

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de  
l'Univers

**Département d'Ecologie et Environnement**

*Laboratoires de recherche*

- Biologie et génétique moléculaire- Constantine
- Valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique- Tlemcen

## **MEMOIRE**

Présenté par

**DJAMAA Ines**

*En vue de l'obtention du*

Diplôme de Magister

En Génétique moléculaire des populations humaines

### **Thème**

Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des bêta thalassémies et  
drépanocytose

Soutenu le:....., devant le jury composé de:

Président	Mr KHELIL Mohamed Anouar	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	ABADI Nouredine	Professeur	Université de Constantine
Examinatrice	AOUAR Amaria	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	DALACHE Fatiha	M.C.A	Université de Mostaganem
Invité	DALI YOUCEF Majda	M.C.B	Université de Tlemcen

Année universitaire: 2012-2013

# Remerciements

Louange à Dieu méricorde et méricordieu qui m'a donné la force, la volonté et la patience durant toutes mes années des études.

Je remercie mes très chers parents qui m'ont accordés le courage, la volonté et le soutien pour bien réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr ABADI. N, professeur et directeur du laboratoire de biologie et génétique moléculaire au CHU-Constantine, c'est sous sa direction scientifique que ce travail de mémoire à été réalisé. Je tiens à le remercier pour ces conseils, ses encouragements et son orientation. Merci Monsieur le professeur pour votre gentillesse et votre patience. Qu'il trouve aussi ici l'expression de ma profonde gratitude d'avoir initié et dirigé ce travail.

Je voudrais remercier Mme BELTRECHE.C, professeur et directrice de laboratoire de biochimie (CHU-Constantine) et unité de recherche, de m'avoir accepté au sein de laboratoire qu'elle dirige, pour la réalisation de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr. KHLIL.MA, professeur à l'université de Tlemcen, qu'a bien voulu présider ce jury.

J'adresse toute ma gratitude à Mme AOUAR. A, Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir très gentiment accepté d'examiner ce travail. Je la suis reconnaissante pour tous les efforts qu'elle a fourni pour ce magistère. Merci Mme pour votre soutien humain et scientifique et votre gentillesse.

Je remercie également Mme DALACHE.F, maitre de conférence à l'université de Mostaganem. Elle m'a fait un plaisir d'être examinatrice de ce travail. Veuillez trouver ici de ma haute considération.

Je tiens à exprimer également ma très grande considération à Mme DALI YOUCEF.M, maitre de conférence à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie du jury. Je la remercie également pour ses encouragements permanents.

Il m'est particulièrement agréable de remercier Docteur SIFI. K, au CHU-Constantine, pour son orientation et sa disponibilité, qu'a été toujours à notre besoin.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à Mme SATTA. D, professeur à l'université de Constantine pour ses conseils et ses suggestions qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit. Je la remercie pour ses encouragements permanents et son aide.

Un grand Merci à Mr BRIHMET. A, membre du laboratoire de biologie et génétique moléculaire au CHU- Constantine. Je voudrais vous remercier pour l'intérêt que vous avez montré pour ce travail, pour votre explications relatives au mis en marche de la DGGE. Merci pour votre nombreux conseil, votre confiance et votre disponibilité.

J'exprime aussi toute ma sympathie et ma reconnaissance à l'ensemble des membres du laboratoire de biologie et génétique moléculaire au CHU-Constantine: Dr HANACHI, Yasmina, Mr BOULAKROUN, Nawal, Manel, Farhat et Yamina.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel médical et paramédical du service de pédiatrie Mansouah-Constantine, en particulier Docteur BENFTIMA, de m'avoir accueilli au sein de son service et pour sa générosité et son aide.

Je tiens aussi à remercier vivement les patients et leurs familles pour leurs disponibilités. Une pensée particulière pour tous les enfants que la maladie à emportés.

En fin mes remerciements vont à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé par leurs encouragements.

## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à mes très chers parents*

*A mon cher fiancé "Amar"*

*A ma grande mère*

*A mon frère et mes sœurs*

*A ma cousine "Achwak"*

*A toute ma famille et mes amis (es)*

## La liste des figures

- Figure 1:** présentation d'une molécule d'hémoglobine.
- Figure 2:** (a) ; les tétramères d'hémoglobine au cours du développement embryonnaire, fœtale, et adulte. (b) ; la synthèse de la chaîne de globine au cours de développement.
- Figure 3:** Structure des gènes de la globine.
- Figure 4:** Structure et organisation des deux familles de gènes-globine.
- Figure 5:** Les éléments structuraux appartenant aux régions promotrices des différents gènes de la globine.
- Figure 6:** Schéma physiopathologique des troubles observés au cours d'une  $\beta$ -thalassémie sévère.
- Figure 7:** Mutations responsables de  $\beta$ -thalassémies.
- Figure 8:**  $\beta$ -thalassémies et de PHHF délétionnelles.
- Figure 9:** Hémoglobine Lepore
- Figure 10:** Frottis sanguin d'un sujet drépanocytaire.
- Figure 11:** Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose.
- Figure 12:** Haplotypes du locus  $\beta$ -globine.
- Figure 13:** Comportement d'un fragment d'ADN à deux domaines A et B au cours de la DGGE.
- Figure 14:** Mécanisme de clampage réalisé par la molécule de psoralène.
- Figure 15:** Migration électrophorétique d'un ADN double-brin dans un gel dénaturant.
- Figure 16:** la carte de fusion du fragment PsoB1/G2.
- Figure 17:** Le gène  $\beta$ -globine avec les amorces utilisées pour son amplification, puis l'analyse par DGGE.
- Figure 18:** Profil électrophorétique sur un gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés (460pb) par PCR du gène  $\beta$ -globine.
- Figure 19:** Répartition de la population selon les différents types d'hémoglobinopathies.
- Figure 20:** Répartition de la population totale selon le sexe.
- Figure 21:** Répartition des patients selon leur sexe.
- Figure 22:** Le taux de la consanguinité chez les patients thalassémiques.
- Figure 23:** Analyse DGGE par clamp chimique des fragments PsoB1/G2 (n°:1).

- Figure 24:** Analyse DGGE par clamp chimique des fragments PsoB1/G2 (n°:2).
- Figure 25:** Analyse DGGE par clamp chimique des fragments PsoB1/G2 (n°:3).
- Figure 26:** Fréquence des mutations  $\beta$ -thalassémiques dans la population étudiée.
- Figure 27:** Pourcentage des mutations identifiées par la DGGE sur la région PsoB1/G2.
- Figure 28:** Généalogie du cas n°:1.
- Figure 29:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°1).
- Figure 30:** Généalogie du cas n°2.
- Figure 31:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°2).
- Figure 32:** Généalogie du cas n°3.
- Figure 33:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°:3).
- Figure 34:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°:4).
- Figure 35:** Profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits d'ADN digérés par l'Eco 81.

