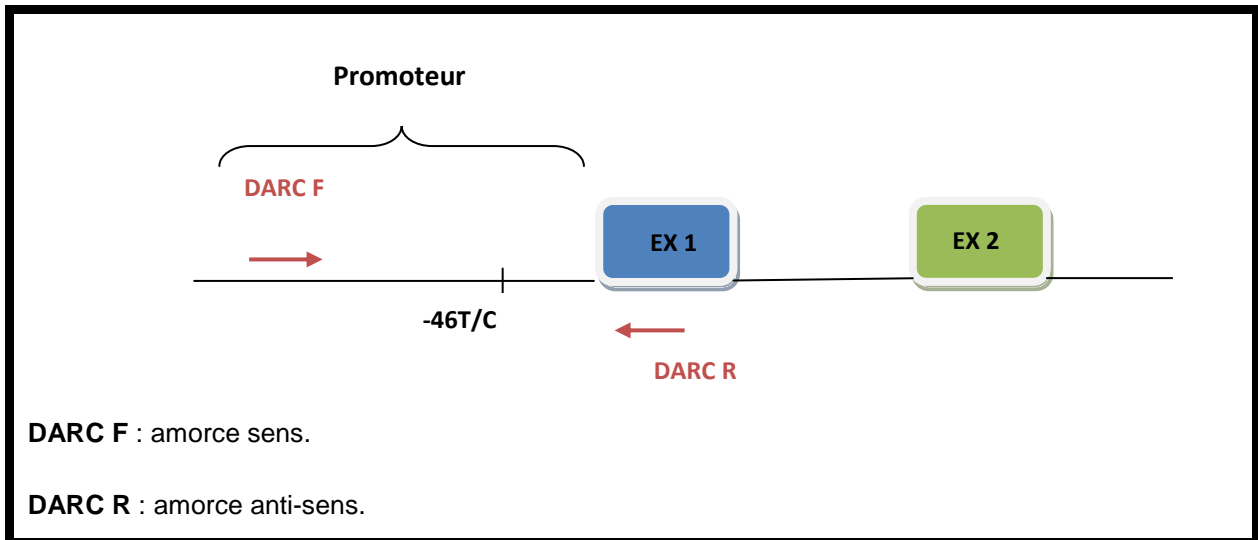


Figure 12 a : Schéma montrant le fragment du gène DARC contenant le polymorphisme -46T/C et amplifié par le couple d'amorce DARC F/DARC R.

Afin de contrôler la PCR, les produits de la réaction d'amplification sont visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Ce contrôle nous a permis d'observer un amplicon de taille 500pb (**figure 12b**).

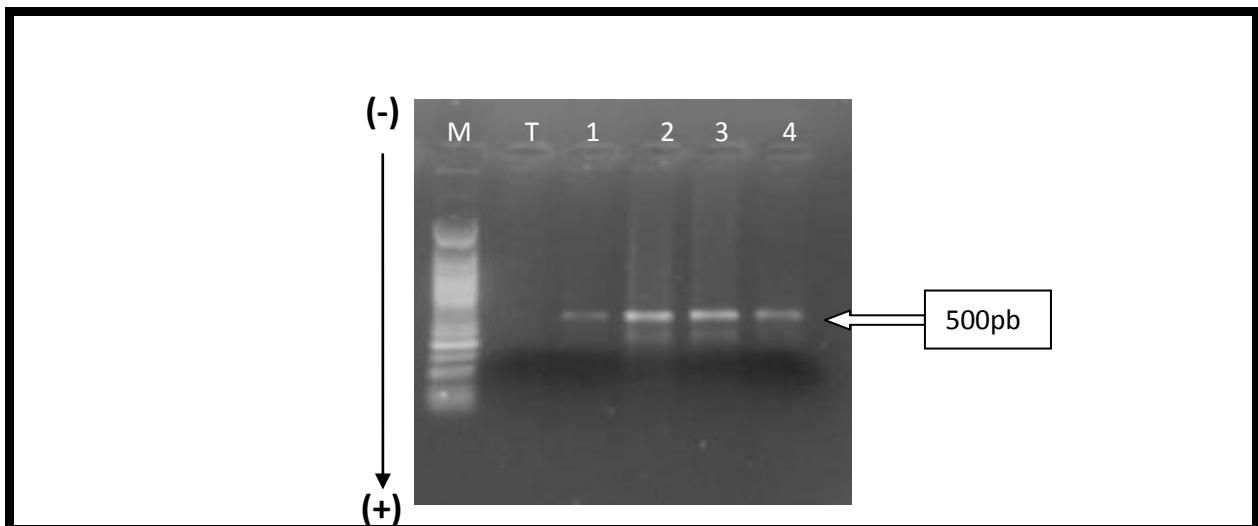


Figure 12 b : mise en évidence de la bande de 500pb contenant le polymorphisme DARC-46 T/C par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% : M : marqueur 100 pb 1, 2, 3,4 échantillon de patients.

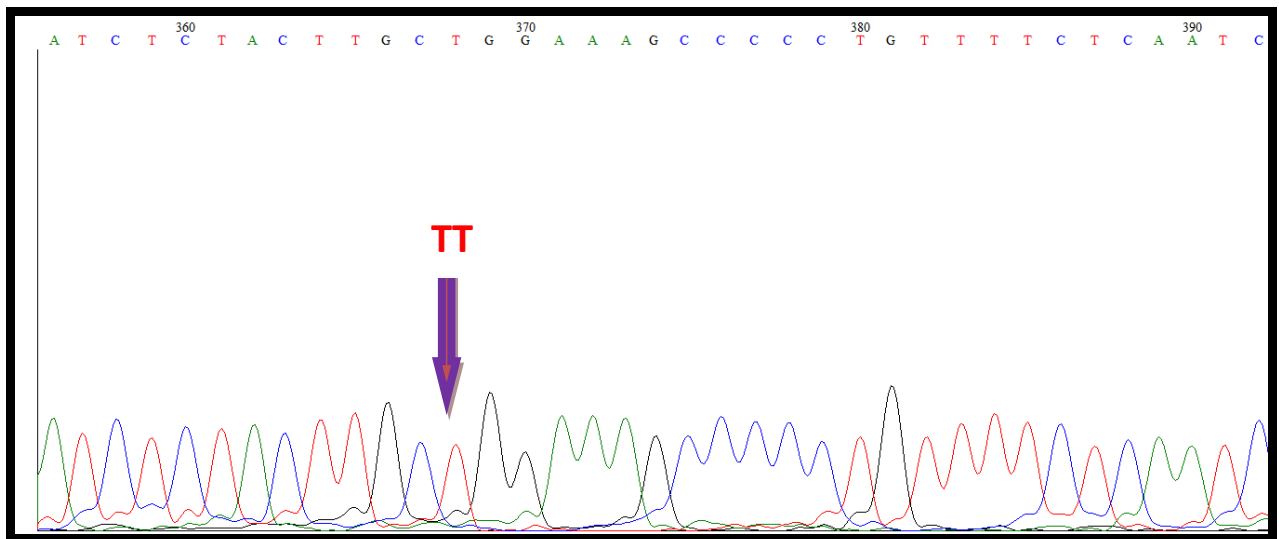


Figure 12 c : Mise en évidence du polymorphisme -46T/C du gène *DARC* par séquençage.

Au niveau génotypique tous les patients étudiés présentent le génotype normal TT (tableau 6).

Tableau 6 : Répartition génotypique chez les drépanocytaires

Génotypes	Drépanocytaires (n=100)
TT (normal)	100
TC	0
CC	0

Couple CCL2/CCR2

Pour le deuxième couple de cytokines CCL2/CCR2 deux complications ont été considérées les CVO et les AVC qui semblent être susceptibles toutes les deux d'être modulées par les deux polymorphismes CCL2 (-2518A/G) et CCR2 (V64I) à la fois.

3. Polymorphisme CCL2 (-2518A/G)

L'étude de ce polymorphisme a été réalisée par PCR-RFLP. Les produits PCR de 689 pb est soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction PvuII. La présence de la transition A/G au niveau du promoteur CCL2 (-2518A/G) crée un site de restriction pour l'enzyme, qui se traduit par la division de la bande normale de 689 pb en deux fragments de tailles respectives 507 et 182 pb. Les produits de digestion ainsi obtenus sont soumis à une migration sur gel de polyacrylamide à 8%, pendant trois heures à 120V, le gel est ensuite visualisé sous UV (**figure 13 a, b, c**).

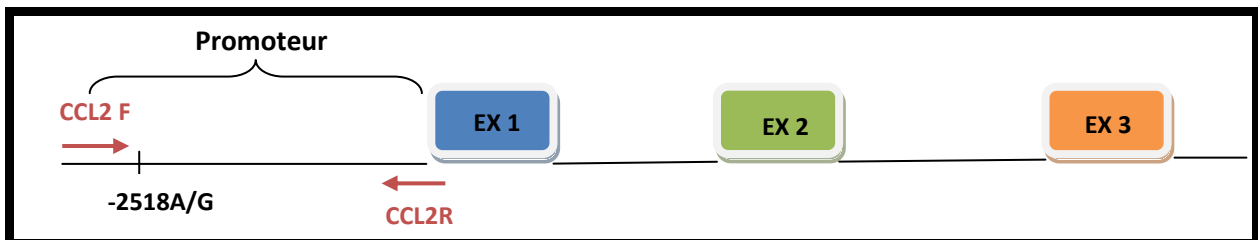


Figure 13 a : position des amorces au niveau du promoteur CCL2

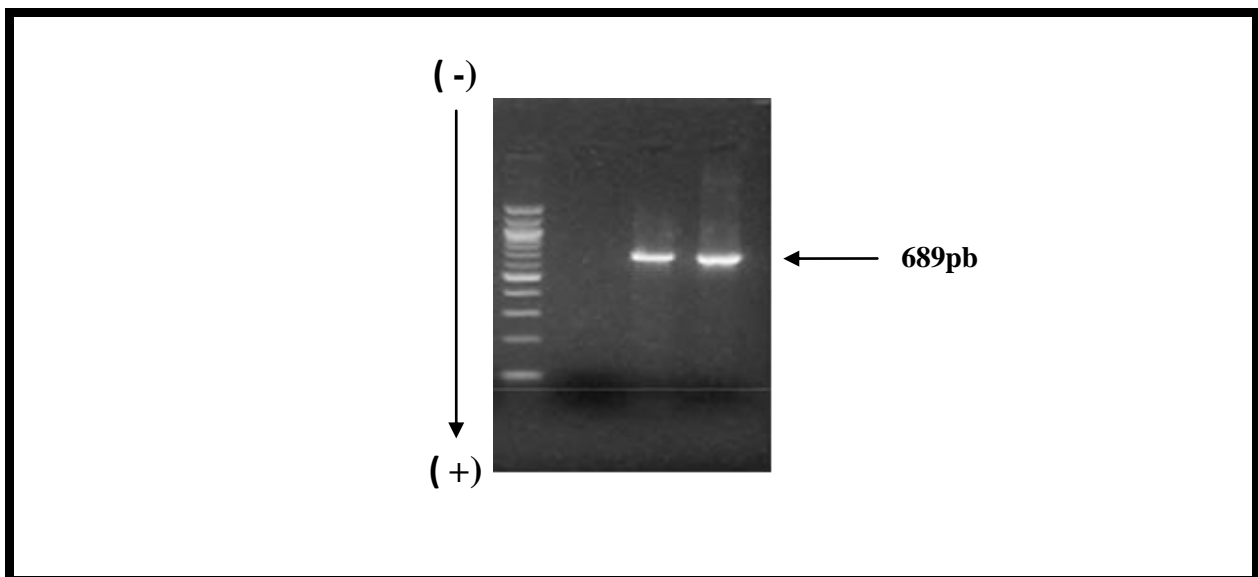


Figure 13 b : produits PCR visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% : T : témoin négatif, 1-2 : amplicons, M : marqueur de taille 100 pb.

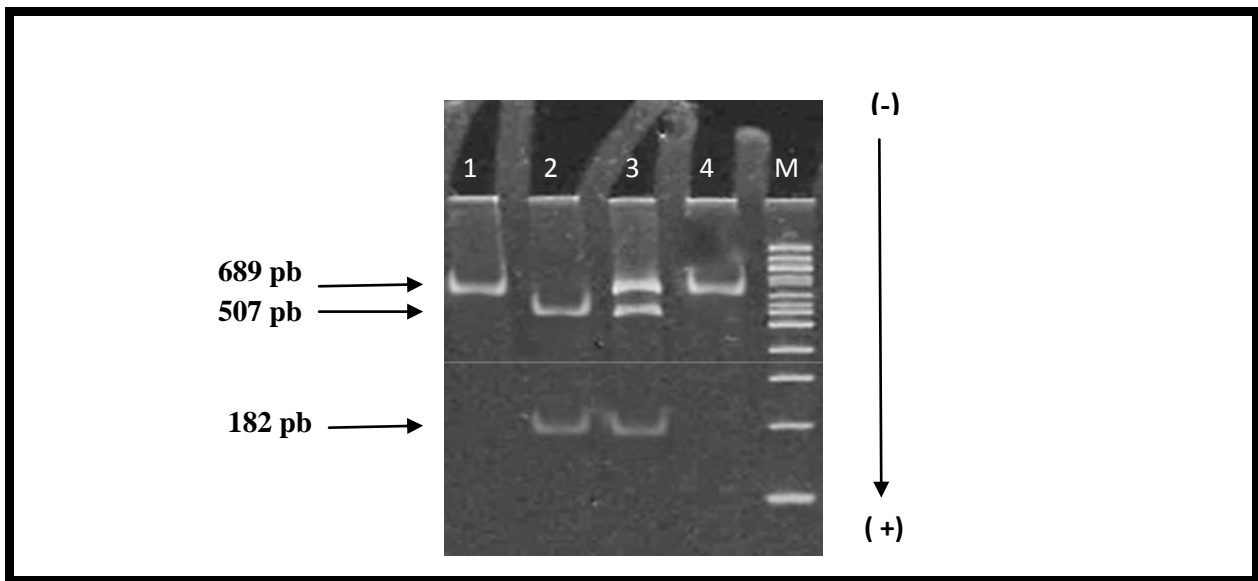


Figure 13 c : Profil de migration des produits de digestion par PvuII de l'amplicon CCL2 sur un gel de polyacrylamide à 8%

1 : amplicon non digéré, 2 : homozygote muté GG , 3 : hétérozygote AG , 4 homozygote AA ,M : marqueur de taille de 100 pb.

Nos résultats montrent trois génotypes : AA, AG et GG avec une prédominance du génotype normal AA présent chez les drépanocytaires avec ou sans AVC. Le génotype homozygote muté GG a été rencontré à une fréquence moindre chez les drépanocytaires sans AVC. Concernant les CVO le génotype AA est majoritaire chez les drépanocytaires avec CVO alors qu'il a été rencontré avec une fréquence faible chez les drépanocytaires sans CVO. Le génotype GG a été rencontré avec la même fréquence chez les deux groupes de drépanocytaires.

7. Polymorphisme CCR2 (V64I)

De la même manière que le précédent, le polymorphisme CCR2-V64I a été analysé par PCR/ RFLP .L'amplification donne lieu à un fragment de 222pb. Il est ensuite digéré par BsaB1 qui révélera une seule bande de 222 pb dans le cas normal et deux bandes de 204 et 18 pb en présence de la mutation CCR2-V64I .Les produits de digestion sont ensuite visualisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 8%. IL donnant lieu (**figure 14 a, b, c**)

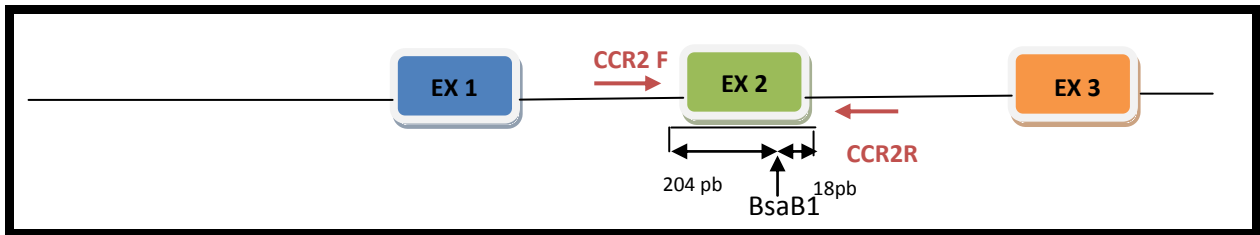


Figure 14 a : Localisation de la mutation V64I sur l'exon 2 et emplacement des amorces et sites de BsaB1.

Dans le cas normal on obtient une seule bande de 222pb. La mutation G/A crée un nouveau site et on obtiendrait deux bandes de 204 et 18 pb.

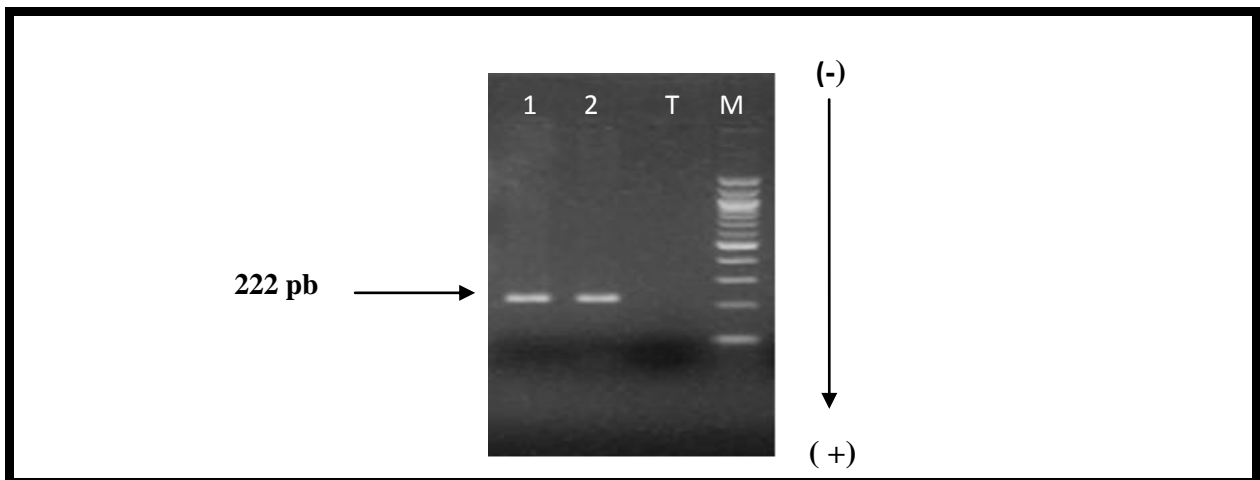


Figure 14 b: Contrôle des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

1-2 : sujets étudiés, T : témoin négatif, M : marqueur de taille 100 pb

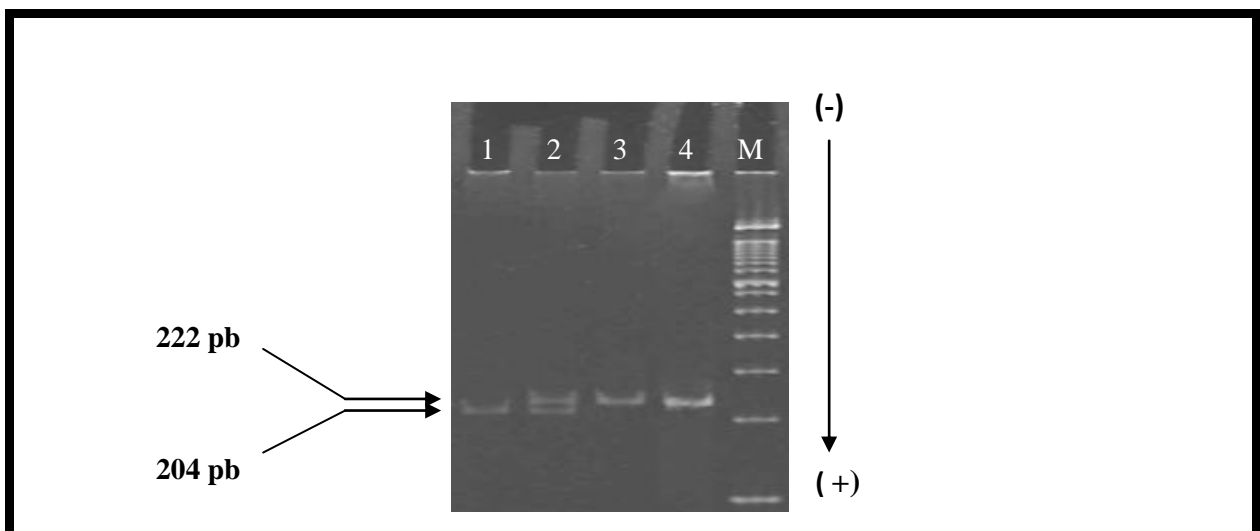


Figure 14 c: produit de digestion par BsaB1

1 : homozygote AA, 2: hétérozygote AG ,3 : homozygote normal GG ,4 : produit PCR non digéré M : marqueur de taille 100 pb

Les résultats montrent trois génotypes: GG, AG et AA avec une prédominance du génotype normal GG chez les drépanocytaires sans et avec AVC. En ce qui concerne le génotype muté AA, il était plus fréquent chez les drépanocytaires avec AVC. Concernant les CVO le génotype GG est majoritaire chez les drépanocytaires avec CVO alors qu'il a été rencontré avec une fréquence faible chez les drépanocytaires sans CVO. Le génotype AA a été rencontré avec la même fréquence chez les deux groupes de drépanocytaires.

Le tableau 7 résume l'essentiel des résultats concernant les deux polymorphismes CCL2 et CCR2.

Tableau 7 : Répartition génotypique et alléliques des polymorphismes CCL2 (-2518A/G) CCR2 (V64I)

Polymorphismes		Nombre	Fréquences
-2518A/G			
Allèles	A	160	0.79
	G	40	0.21
Génotypes	AA	65	65%
	AG	30	30%
	GG	5	5%
V64I			
Allèles	G	176	0.88
	A	24	0.12
Génotypes	GG	81	81%
	GA	14	14%
	AA	5	5%

IV. Complications infectieuses

Parmi les 100 patients drépanocytaires étudiés 33 ont développé des infections. Les mêmes cytokines (RANTES et son récepteur DARC, CCL2 et son récepteur CCR2) décrites dans les complications vasculaires sont explorées. L'étude moléculaire a été réalisée comme décrit dans le paragraphe précédent. L'exploration du gène RANTES (polymorphisme -403 G/A) révèle que le génotype majoritaire est encore le génotype normal G/G. Les fréquences des hétérozygotes GA et homozygotes mutés AA ne semblent pas différer pour les patients avec ou sans infection. En ce qui concerne le polymorphisme -28C/G le 2/3 des drépanocytaires ayant le génotype CC normal n'ont pas présenté d'infection. Par ailleurs, un seul patient hétérozygote C/G a présenté cette complication. L'analyse du polymorphisme INT1.1T/C montre que parmi les 79 drépanocytaires de génotype TT, une majorité d'entre eux (55) n'ont pas développé d'infection. Cependant, pour les génotypes présentant la mutation que se soit à l'état hétérozygote TC ou homozygote CC, nous avons noté une similitude entre le nombre de drépanocytaires avec ou sans infection.

L'exploration du polymorphisme -46T/C du gène DARC révèle que tous les patients étudiés présentent le génotype normal TT.

L'exploration du couple CCL2/CCR2 a révélé que le génotype normal AA du polymorphisme -2518 A/G est le plus fréquent (66.18%) chez les drépanocytaires sans infection et 62.5% chez les drépanocytaires avec infection. Par ailleurs, le génotype muté G/G est absent chez les drépanocytaires présentant les infections.

Enfin, et pour le polymorphisme V64I de CCR2, Nous avons noté que le génotype normal GG est fréquent chez les sujets avec ou sans infection (87.5 et 77.94% respectivement) le génotype muté AA est le moins fréquent 5.88% chez les sujets sans infection et 3.12% chez les sujets avec infection. Le tableau 8 résume l'ensemble des données que nous venons d'évoquer.

Tableau 8 : Répartition génotypique et allélique des polymorphismes RANTES, DARC, CCL2 et CCR2 selon la présence ou l'absence de l'infection chez les drépanocytaires.

Polymorphismes	SS sans infection			SS avec infection		
	N=67			N=33		
	HN	HT	HM	HN	HT	HM
RANTES						
-403G/A	49	14	5	19	12	2
-28C/G	67	0	0	32	1	0
INT1.1T/C	55	10	3	24	7	2
DARC						
-46T/C	67	0	0	33	0	0
CCL2						
-2518A/G	44	18	5	20	13	0
CCR2						
V64I	52	11	4	28	4	1

HN : homozygote normal, **HT** : hétérozygote, **HM** : homozygote.

V. Modulation de la drépanocytose par l'Hb F

Il est communément admis que la présence d'Hb F dans le globule rouge drépanocytaire lui confère une couverture contre la falciformation. C'est ainsi que les drépanocytaires ayant plus d'Hb F ont tendance à mieux tolérer leur maladie. L'expression de cette hémoglobine semble être modulée par différents facteurs génétiques impliquant des polymorphismes sur le cluster des gènes de globine et d'autres en trans ayant un rôle plus ou moins direct dans cette modulation. Des polymorphismes des gènes BCL11A et HMIP sont largement étudiés de nos jours.

A. Cas de BCL11A

BCL11A est impliquée dans la répression du taux de l'hémoglobine F dans les conditions normales. Deux polymorphismes de ce gène : rs 4671393 et rs 11886868 ont été ciblés pour comprendre le mécanisme moléculaire de cette répression. En effet, une mutation A/G du rs 4671393 ou C/T du rs 11886868 aurait tendance à diminuer le taux d'Hb F. Dans le présent travail, 74 drépanocytaires pris au premier diagnostic et présentant des taux d'HbF variables ont été explorés à la recherche des polymorphismes précités.

1. Recherche de la mutation A/G du rs 4671393

La mise en évidence de ce polymorphisme est faite par PCR/Séquençage. L'amplification génère un amplicon de 501pb visualisé sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. L'amplicon ainsi obtenu est séquençé, la lecture est faite à partir des séquences flanquantes de part et d'autre du polymorphisme recherché sur le brin sens. Le résultat montre 3 génotypes : AA (normal), AG et GG (**figure 15 a, b, c**).

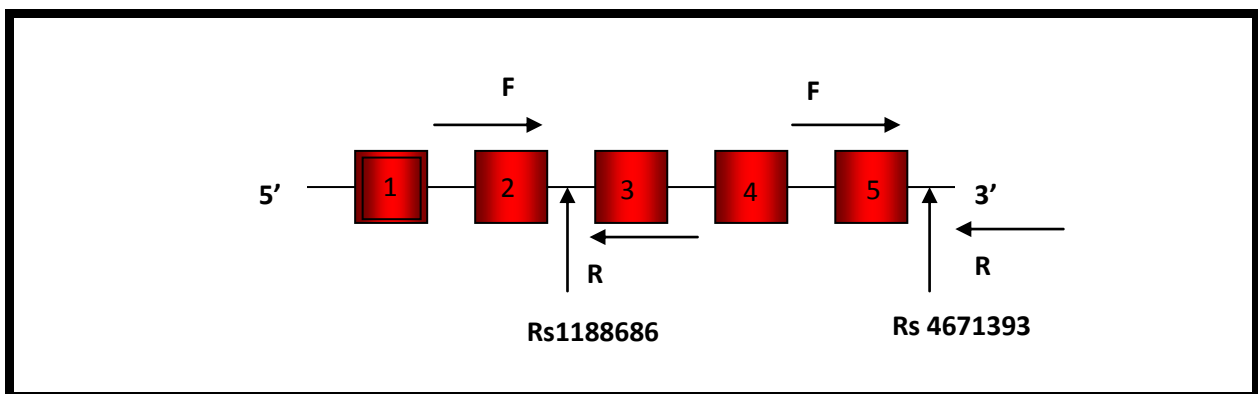


Figure 15 a : Emplacement des amorces et des polymorphismes sur le gène BCL11A

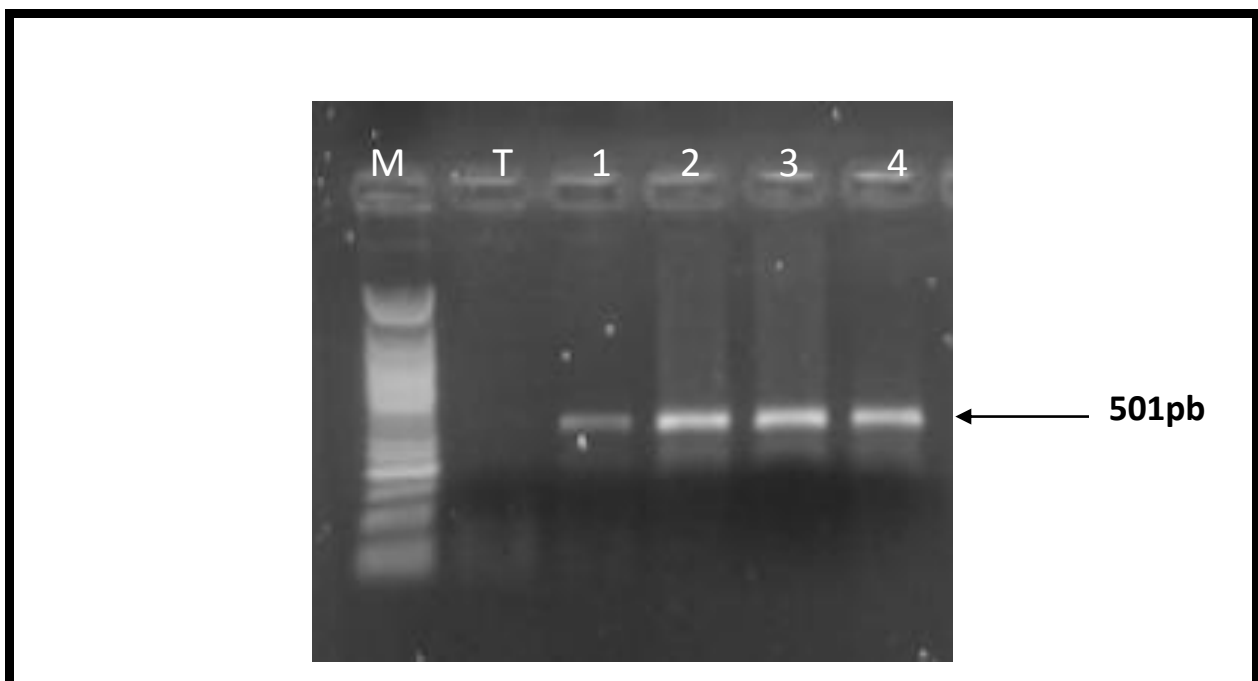


Figure 15 b: Migration des produits de PCR sur gel d'agarose.

M : marqueur de taille 100pb, T : témoin négatif, 1-4: amplicon attendu.

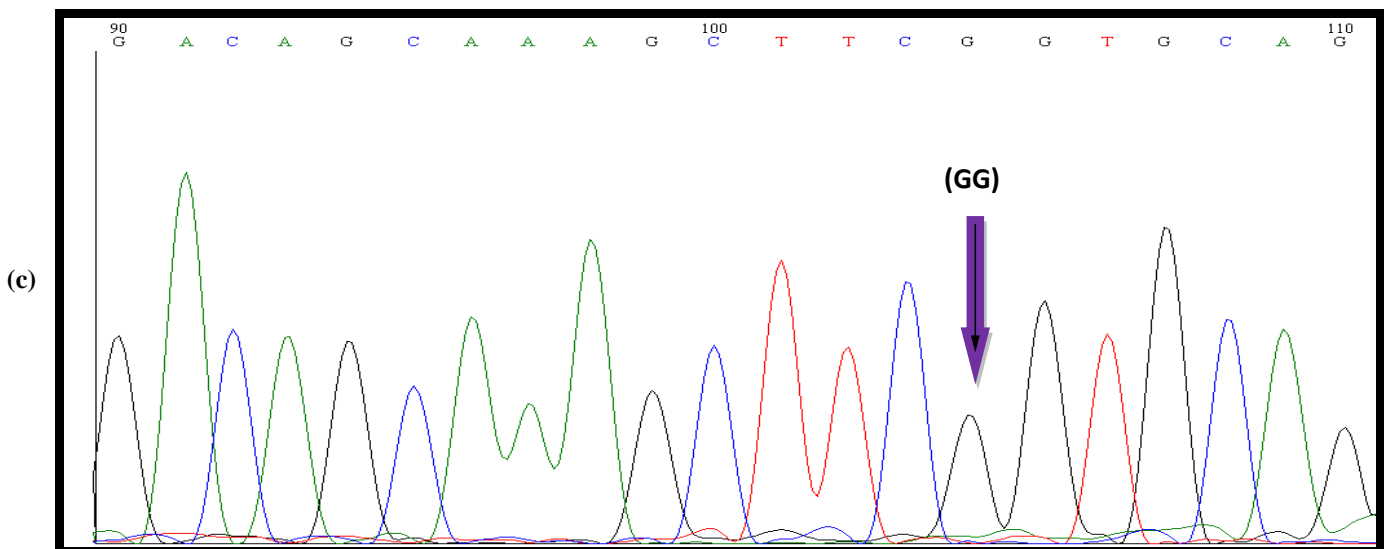
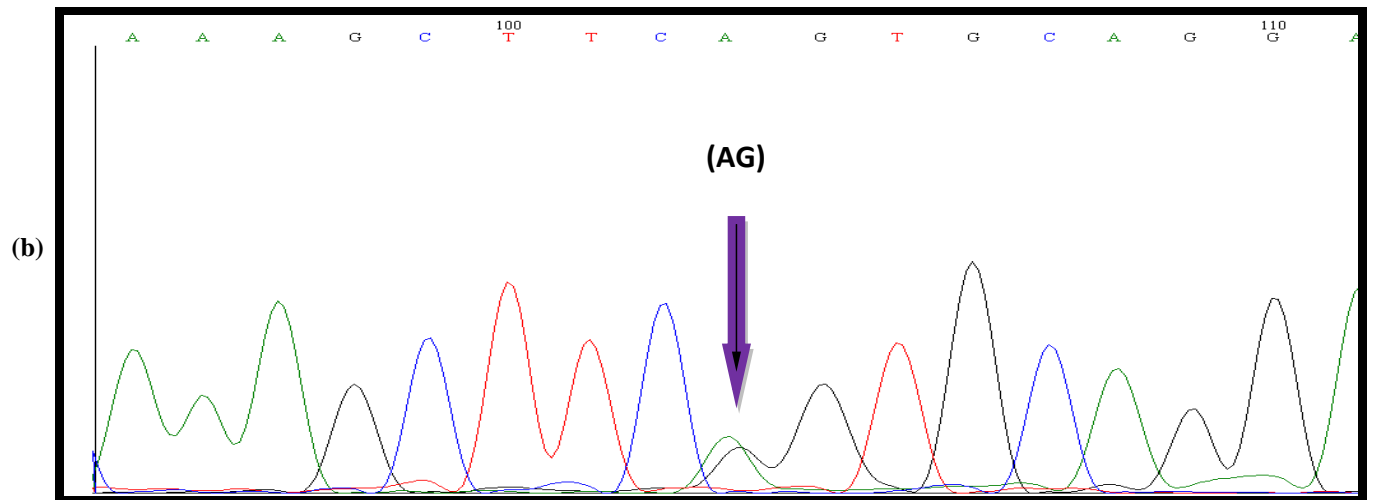
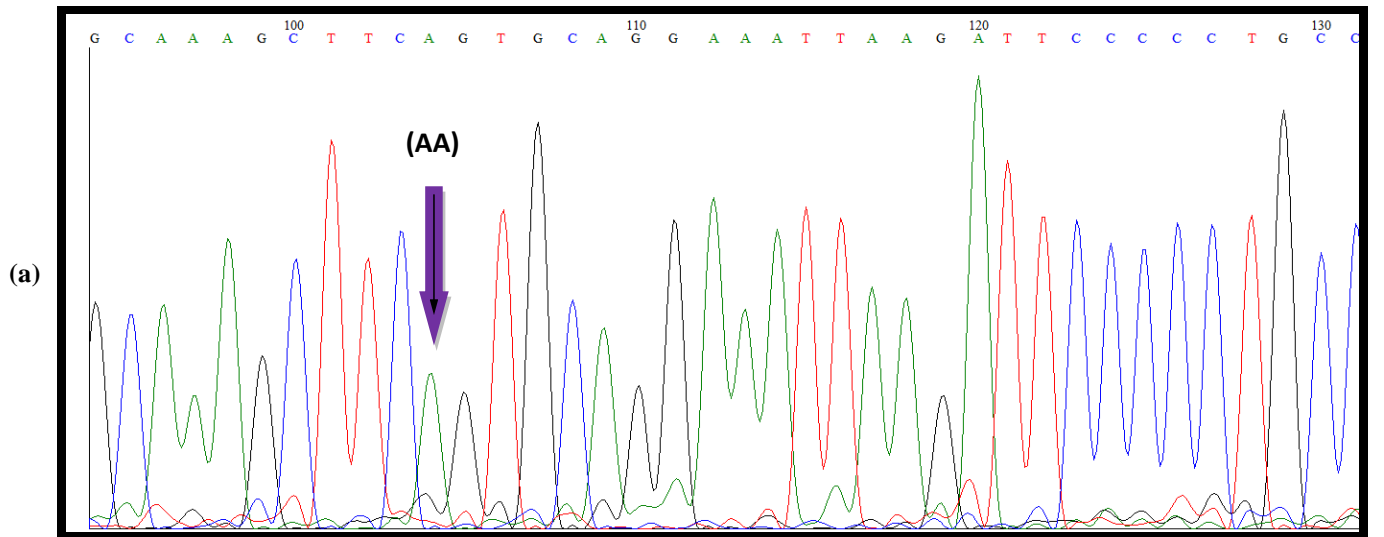


Figure 15 c: Mise en évidence du polymorphisme rs46711393 par séquençage

(a) : homozygote normal AA, (b) : hétérozygote AG, (c) : séquence du génotype homozygote muté GG

2. Recherche de la mutation C/T du rs11886868

L'exploration du rs11886868 a été également réalisée par PCR/séquençage. Le même protocole expérimental a été adopté. On obtient un amplicon de 394 pb Ce dernier est séquencé donnant lieu à trois génotypes : CC, CT et TT (**Figure 16 a, b**).