## La liste des tableaux

- Tableau I:** Caractéristique biologique des principaux syndromes drépanocytaires
- Tableau II:** Séquences des amorces utilisées en DGGE.
- Tableau III:** préparation de milieu réactionnel de la digestion.
- Tableau IV:** Les conditions de migration respectives à chaque fragment.
- Tableau V:** Répartition de la population selon les différents types des hémoglobinopathies
- Tableau VI:** Répartition des patients selon l'âge.
- Tableau VII:** Représentation de la répartition des patients selon la région.
- Tableau VIII:** Répartition des patients thalassémiques en fonction du nombre d'antécédents familiaux.
- Tableau IX:** Fréquences alléliques des mutations  $\beta$ -thalassémiques (région PsoB1/G2).
- Tableau X:** Les différents génotypes retrouvés dans notre étude.
- Tableau XI:** Données hématologique du cas n°1.
- Tableau XII:** Données hématologiques du cas n°:2.
- Tableau XIII:** Paramètres hématologique du cas n°:3.
- Tableau XIV:** Données hématologique du cas n°4.
- Tableau XV:** Fréquence allélique (%) dans les pays du bassin Méditerranéen des cinq mutations prédominantes.



# Sommaire

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique	
1. La génétique des hémoglobines	3
1.1. Les molécules d'hémoglobines	3
1.2. L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines	4
1.3. Les gènes de l'hémoglobine	5
1.3.1. La famille des gènes des chaînes $\alpha$ -globine	5
1.3.2. La famille des gènes des chaînes $\beta$ -globine	6
2. Régulation de la transcription des gènes de la globine	7
2.1. Les séquences cis régulatrices	7
2.1.1. Promoteurs	7
2.1.2. Séquences stimulatrice ou enhancers	8
2.1.3. Séquences extrinctrices ou silencers	8
2.1.4. Le LCR $\beta$ -globine	8
2.2. Les facteurs trans régulateurs	8
2.3. La régulation traductionnelles	9
3. Les $\beta$ -thalassémie	9
3.1. L'épidémiologie	10
3.2. La classification des syndromes $\beta$ -thalassémique	10
3.2.1. La $\beta$ -thalassémie majeur	10
3.2.2. La $\beta$ -thalassémie intermédiaire	11
3.2.3. La $\beta$ -thalassémie hétérozygote ou mineur	12
3.3. Physiologie	13
3.4. La transmission héréditaire	14
3.5. Les bases moléculaires des syndromes $\beta$ -thalassémiques	14
3.5.1. Les mutations ponctuelles	15
3.5.2. Les mutations délétionnelles	16
3.6. Les facteurs modulateurs d'origines génétiques de la $\beta$ -thalassémie.	17
3.6.1. Les facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes	18

3.6.2.	Modulation de la sévérité par persistance d'HbF	18
3.7.	Traitement des $\beta$ -thalassémies	19
3.8.	Les nouvelles approches thérapeutiques pour les thalassémies	20
3.8.1.	La transplantation de moelle osseuse	20
3.8.2.	Réactivation pharmacologique de l'hémoglobine fœtale	20
3.8.3.	La thérapie génique des hémoglobinopathies	21
3.9.	Le conseil génétique et diagnostic prénatal	21
4.	La drépanocytose	22
4.1.	Présentation de la drépanocytose	22
4.2.	Historique	23
4.3.	Prévalence de la drépanocytose	23
4.4.	Génétique et physiopathologie de la drépanocytose	24
4.4.1.	Mode de transmission	24
4.4.2.	Physiopathologie	24
4.4.3.	Effets modulateurs de la drépanocytose	25
4.5.	Autres troubles drépanocytaires	27
4.6.	Diagnostic biologiques	27
4.7.	Les caractéristiques cliniques	28
4.8.	Traitement de la drépanocytose	29
5.	La DGGE	30
5.1.	Fondement de la technique	30
5.1.1.	Dénaturation de l'ADN	31
5.1.2.	La température de fusion ( $T_m$ )	31
5.2.	Le principe de la DGGE	32
5.3.	Conditions d'utilisation	33
5.4.	La formation d'hétéroduplex: comportement des allèles normal et muté	34
5.5.	Les fragments d'ADN analysés	35
II	Patients et Méthodes	
1.	Patients	37
1.1.	Recrutement	37

1.2.	Analyse phénotypique	37
1.3.	Questionnaire	37
1.4.	Prélèvement sanguin	37
2.	Méthodes	37
2.1.	Extraction d'ADN	37
2.1.1.	Principe	38
2.1.2.	Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN	38
2.2.	Amplification enzymatique d'ADN in vitro (PCR)	39
2.2.1.	Principe	39
2.2.2.	Les amorces utilisées	39
2.2.3.	Déroulement de la PCR	41
2.2.4.	Visualisation de l'amplification (contrôle de la PCR)	41
2.3.	L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)	42
2.3.1.	Mise au point du <i>clamp</i> chimique	42
2.3.2.	Digestion par les enzymes de restriction	43
2.3.3.	Préparation du gel de polyacrylamide	44
2.3.4.	Formation du gradient de dénaturant	45
2.3.5.	Dépôt des échantillons et système électrophorétique	45
2.3.6.	Révélation au BET	46
III	Résultats	
1.	Répartition de la population générale	47
1.1.	Répartition de la population selon le type d'hémoglobinopathies	47
1.2.	Répartition des patients selon l'âge et le sexe	48
1.3.	Répartition des patients par région	49
1.4.	Répartition des patients thalassémiques et antécédents familiaux	50
1.5.	Le taux de la consanguinité chez les patients thalassémiques	50
2.	Qualité des gels et interprétation	51
2.1.	Qualité des gels	52
2.2.	Profils d'électrophorèse	52
2.2.1.	Homozygote	52

2.2.2.	Hétérozygote simple et hétérozygote composite	53
3.	L'analyse moléculaire	55
4.	Explication de nos résultats à travers quelques cas	57
IV	Discussion	65
V	Conclusion	75
	Références bibliographiques	77
	Annexes	

## La liste des abréviations

**ADN:** Acide désoxyribonucléique.

**AHSP:** Alpha Hemoglobine Stabilising Protein.

**AP2:** Activating Protein 2.

**ARN:** Acide ribonucléique.

**ARNm:** Acide ribonucléique messenger.

**ARMS:** Amplification Refractory Mutation System.

**ASO:** Allel Spécific Oligonucléotide.

**ATCD:** Antécédents

**BBP:** Bleu de Bromophénol.

**BET:** Bromure d'éthiduim.

**CCMH:** Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**CD:** Codon.

**DGGE:** Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

**dNTP:** désoxyribonucléotides Triphosphates.

**DO:** Densité optique.

**EDTA:** Ethylène Diamine Tétra Acétique

**EPO:** Erythropoïétine.

**Glu:** Acide Glutamique.

**GR:** Globule rouge.

**Hb:** Hémoglobine.

**Hb A:** Hémoglobine adulte.

**Hb F:** Hémoglobine Fœtale.

**HLA:** Human Leucocyte Antigen.

**Hb S:** Hémoglobine drépanocytaire.

**HT:** Hématocrite.

**HR1:** Heme regulator inhibitor.

**HU:** Hydroxyurée.

**IVS:** Intervening Sequences.

**Kb:** Kilo base.

**LCR:** Locus Control Region.

**Mb:** Mega base.

**Pb:** Paire de base.

**PCR:** Polymerase Chain Reaction.

**PHHF:** Persistance Hériditaire d'Hémoglobine Fœtale.

**PM:** Poids moléculaire.

**QTL:** Quantitative Trait Loci.

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism.