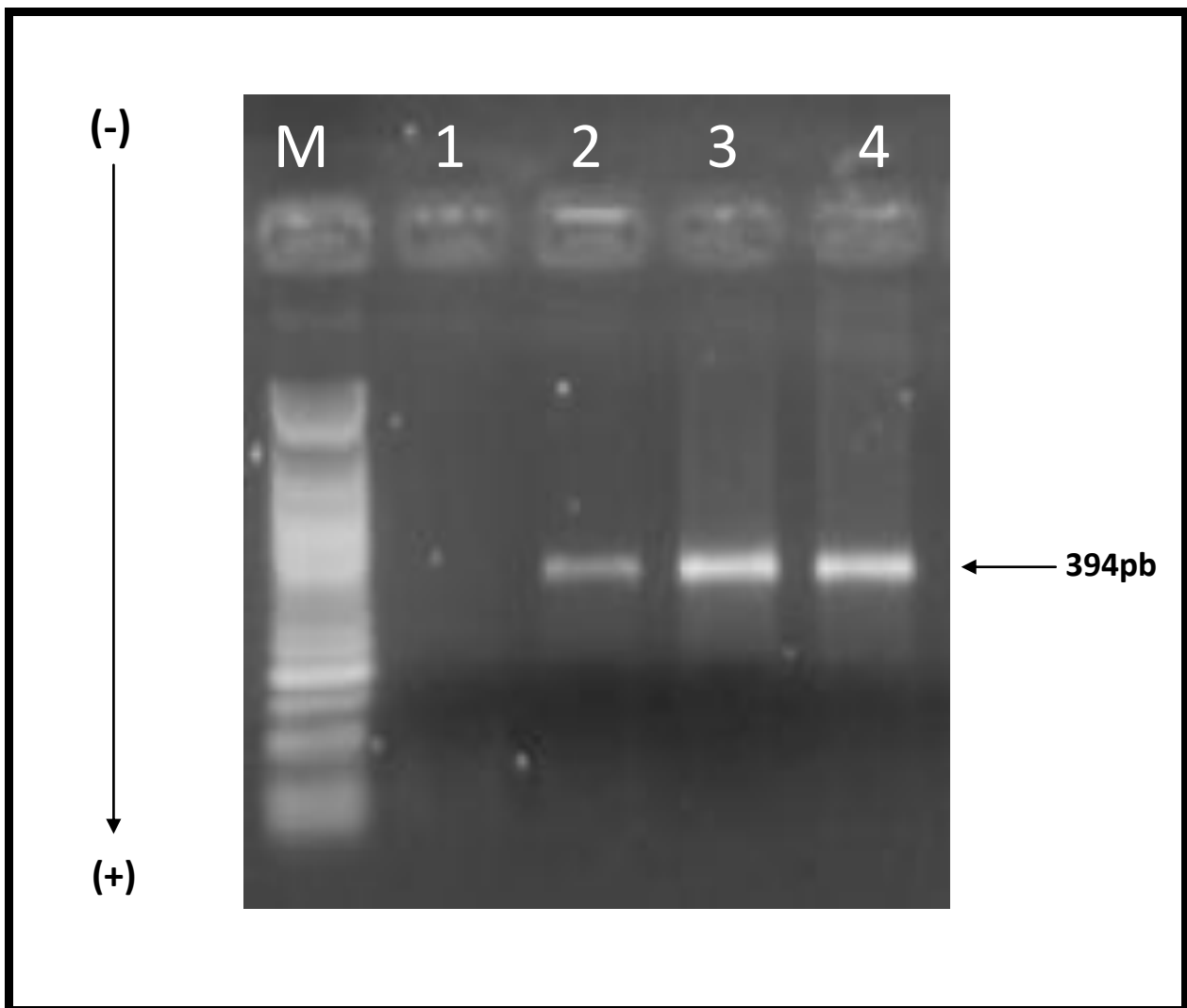


Figure 16 a : Amplicon contenant le rs11886868 migré sur gel d'agarose 1%.

M : marqueur de taille 100pb, **1** : témoin négatif, **2-4** : amplicon attendu.

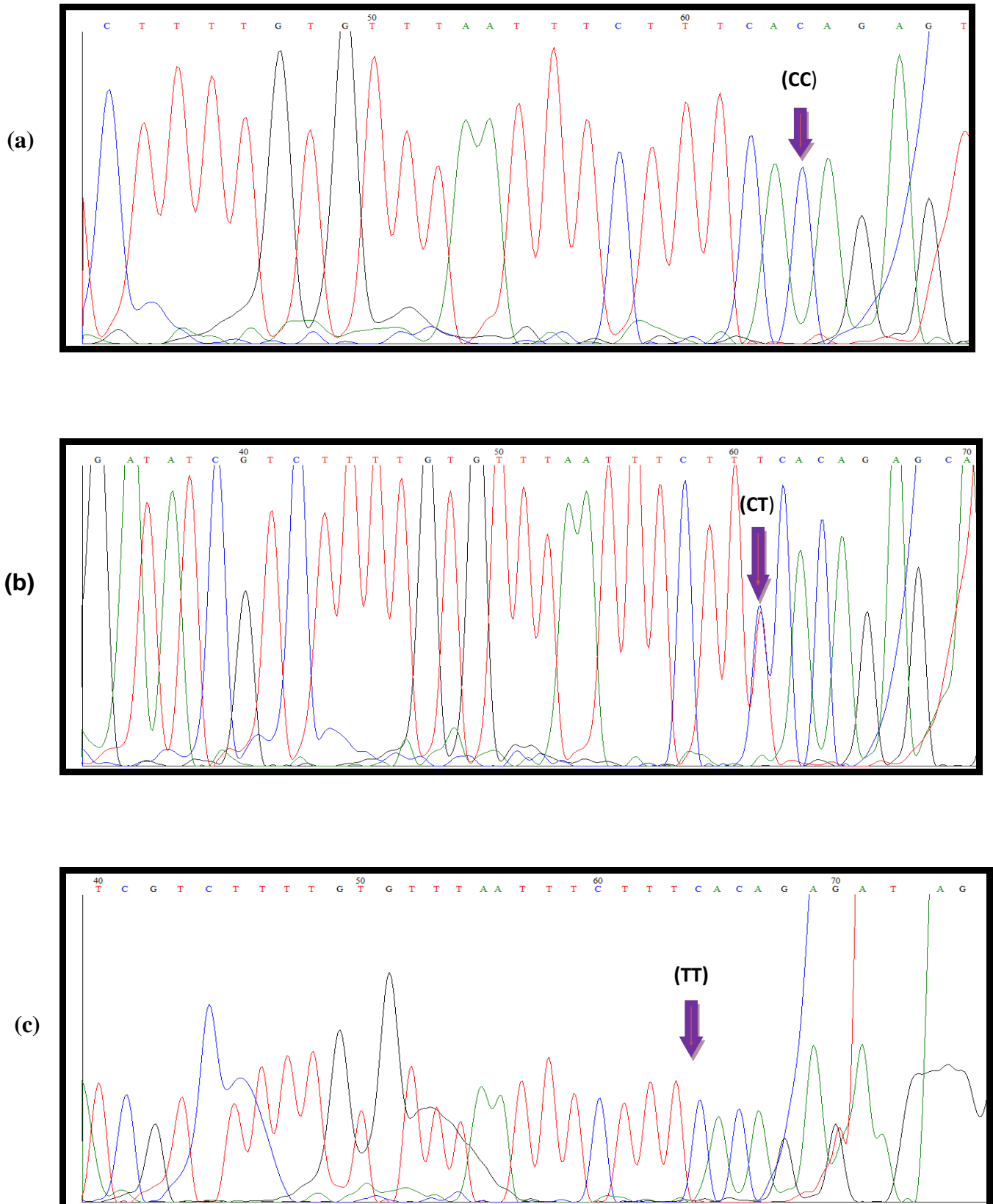


Figure 16 b : Mise en évidence du polymorphisme rs11886868 par séquençage

(a) : séquence du génotype homozygote sauvage CC, **(b)** : séquence du génotype hétérozygote CT, **(c)** : séquence du génotype homozygote muté TT.

3. Répartition génotypique et allélique des polymorphismes BCL11A

La répartition génotypique et allélique des deux rs étudiés est résumée dans le tableau 9 suivant :

Tableau 9 : Répartition génotypique et allélique des rs46711393 et rs 11886868.

Polymorphismes		Nombre	Fréquences
RS46711393			
Allèles	A	46	0.31
	G	102	0.68
Génotypes	AA	11	14.86%
	AG	24	32.43%
	GG	39	52.70%
Rs11886868			
Allèles	C	53	0.35
	T	95	0.61
Génotypes	CC	7	9.46%
	CT	39	52.70%
	TT	28	37.83

B. Cas de HMIP

Concernant la partie intergénique HMIP située entre les gènes HBS1L et cMYB, plusieurs polymorphismes ont été rapportés dans la littérature comme étant associés à la variation du taux de l'HbF dont deux semblent avoir les effets les plus importants et qui sont : rs 4895441, rs 9399137. En pratique nous avons amplifié chaque région contenant le polymorphisme approprié à part et séquencé les amplicons obtenus (figure 17 a, b, c, d e).

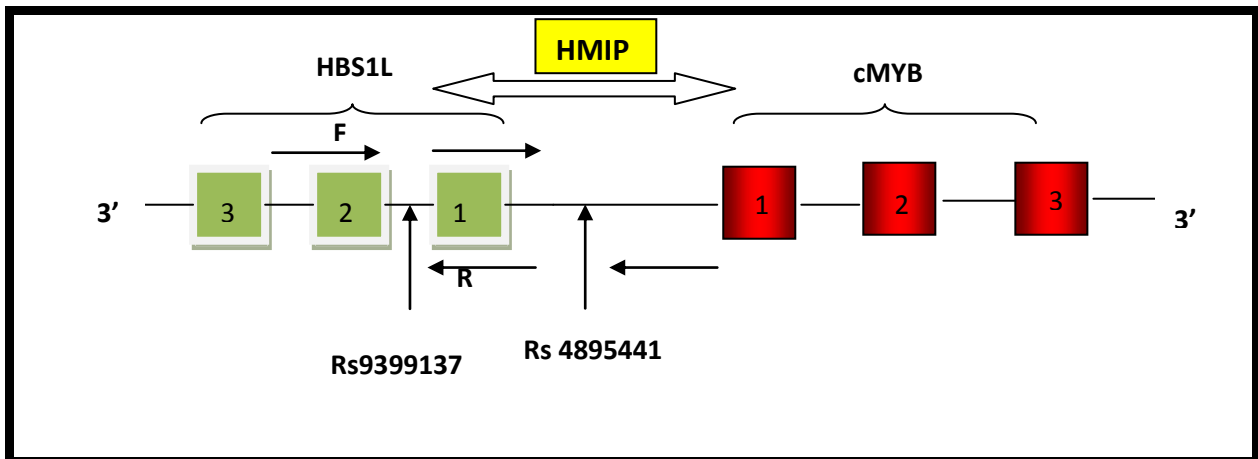


Figure 17 a : Emplacement des amorces et localisation des rs 4895441 et rs 9399137 dans la région inter génique HMIP

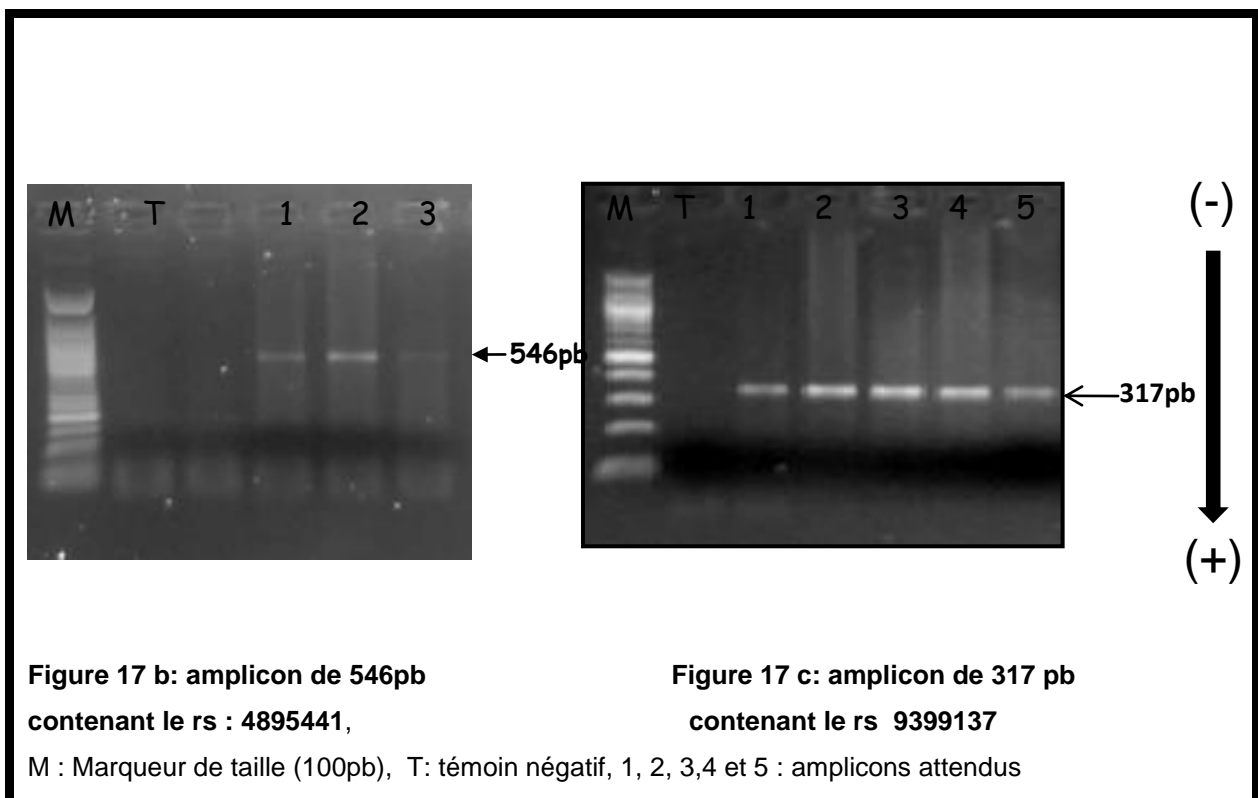


Figure 17 b: amplicon de 546pb contenant le rs : 4895441,

Figure 17 c: amplicon de 317 pb contenant le rs 9399137

M : Marqueur de taille (100pb), T: témoin négatif, 1, 2, 3,4 et 5 : amplicons attendus

Les résultats du séquençage conduisent à l'obtention de plusieurs génotypes : AA, AG et GG pour le rs 4895441 alors que seulement l'homozygote TT et l'hétérozygote TC ont été observés pour le rs 93991375 (figure 17 d, e)

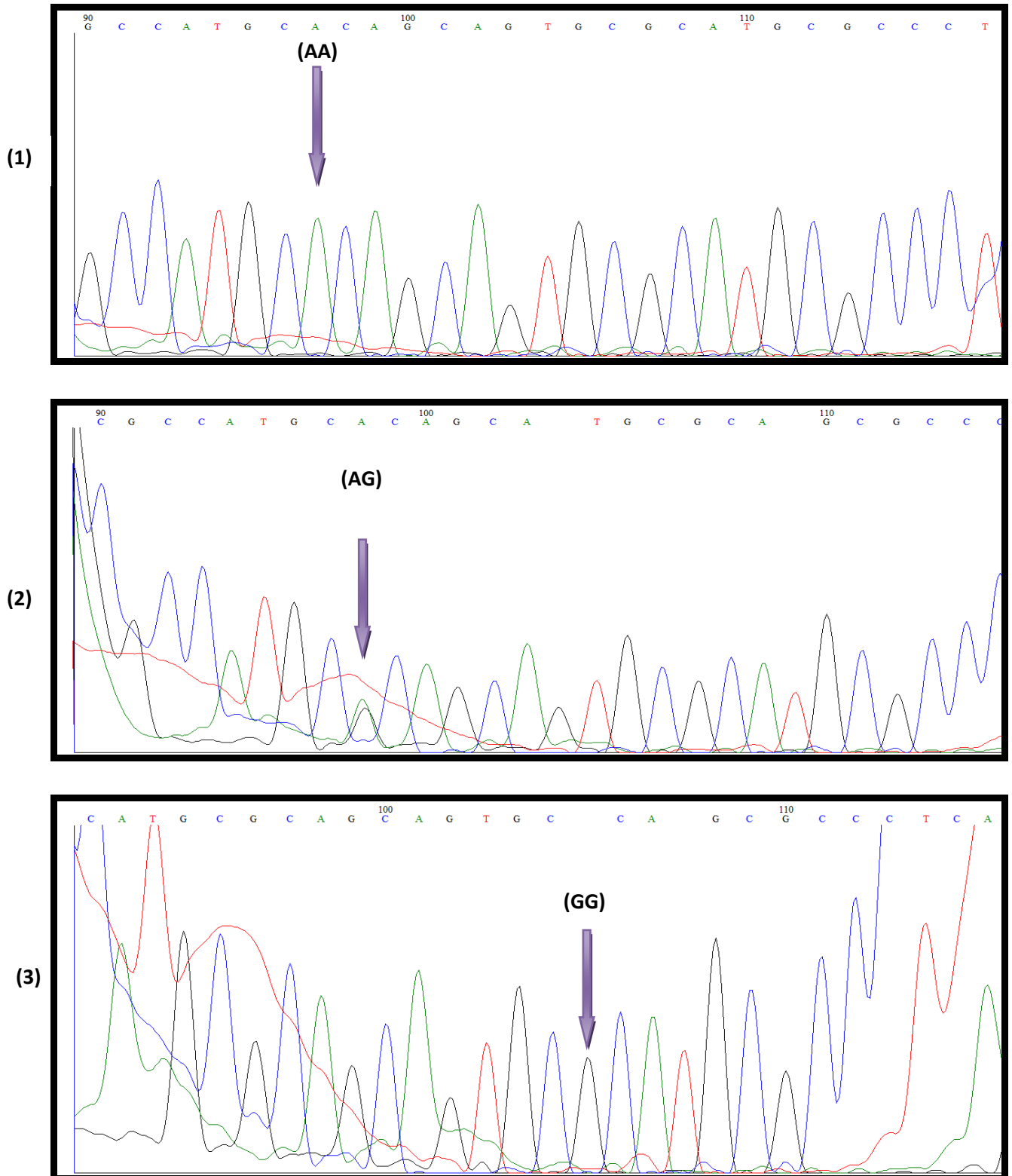


Figure 17 d : séquençage de la région contenant le rs4895441

(1) : génotype homozygote normal AA, (2) : hétérozygote AG, (3) : homozygote muté GG.