**SPN:** Single Nucléotide Polymorphism.

**SSCP:** Single Stand Conformation Polymorphism.

**TCMH:** Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**Tm:** Température de fusion.

**TN:** Témoin normal.

**TTGE:** Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis.

**U.V:** Ultra violet.

**Val:** Valine.

**VGM:** Volume Globulaire Moyen.

## Introduction

---

Les hémoglobinopathies représentent la catégorie la plus fréquente des troubles héréditaires cliniquement significatives, provoquant un énorme fardeau sur la santé publique. Leur transmission se fait selon le mode autosomique récessif, mais elles représentent une variation significative de la sévérité clinique. Il est maintenant évident que le patrimoine génétique des individus touchés donne une partie importante de la variation dans le phénotype clinique.

Les études épidémiologiques précédentes ont montré une grande incidence de ces maladies dans les populations originaire de pays tropicaux et méditerranéens, elles sont aussi répandues dans tout le moyen orient, le Sud –Est asiatique. Cependant, en raison des mouvements de population, cette répartition tend à se modifier et la plupart des pays sont concernés.

Parmi les hémoglobinopathies, deux types de pathologie sont à distinguer: Les anomalies de structure de l'Hb, une hémoglobine anormale est présente, entraînant ou non des signes fonctionnels, l'Hb S responsable de la drépanocytose, y a une place prépondérante, les anomalies de synthèse de l'Hb s'exprimant par le groupe très hétérogène des thalassémies.

A l'inverse de la drépanocytose où la mutation causale est unique, les  $\beta$ -thalassémie sont dues à un nombre élevé de défauts moléculaires qui sont majoritairement de nature ponctuelle, actuellement plus de 200 mutations ont été répertoriées altérant les différentes étapes de l'expression du gène  $\beta$  globine (Weatherall, 2005). Chaque population se caractérise par un groupe de mutations qui lui est spécifique. La connaissance du spectre de leur répartition constitue une donnée essentielle pour un diagnostic moléculaire car elles seront les premières à rechercher. En Algérie, la fréquence du gène  $\beta$ -thalassémique est de 3 % (Belhani, 2009), ces affections constituent un réel problème de santé publique souvent aggravé par le taux de la consanguinité de la population (30 à 32%) (Billis *et al.*, 2001).

Les techniques utilisées dans le diagnostic génétique des hémoglobinopathies et dans beaucoup d'autres maladies génétiques, n'ont cessé d'évoluer ces dernières années. Il s'agit notamment de l'hybridation des oligonucleotides spécifique d'allèles (ASO), le polymorphisme de longueurs de restriction (RFLP) (Boussiou *et al.*, 2007), la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), la fusion à haute résolution

## Introduction

---

(GRH) (Shih *et al.*, 2009), la TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) (Shaji *et al.*, 2003), la DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) et la technique d'ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System) (Khilil *et al.*, 2003). Dans notre étude, nous avons opté la technique de la DGGE.

La technique de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet de détecter des substitutions, de petites insertions ou délétions dans les séquences d'ADN de 200 à 700 bp. Son principe est basé sur la séparation de molécules d'ADN double brin obtenus par PCR, qui diffèrent par un ou plusieurs nucléotides, dans un gel de polyacrylamide supposé linéaire et croissant de substances dénaturantes (Urée et Formamide) (Fischer et Lerman, 1993).

Les objectifs de notre travail étaient de:

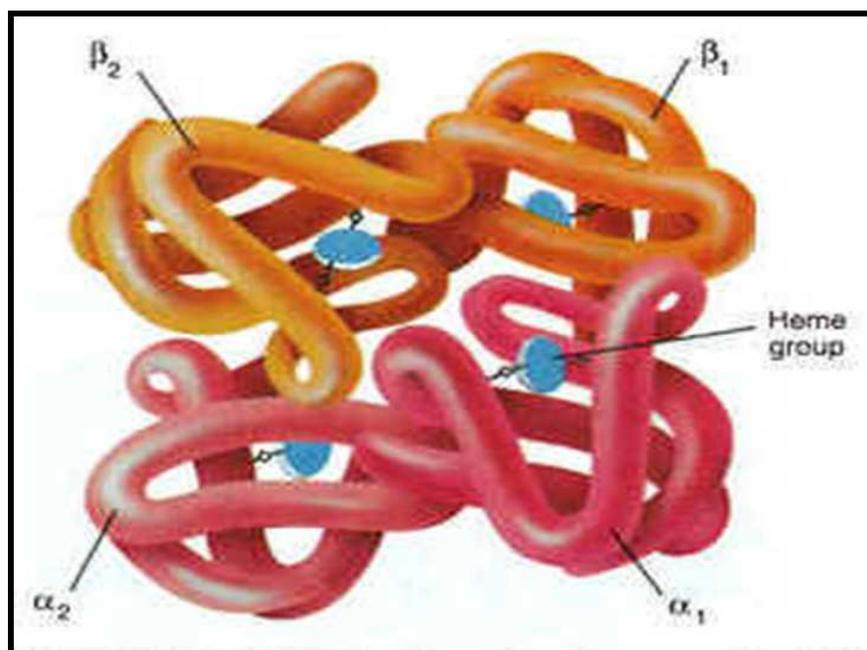
- Mettre au point de la technique de la DGGE à la détection d'anomalies moléculaires ponctuelles affectant le gène bêta globine.
- Caractériser des mutations  $\beta$ -thalassémies portées par les sujets malades homozygotes pour les placer dans le spectre de répartition dans la population Algérienne.

## 1. La génétique des hémoglobines:

L'hémoglobine est formée d'une partie protéique "la globine" et d'un groupement prosthétique "l'hème", elle compte aujourd'hui parmi les protéines les mieux connues facile à étudier à cause de son abondance et sa facilité d'extraction. Il s'agit d'un pigment de coloration rouge contenu dans les globules rouges, elle constitue 33% du poids d'un GR, c'est la protéine majoritaire des GR et dont la principale fonction est le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus.

### 1.1. Les molécules d'hémoglobine :

L'hémoglobine constituant majeure de l'érythrocyte est une hémoprotéine de poids moléculaire apparent de 64500 daltons, de structure tétramérique, constituée de 4 chaînes polypeptidiques de globine associées à une molécule d'hème. Ces monomères sont de deux types assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie: deux chaîne  $\alpha$  (type  $\alpha$ :  $\zeta$  et  $\alpha$ -globine) constituées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes non  $\alpha$  (type  $\beta$ :  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , et  $\beta$ -globine) composées de 146 acides aminés. Chaque chaîne est liée à une molécule d'hème ayant en son centre un atome de fer (figure 1). Que la molécule d'hémoglobine soit oxygénée ou désoxygénée, l'atome de fer est sous forme réduite ( $Fe^{++}$ ).



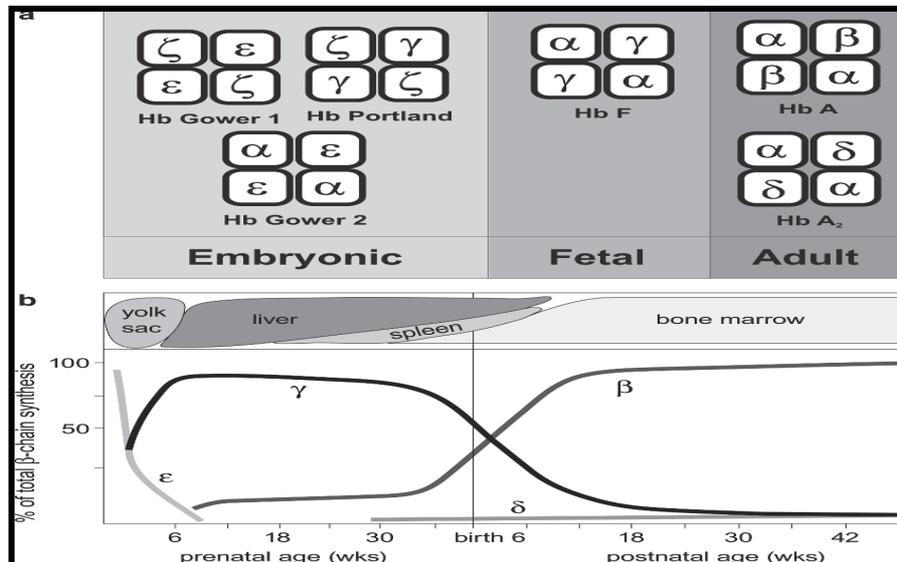
**Figure 1** : présentation d'une molécule d'hémoglobine (Wajcman *et al.*, 1992).

# Synthèse bibliographique

La structure tétramérique de l'hémoglobine régit sa fonction fondamentale de transporteur d'oxygène. La régulation de cette fonction oxyphorique est assurée selon un mécanisme allostérique par différents ligands : protons, 2,3 diphosphoglycerate et CO<sub>2</sub>.

## 1.2. L'évolution ontogénique des hémoglobines humaines

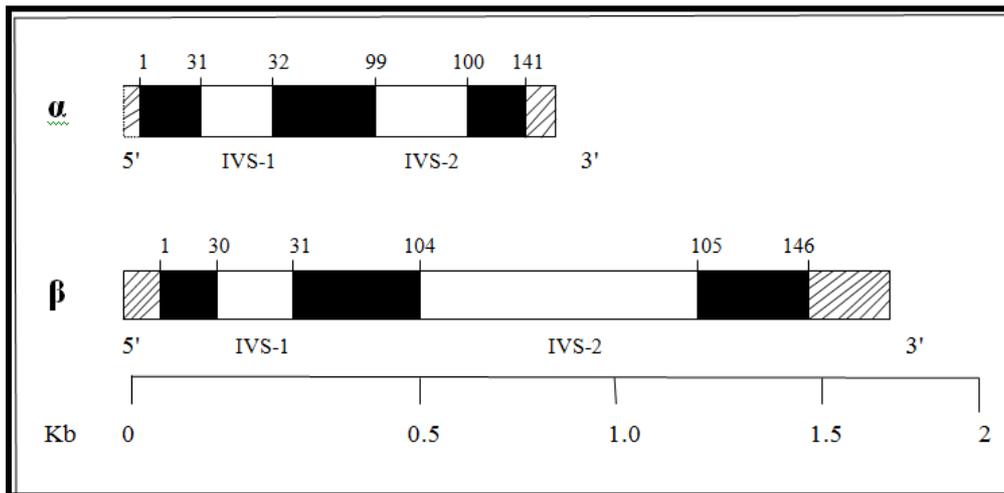
Plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie. Ces hémoglobines se distinguent par la nature des sous-unités qui les constituent. Durant la vie embryonnaire, deux chaînes de la famille  $\alpha$  coexistent :  $\zeta$ , qui apparaît la première, puis  $\alpha$ . De même, il existe deux chaînes de type  $\beta$  :  $\epsilon$ , spécifique à cette période initiale de la vie et les chaînes  $\gamma$  (ou fœtales) (figure 2). Ces diverses sous-unités permettent de réaliser les trois hémoglobines de l'embryon, l'Hb Gower 1 ( $\zeta_2, \epsilon_2$ ), l'Hb Gower 2 ( $\alpha_2, \epsilon_2$ ) et l'Hb Portland ( $\zeta_2, \gamma_2$ ) (Gale RE *et al.*, 1979; Kamuzora H *et al.*, 1974). L'hémoglobine fœtale (Hb F) de structure ( $\alpha_2, \gamma_2$ ) est détectable à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine de vie intra-utérine. Parallèlement à cette modification de la nature des sous-unités de globine, il y a un changement du lieu où s'effectue l'érythropoïèse : le sac vitellin dans la vie embryonnaire puis le foie et la rate dans la vie fœtale et enfin la moelle osseuse chez l'adulte (Stamatoyannopoulos G, 2000)



**Figure 2 :** (a) ; les tétramères d'hémoglobine au cours du développement embryonnaire, fœtale, et adulte. (b) ; la synthèse de la chaîne de globine au cours de développement et les différents tissus qui contribuent à l'hématopoïèse aux différents stades du développement (Speicher *et al.*, 2010).

## 1.3. Les gènes de l'hémoglobine :

Les gènes de la globine humaine sont regroupés en familles multigéniques (cluster : « agrégat ») : le cluster  $\alpha$  ( $\zeta$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$ ) et le cluster  $\beta$  ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ). Ces gènes sont organisés sur un même modèle à 3 exons et dérivent de duplications successives d'un ancêtre commun. L'ordre des gènes, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au sein de chaque complexe, reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse (KAZAZIAN HH & ANTONARAKIS S, 1997).



**Figure 03 :** structure des gènes de globine ; les carrés noirs correspondent aux exons. Les carrés hachurés sont les séquences non traduites et les carrés blancs les introns (IVS).