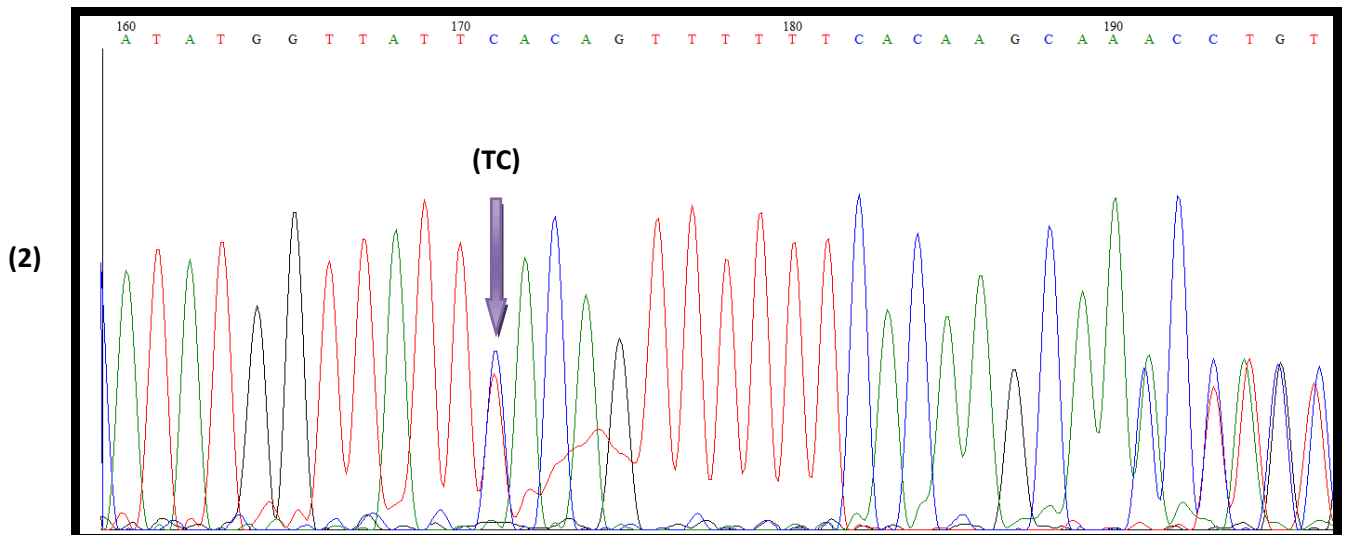
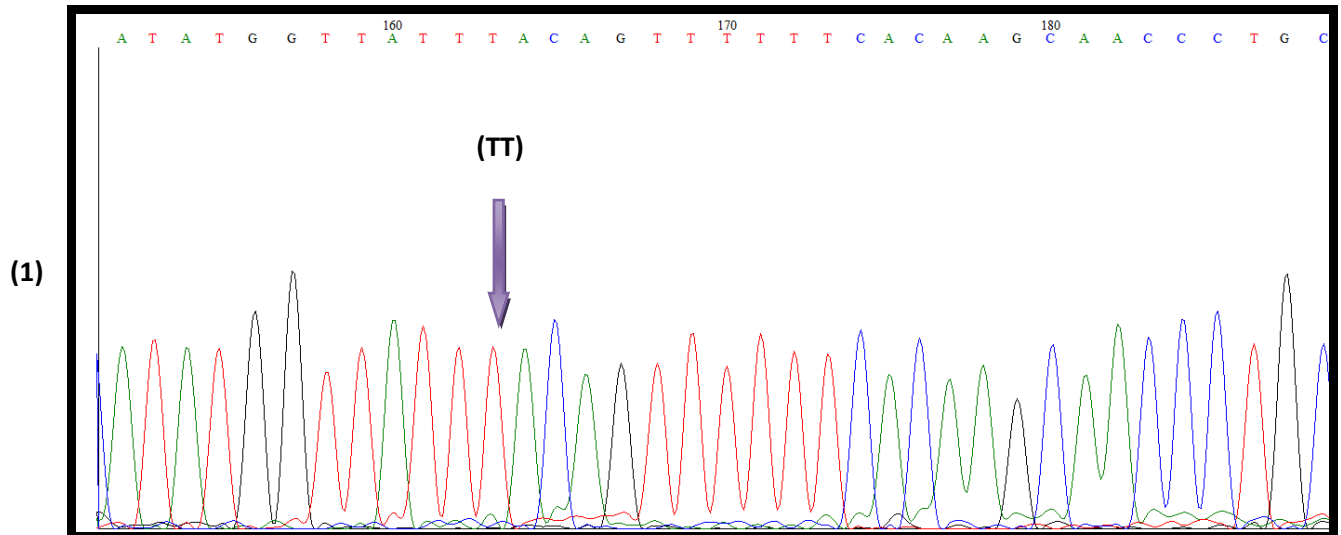


Figure 17 e: Séquençage de la région contenant le rs93991375

(1) : Génotype homozygote normal TT, (2) : hétérozygote TC , (3) : L' homozygote muté CC n'a pas été observé .

Le tableau 10 résume la répartition et les fréquences alléliques et génotypiques rencontrées pour les deux rs de HMIP.

Tableau 10 : répartition allélique et génotypique des rs de HMIP.

Polymorphismes		Nombre	Fréquence
Rs 4895441			
Allèles	A	98	0.625
	G	50	0.375
Génotypes	AA	38	51.25%
	AG	22	29.72%
	GG	14	18.91%
Rs93991375			
Allèles	T	120	0.81
	C	28	0.29
Génotypes	TT	46	62.16
	TC	28	37.80

Chapitre III:

CORRELATION PHENOTYPE GENOTYPE

III. Complications drépanocytaires

4. Complication lithiasique

L'hémolyse chez le drépanocytaire est un facteur favorisant la formation de lithiasie. En outre, ce risque est accentué quand un drépanocytaire est porteur d'un autre facteur aggravant. C'est ainsi que nous avons testé l'association du polymorphisme A(TA) nTAA avec l'hyperbilirubinémie et par la suite avec la lithiasie biliaire chez les drépanocytaires. Trois populations sont concernées dans cette étude : une population normale, une population de lithiasiques non drépanocytaires et une population de drépanocytaires.

La répartition des différents génotypes trouvés en fonction du taux de bilirubine totale a montré que les patients ayant le variant (TA) 7 et (TA)8 à l'état homozygote ou hétérozygote sont associés significativement à l'hyperbilirubinémie.

Tableau 11: Répartition des génotypes en fonction du taux de bilirubine

Génotypes	I1	I2	I3
(TA) ₆ /(TA) ₅	2	0	0
(TA) ₅ /(TA) ₇	0	1	0
(TA) ₆ /(TA) ₆	56	10	0
(TA) ₆ /(TA) ₇	7	20	41
(TA) ₇ /(TA) ₇	0	0	31
(TA) ₇ /(TA) ₈	0	0	7
Total	65	31	79

$$\chi^2=46,5415013 ; p=0.003$$

I1: Intervalle de bilirubine totale compris entre 15 et 24 μ mol/l. I2: Intervalle de bilirubine totale compris entre 25 et 34 μ mol/l. I3: Intervalle de bilirubine totale compris entre 35 μ mol/l et 90 μ mol/l.

Association A(TA)_nTAA avec la lithiase non drépanocytaire

L'approche utilisée consistait à tester l'association du polymorphisme A(TA)_nTAA avec la lithiase biliaire par une étude cas-témoin. Le travail a concerné 141 individus sains pris comme témoins et 76 patients non drépanocytaires ayant développés des lithiases biliaires. L'analyse statistique de la distribution génotypique a montré que les génotypes (TA)₆/(TA)₇ et (TA)₇/(TA)₇ sont associés significativement aux patients lithiasiques. Au niveau allélique, nos résultats montrent l'association de deux variants : TA₇ et TA₈ avec la lithiase. Il s'avère à la première intention que les deux variants TA₇ et TA₈ semblent être des facteurs aggravant (tableau 12).

Tableau 12 : Comparaison de la distribution génotypique et allélique entre les sujets sains et les sujets présentant des lithiases

	sains (N=140)	Lithiasiques (N=76)	p	OR (CI: 95%)
Génotypes				
(TA) ₆ /(TA) ₆	94	30	1*	-
(TA) ₅ /(TA) ₆	2	0	0.571	-
(TA) ₆ /(TA) ₇	44	31	0.0017	1.292 (1.04-1.60)
(TA) ₇ /(TA) ₇	1	11	6.1 10 ⁻⁶	34.47 (4.543-1498)
(TA) ₅ /(TA) ₇	0	1	0.433	-
(TA) ₇ /(TA) ₈	0	2	0.597	-
(TA) ₈ /(TA) ₈	0	1	0.433	-
Allèles				
	Fréquence	Fréquence		
(TA) ₆	0.8297	0.5986	1*	-
(TA) ₅	0.0070	0.0065	NS	-
(TA) ₇	0.1631	0.3684	1.5 10 ⁻⁶	3.07(1.8-5.036)
(TA) ₈	0.0000	0.0263	0.025	10.29(1.196-255.45)

1* : groupe de référence, p : indice de significativité, OR : odds ratio, CI : intervalle de confiance.

Association A(TA)nTAA avec la lithiase drépanocytaire

En ce qui concerne la recherche d'associations entre ce polymorphisme et la lithogénèse chez les drépanocytaires, nous avons cherché à établir le risque relatif au sein d'une population de 150 drépanocytaires dont 97 étaient lithiasiques.

Les patients sont classés en deux groupes : les drépanocytaires lithiasiques et les drépanocytaires non lithiasiques. La distribution génotypique entre les deux groupes a montré qu'il y'a une différence significative des génotypes (TA)6/(TA)7, (TA)7/(TA)7 et (TA)7/(TA)8 et la formation des lithiases chez les drépanocytaires. Au niveau allélique, nos résultats montrent que (TA)7 et (TA)8 présentent des facteurs de risque pour la formation des lithiases chez les drépanocytaires (Tableau 13).

Tableau 13: comparaison génotypique et allélique entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou e l'absence de la lithiase biliaire.

	D-LB (N=78)	D+LB (N=97)	P	RR (CI: 95%)
Génotypes				
(TA)6/(TA)6	46	20	1*	-
(TA)6/(TA)5	2	0	NS	-
(TA)6/(TA)7	27	41	9.310-4	1.755(1.26-2.45)
(TA)7/(TA)7	3	28	5.710-9	20.21(2.93139.59)
(TA)5/(TA)7	0	1	NS	
(TA)7/(TA)8	0	7	2.910-3	5.57 (0.89-35.12)
Allèles				
	Fréquence	Fréquence		
(TA)6	0.77	0.41	1*	-
(TA)5	0.012	0.005	NS	-
(TA)7	0.198	0.541	1.110-11	2.768 (1.97-3.89)
(TA)8	0.00	0.036	0.01	4.79 (0.43-53.57)

D-LB : drépanocytaires sans lithiases biliaires, D+LB : drépanocytaires avec lithiases biliaires, 1* : groupe de référence, P : indice de significativité, RR : risque relatif.

5. Complications vasculaires

Nous avons cherché une éventuelle corrélation entre le couple RANTES /DARC avec les vaso-occlusion d'une part et le couple CCL2/CCR2 et les AVC d'autre part les patients sont classés en deux groupes: les drépanocytaires développant la complication et les drépanocytaires ne présentant pas cette complication.

L'analyse a montré l'absence d'associations statistiquement significatives entre tous les polymorphismes du gène RANTES et le polymorphisme V64I du gène CCR2 avec la vaso-occlusion. De la même manière, aucune association n'a été également observée entre le polymorphisme -2518 du gène CCL2 et V64I. de CCR2 avec les AVC. Au contraire, une seule association significative a été observée entre le génotype normal AA du polymorphisme du CCL2 et la vaso-occlusion (**Tableau14 a et b**).

Tableau 14a : Comparaison génotypique et allélique entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou l'absence des CVO.

CVO	p	RR	Intervalle de confiance à95%	
			Valeur inférieure	Valeur supérieure
[CCL22518=AA]	,000	1,015E7	1501190,863	6,867E7
[CCL22518=AG]	.	1,636E7	1,636E7	1,636E7
[CCL22518=GG]
[CCR2=AA]	,999	6,113E-8	.	.
[CCR2=AG]	,997	9,849E-8	.	.
[CCR2=GG]

CVO : crises vaso-occlusives, p : indice de significativité, RR :risque relatif.

Tableau 14b : corrélation des différentes combinaisons génotypiques des cytokines avec les CVO

Combinaison génotypique	Chi-Square	p
(-2528A/G de CCL2 et V64I de CCR2)	,000	.
(RANTES/DARC)	,000	.
(CCL2/CCR2/RANTES/DARC).	13,539	,260

p : indice de significativité.

6. Complication infectieuses

Nous avons entrepris une exploration des polymorphismes cités dans le paragraphe précédent afin d'établir une corrélation phénotype/génotype entre ces derniers et l'infection. L'analyse statistique basée sur le principe de la table de contingence a montré que la distribution génotypique et allélique des polymorphismes de RANTES et le polymorphisme V64I de CCR2 n'a révélé aucune association significative avec l'infection. L'absence d'association a été également enregistrée même en combinant les polymorphismes de toutes les cytokines à la fois réalisé par le test de régression logistique. Une seule association significative a été observée entre le génotype normal AA du polymorphisme -2518 A/G de CCL2 et l'infection (**Tableau 15a, b et c**).

Tableau 15 a : Comparaison génotypique et allélique des polymorphismes de RANTES entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou l'absence de l'infection.

	D+INF	D-INF	P
	N=33	N=67	
-403G/A (RANTES)			
GG	20	48	1*
GA	11	11	NS
AA	2	5	NS
G	0.76	0.82	1*
A	0.23	0.17	NS
-28C/G (RANTES)			
CC	32	67	1*
CG	1	0	NS
GG	0	0	NS
C	0.98	1	1*

G	0.01	0	NS
INT1T/C (RANTES)			
TT	24	54	1*
TC	7	10	NS
CC	2	3	NS
T	0.83	0.88	1*
C	0.16	0.11	-

Tableau 15 b : Comparaison géotypique et allélique des polymorphismes de CCL2 et CCR2 entre les drépanocytaires en fonction de la présence ou l'absence de l'infection.

Infection ^a	p	RR	Intervalle de confiance 95%	
			Limite inférieure	Limite supérieure
[CCL22518=AA]	,000	3,886E-8	1,111E-8	1,359E-7
[CCL22518=AG]	.	3,238E-8	3,238E-8	3,238E-8
[CCL22518=GG]
[CCR2=AA]	,998	3,088E7	,000	.
[CCR2=AG]	,995	2,573E7	,000	.
[CCR2=GG]

p : indice de significativité, RR : risque relatif.

Tableau c : Corrélation des différentes combinaisons géotypiques des cytokines avec les infections

Combinaison géotypique	Chi-Square	p
(-2528A/G de CCL2 et V64I de CCR2)	,000	.
(RANTES/DARC)	,000	.
(CCL2/CCR2/RANTES/DARC).	13,539	,260

p : indice de significativité.

IV. Modération de la drépanocytose

Plusieurs facteurs génétiques du complexe des gènes de globine ont été impliqués dans la modération de la maladie drépanocytaire. Il s'agit en particulier de la co-existence d'une alpha thalassémie ou l'élévation de l'Hb Fœtale. De nos jours plusieurs autres gènes en trans semblent être impliqués dans la régulation de l'expression de l'Hb F et par conséquent auraient un rôle important dans l'atténuation de la maladie drépanocytaire. Dans ce contexte, nous avons étudié les gènes BCL11A et HMIP pour évaluer leur implication dans la modulation de la drépanocytose dans notre population. Nous avons exploré deux polymorphismes touchant le gène BCL11A et deux polymorphismes touchant la partie intérgénique HMIP connus pour être impliqués dans la variation du taux de l'HbF. La recherche d'une corrélation phénotype/génotype a été réalisée par l'analyse statistique basée sur le principe de la table de contingence) de la distribution génotypique et allélique entre les drépanocytaires en fonction du taux de l'HbF.

1. Cas de BCL11A

Nos résultats ont révélé l'existence d'une association significative entre l'hétérozygote AG et l'homozygote muté GG du rs 4671393 de BCL11A avec une diminution du taux de l'hémoglobine F chez les drépanocytaires. la même association a été rencontrée avec l'allèle G.

En ce qui concerne le deuxième polymorphisme : le rs11886868 nous avons observé que Le génotype normal CC est toujours associé avec un taux d'HbF>15% et qu'à l'opposé l'hétérozygote CT est associé à un taux faible d'Hb F<15%.**(tableau 16)**

Tableau 16 : corrélation entre les polymorphismes BCL11A et l'expression de l'hémoglobine F

polymorphismes		G1	G2	P	RR
RS46711393					
Allèles	A	0.187	0.396	1*	-
	G	0.812	0.586	8.9 10 ⁻³	0.567(0.35-0.93)
Génotypes	AA	0	11	1*	-
	AG	14	10	0.016	0.176(0.03-1.15)
	GG	23	16	0.021	0.189(0.03-1.22)
Rs11886868					
Allèles	C	0.42	0.62	1*	-
	T	0.70	0.58	0.06	0.39 (0.178-0.853)
Génotypes	CC	0	7	1*	-
	CT	23	7	0.029	0.08 (0.002-0.885)
	TT	14	14	1	-

1* : groupe de référence. Groupe1 : drépanocytaires ayant un taux d'HbF < 15% Groupe2 : drépanocytaires ayant un taux d'HbF > 15% P : indice de significativité, RR : risque relatif.

2. Cas de HMIP

Pour les deux polymorphismes étudiés : rs4895441 et rs9399137, les résultats ont montré l'absence d'association significative entre les différents rs (génotypes ou allèles) et l'expression d'Hb F (**Tableau 17**)

Tableau 17 : corrélation entre les polymorphismes BCL11A et l'expression de l'hémoglobine F

	G1	G2	p
	N=37	N=37	
rs9399137			
Allèle			
T	0.86	0.77	1*
C	0,13	0,22	NS
Génotypes			
TT	27	19	1*
TC	10	16	NS
CC	0	0	NS
rs4895441			
Allèle			
A	0.687	0.566	1*
G	0.312	0.433	NS
Génotypes			
AA	20	18	1*
AG	10	12	NS
GG	7	7	NS

1* : groupe de référence, Groupe1 : drépanocytaires ayant un taux d'HbF < 15% , Groupe2 : drépanocytaires ayant un taux d'HbF > 15%, P : indice de significativité.