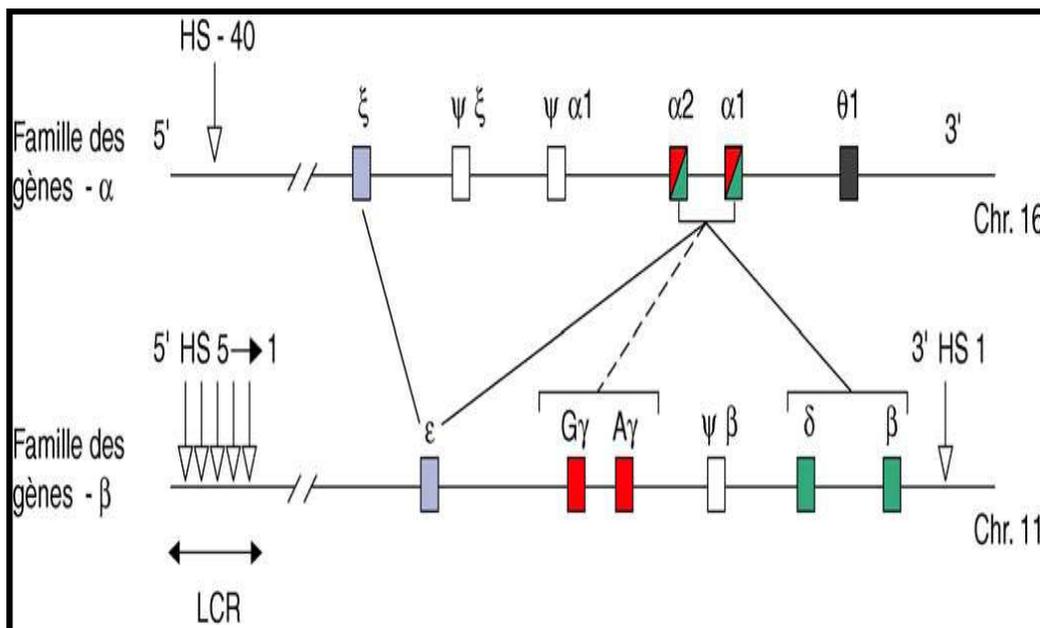
### 1.3.1. La famille des gènes des chaînes $\alpha$ -globine :

Cette famille est localisée sur la partie distale du bras court du chromosome 16 (16p13.3) (Deisseroth *et al.*, 1977) elle s'étend sur 30 kb. Le gène  $\zeta$ , le plus télomérique, est le premier exprimé durant l'embryogenèse. Le gène  $\alpha$ -globine existe en deux exemplaires :  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  qui sont exprimés dès la vie fœtale et continueront à fonctionner durant la vie adulte. Les séquences exoniques des gènes  $\alpha 2$  et  $\alpha 1$  sont identiques, ainsi que celles de leur 1<sup>er</sup> intron (IVS-I : Intervening sequences). Une région cis-régulatrice a été identifiée à 40 kb en amont de  $\zeta$  nommée HS40, elle contrôle l'expression des gènes  $\zeta$  et  $\alpha$ . Le phénomène de la commutation des gènes (le switch), c'est-à-dire le passage de l'expression du gène  $\zeta$  à celle des gènes  $\alpha$ , au début de la vie fœtale, n'est pas encore clairement décrypté.

## Synthèse bibliographique

### 1.3.2. La famille des gènes des chaînes $\beta$ -globine :

La famille des gènes des chaînes  $\beta$ -globines s'étend, elle, sur environ 50 kb à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 (11p15.5) (Deisseroth *et al.*, 1978 ; Lebo *et al.*, 1979 ; Fritsch *et al.*, 1980). Le gène  $\epsilon$ , le plus proche en 5' du complexe, est le premier à être exprimé, durant la vie embryonnaire. Les gènes  $G\gamma$  et  $A\gamma$  s'expriment durant la vie fœtale. Leurs séquences exoniques sont identiques à une position près : le codon 136 (glycine pour la chaîne  $G\gamma$  et alanine pour la chaîne  $A\gamma$ ). Entre les paires  $G\gamma / A\gamma$  et  $\delta / \beta$  est localisé un pseudogène de type  $\beta$  ( $\psi\beta$ ) (Figure 4). L'expression du gène  $\beta$  commence dès la vie fœtale et atteindra son plateau d'expression quelques mois après la naissance. Le gène  $\delta$ , dont l'expression débute seulement après la naissance, est faiblement transcrit. Il n'intervient que pour 2 à 3% des tétramères (hémoglobine A2 :  $\alpha_2\delta_2$ ). En amont du locus  $\beta$ -globine, cinq sites hypersensibles à l'ADNase1 (HS1→5, numéroté de 3' à 5') constituent une zone régulatrice majeure : le LCR (Locus Control Region). Un autre site, a été identifié en aval (3' HS1). La commutation des gènes de la famille  $\beta$ , sous le contrôle des éléments du LCR entre autres, se fait en deux étapes :  $\epsilon$  vers  $G\gamma$  et  $A\gamma$ , au début de la vie fœtale, puis  $\beta$  et  $\delta$  dans la période périnatale.



**Figure 4 :** Structure et organisation des deux familles de gènes-globine (Lalie *et al.*, 2005)

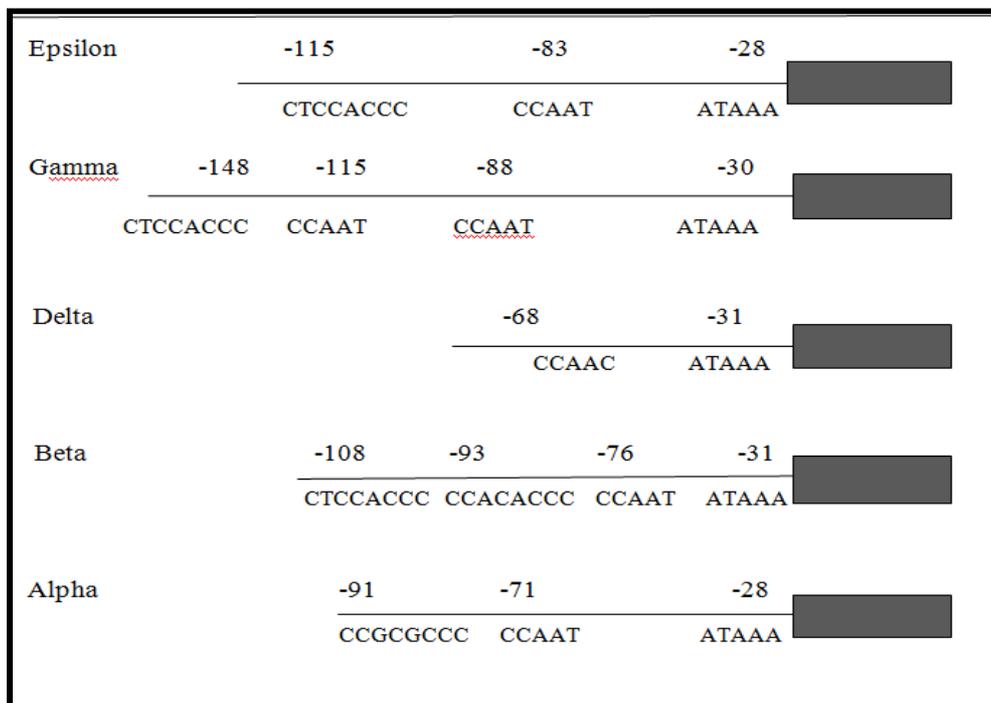
## 2. La régulation de la transcription des gènes de la globine:

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

### 2.1. Les séquences cis régulatrices:

#### 2.1.1. Promoteurs:

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



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

### 2.2.2. Séquence stimulatrices ou enhancers:

L'"enhancer" active la transcription d'un gène en augmentant la densité de la RNA polymérase II et requiert un promoteur intact (Treisman et Maniatis; 1985). Dans le cluster  $\beta$  globine, on retrouve trois séquences stimulatrices, en 3' des gènes  $A\gamma$  (Bodine et Ley, 1987) et  $\beta$  globine ainsi que dans le deuxième intron du gène de la  $\beta$  globine (Kosche *et al.*, 1985; la Flamme *et al.*, 1987; Kollias *et al.*, 1987; Behringer *et al.*, 1987; Antoniou *et al.*, 1988). Des sites de fixation pour des facteurs érythroïdes spécifiques (GATA-1) et ubiquitaires (AP2, Activating Protein2, et CP 1) ont été localisés (Wall *et al.*, 1988; Purucker *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1995).

### 2.2.3. Séquences extinctrices ou silencers:

Des études portant sur les délétions dans la région 5' du gène  $\epsilon$  suggèrent la participation d'un "silencer" à la spécificité tissulaire de son expression. Des souris transgénique, (Raich *et al.*, 1992) ont montré que la délétion de ce silencer entraînait une expression continue, quoique faible, du gène  $\epsilon$  au stade adulte. Le second "silencer" a été identifié en amont du gène  $\beta$  globine, entre -610 et -490.

### 2.2.4. Le LCR $\beta$ -globine:

La régulation de l'expression des gènes du locus  $\beta$  globine s'effectue en partie à travers l'interaction de leurs séquences régulatrices, en particulier le promoteur avec des facteurs protéiques nucléaires. Toutefois cette régulation ne peut pleinement s'exercer qu'en présence d'une région éloignée des gènes structuraux ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\beta$ ), différente des enhancers et située en 5' du cluster  $\beta$ : le  $\beta$  LCR ou "Locus Control Region", dont l'importance a été soulignée par de nombreux travaux, intervient à différents niveaux de régulation et possède plusieurs propriétés dont l'activation de l'expression tissu-spécifique des gènes de la famille  $\beta$  globine (Fleenor et Kaufman, 1993).

### 2.2. Les facteurs *trans* régulateurs:

L'expression des gènes de la  $\beta$  globine est contrôlée par deux types de facteurs: les facteurs érythroïdes spécifiques (GATA1, NF-E2, EKLF, SSP) et les facteurs ubiquitaires (YY1, Sp1, CBP, NFY ou CP1).

### 2.3. La régulation traductionnelle:

L'initiation de la traduction peut constituer un niveau important de régulation de l'expression génique chez les eucaryotes. Ainsi l'ARNm  $\alpha$ , produit de la transcription des deux gènes  $\alpha 2$ ,  $\alpha 1$  est en excès d'environ 40% par rapport à l'ARNm  $\beta$ . Pourtant la synthèse des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la globine est équilibrée avec un rapport de biosynthèse  $\alpha/\beta$  égale à 1 (Lodish, 1976). Le processus de traduction des ARNm de globine ne peut se faire qu'en présence de quantités suffisantes d'hème. Un mécanisme est mis en jeu lorsque les quantités d'hème sont limitées. Cette régulation est illustrée par la protéine, HR1 (Heme regulator inhibitor). En absence d'hème ou en présence de faibles concentrations ou alors dans des cas de déficience en fer, la protéine Kinase HR1 est activée et agit au niveau traductionnel en inhibant l'initiation de la traduction des chaînes de globine par phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eif2. Des travaux récents sur des souris thalassémiques ont montré que la protéine HR1 module l'accumulation de l'excès des chaînes  $\alpha$  globine et diminuerait de ce fait la sévérité de la pathologie (Han *et al.*, 2005).

### 3. Les $\beta$ - thalassémies :

Les thalassémies se caractérisent par un certain nombre d'anémies héréditaires chroniques très sévères chez l'enfant (Whipple GH, Bradford WL, 1933) et couvre un ensemble très hétérogène d'affections dont le caractère commun est le défaut de synthèse, partiel ou total, d'une ou plusieurs chaînes de l'hémoglobine (Weatherall DJ *et al.*, 2000). Ce déficit a pour conséquence spécifique un déséquilibre entre les chaînes, avec un excès de chaînes non appariées (Lapie D, Elion J, 2005). Ces désordres sont génétiquement déterminés.

Elles sont observées initialement dans le bassin méditerranéen où elles sont endémiques, elles sont, en réalité, encore plus fréquentes dans toute l'Asie du Sud ou du Sud-Est où a sévi le paludisme. La première classification a été phénotypique :  $\beta^+$  ou  $\beta^0$  selon que l'électrophorèse montrait ou non l'existence d'HbA chez les homozygotes atteints.

### 3.1. L'épidémiologie :

Les thalassémies sont parmi les troubles génétiques les plus courants dans le monde. L'Organisation mondiale de la Santé a estimé que près de 270 millions porteurs d'une anomalie génétique du gène de la globine existent dans le monde entier (Flintt *et al.*, 1998), dont 80 à 90 millions sont des porteurs de  $\beta$ -thalassémie, avec environ 60.000 individus symptomatiques qui naissent chaque année (Vichinsky, 2005). En raison d'un avantage sélectif des hétérozygotes contre le paludisme, les fréquences de la thalassémie sont particulièrement élevés dans les régions tropicales et subtropicales du paludisme de l'Asie, la Méditerranée et le Moyen-Orient (Flintt *et al.*, 1998). La fréquence la plus élevée des porteurs a été rapportée à Chypre (14%), en Sardaigne (10,3%) (Flintt *et al.*, 1998).

La migration des populations et les mariages entre les différents groupes ethniques ont introduit la thalassémie dans presque chaque pays du monde, y compris l'Europe du Nord où la thalassémie était précédemment absente. Il a été estimé qu'environ 1,5% de la population mondiale sont porteurs de bêta thalassémies. L'incidence annuelle totale des individus symptomatiques est estimée à 1 sur 100.000 à travers le monde et 1 sur 10.000 personnes dans l'Union européenne.

### 3.2. La classification des syndromes $\beta$ -thalassémique :

On distingue trois syndromes cliniques de sévérité variable :

- La  $\beta$ -thalassémie majeure ou anémie de Cooley et la  $\beta$ -thalassémie intermédiaire qui constituent les formes sévères.
- La  $\beta$ -thalassémie mineur représente généralement la forme asymptomatique.

#### 3.2.1. La $\beta$ -thalassémie majeure :

Elle est la forme habituelle à l'état homozygote, il existe une suppression totale (forme  $\beta^0$ ) ou une diminution considérable (forme  $\beta^+$ ) de la synthèse des chaînes  $\beta$  de l'hémoglobine. L'organisme réagit en augmentant la synthèse des chaînes  $\gamma$ , ce qui abouti à un très fort pourcentage d'hémoglobine fœtale. Ce mécanisme compensateur est très imparfait et la quantité d'hémoglobine ainsi produite reste insuffisante.

Dans la forme  $\beta^0$ , la quasi-totalité de l'hémoglobine du sang est de type fœtal, et le reste étant constitué par l'hémoglobine A2. Dans la forme  $\beta^+$ , il persiste une

## Synthèse bibliographique

---

synthèse  $\beta$  résiduelle rendant compte de la présence d'un pourcentage variable d'hémoglobine A. Les transfusions sont nécessaires à la vie.