V. Conclusion générale

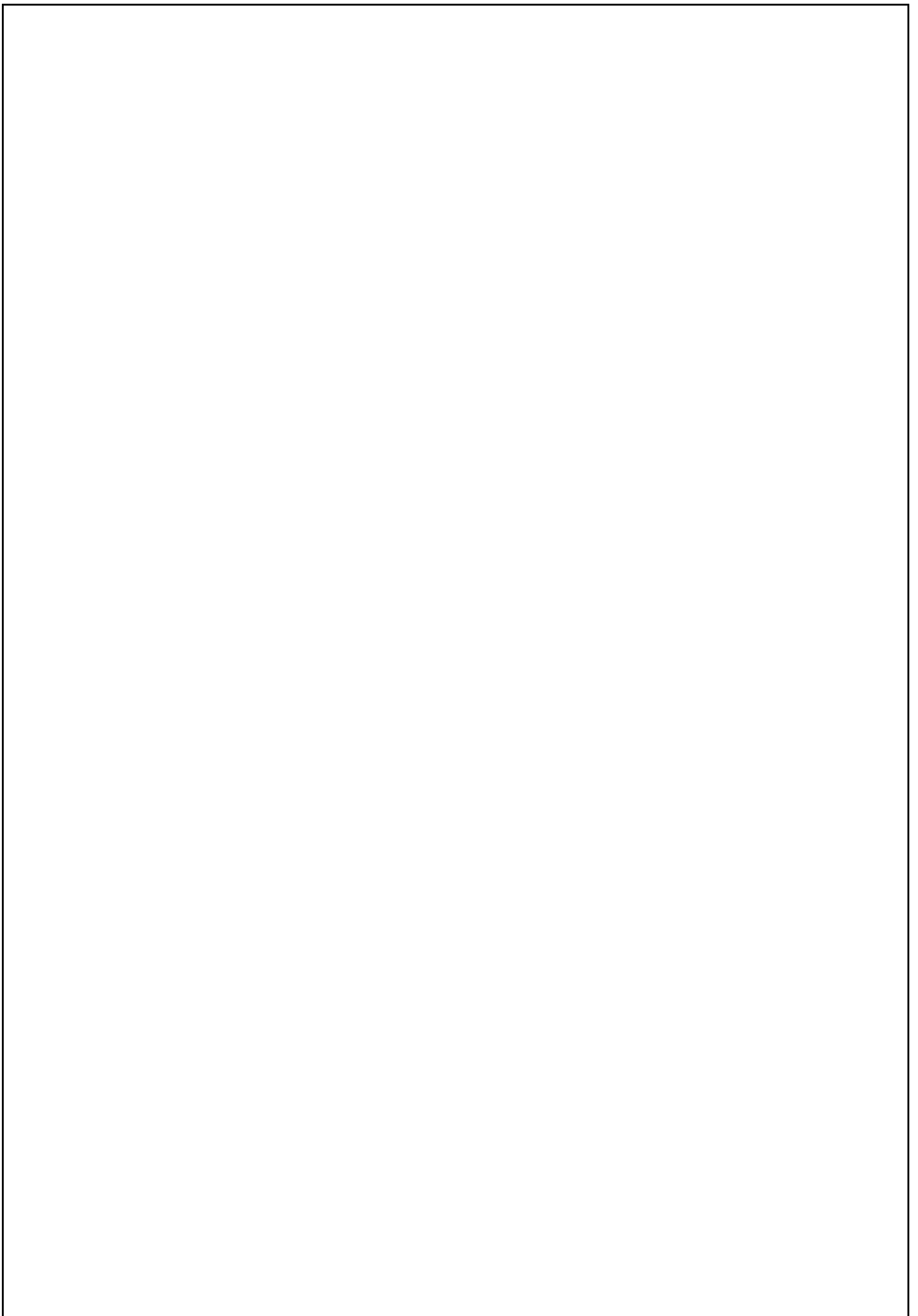
Le tableau ci-dessous résume les résultats de la corrélation entre les polymorphismes étudiés et les complications de la drépanocytose considérées dans cette étude.

Tableau 18 : Récapitulation des résultats de la corrélation phénotype/génotype

Polymorphismes	LB	CVO	AVC	Inf	HbF
<i>UGT1A1</i> : A(TA) _n TAA	+				
<i>RANTES</i> : -403G/A		-		-	
<i>RANTES</i> : -28C/G		-		-	
<i>RANTES</i> : INT1.1T/C		-		-	
<i>DARC</i> : -46T/C					
<i>CCL2</i> : -2518A/G		+		+	
<i>CCR2</i> : V64I		-		-	
<i>BCL11A</i> : rs11886868					+
<i>BCL11A</i> : rs4671393					+
<i>HMIP</i> : rs9399137					-
<i>HMIP</i> : rs4895441					-

LB : lithiase biliaire, **CVO** : crises vasoocclusives, **AVC** : accident vasculaire cérébral, **inf** : infection

DISCUSSION



La drépanocytose n'est plus considérée comme une simple maladie due à une mutation ponctuelle. Il s'agit d'une maladie multifactorielle dans laquelle plusieurs éléments interfèrent pour donner des phénotypes différents d'un individu à l'autre et d'une population à une autre. Des facteurs génétiques impliquant les gènes de globine et d'autres situés en trans sont largement étudiés pour donner une explication à cette variabilité clinique. Plus de 300 polymorphismes génétiques sont rapportés dans des études statistiques de liaison (GWAS : genome wide association system) pour être impliqués dans la modulation de la maladie drépanocytaire. La liste s'allonge encore avec l'apport de la bioinformatique et la bio statistique. Dans notre travail nous avons cherché à étudier les complications les plus rencontrées dans notre série et étudier les polymorphismes les plus impliqués. Nous avons retenu les complications les plus documentées et dont les dossiers médicaux sont les plus complets à savoir les complications lithiasiques, vasculaires et infectieuses. Dans une autre approche, nous avons cherché à expliquer la variation d'expression de l'Hb Foétale en explorant des polymorphismes de gène non globine décrit dans d'autres population pour être associés à une amélioration de la drépanocytose par l'expression spécifique de l'hémoglobine foétale.

I. Complications lithiasiques

L'UGT1A1 est une enzyme hépatique, catalyse essentiellement la réaction de glucuronoconjugaison de la bilirubine. Le déficit enzymatique est à l'origine d'une augmentation du taux de la bilirubine non conjuguée dans le sang. Ce déficit est causé par certains polymorphismes touchant le gène UGT1A1. Parmi ces polymorphismes, celui situé dans la TATA box au niveau du promoteur appelé A(TA)_nTAA a été associé aux syndromes de Gilbert et de Crigglar-Najjar. En effet, dans les populations caucasiennes et afro-américaines la maladie de Gilbert est liée à l'homozygotie de l'allèle muté (TA)₇ appelé aussi UGT1A1*28. Ce dernier est obtenu suite à une répétition supplémentaire d'un dinucléotide de TA produisant un motif microsattelitaire de type A(TA)₇TAA. Ce motif est à l'origine d'une baisse de l'activité hépatique de 30% de la normale (Bosma et al, 1995). Une autre théorie dit que les patients atteints du syndrome de Gilbert sont homozygotes (TA)₇ ou (TA)₈ insertions de deux dinucléotides (Iolascon 1999).

L'hyperbilirubinémie causée par la présence de ces deux allèles entraîne la formation des lithiases biliaires de type pigmentaire. Par ailleurs cette complication clinique est très fréquente chez les drépanocytaires. Ceci est expliqué par l'hémolyse chronique qui libère la bilirubine dans le sang avec un débit très supérieur à la normale.

Dans une Meta analyse sur les facteurs génétiques impliqués dans le développement de calculs biliaires, Krawczyk et al 2011 ont résumé les résultats récents liés à la génétique de la lithiase biliaire, et ont souligné que ABCG5/G8 un transporteur hépato canaliculaire de cholestérol et de l'UGT1A1 enzyme de conjugaison de la bilirubine sont les principaux déterminants génétiques de calculs biliaires chez les humains. Par ailleurs dans une étude du génome (GWAS) réalisée par (Buch et S al 2010) trois locus (UGT1A1, SCO1B1, LST-3TM12, SLCO1A2) étaient associés à une hyperbilirubinémie avec une valeur p de moins de $1,0 \times 10^{-7}$.

Dans ce chapitre on s'est intéressé à étudier l'effet du polymorphisme A(TA)_nTAA sur la lithogénèse chez les normaux ainsi que chez les drépanocytaires. Concernant les patients lithiasiques mais non drépanocytaires nos résultats montrent une concordance avec ceux trouvés dans d'autres populations (Tsezou A et al 2009 ; Kitsiou-Tzeli S et al 2003). Ces résultats concernent l'association des génotypes ayant l'allèle TA7 à l'état homozygote ou hétérozygote avec l'hyperbilirubinémie et la formation des lithiases biliaires.

Nos résultats montrent l'association des génotypes (TA)₆/(TA)₇ et (TA)₇/(TA)₇ à la formation de calculs biliaires avec des valeurs p et OR respectivement de $p = 0,0017$; OR = 1,292, IC 95% (de 1.04 à 1.60), $p = 6,1 \times 10^{-6}$; OR = 34,47, IC à 95% (de 4,543 à 1498). Nos résultats sont similaires à ceux d'une étude réalisée sur une cohorte plus importante d'individus adultes grecques présentant des calculs biliaires pour lesquels (TA)₆/(TA)₇ et (TA)₇/(TA)₇ ont été associées à des calculs biliaires avec ($p = 0,013$; OR 2,2, IC 95%, de 1,37 à 3,61, $p = .01$ et OR, 2,1; IC 95%, de 1,17 à 3,77) respectivement (Tsezou A et al 2009). D'autres données chez les enfants grecs avec cholélithiase idiopathique ont montré que (TA)₆/(TA)₇ et (TA)₇/(TA)₇ étaient fortement associés à un risque de cholélithiase (Kitsiou-Tzeli S et al 2003). Dans cette étude, nous avons constaté les mêmes résultats que les études précédentes. Au niveau allélique, (TA)₇, correspondant à une insertion d'une paire de base, représente un facteur de risque de lithiase biliaire avec OR:3,07 IC à

95% (de 1,8 à 5,036). En outre, nos résultats ont montré que le variant (TA)8 correspondant à une insertion de deux paires de bases est également significativement associée à une lithiase biliaire $p = 0,025$, OR: 10,29 IC 95% (1.263-3.255.45).

Le deuxième volet de cette étude a concerné l'étude de l'effet de A(TA)_nTAA sur la lithogénèse chez les drépanocytaires. Nous avons divisé l'échantillon des drépanocytaires en deux groupes ceux qui ont des calculs biliaires et ceux qui n'ont pas de calculs biliaires.

Nos résultats montrent que la concentration de la bilirubine totale augmente avec les génotypes : (TA)6/(TA)7, (TA)7/(TA)7, (TA)7/(TA)8 et (TA)8/(TA)8 ($\chi^2 = 46,5415013$, $p = 0,003$). Plusieurs études précédentes ont démontré que le génotype (TA)7/(TA)7 est associé avec une hyperbilirubinémie ainsi qu'avec une incidence significativement élevée de la cholécystectomie (Krawczyk M et al,2011) . Nous avons trouvé une association significative entre les génotypes (TA)6/(TA)7, (TA)7/(TA)7 et (TA)7/(TA)8 et la lithiase biliaire chez les drépanocytaires avec $p=9.310^{-4}$, OR= 1.755(1.26-2.45) ; $p= 5.710^{-9}$, OR=20.21(2.93139.59) et $p=2.910^{-3}$, OR= 5.57 (0.89-35.12). Au niveau allélique, les allèles (TA)7 et (TA)8 sont associés à une lithiase biliaire chez les drépanocytaires. Nous avons trouvé des résultats similaires à ceux rapportés par Chaar V et al 2005.

L'interprétation des différents résultats trouvés dans les deux volets de ce chapitre nous amène à tirer quelques conclusions. : Les génotypes ayant l'allèle (TA)7 et l'allèle (TA)8 à l'état homozygote ou hétérozygote sont associés à une hyperbilirubinémie. Au niveau génotypique, (TA)6/(TA)7, (TA)7/(TA)7 et (TA)7/(TA)8 sont associés à la formation ses calculs biliaires. Au niveau allélique, (TA)7 et (TA)8 présentent un facteur de risque pour la lithogénèse chez les deux populations étudiés.

En comparant nos résultats par rapport à ceux rapportés dans d'autres populations, l'allèle (TA)7 semble être un marqueur génétique de la lithogénèse(Driss et al, 2009 ; Krawczyk M et al,2011). Concernant l'allèle (TA)8 , nos résultats concordent avec quelques résultats rapportés par d'autres populations. Par ailleurs, dans d'autres populations cet allèle est très rare ou même absent et donc ne présente pas un facteur génétique de risque pour la formation des lithiases biliaires (Driss et al,2009).

Pour la population tunisienne les deux allèles (TA)7 et (TA)8 pourraient être considérés comme des biomarqueurs génétiques à la lithogénèse.

En conclusion, les drépanocytaires sont des patients qui présentent une hyperbilirubinémie due à l'hémolyse chronique. Cette hyperbilirubinémie entraîne la formation des lithiases biliaires pigmentaires. Dans notre étude on a montré que le risque de la survenue de la lithogénèse chez les drépanocytaires est augmenté avec les allèles (TA)7 et (TA)8.

Notre étude vise à améliorer la prise en charge des enfants drépanocytaires. Les cliniciens pourraient demander un diagnostic moléculaire du syndrome de Gilbert pour les patients à risque. Les enfants drépanocytaires considérés à risque présentent des taux de bilirubine totale très élevées par rapport aux autres patients. Dans ce cas l'hyperbilirubinémie peut dépasser les valeurs de 70 μ M. Après le diagnostic moléculaire, tout enfant drépanocytaire positif pour l'allèle (TA)7 ou (TA)8 serait suivi avec vigilance par les cliniciens.

II. Complications vasculaires et infectieuses

Dans le premier volet de ce chapitre on s'est intéressé à l'étude de l'implication des polymorphismes -403G/A et -28C/G au niveau du promoteur et IN1.1T/C au niveau du premier intron du gène RANTES dans la complication vasculaire.

RANTES est une chémokine CC qui intervient dans le chimiotactisme des leucocytes, depuis leur site de synthèse jusqu'au site de l'inflammation. Le gène codant pour cette chémokine est situé sur le chromosome 17 en position q11.2-q12. Il est constitué d'un promoteur, trois exons et deux introns. Ce gène est le siège de différentes mutations, dont les plus fréquentes sont -403G/A et -28C/G au niveau du promoteur et IN1.1T/C au niveau du premier intron.

Des études ont montré que ces trois polymorphismes seraient impliqués dans la modulation de l'expression du gène RANTES (An et al, 2002). En effet, la substitution de G/A en position -403 et de C/G en position -28 au niveau de la région promotrice du gène RANTES sont corrélées avec une augmentation de l'activité du promoteur et donc de l'augmentation de la production de la protéine RANTES. Par

contre la substitution de T/C dans l'intron 1 est associée à une diminution de l'activité du promoteur et donc de la diminution de la production de la protéine RANTES (An et al, 2002).

Les polymorphismes -403G/A, -28C/G et IN1.1T/C, impliqués dans les phénomènes inflammatoires, pourraient avoir un rôle dans la physiopathologie de la drépanocytose, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de ces trois polymorphismes sur les crises vaso-occlusives et les infections chez les drépanocytaires.

Dans notre étude, nous avons montré que les fréquences des allèles mutés (-403A, -28G et IN1.1C) sont inférieures à celles des allèles normaux, désignés respectivement -403G, -28C et IN1.1T.

Ces trois polymorphismes en corrélation avec la drépanocytose ont déjà été rapportés par Dossou-Yovo et al en 2009. En partant d'une population de 97 drépanocytaires d'origine Afro-Européenne (dont 77 Africains "Cotonou" et 20 Européens "Paris"), cette étude a montré que la fréquence de l'allèle -403A du gène RANTES est de 47.9% chez la population drépanocytaire Afro-Européenne. Dans le cadre de notre travail, nous avons obtenu une fréquence beaucoup plus faible de l'ordre de 19.5%.

Concernant l'allèle -28G, sa fréquence est de 0.5% chez les drépanocytaires tunisiens. Par ailleurs, elle est nulle chez les drépanocytaires Afro-Européenne (Dossou-Yovo et al, 2009). Pour l'allèle IN1.1C, nous avons obtenu une fréquence de l'ordre de 13%. Ceci a déjà été rapporté également dans le cas de la population Afro-Européenne (Dossou-Yovo et al, 2009).

Ces résultats montrent qu'il y a une variabilité inter-ethnique dans les fréquences alléliques au niveau des deux polymorphismes du promoteur (-403G/A et -28C/G) et une similitude dans les fréquences alléliques du polymorphisme intronique (IN1.1T/C). D'autre part, nous pouvons constater que la plupart des porteurs de l'allèle IN1.1C sont aussi porteurs de l'allèle -403A indiquant un éventuel effet additif des deux mutations.

Nous nous sommes intéressés à établir une éventuelle association entre les génotypes trouvés et les phénotypes drépanocytaires comprenant l'occlusion

vasculaire et l'infection. Les crises vaso-occlusives ont été observés chez toutes les catégories de drépanocytaires avec des fréquences importantes. En effet, pour le polymorphisme -403G/A, 83.82% des drépanocytaires G/G, 76% des G/A et 100% des A/A ont développé des crises vaso-occlusives au moins une fois dans leur vie.

Pour le polymorphisme -28C/G, 83.83% des C/C et un seul cas G/C ont présenté des crises vaso-occlusives alors qu'aucun drépanocytaire n'a présenté le génotype G/G. En ce qui concerne le polymorphisme IN1.1T/C, 84.81% des TT, 75% des T/C et 100% des CC ont développé des crises vaso-occlusives.

Dans le cas des infections, les génotypes émanant des trois polymorphismes ci-dessus indiqués ont montré que dans tous les cas les génotypes normaux -403 G/G, -28C/G et IN1.1T/T ne sont pas associés avec la présence d'infections. Toutefois, certains patients à génotypes anormaux présentaient une infection, il s'agissant en particulier de 48% de -403G/A, 28.57% -403A/A, 100% -28C/G, 0% -28G/G, 43.75% IN1.1T/C et 40% IN1.1C/C. Ainsi, les différentes mutations ne semblent pas avoir d'effet sur le développement de la CVO et de l'infection dans notre population de drépanocytaire ($P > 0.05$). Des résultats similaires ont déjà été rapportés par Dossou-Yovo et al. (2009), qui ont montré suite à une étude statistique l'absence de corrélation entre les trois polymorphismes et les crises vaso-occlusives dans des populations Africains et Afro-Européennes.

Néanmoins, la même étude a rapporté la présence d'une association significative entre les polymorphismes du gène RANTES et l'infection particulièrement chez les patients porteurs de l'allèle muté IN1.1C suggérant son effet protecteur contre l'infection bactérienne. L'étude de Dossou-Yovo ci dessus indiquée présente une limite c'est qu'ils n'ont pas étudié le récepteur érythrocytaire de RANTES appelé DARC. En effet. Le gène qui code pour DARC est situé sur le chromosome 1q22-q23 et présente un polymorphisme fonctionnel situé au niveau du promoteur appelé -46 T/C. Ce polymorphisme entraîne le dysfonctionnement de DARC et par conséquent il ne s'exprime pas sur les érythrocytes et par la suite le complexe RANTES-DARC ne se formera pas sur les érythrocytes (Rivera et al, 2002 ; Durpès et al, 2010).), ce polymorphisme a été exploré pour tous les sujets de notre série. Le résultat de cette investigation a montré que tous les sujets présentaient le génotype normal TT confirmant le bon fonctionnement de du complexe RANTES-DARC sur les

érythrocytes. A ce jour aucune étude n'a été publiée concernant l'implication du couple RANTES-DARC dans la complication drépanocytaire. Notre étude constitue donc la première approche qui montre que le complexe RANTES-DARC n'est pas impliquée dans la survenue des crises vaso-occlusives ainsi que dans l'infection chez le drépanocytaire.