- **Signes hématologiques :**

L'anémie est constante et sévère à un taux d'hémoglobine de 4 à 7 g/dl, commence dès la petite enfance par une altération de l'état général révélant une anémie microcytaire (VGM : 60-65 fl. Norme 90 fl), hypochrome (TCMH inférieur à 26 pg, et la CCMH inférieur à 33g/dl). La réticulocytose est voisine de 100 000 par  $\text{mm}^3$ . Le frottis sanguin montre une anisocytose, une poikilocytose, des hématies à ponctuation basophiles et une érythroblastose parfois très élevée, jusqu'à 100 000 éléments par  $\text{mm}^3$ . La moelle osseuse est très riche en érythroblastes (voir annexe 1 pour les valeurs normales de chaque paramètre).

- **Signes biochimiques :**

L'électrophorèse de l'hémoglobine montre que : le pourcentage d'Hb F est constamment augmenté (50-98%), avec persistance de l'Hb A (5-45%) (Forme  $\beta^+$ ) ou non ( $\beta^0$ ), le taux d'hémoglobine A2 est normal ou augmenté. La bilirubine non conjuguée est augmentée du fait de l'hémolyse chronique. Le taux du fer est toujours augmenté, même en l'absence de transfusion, du fait de l'hyperabsorption intestinale de fer, secondaire à la dysérythropoïèse.

- **Signes cliniques :**

La présentation clinique de la thalassémie majeure se produit entre 6 et 24 mois. Les nourrissons atteints deviennent progressivement pâles, des épisodes récurrents de fièvre, et l'élargissement progressif de l'abdomen causé par la spléno-hématomégalie peuvent survenir. La formation de calculs à l'intérieur de la vésicule biliaire peut survenir..

### 3.2.2. La $\beta$ -thalassémie intermédiaire :

La  $\beta$ -thalassémie intermédiaire s'applique généralement à certaines formes homozygotes atténuées de l'anémie Cooley. Elle représente 5 à 10% de l'ensemble des  $\beta$ -thalassémie homozygotes. Sur le plan génotypique, la  $\beta$ -thalassémie intermédiaire est habituellement  $\beta^+/\beta^+$  ou peut être  $\beta^+/\beta^0$ .

## Synthèse bibliographique

---

- **Signes hématologiques :**

La  $\beta$ -thalassémie intermédiaire est caractérisée par une anémie de gravité modérée (Hb entre 6 et 9g/dl), microcytaire (VGM entre 50 et 80 fl), hypochrome (TCMH entre 16 et 24 pg) régénérative de type hémolytique avec augmentation du taux de bilirubine. L'hyper réticulocytose, l'érythroblastose et la poikilocytose sont plus ou moins prononcés.

- **Signes biochimiques :**

L'électrophorèse de l'hémoglobine montre une augmentation de l'hémoglobine fœtale, la composition hémoglobinique en Hb A2 est également variable, elle peut être normale ou augmentée (Hb A2>4%).

- **Signes cliniques :**

L'anémie est moins importante et assez bien tolérée par les malades. Les signes apparaissent plus tardivement, après l'âge de 2 ans et les personnes atteintes n'ont théoriquement pas besoin de transfusions sanguines, tous les mois comme dans les formes majeures. Cependant, l'anémie peut s'aggraver brutalement, en cas d'infection par exemple.

### **3.2.3. La $\beta$ -thalassémie hétérozygote ou mineure :**

La  $\beta$ -thalassémie mineure appelée aussi le trait  $\beta$ -thalassémique est due à la mutation d'un seul des deux gènes de la bêta globine et l'autre gène est capable de compenser l'anomalie et produire un taux d'hémoglobine normale ou proche de la normale. Les sujets porteurs d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygotes sont exceptionnellement anémiques, une splénomégalie de petite taille peut être palpée. Biologiquement, le taux d'hémoglobine est normal ou discrètement diminué (entre 10 et 13g /l), la réticulocytose est normale ou un peu élevée.

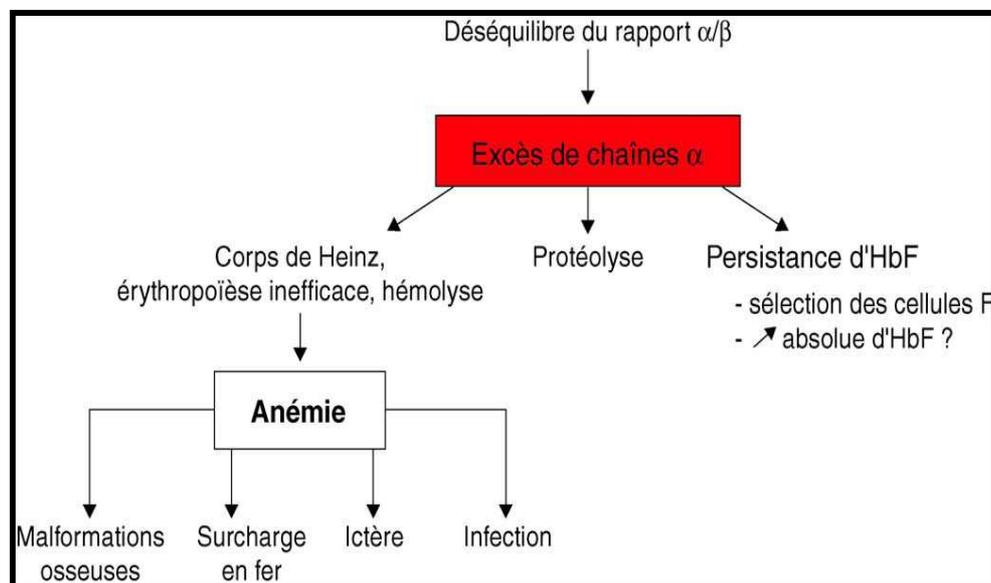
Le frottis sanguin peut montrer une anisocytose et une poikilocytose. Les deux signes biologiques caractéristiques sont la microcytose (Volume moyen cellulaire < à 80 fl.), avec l'augmentation du taux d'Hb A2 ( $\alpha 2\delta 2$ ) >3.3%. L'élévation du taux d'Hb A2 peut être masquée par une carence martiale significative.

## Synthèse bibliographique

### 3.3. Physiopathologie :

Le mécanisme physiopathologique est représenté dans la (figure 6). Les chaînes d' $\alpha$ -globine en excès, non associées en tétramères, précipitent dès le stade des précurseurs érythropoïétiques, entraînant la destruction intramédullaire des cellules et une érythropoïèse inefficace. Les lésions cellulaires sont une conséquence directe de cet excès de chaînes  $\alpha$  qui coprécipitent sur la membrane avec les protéines du squelette, formant des hémichromes et libérant des espèces réactives de l'oxygène. L'anémie a donc plusieurs composantes : une destruction intramédullaire précoce, l'hémolyse intravasculaire des globules rouges (GR) qui sont parvenus à maturité, enfin le pouvoir oxyphorique réduit de GR hypochromes et microcytaires.