Dans le deuxième volet de ce chapitre nous nous sommes intéressés à l'étude de l'implication des polymorphismes CCL2 (-2518A/G) et CCR2 (-V64I) du couple MCP-1(CCL2)/CCR2 avec les crises vaso-occlusives, les AVC et les infections. Etant donné que la réaction inflammatoire a un rôle prépondérant dans le développement de l'athérosclérose, puis dans la rupture des plaques menant à l'AVC et étant donné que les 2 polymorphismes MCP1-2518A/G et CCR2-V64I ont déjà démontré leur rôle dans le développement de l'athérosclérose (Oliver *et al*, 2007 ; Nyquist *et al*, 2009), nous nous sommes proposés de rechercher une éventuelle association entre ces 2 polymorphismes et la survenue des crises vaso-occlusives et des AVC chez les drépanocytaires.

Notre étude est la première dans le genre à vouloir rechercher une association éventuelle entre ces 2 polymorphismes au niveau des gènes CCL2 et CCR2 et la vaso-occlusion, les AVC ainsi que l'apparition d'infections chez les drépanocytaires. Par ailleurs une étude faite par Sebastini P *et al* 2005 a rapporté l'association d'un autre polymorphisme de CCL2, le rs 4586 avec les AVC chez les drépanocytaires. Nos résultats ont montré une association significative entre le génotype AA du polymorphisme -2518A/G de CCL2 et les 2 complications étudiées ($p > 0.05$). Le génotype AA semble avoir un effet aggravant sur les infections et les crises vaso-occlusives $RR=3.88$ et $RR=1.015$ respectivement. En effet, l'allèle muté G est corrélé à une hyper expression de la cytokine CCL2 et inversement pour l'allèle normal A. Par conséquent, le génotype AA lié à une baisse d'activité de CCL2 serait un facteur de risque pour le développement des infections et des crises vaso-occlusives. Aucune association significative n'a été observée entre le polymorphisme V64I de CCR2- au et les complications étudiées chez les drépanocytaires ($p > 0.05$). Ce même polymorphisme a été étudié dans le cadre de la drépanocytose par Hoppe *et al* en 2004 qui ont trouvé qu'il n'existe pas d'association entre ce polymorphisme et la drépanocytose. Par contre il a été associé comme facteur protecteur du SIDA et de l'asthme.

En conclusion, notre étude révèle une nouvelle association entre la cytokine CCL2 et la drépanocytose. Le génotype AA du polymorphisme CCL2-2528 présente un facteur de risque pour les drépanocytaires. Le risque de développer des infections est plus important que celui des crises vaso-occlusives $RR=1.015$, $RR=3.88$ respectivement. Cette conclusion pourrait être considérée dans la prise en charge précoce des drépanocytaires.

III.Expression de l'hémoglobine Fœtale

La présence de l'hémoglobine F dans le globule rouge drépanocytaire a un effet modérateur de la complication drépanocytaire en raison de l'effet anti polymérisant de l'Hb F sur l'Hb S (Ellion et Labie, 1996). La concentration de l'HbF varie de 0.2% à 30% chez les drépanocytaires. Cette variation interindividuelle est très importante ce qui a suscité l'intérêt des cliniciens et des chercheurs pour trouver un moyen d'augmenter le taux d'Hb F chez les drépanocytaires. . C'est ainsi que les idées sont orientées vers l'utilisation d'un traitement basé sur l'administration l'hydroxyurée, agent chimique induisant l'expression de l'HbF. Toutefois la réponse des drépanocytaires à ce traitement est différente d'un patient à un autre. Ceci a amené les chercheurs à poser une hypothèse d'une modulation multigénique.

Plusieurs déterminants génétiques ont été montrés comme associés à l'hétérogénéité du taux de l'HbF dans la drépanocytose. Parmi lesquels, les haplotypes du gène β globine. Un taux élevé de l'HbF a été associé avec les haplotypes sénégalais et Arabo-indien (Elion J, 2005). Le déterminant commun entre ces deux haplotypes est la présence du polymorphisme XmnI C>T situé à -158 au niveau du promoteur du gène G-gamma. D'autres variations génétiques extérieures aux gènes de globines ont été également incriminées dans ce processus de régulation du taux de l'HbF. Il s'agit en particulier d'un QTL dans le chromosome Xp22 et le chromosome 6q22.3-23.2 qui ont été associés à l'élévation de la production des cellules fœtales (Dover et al 1992 et Chang et al, 1995).

Menzel et al, 2007 ont appliqué une stratégie d'association de cartographie du génome pour des personnes présentant une variabilité extrêmes dans les valeurs des cellules F. Un trait quantitatif du locus (QTL) situé dans une région du

chromosome 2p15 et qui comprenait le gène BCL11A représentait 15,1% de la variabilité du taux de l'HbF (Uda et al, 2008, Sedgewick et al, 2008, Lettre et al, 2008). Les associations les plus fortes ont été signalées dans une région couvrant 14 kb dans le second intron du gène BCL11A. La deuxième association touche un cluster de 67 kb dans la région 3' en aval de l'exon 5 du gène BCL11A (Lettre et al, 2008). Sankaran et al 2008 ont montré que l'expression de l'HbF est sous le contrôle de BCL11A, dont l'expression varie au cours du développement. Le variant BCL11A, situé dans le second intron du gène (rs11886868) est, en effet, celui dont l'influence est la plus importante. Ce gène BCL11A avait été étudié au cours du développement lymphocytaire ; il avait été montré qu'en raison d'épissages alternatifs il est traduit en 4 isoformes de longueur différente, XL, L, S et XS, dont l'extrémité amino-terminale est conservée. L'absence des isoformes longues de BCL11A, ou un variant inactif, associé au SNP C/T sur le chromosome 11, interviendrait en amplifiant la synthèse des chaînes g-globine. Uda et al. (2008) ont trouvé une association significative entre le gène BCL11A et la persistance de l'hémoglobine fœtale. La plus forte association a été retrouvée avec l'allèle C d'un SNP (rs11886868) dans l'intron 2 du gène BCL11A ($p = 10^{-35}$). En outre, l'allèle C a été associé à un phénotype atténué chez les patients atteints de bêta-thalassémie et de la drépanocytose, indiquant que les SNP dans le gène de BCL11A peuvent modifier ces phénotypes en augmentant les niveaux de l'HbF. Chez 1275 Afro-Américains et 350 Brésiliens atteints de drépanocytose.

Dans notre étude, nos résultats ont montré que le génotype normal CC est toujours associé à un taux d'HbF >15% et le génotype CT est associé à un taux <15%. L'analyse statistique a montré une association significative entre le génotype hétérozygote CT et la diminution du taux de l'hémoglobine F ($p = 0.029$, RR = 0.08, CI 95%(0.002-0.885)). le même résultat est observé pour le variant T avec $p = 0.016$ et RR=0.39; CI95%(0.178-0.853). Nos résultats sont concordants avec des études faites sur les populations: Européenne, Brésilienne et Afro-américaine (Uda et al, 2008, Sedgewick et al, 2008, Lettre et al, 2008).

Lettre et al. (2008) ont trouvé une association significative entre les taux de HbF et des SNPs touchant le gène BCL11A. L'association la plus significative entre les deux groupes était avec rs4671393 ($p = 2 \times 10^{-42}$) chez les Afro-Américains, ($p = 3 \times 10^{-8}$) chez les Brésiliens). L'effet de ces SNPs pourrait expliquer l'écart de 6,7 à 14,1% des

taux de l'HbF. Nos résultats ont révélé qu'il existe une association significative entre les génotypes AG et GG du rs4671393 avec une diminution du taux de l'hémoglobine F chez les drépanocytaires. $P=0.016$; $OR=0.176$ CI 95% (0.03-1.15) et $p=0.021$; $OR=0.189$ CI 95% (0.03-1.22) respectivement. Au niveau allélique, l'allèle muté G est associé significativement avec une diminution du taux de l'hémoglobine F chez les drépanocytaires $p=8.9 \times 10^{-3}$; $OR= 0.567$ CI 95% (0.35-0.93). Le rs 4671393 est une mutation intronique qui serait située au niveau d'une région consensus (enhancer) et entrainerait une surexpression du répresseur érythroïde BCL11A.

Nos résultats concordent avec ceux rapportés dans la littérature et confirment le rôle important de BCL11A dans la modulation du taux de l'HbF. En effet, BCL11A joue un rôle de répresseur du gène gamma. BCL11A s'associe avec la protéine de la matrice nucléaire matrine-3, ainsi qu'avec des peptides de GATA-1, principal facteur de transcription érythroïde, et son cofacteur FOG-1 (Friend of Gata).

Conformément à ce qui vient d'être rapporté, Galarneau et al. (2010) a montré par une étude du génome touchant tous les rs associés à une variation du taux de l'HbF que le rs4671393 dans l'intron 2 de BCL11A a été le marqueur génétique le plus associé à des niveaux élevés HbF ($p = 3,7 \times 10^{-37}$).

Par ailleurs, d'autres études ont révélé l'implication de la partie intergénique HMYB dans la variation du taux de l'HbF. Deux QTL semblent plus informatifs. L'étude sur quatre générations d'une grande famille indienne a révélé un QTL en 6q23, localisé entre les gènes HBS1L et c-MYB, qu'on a appelé polymorphisme intergénique HBS1L-MYB (HMIP). Ce segment s'étend sur 79 Kb et commence à partir 188pb en amont de l'exon1 du gène HBS1L et se termine au niveau de 45Kb en amont du gène MYB (Wahlberg K et al 2009). 12 marqueurs ont été identifiés dont 3 sont les plus associés à la variation du taux de l'HbF. Il s'agit du Rs 4895441 situé dans la partie 5'UTR de l'exon 1 du gène HBS1L, Rs 9399137 situé au niveau de l'intron1 du gène HBS1L. En outre, les variations dans la partie intergénique HMIP ont été identifiées par une étude du génome comme associées à la variation du taux de l'HbF chez des sujets non anémiques (Thein SL et al 2007).

Nos résultats montrent qu'il n'existe pas d'association significative entre les rs4895441 et rs 9399137 de HMIP et la variation du taux de l'hémoglobine Foetale

chez les drépanocytaires tunisiens. Concernant le rs9399137 le génotype homozygote muté CC n'a pas été rencontré dans notre population. Tous les patients étaient soit hétérozygotes CT et homozygotes normaux TT quelque soit le taux d'Hb F exprimé. Le même profil génotypique a été rapporté par Letter et al, 2008 mais ces auteurs ont trouvé une association entre le rs9399137 et la variation du taux de l'HbF.

En conclusion, l'expression de l'Hb F reste encore un sujet très débattu, l'histoire de polymorphismes parsemés dans le génome et ayant une association avec une expression différente d'Hb F restent encore une spécificité de population et de simples données statistiques. Les études d'expression seront les seules qui puissent donner une explication plausible et générale.

PERSPECTIVES

Le problème de la corrélation phénotype/ génotype est encore loin d'être élucidé.
Nous envisageons de continuer dans le projet des gènes modificateurs du syndrome drépanocytaire.

En étudiant une population mieux caractérisée cliniquement et génétiquement

Etudier d'autres gènes modificateurs

Etudier des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de tels gènes

A titre d'exemples :

- Etudier l'implication des protéines de transport de la bilirubine dans la lithogénèse. Exemple de l'albumine, SLCO1A2 et SLCO1B1.

- Explorer des cytokines susceptibles d'être impliquées dans le contexte pro inflammatoire de la drépanocytose.

- Etudier le rôle de facteurs de transcription dans l'expression du gène gamma globine. Exemple : KLF.

Nous projetons aussi d'appliquer la même approche d'étude des gènes non globines dans la modulation de la thalassémie et des enzymopathies comme le déficit en pyruvate kinase et en glucose 6 phosphate déshydrogénase.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- Allison AC. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malaria infection. Br Med J. 1954 ; Vol 1(4857): 290-4.
- An P, Nelson GW, Wang L, Donfield S, Geodert JJ, Phair J et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; vol 99(15): 10002-7.
- Andjelkovic AV, Kerkovich D & Pachter JS. Monocyte: astrocyte interactions regulate MCP-1 expression in both cell types. J Leukoc.Biol. 2000; Vol 68(4): 545-52.
- Appay V & Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. Trends Immunol. 2001; vol 22(2): 83-7.

-B-

- Bachir D. La drépanocytose. Revue Française des laboratoires. 2000; 324: 29-35.
- Balabanian K & Emilie D. Les récepteurs de chimiokines. Hématologie. 2004; vol 10(2): 123-34.
- Baldwin C, Nolan VG, Wyszynski DF, Ma QL, Sebastiani P, Embury SH, Bisbee A, Farrell J, Farrer L Steinberg MH. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell ostéonécroses. Bloodjournal. 2005; Vol 106(1): 372-5.
- Balogun RA, Obalum DC, Giwa SO, Adekoya-Cole TO, Ogo CN & Enweluzo GO. Spectrum of musculo-skeletal disorders in sickle cell disease in Lagos, Nigeria. Orthop Traumatol Surg Res. 2010; 5: 2.

- Banisadr G, Queraud-Lesaux F, Boutterin MC, Pelaprat D, Zalc B, Rostene W, Haour F & Parsadaniantz SM. Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. *J Neurochem.* 2002; Vol 81(2): 257–69.
- Bardakdjian J & Wajcman H. Epidémiologie de la drépanocytose. *Rev Prat.* 2004 ; Vol 54(14) : 1531-3.
- Barnwell et al. *J Exp Med* 1989; 169:162-7.
- Beet EA. Sickle-cell disease in the Balovale district of Northern Rhodesia. *East Afr Med J.* 1947; Vol 24(6): 212-22.
- Benamar K, Geller EB & Adler MW. Elevated level of the proinflammatory chemokine, RANTES/CCL5, in the periaqueductal grey causes hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008; vol 592(1-3): 93-5.
- Bertrand E. Drépanocytose et cœur. *Arch Mal Cœur.* 1989; Vol 82(11): 1881-4.
- Beutler E, Gelbart T, Demina A. UDPglucuronosyltransferase1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for Racial variability in the regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:8170–4.
- Blanpain,C, Migeotte I, Lee B, Vakili J, Doranz BJ, Govaerts C, Vassart G & al. CCR5 binds multiple CC-chemokines: MCP-3 acts as a natural antagonist. *Blood.* 1999; Vol 94(6): 1899-1905.
- Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum.* 2003; Vol 48(9):2501–8.
- Boring L, Gosling J, Cleary M and Charo IF. Decreased Lesion Formation in CCR2-/- Mice Reveals a Role for Chemokines in the Initiation of Atherosclerosis. *Nature.* 1998; Vol 394(6696): 894-7.
- Brown TA. *Gene Analysis.* USA: Academic Press; 1998.
- Brugnara C, Gee B, Armsby CC, Kurth S, Sakamoto M, Rifai N, Alper SL & Platt OS. Therapy with oral clotrimazole induces inhibition of the Gardos channel and reduction of erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest.* 1996; Vol 97(5): 1227–34.
- Brugnara C & Franceschi L. Essais cliniques de nouvelles thérapeutiques pharmacologiques de la drépanocytose. *Hématologie.* 2006; vol 12(4): 239-45.
- Buch S, Schafmayer C, Volzke H, et al. Loci from a genome-wide analysis of bilirubin levels are associated with gallstone risk and composition. *Gastroenterology* 2010; 139:1942-1951.

- [Bunn HF](#) & [McDonough M](#). Asymmetrical hemoglobin hybrids. An approach to the study of subunit interactions. [Biochemistry](#). 1974; Vol 13(5): 988-93.
- Buraczynska K, Luchowski P, Wojczal J, Ksiazek A & Stelmasiak Z. Monocyte chemoattractant protein (MCP-1) A-2518G gene polymorphism in stroke patients with different comorbidities. [Clinical Biochemistry](#). 2010; Vol 43(18); 1421-6.
- Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. [J Gastroenterol Hepato](#) 1999; 14:960–6.
- Burtreau C, Willems L & Kettmann R. Les chémokines et leurs récepteurs: rôle dans les infections virale et dans les pathologies cancéreuses. [Biotechnologie Agronomie Société et Environnement](#). 2007; vol 11(2): 141-150.

-C-

- [Calvo MB](#), [Fernández VB](#), [Villaamil VM](#), [Gallego GA](#), [Prado SD](#) & [Pulido EG](#). Biology of BMP signalling and cancer. [Clin Transl Oncol](#). 2008; Vol 11(3): 126-37.
- Cartron JP. Le double rôle des antigènes de groupe sanguin Duffy: récepteurs de P. vivax et de peptides chimiotactiques. [Hématologie](#). 1995; vol 1(3): 269-70.
- Carvalho TL, Ribolla PE, Curi RA & Mota LS. Characterization and transcriptional analysis of the promoter region of the Duffy blood group, chemokine receptor (DARC) gene in cattle. [Vet Immunol Immunopathol](#). 2009; vol 132(2-4): 153-9.
- Catonné Y, Mukisi Mukasa M, Rouvillain JL & Ribeyre D. Manifestations ostéo-articulaires de la drépanocytose. [Maîtrise Orthopédique](#). 2004; 135: 24-8.
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, [Hewick RM](#), [Rosen V](#), [Wang EA](#) & [Wozney JM](#). Identification of transforming growth factor- β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. [Proc Natl Acad Sci USA](#). 1990; Vol 87(24):9843–7. [Cerebrovasc Dis](#). 2009; Vol 28(2):124-30.

- Chaar V, Kéclard L, Diara JP, Leturdu C, Elion J, Krishnamoorthy R et al. Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2005; vol 90(2): 188-99.
- Charache S, Terrin ML, Moore RD, [Dover GJ](#), [Barton FB](#) & al. Effect of hydroxyurée on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N. Engl. J. Med.* 1995; Vol 332(20):1317–22.
- Charo IF & Taubman MB. Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease. *Circ Res.* 2004; Vol 95(9): 858-66.
- Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ & Coughlin SR. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxylterminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; Vol 91(7): 2752-6.
- Charo IF. CCR2: from cloning to the creation of knockout mice. *Chem Immunol.* 1999; 72: 30-41.
- Chekoury A, Laporte M & Dupuy E. Les accidents vasculaires cérébraux dans la drépanocytose. *Sang thrombose vaisseaux.* 2008; Vol 20(2): 77-81.
- [Chen D](#), [Zhao M](#) & [Mundy GR](#). Bone morphogenetic proteins. [Growth Factors](#). 2004; Vol 22(4):233-41.
- Chies JA & Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses.* 2001; vol 57(1): 46-50.
- Cho ML, Yoon BY, Ju JH, Jung YO, Jhun JY, Park MK & al. Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. *Exp Mol Med.* 2007; Vol 39(4): 499-507.
- Combadière B, Combadière C & Deterre Ph. Les chimiokines : un réseau sophistiqué de guidage cellulaire. *Médecine Sciences.* 2007; vol 23(2): 173-179.
- Condon PI & Serjeant GR. Ocular findings in elderly cases of homozygous sickle-cell disease in Jamaica. *Br J Ophthalmol.* 1976; Vol 60(5): 361-4.

-D-

- Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z & Keller ET. Bone Morphogenetic Protein-6 Promotes Osteoblastic Prostate Cancer Bone Metastases through a Dual Mechanism. *Cancer Res.* 2005; Vol 65(18):8274 -85.
- de Brevern AG, Auntin L, Colin Y, Bertrand O & Etchebest C. In silico studies on DARC. *Infect Disord Drug Targets.* 2009; vol 9(3): 289-303.
- Deisseroth A, Nienhuis A, Tuner P, Veler R, Anderson WF, Ruddle F, Laurnce J, Creagan R & Kuchalapati R. Localisation of human alpha-globin: Structural gene to chromosome 16 in somtic cell hybrids by molecular hybridation assay. *Cell.* 1977; Vol 12(1): 205-18.
- del Giudice EM, Perrotta S, Nobili B, et al. Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. *Blood* 1999; 94: 2259–62.
- Deshmane SL, Kermelev S, Amini S & Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1): An overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; Vol 29(6): 313-26.
- Diagne I, Badiane M, Moreira C, Signate-Sy H, Ndiaye O, Lopez-Sall P et al. Lithiase biliaire et drépanocytose homozygote en pédiatrie à Dakar (Sénégal). *Archives de pédiatrie.* 1999; vol 6(12): 1286-1292.
- Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF & Andjelkovi AV. Absence of the Chemokine Receptor CCR2 Protects Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Stroke.* 2007; Vol 38(4): 1345-53.
- Dossou-Yovo OP, Zaccaria I, Benkerrou M, Hauchecorne M, Alberti C, Rahimy MC et al. Effects of RANTES and MBL2 gene polymorphisms in sickle cell disease clinical outcomes: Association of the g.In1.1T>C RANTES variant with protection against infections. *Am J Hematol.* 2009; vol 84(6): 378-80.
- Driss A, Asare KO, Hibbert JM, Gee BE, Adamkiewicz TV & Stiles JK. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. *Genomics Insights.* 2009; 2: 23- 48.

- Durpès MC, Nebor D, du Mesnil PC, Mougènel D, Decastel M, Elion J et al. Effect of interleukin-8 and RANTES on the Gardos channel activity in sickle human red blood cells: Role of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Blood Cells Mol Dis.* 2010; vol 44(4): 219-23.
- Durpès MC. Thèse de Doctorat : Biologie : Antilles-Guyane : 2010.

-E-

- Elion J & Labie D. Bases physiopathologiques moléculaire et cellulaires du traitement de la drépanocytose. *Hématologie.* 1996; vol 2(6): 499-510.
- Elion J & Labie D. Drépanocytose et adhérence cellulaire. *Hématologie.* 1998; Vol 4 (3): 201-11.
- Emmel VE. A study of the erythrocyte in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. *Arch Int Med.* 1917; Vol 20 (4): 586-98.
- Erlacher L, McCartney J, Piek E, ten Dijke P, Yanagishita M, Oppermann H, Luyten FP. Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *J Bone Miner Res.* 1998; Vol 13(3):383–92.
- Etienne J, Clauser E, Housset C & Roingard P. *Biochimie génétique, Biologie moléculaire.* Paris: Elsevier Masson; 2006.
- Eugenin EA, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon TM & Berman JW. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Mediates Enhanced Transmigration of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Leukocytes across the Blood-Brain Barrier: A Potential Mechanism of HIV-CNS Invasion and NeuroAIDS. *The Journal of Neurosciences.* 2006; Vol 26(4): 1098-1106.
- [Everson GT](#), [Nemeth A](#), [Kourourian S](#), [Zogg D](#), [Leff NB](#), [Dixon D](#) et al. Gallbladder function is altered in sickle hemoglobinopathy. [Gastroenterology.](#) 1989; Vol 96(5 Pt 1): 1307-16.

-F-

- Fattoum S. Les hémoglobinopathies en Tunisie : Revue actualisée des données épidémiologiques et moléculaires. Tunisie médicale. 2006 ; Vol 84(11):687-96.
- Flanagan JM, [Frohlich DM](#), [Howard TA](#), [Schultz WH](#), [Driscoll C](#), [Nagasubramanian R](#), [Mortier NA](#) & al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia.
- [Fowler JE Jr](#), [Koshy M](#), [Strub M](#), [Chinn SK](#). Priapism associated with the sickle cell hemoglobinopathies: prevalence, natural history and sequelae. [J Urol](#). 1991; Vol 145(1):65-8.
- Frade, JM., Mellado M, del Real G, Gutierrez-Ramos JC, Lind P & Martinez AC. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. J Immunol. 1997; Vol 159(11): 5576-84.
- Frenette PS & Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts and future promise. J Clin Invest. 2007; vol 117(4): 850-8.
- Frikha M, Fakhfakh F, Mseddi S, Gargouri J, Ghali L, Labiadh Z, Harrabi M, Souissil T & Ayadi H. Étude de l'haplotype βS de l'hémoglobine dans la région de Kébili (Sud Tunisien). Transfusion Clinique et Biologique. 1998 ; vol (5) : 166-172.
- F.Bernaudin. Qu'est ce que la drépanocytose ? Drépanosite. 2006.

-G-

- Galacteros F. Anatomical and pathophysiological bases of renal disorders in sickle cell syndrome patients and carriers of the trait. Bull Eur Physiopathol Respir. 1983; 19: 351-5.

- Galacteros F. Drépanocytose. Encyclopédie Orphanet; 2000.
- Galacteros F. Le diagnostic prénatal de la drépanocytose. *Sciences Sociales et Santé*. 2005; Vol 23(2): 67-73.

Galanello R, Piras S, Barella S, et al. Cholelithiasis and Gilbert's syndrome in homozygous beta-thalassaemia. *Br. J. Haematol* 2001; 115: 926–8.

- Gardos G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1958; Vol 30(3): 653-4.
- [Gbadoe AD](#), [Akakpo-Vidah A](#), [Pitche](#) charge par injections intracaverneuses [P](#), [Assimadi JK](#). Priapisme drépanocytaire: Prise en d'etilefrine. [Med Trop](#). 2000; Vol 60(1): 53-6.
- Gether U. Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocr Rev*. 2000; Vol 21(1):90-113.
- Girot R, Bégué P & Galacteros F. La drépanocytose. Paris : John Libbey Eurotext; 2003.
- Gitelman SE, Kirk M, Ye JQ, Filvaroff EH, Kahn AJ & Derynck R. Vgr-1/BMP-6 induces osteoblastic differentiation of pluripotentialmesenchymal cells. *Cell Growth Differ*.1995; Vol 6(7): 827–36.
- Gitelman SE, Kobrin MS, Ye JQ, Lopez AR, Lee A, Derynck R. Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone formation in vivo. *J Cell Biol*. 1994; Vol 126(6):1595–609.
- Godeau B, Bachir D, Schaeffer A & Galactéros F. La drépanocytose de l'adulte : actualités cliniques et thérapeutiques. *Contours Med*. 1996; Vol 118(42): 3063-70.
- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, [Tseng S](#), [Zlot CH](#), [Young SG](#) & al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest*. 1999; Vol 103(6): 773-8.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, [Gerard C](#), [Sukhova GK](#), [Libby P](#) & [Rollins BJ](#). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998; Vol 2(2): 275-81.
- Gu L, Tseng SC & Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem Immunol*. 1999; 72: 7-29.
- Gulbis B, Cotton F & Vertongen F. Hémoglobines anormales rare. *EMC-Hématologie*. 2004; 1: 106-114.
- Guo J, De Waard V, Van Eck M, [Hildebrand RB](#), [Van Wanrooij EJ](#), [Kuiper J](#) & al. Repopulation of apolipoprotein E knockout mice with CCR2-deficient bone

marrow progenitor cells does not inhibit ongoing atherosclerotic lesion development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; Vol 25(5): 1014-9.

- Guo J, Van Eck M, Twisk J, [Maeda N](#), [Benson GM](#), [Groot PH](#) & [Van Berkel TJ](#). Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; Vol 23(3): 447-53.
- Gusella J, Varsanyi-Breiner A, Kao FT, Jones C, Puck TT, Keys C, Orkin S & Housman D. Precise localization of human β -globin gene complex on chromosome 11*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA.* 1979; Vol 76(10): 5239-43.

-H-

- Habibi A, Bachir D & Godeau B. Complications aiguës de la drépanocytose. *La Revue Du Praticien.* 2004; 54: 1548-1556.
- Habibi A, Godeau B & Galacteros F. Drépanocytose et réanimation. *Réanimation.* 2007; 16: 310-317.
- Hahn EV & Gillespie EB. Sick cell anemia: Report of a case greatly improved by splenectomy. Experimental study of sickle cell formation. *Arch Intern Med.* 1927; vol 39(2): 233-254.
- Hahn EV, Gillespie EB. Sick Cell Anemia. *Arch Intern Med.* 1927; Vol 39(2): 233-54.
- Hahn GV, Cohen RB, Wozney JM, Levitz CL, Shore EM, Zasloff MA & Kaplan FS. A bone morphogenetic protein subfamily: Chromosomal localization of human genes for BMP5, BMP6 and BMP7. *Genomics.* 1992; [Vol 14\(3\)](#): 759-62.
- Handel TM & Domaille PJ. Heteronuclear (1H, 13C, 15N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry.* 1996; Vol 35(21): 6569-84.
- Harrington JR. The Role of MCP-1 in Atherosclerosis. [STEM CELLS](#). 2000; [Vol 18\(1\)](#): 65-6.

- Haverfield EV, McKenzie CA, Forrester T, et al. UGT1A1 variation and gallstone variation in sickle cell disease. *Blood* 2005; 3:968-72.
- Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red corpuscles in a case of severe anemia. *Arch Intern Med.* 1910; vol 6(5): 517-521.
- Hong JH, TaekLee G, Lee JH, Kwon SJ, Park SH, Kim SJ & Kim IY. Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. *Immunology.* 2008; Vol 128(1 Suppl): e442- 50.



- Inagaki K, Otsuka F, Suzuki J, Kano Y, Takeda M, Miyoshi T, Otani H & Involvement of Bone Morphogenetic Protein-6 in Differential Regulation of Aldosterone Production by Angiotensin II and Potassium in Human Adrenocortical Cells. *Endocrinology.* 2006; Vol 147(6):2681–9.
- Ingram VM. Abnormal human haemoglobins.III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochim Biophys Acta.* 1959; 36: 402-411.
- Ioannidis JP, Rosenberg PS, Goedert JJ, Ashton LJ, Benfield TL, Buchbinder SP, Coutinho RA, Eugen-Olsen G & al. Effects of CCR5-Delta32 CCR2-64I and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. *Ann Intern Med.* 2001; Vol 135(9): 782-95.
- Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human haemoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 1953; Vol 47(1): 148-159.
- Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human haemoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 1953; 47: 148-159.

-J-

- Jiang Y, Beller DI, Frenzl & Graves DT. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Adhesion Molecule Expression and Cytokine Production in Human Monocytes. *J Immunol.* 1992; 148: 2423-28.

-K-

- Kadakol A, Ghosh SS, Sappal BS, et al. Genetic lesions of bilirubin-diphosphoglucuronate glucosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar Gilbert syndromes: correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat* 2000; 4:297-306.
- Kaplan M, Renbaum P, Levi-Lahad E, et al. Gilbert Syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1997; 94:12128-12132.
- Kéclard L, Romana M & Saint-Martin C. Epidémiologie des gènes globines dans le bassin caribéen. La drépanocytose, regards croisés sur une maladie orpheline, éditions Khartala, 2004: 75-94.
- Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB & Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol.* 2005; 6:9.
- Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Fujimoto M, Lindley I & Furusho K. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. *J Exp Med.* 1996; vol 183(5): 2397-402.
- Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Tzetis M, et al. Gilbert's syndrome as a predisposing factor for idiopathic cholelithiasis in children. *Haematologica* 2003; 10: 1193-4.

- Krawczyk M, Wang DQ, Portincasa P et al. Dissecting the genetic heterogeneity of gallbladder stone formation. *Epub* 2011; 2:157-72.
- Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY & Kaplan AP. Rantes, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol.* 1992; vol 149(2): 636-42.
- Kurihara T, Warr G, Loy J & Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997; Vol 186(10): 1757-62.

-L-

- Labie D & Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie.* 2005; 2: 220-239.
- Labie D & Elion J. Modulation polygénique des maladies monogéniques : l'exemple de la drépanocytose. *Médecine Science.* 1996; Vol 12(3): 341-49.
- Lachheb J, Chelbi H, Hamzaoui K & Hamzaoui A. Association between RANTES polymorphisms and asthma severity among Tunisian children. *Hum Immunol.* 2007; vol 68(8): 675-80.
- Lavery K, Swain P, Falb D & Alaoui-Ismaili MH. BMP-2/4 and BMP-6/7 Differentially Utilize Cell Surface Receptors to Induce Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *J Biol Chem.* 2008; Vol 283(30): 20948-58.
- Lew VL & Bookchin RM. Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol Rev.* 2005; Vol 85(1): 179-200.
- Lew VL, Etzion Z & Bookchin RM. Dehydration response of sickle cells to sickling-induced Ca (++) permeabilization. *Blood.* 2002; Vol 99(7): 2578-85.

- Lin JP, Cupples LA, Wilson PW et al. Evidence for a gene influencing serum bilirubin on chromosome 2q telomere: a genome wide scan in the Framingham study. *Am J Hum Gene* 2003; 4:1029-34.
- Lirussi F, Nassuato G, Passera D, et al. Gallstone disease in an elderly population: the Silea study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:485-491.
- Luster AD. Chemokines-Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *The New England Journal of Medicine*. 1998; vol 338(7): 436-445.
- Luther SA & Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2001; Vol 2(2): 102-7.

-M-

- [Maniatis T](#), [Hardison RC](#), [Lacy E](#), [Lauer J](#), [O'Connell C](#), [Quon D](#), [Sim GK](#) & [Efstratiadis A](#). The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell*. 1978 ; Vol 15(2): 687-701.
- Marks J, Shaw JP & Shen CKJ. The orangutan adult alpha-globin gene locus: Duplicated functional gens and a newly detected member of the primate alpha-globin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; Vol 83(5): 1413-7.
- Marschall HU, Katsika D, Rudling M, et al. The genetic background of gallstone formation: an update. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396:58–62.
- Maxwell PH. *Néphrologie*. Bruxelles : De Boeck; 2009.
- [Mehrabian M](#), [Sparkes RS](#), [Mohandas T](#), [Fogelman AM](#) & [Lusis AJ](#). Localization of monocyte chemotactic protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. *Genomics*. 1991; Vol 9(1): 200-3.
- Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S & Tashiro K.C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003; Vol 145(1-2):135-8.

- Miller et al. Science 1975; 189: 561-3.
- [Moll S](#) & [Orringer EP](#). Case report: splenomegaly and splenic sequestration in an adult with sickle cell anemia. Am. J. Med. Sci. 1996; Vol 312(6):299-302.
- Montalembert M. Traitement de la drépanocytose par l'hydroxyurée. Hématologie. 2002; vol 8(1): 28-34.
- Mukaza-Martin M, Bashoun K & Burny F. Ostéonécrose drépanocytaire de la tête fémorale et pression intraosseuse. Revue de chirurgie orthopédique et traumatologique. 2009; vol 95(2): 153-157.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim & Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev. 2000; Vol 52(1): 145-76.

-N-

- [Nagel RL](#), [Bookchin RM](#), [Johnson J](#), [Labie D](#), [Waicman H](#), [Isaac-Sodeye WA](#) et al. Structural bases of the inhibitory effects of hemoglobin F and hemoglobin A2 on the polymerization of hemoglobin S. [Proc Natl Acad Sci USA](#). 1979; Vol 76(2):670-2.
- Nakayama EE, Yuetsua T, Yoshiyukib N; Aikichic I, Tatsuo S. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. AIDS. 2004; Vol 18(5): 729-38.
- Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 Chemokines/Chemokine Receptors genes and their association with diseases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006; Vol 150(2): 191–204.
- Nebor D, Durpes MC, Mougengel D, Mukisi-Mukaza M, Elion J, Hardy- Dessources MD et al. Association between Duffy antigen receptor for chemokine expression and levels of inflammation markers in sickle cell anemia patients. Clin Immunol. 2010; vol 136(1): 116-22.
- Neel JV. The inheritance of sickle cell anemia. Science. 1949; vol 110(2846): 64-66.
- Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques J Clin Invest. 1991; Vol 88(4):1121-7.

- Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors and allograft rejection. *Immunity*, 2001 (14): 377-386.
- Nickel R, Beck LA, Stellato C & Scheimer RP. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; vol 104(4): 723-742.
- Noguchi CT, Schechter AN & Rodgers GP. Sickle cell disease pathophysiology. *Baillieres Clin Haematolo*. 1993; vol 6(1): 58-91.
- Nyquist PA, Winkler CA, McKenzie LM, Yanek LR, Becker LC & Becker DM. Single nucleotide polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor act synergistically to increase the risk of carotid atherosclerosis.



- Old JM. DNA-based diagnosis of the hemoglobin disorders. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001: 941.
- Omrani MD, Mokhtari MR, Tagizadae A, Bagheri M & hmad-Poor P. Association of CCR5-59029 A/G and CCR2-V64I variants with renal allograft survival. *Iran J Immunol*. 2008; Vol 5(4):201-6.
- [Oppenheim JJ](#), [Zachariae CO](#), [Mukaida N](#) & [Matsushima K](#). Properties of the novel proinflammatory supergene-intercrine-cytokine family. *Ann Rev Immunol*. 1991; 9: 617-48.
- Organisation Mondiale de la Santé. Sickle-cell anemia : Report. Mis en ligne le 24 avril 2006. URL: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59/A59_9-en.pdf
- Orkin SH. The duplicated human alpha gene lies close together in cellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Dec;75(12):5950-4

- Orsini A & Orsini –Robin J. Classification et mécanismes physiopathologiques et génétiques des hémoglobinoses. *Annales de Pédiatrie*. 1985 ; Vol 32(9): 755-65.

-P-

- Pauling L, Itano HA, Singer SJ & Wells IC. Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science*. 1949; 110: 543-548.
- [Pham PT](#), [Pham PC](#), [Wilkinson AH](#) & [Lew SQ](#). Renal abnormalities in sickle cell disease. [Kidney Int.](#) 2000; Vol 57(1): 1-8.
- Pollard TD & Earnshaw WC. *Biologie cellulaire*. Paris : Editions Elsevier Science; 2004.
- Potteaux S, Tedgui A & Mallat Z. Rôle des chimiokines dans l'athérosclérose : complémentarité des recherches fondamentales et cliniques dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques. *mt cardio*. 2006; vol 2(5): 561-70.
- Premawardhena A, Fisher CA, Fathiu F, et al. Genetic derterminants of jaundice in hemoglobin Eb thalaseamia. *Lancet* 2001; 357:1945–6.
- Proudfoot AE, Power CA & Schwarz MK. Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin Investig Drugs*. 2010; Vol 19(3): 345-55.
- Proudfoot AEI & Chvatchko Y. Les chémokines: des cibles thérapeuthiques potentielles de l'asthme au VIH. *Revue de l'ACOMEN*. 1999; vol 5(3): 259-270.

-R-

- Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D & Farber JM. Chemokine Receptor Responses on T Cells Are Achieved Through Regulation of Both Receptor Expression and Signaling. *Journal of Immunology*. 1999; Vol 162(7): 3840-50.
- Rajimakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene. *J Hepato* 2000; 33:348–51.
- Rek A, Brandner B, Geretti E & Kungl AJ. A biophysical insight into the RANTES-glycosaminoglycan interaction. *Biochim Biophys Acta*. 2009; vol 1794(4): 577-582.
- Rhinesmith HS, Schroeder WA, & Pauling L. A quantitative study of the hydrolysis of human dinitrophenyl (DNP) globin: The number and kind of polypeptide chains in normal adult human hemoglobin. *J Am Chem Soc*. 1957; Vol 79(17): 4682-86.
- Rivera A, Jarolim P & Brugnara C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood*. 2002; vol 99(1): 357-363.
- Roberts. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*. 1998; Vol 24(2-3): 111-19.
- [Rollins BJ](#). Chemokines. [Blood](#). 1997; Vol 90(3): 909-28.
- Romana M, Diara JP, Doumbo L, Muralitharan S et al. Angiotensinogen gene associated polymorphisms and risk of stroke in Sickle Cell Anemia: Additional data supporting an association. *Am J Hematol* 76:310-311, 2004.
- Romana M, Nebor D et Elion J. Gènes modulateurs de la drépanocytose. *Bull Soc Pathol Exot*, 2009, 102 (3) : 199-205.
- **Roth MP, Coppin H. BMP6, un acteur clé dans la régulation du métabolisme du fer. *Med Sci (Paris)*. 2009; Vol 25(8-9): 678–80.**
- Rovin BH, Lu L & Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 259(2): 344-8.
- Rovin BH. Chemokine blockade as a therapy for renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000, 9, 225-232.
- Russo-Marie F, Peltier A & Polla BS. L'inflammation. Paris: Editions John Libbey Eurotext; 1998.

-S-

- Samson M, LaRosa G, Libert F, Painsavoine P, Detheux M, Vassart G & Parmentier M. The Second Extracellular Loop of CCR5 Is the Major Determinant of Ligand Specificity. *J Biol Chem.* 1997; Vol 272(40): 24934-41.
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. DNA sequencing with-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; vol 74(12): 5463-7.
- Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science.* 2008; vol 322(5909): 1839-42.
- Saremba S, Nickel J, Seher A, Kotzsch A, Sebald W & Mueller TD. Type I receptor binding of bone morphogenetic protein 6 is dependent on N-glycosylation of the ligand. *FEBS J.* 2008; Vol 275(1):172-83.
- Savarin-Vuaillet C & Ransohoff RM. Chemokines and Chemokine receptors in Neurological Disease: Raise, Retain or Reduce?. *NeuroTherapeutics.* 2007; vol 4(4): 590-601.
- Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine.* 1991; vol 3(3): 165-183.
- Schmutz M, Speer O, Ozsahin AH & Martin G. La drépanocytose en Suisse. *Forum Med Suisse.* 2008; vol 8(33): 582-586.

- Sebastiani P, Ramoni MF, Nolan V, Baldwin CT & Steinberg MH. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke in sickle cell anemia. *Nat Genet.* 2005; Vol 37 (4): 435–40.
- Sebes JI & Kraus AP. Avascular necrosis of the hip in the sickle cell hemoglobinopathies. *J Can Assoc Radiol.* 1983; Vol 34(2): 136-9.
- Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptor, and renal disease: from basic science to pathophysiology and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol,* 2000, 11, 152-176.

- Shaffer EA. Epidemiology and risk factors for gallstone disease: has the paradigm changed in the 21st century? *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 2:132-40.
- Shaw JP, Johson Z, Borlat F, Zwahlen C, Kungl A, Roulin K et al. The X-Ray Structure of RANTES: Heparin-Derived Disaccharides Allows the Rational Design of Chemokine Inhibitors. *Structure*. 2004; vol 12(11): 2081-93.
- Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T & al. Bone morphogenetic protein-6 stimulates gene expression of follicle-stimulating hormone receptor, inhibin/activin beta subunits, and anti-Müllerian hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2009; Vol 92(5): 1794-8.
- Siguret V & Andreux JP. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. *Ann Biol Clin*. 1997; Vol 55(2): 103-12.
- Springael JY, Urizar E & Parmentier M. (2005). Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; Vol 16(6): 611-23.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994; Vol 76(2): 301-14.
- Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; Vol 27(4): 204-10.
- Steinberg MH. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27: 204–10.
- Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1998;
- [Sydenstricker VP](#), [Mulherin WA](#) & [Houseal RW](#). Sickle cell anemia: report of two cases in children, with necropsy in one case. [Am J Dis Child](#). 1923; 26:132-54.

-T-

- Taub DD, Ortaldo JR, Turcovski-Corrales SM, Key ML, Longo DL. & Murphy WJ. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol.* 1996; vol 59(1): 81-9.
- Tchamago CJ. Dépistage néonatal de la drépanocytose au Sénégal: Etude préliminaire au sein de deux maternités de Dakar. Doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar; 2006.
- Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2001; 2: 129-34.
- Thomas C, Lemerle S, Bernaudin F, Feingold J, Guillou-Bataille M, Reinert P et al. Drépanocytose : étude de la mortalité pédiatrique en Ile de France de 1985 à 1992. *Archives de Pédiatrie.* 1996; vol 3(5): 445-451.
- Tosteson DC, Carlsen E et Dunham ET. The effects of sickling on ion transport. I. Effect of sickling on potassium transport. *J Gen Physiol.* 1955; Vol 39(1): 31-53.
- Tosteson DC, Shea E et Darling RC (1952). Potassium and sodium of red blood cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest.* 1952; Vol 31(4): 406-11.
- Tran THC, Mekinian A, Godinaud M & Rose C. Rétinopathie drépanocytaire chez les adultes de la région Nord-Pas-de-Calais. *Journal Français d'Ophtalmologie.* 2008; vol 31(10): 987-992.
- Tsezou A, Thétis M, Giannatou E, et al. Gilbert syndrome as a predisposing factor for cholelithiasis risk in the Greek Adult Population. *Gen. Test* 2009; 13:143–6.
- (tunisien). *Transfusion Clinique et Biologique.* 1998 ; Vol 5(2) : 166-172.

-V-

- Van Coillie E, Van Damme J & Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999; Vol 10(1): 61-86.
- Vandepitte J & Delaisse J. Sicklémie et paludisme. *Ann Soc belge Méd Trop.* 1957; Vol 37(5): 703-35.
- Vangelista L, Secchi M & Lusso P. Rational design of novel HIV-1 entry inhibitors by RANTES engineering. *Vaccine.* 2008; vol 26(24): 3008-15.
- Verlhac S & Bernaudin F. Echodoppler transcrânienne Chez les drépanocytaires Enfants. *Hématologie*, n ° hors-série, 8, 3 / 2002, résumé 53 p32.

- Vichinski EP, Neumayr LD, Earles AN, [Williams R](#), [Lennette ET](#), [Dean D](#) et al. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. N Engl J Med. 2000; Vol 343(11):824.
Vol 11(1): 163-84.

-W-

- Wajcman H & Galacteros F. Drépanocytose : laboratoire et études de l'hémoglobine. Bull Soc Pathol Exot. 2001; Vol 94(2): 80-4.
- Wajcman H & Galacteros, F. Drépanocytose : laboratoire et étude de l'hémoglobine. Journée "Drépanocytose et β -thalassémie". 2000.
- Wajcman H. Diagnostic et dépistage de la drépanocytose. La Revue Du Praticien. 2004; 54: 1543-1547.
- Wajcman H. Hémoglobines : structure et fonction. EMC-Hématologie. 2005; 2: 145-157.
- Weatherall DJ & Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. Bulletin of the World Health Organization. 2001; Vol 79 (8): 704-12.
- [Webb DK](#) & [Serjeant GR](#). Systemic Salmonella infections in sickle cell anaemia. [Ann Trop Paediatr](#). 1989; Vol 9(3):169-72.
- Williams TN & Obaro SK. Sickle cell disease and malaria morbidity: a tale with two tails. Trends Parasitol. 2011.
- Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF. Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene: evidence for the role of the carboxyl terminal tail in receptor trafficking. J Biol Chem. 1997. Vol 272(2): 1038-45.
- Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. Spine. 2002; Vol 27(16 Supp 1): S2-8.
- WWW. inrp. fr/Access/biotic/gpe/dossiers/drépanocytose/html/carte.htm

-X-

- Xu J, Peng C, Sankaran VG, Shao Z, Esrick EB, Chong BG, Ippolito GC, Fujiwara Y, Ebert BL, Tucker PW, Orkin SH. Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. *Science* 2011 Nov 18;334(6058):993-6.

-Y-

- Yabe T, Samuels I & Schwartz JP. Bone morphogenetic proteins BMP-6 and BMP-7 have differential effects on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cell neurons. *J Neurosci Res.* 2002; Vol 68(2):161–8.
- Yamamoto K, Sato H, Fujiyama Y, et al. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1406:267-273.

-Z-

- Zafiropoulos A, Crikas N, Passam AM, Spandidos DA. Significant involvement of CCR2-64I and CXCL12-3a in the development of sporadic breast cancer. *J Med Genet.* 2004; Vol 41(5):e59.
- Zee RYL, Cook NR, Cheng S, Reynolds R, Erlich HA, Lindpaintner K & Ridker PM. Human Molecular Genetics, Polymorphism in the P-selectin and interleukin-4 genes as determinants of stroke: a population-based, prospective genetic analysis.

- Zhang Z, Trautmann K, Artelt M, Burnet M & Schluesener HJ. Bone morphogenetic protein-6 is expressed early by activated astrocytes in lesions of rat traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2006; Vol 138(1): 47–53.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000 (12): 121-127.

ANNEXES

Annexe1

Frottis sanguin :

Coloration au MGG :

- Principe :

Il s'agit d'un examen microscopique d'un frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa. Il met en évidence les anomalies morphologiques des cellules sanguines. Les éléments basophiles en bleu par le bleu de méthylène.

- Protocol expérimental :
 - Déposer une goutte de sang sur une lame dégraissée à l'alcool.
 - Laisser sécher.
 - Ajouter 10 à 15 gouttes de May- Grunwald sur le frottis (3mm) pour fixer les cellules.
 - Egoutter
 - Recouvrir la lame par le Giemsa 1/15 (15mn).
 - Egoutter
 - Laver à l'eau tamponnée (2mn).
 - Laisser sécher.
 - Observer au microscope optique par l'objectif 40X puis 100X.

Coloration au bleu de Crésyl brillant :

- Principe :

C'est un examen microscopique d'un frottis sanguin après coloration au bleu de Crésyl brillant de l'ARN qui apparait en forme granulo-filamenteuse au microscope. Il met en évidence les réticulocytes.

- Protocol expérimental :
 - Incuber 2v de sang avec 1v de bleu de crésyl à 37°C (10mn).

- Etaler une goutte du mélange sur une lame.
- Laisser sécher.
- Observer au microscope optique par l'objectif 40X puis 100X.

Identification de l'hémoglobine S par le test de solubilité

Principe :

En absence d'oxygène, l'Hb S a la propriété de précipiter plus rapidement que les autres hémoglobines qui demeurent solubles dans le surnageant.

Protocole opératoire :

Dans un tube eppendorff, on met 1ml de tampon de solubilité (30g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,2g de K_2HPO_4 , 1g de saponine et 100ml d'eau distillée) et une pincée de dithionite de sodium (réducteur qui désoxygénise le globule rouge). Après dissolution du dithionite de sodium, on ajoute 50 μl de globules rouges lavés ou 100 μl de sang total. Agiter pour homogénéiser puis laisser reposer pendant 5mn, enfin centrifuger pendant deux minutes à 2000rpm.

Résultats possibles lors d'un test de solubilité :

Surnageant	Culot	Résultat	Conclusion
Rouge	Blanc (protéines)	Solubilité totale	Absence d'HbS
Rose	GR+protéines	Solubilité diminuée	Hétérozygote S
Pâle	Tous les GR+protéines	Insolubilité totale	Homozygote S

Dosage de l'hémoglobine fœtale par la méthode de la résistance à la dénaturation alcaline :

Principe :

On exploite dans ce test la particularité qu'a l'HbF à savoir sa résistance à la dénaturation alcaline, ce qui fait que contrairement aux autres Hb qui sont dénaturées et précipitées se trouvant ainsi dans le culot, l'HbF ne précipite pas et demeure dans le surnageant après centrifugation.

On utilise au cours de cette expérience du sang frais qui sera lavé 3 fois à l'eau physiologique.

Protocole opératoire :

Préparation de l'hémolysat :

0.4ml eau distillée

2.6ml solution de Drabkin

200µl globules rouges lavés

La réaction :

	Témoin	Dosage
Hémolysat	1.4ml	1.4ml
Soude 1.2N	0	0.2ml
H2O	0.2ml	0
SO₄(NH₄)₂	1ml	1ml

Laisser reposer 5mn.

Centrifuger à 2000rpm pendant 5mn.

.récupérer le surnageant qui contient l'Hb alcaline résistante.

Lecture :

La densité optique du surnageant est lue à 540nm, lecture contre le blanc (solution de drabkin).

Le témoin nous renseigne sur l'hémoglobine totale (on le dilue 20 fois pour pouvoir lire au spectrophotomètre).

Les tubes du dosage nous renseignent sur la quantité de l'hémoglobine fœtale.

La lecture se fait à 540nm.

$$\% \text{ de l'Hb F} = (\text{D.O dosage} / \text{D.O témoin} * 20) * 100$$

Dosage de la bilirubine

principe

La bilirubine du sérum réagit avec l'acide sulfanilique diazoté pour former un composé coloré. Cette réaction est facilitée en présence de deux solvants : la diméthyl sulfoxyde et l'éthylène glycol. L'intensité de la coloration générée par ce colorant en solution est proportionnelle à la concentration de la bilirubine totale.

b) Prélèvement :

Réaliser un prélèvement de sang veineux recueilli sans anticoagulant. Centrifuger à pleine vitesse pendant 5 minutes. Séparer rapidement le sérum des globules grâce à une passette.

Tout prélèvement hémolysé devra être traité avec suspicion. Si possible, réaliser un nouveau prélèvement.

c) Technique :

Le dosage se fait à l'aide de l'automate Konelab 20.

Les réactifs utilisés sont

- Réactif A

Ce réactif est composé de :

Acide sulfanilique (32.2mmol/l), chlorure de sodium (NaCl)(0.145mol/l), chlorure d'hydrogène (HCl)(120mmol/l), acide maléique (0.125mol/l), éthylène glycol(1.8mol/l) et du diméthylsulfoxyde (6mol/l).

- Réactif B

Ce réactif est composé de nitrite de sodium (103mmol/l).

Annexe2

1. Préparation de lyse des GR :

Tris 2M pH 7,6 : 10ml.

EDTA 0.25M pH8 : 20ml.

QSP d'eau distillée : 1L.

2. Préparation de la solution de lyse des GB :

SDS 10% dans du Tris 2M pH 7,6.

Agiter délicatement, filtrer et laisser reposer Over Night.

3. Préparation de la solution de Tris 2M :

Tris : 242.2g

Dissoudre la poudre dans 500ml d'eau distillée sous agitation pendant 2 à 3 heures
QSP 1000ml d'eau distillée.

Ajuster le pH avec HCl.

Conservation à +4°C.

4. Préparation de la solution d'EDTA 0.4M :

EDTA : 148.8g

QSP 1000ml d'eau distillée.

Préparation de la solution de T10E1

Tris-HCl 1M pH7.5 : 10ml.

EDTA 0.5M pH8 :2ml

QSP 1000ml d'eau distillée.

Conservation +4°C

Annexe 3

1. Réactifs utilisés en biologie moléculaire

a) *Solutions, Tampons et kits*

- EDTA (acide éthylène-diamine-tétra acétique): 0,5 M
- Nonidet P40: 1%
- Solution A: NaCl 100 mM; EDTA 25 mM; SDS 1%
- Protéinase K: 10µg/µl
- Solution de phénol/ chloroforme: Volume/Volume (1/1)
- NaCl (chlorure de sodium): 3M
- Ethanol absolu, Ethanol 70%, Ethanol 10%
- TBE 10X: 0,88 M Tris-borate; 0,89 M Acide Borique; 20 mM EDTA
- BET (Bromure d'éthidium): 10mg/ml
- Tampon de dépôt d.ADN (double bleu): 0,25% bleu de bromophénol; 0,25% Xylène Cyanol; 50% Glycérol, 5% Tris-HCl 1M; 10% EDTA 0,5M.
- Solution de polyacrylamide: T9C5
- TEMED (N, N, N, N.-tetraméthyléthylènediamine)
- Persulfate d.ammonium: 10 mg de persulfate d.ammonium dans 1ml d.eau
- Tampon d'électrophorèse: 0,125 M Tris/Glycine, pH 8,8
- Tampon du gel: 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8
- Kit d.extraction d.ADN à partir du sang: QIAGEN amp DNA Mini Kit.
- Kit Biorad de l'automate D10.
- Big Dye Terminator V3.1: (Applied Biosystem)

Tableau 1 : Propriétés des enzymes de restriction utilisées pour l'étude des polymorphismes au niveau des gènes RANTES, CCL2 et CCR2

Polymorphismes étudiés	Enzymes	Site de restriction	Concentration	Température et durée d'incubation
INT1T/C RANTES	MbolI	...5'...GAAGANNNNN↓NNN.....3' 3'... CTTCTNNNNNN↑.....5'	5U/μl	37°C, une nuit
CCL2	PvuII	5'...CAGG↓TG...3' 3'...GTC↑GAC...5'	10U/μl	37°C, une nuit
CCR2	BsaBI	5'...GATNN↓NNATC...3' 3'...CTANN↑NNTAG...5'	10U/μl	37°C, une nuit

Tableau 2 : les amorces utilisées pour l'étude des polymorphismes.

Polymorphismes	Amorce sens	Amorce anti sens
	5'-3'	5'-3'
(TA) _n	TCGTCCTTCTTCCTCTCTGG	TCCTGCTCCTGCCAGAGGTT
BCL11A :rs4671393	ACCTCCCCCATTAGCAGCAT	CTCCACTCCCCGTACCTTCC
BCL11A :rs11886868	CACTGAACCCCCACCTACCA	GCAGCCTGGAGGATGACAAA
HMIP :rs 4895441	TCCCCGCTTGCAACATTTAG	GCCACAGCCCCTTAACCTCT
HMIP :rs 9399137	CATAAGCCTGGGGTGGGTTT	CCAGAAGCACTTTGGCAAGC
RANTES	CAGAGGACCCTCCTCAATAAAAC	CTCCCCAACATGAGTCCACAC
-403G/A et -28G/C		
RANTES ; INT T/C	CACAAGAGGACTCATTCCAACCTCA	CTGACTCATGCCTGTCAGC
DARC (-46T/C)	GATAGCTAGACACACCCAGACACC	TTGAGGTTGGATTTGGCTGGT
CCL2 (-2518A/G)	GCTCCGGGCCCAGTATCT	GGCCATCTCACCTCATCTTCC
CCR2 (V64I)	TTGTGGGCAACATGATGG	TGAAGAAGATTCCGCCAAAA