La persistance de l'expression d'Hb F, est en grande partie liée à la survie sélective des cellules normalement riches en Hb F, ou cellules F, dont la proportion est génétiquement déterminée. Une sécrétion d'érythropoïétine répondant à l'hypoxie tissulaire, s'installe, entraînant une expansion de la moelle, déformations osseuses, parfois même érythropoïèse extramédullaire. Une susceptibilité accrue aux infections est classique, mais imparfaitement expliquée (Labie D. Elion J, 2005).



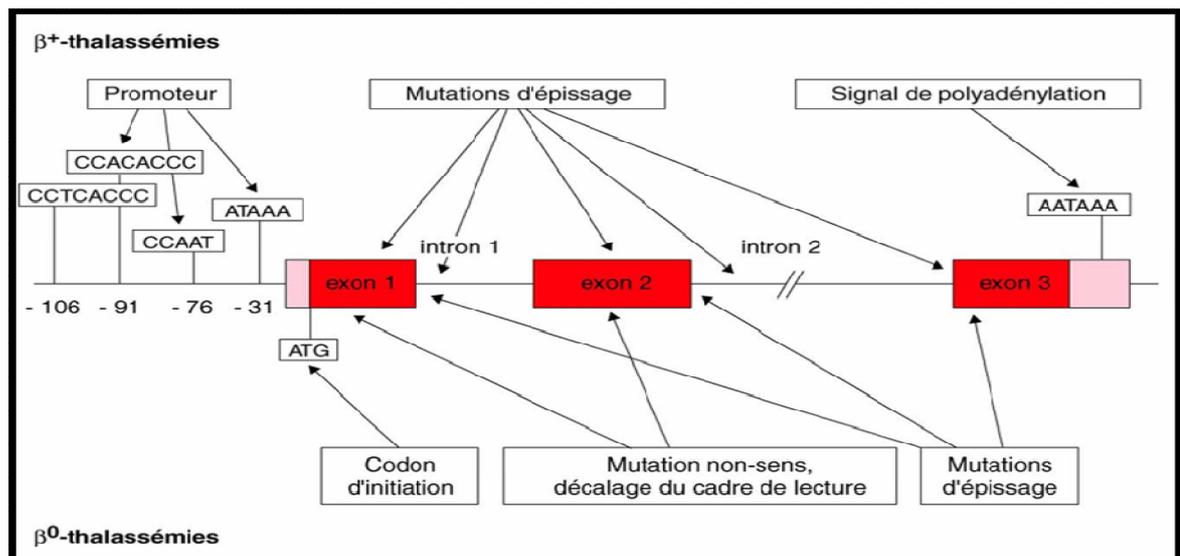
**Figure 6 :** Schéma physiopathologique des troubles observés au cours d'une b-thalassémie sévère. C'est l'excès de chaînes  $\alpha$  libres non appariées qui est à la base de la physiopathologie (voir texte). (Labie *et al.*, 2005).

### 3.4. La transmission héréditaire:

Les bêta- thalassémies sont héritées selon un mode autosomique récessif. Les parents d'un enfant atteint sont obligatoirement hétérozygotes et porteurs d'une seule copie d'une mutation bêta -globine. A la conception, chaque enfant de parents hétérozygotes a 25% de risque d'être touché par la maladie, 50% de risque d'être porteur asymptomatique, et 25% de chance d'être non affecté et non porteur. (Galanello, and Origa, 2010).

### 3.5. Les bases moléculaires des syndromes beta –thalassémique :

Si le tableau clinique des thalassémies est relativement homogène, les bases moléculaires en sont extrêmement variées. Plus de 300 mutations affectant l'expression des gènes de la globine ont été rapportées à ce jour, les 3 quarts concernant le locus bêta-globine (Bonello-Palot *et al.*, 2010). L'avènement de la biologie moléculaire a permis de raffiner la classification des  $\beta$ -thalassémie (Forget, 2001). On sait que la grande majorité des  $\beta$ -thalassémies est due à des mutations ponctuelles ou à des microdélétions ou à des insertions de nucléotides. Ces mutations ont été observées sur toute l'étendue du gène  $\beta$  : exons, introns, sites d'épissage et leurs séquences consensus, promoteurs, autres régions non transcrites ou non traduites en 5' et en 3' (figure 7). Elles ont par ailleurs été identifiées à toutes les étapes de la synthèse protéique : transcription, maturation de l'ARNm, traduction, et même en post-traductionnel.



**Figure 7:** Mutations responsables de  $\beta$ -thalassémies. On a représenté dans la partie supérieure de la figure les grands types de défauts moléculaires responsables d'une  $\beta^+$ -thalassémie, et dans la partie inférieure ceux qui entraînent une  $\beta^0$ -thalassémie (Labie et al. 2005).

### 3.5.1. Les mutations ponctuelles :

On distingue les mutations  $\beta^+$ -thalassémiques qui diminuent l'expression du gène sans l'abolir, des mutations  $\beta^0$ -thalassémiques qui abolissent totalement l'expression du gène  $\beta$ -globine. Plus de 200 mutations ont été rapportées à ce jour (voir le tableau 1; annexe 2):

- Les mutations  $\beta^0$ -thalassémiques: ce sont des mutations non sens, des insertions ou délétions entraînant un décalage du cadre de lecture ou des mutations des sites d'épissage ou du codon d'initiation (Bonello-Palot *et al.*, 2010).
- Les mutations  $\beta^+$ -thalassémique: affectent des séquences régulatrices comme les séquences conservées du promoteur (TATA box, CAAT box ou motifs CACCC) ou les séquences 5' ou 3' non traduites (la séquence Poly A). D'autres créent ou activent un site alternatif d'épissage. Ce dernier type de mutation peut être localisé dans une région codante du gène et avoir donc 2 effets : un effet faux-sens qui va aboutir à la synthèse d'une chaîne de globine anormale et donc à une hémoglobine anormale, et un effet sur l'épissage (en créant ou en activant un site cryptique d'épissage) qui conduit à une diminution du niveau de production de la chaîne protéique anormale. On parlera ici de variant de l'hémoglobine à effet thalassémique ; le plus fréquent de ces variantes est l'hémoglobine E particulièrement répandue en Asie (Bonello-Palot *et al.*, 2010).
- Certaines mutations siégeant dans le promoteur ou dans les régions 5' et 3' non traduites ont un effet particulièrement discret sur le niveau de synthèse de la chaîne de bêta-globine. Chez l'hétérozygote, elles n'entraîneront aucune modification ni clinique ni biologique. Chez l'homozygote, elles produisent un tableau classique de trait thalassémique avec microcytose, polyglobulie et élévation de l'Hb A2 ; Elles ne seront réellement pathogènes qu'en association avec une mutation  $\beta^0$ -thalassémique sur l'autre allèle et produiront un phénotype de thalassémie intermédiaire. On les appelle des mutations bêta-thalassémiques silencieuses ou mutations bêta<sup>++</sup>-thalassémiques (Bonello-Palot *et al.*, 2010).
- Des mutations bêta-thalassémiques rares ont été décrites avec une transmission dominante (Tableau 2; annexe 2). Ce sont des mutations ponctuelles faux sens qui entraînent la production d'une chaîne protéique tronquée hyperinstable, incapable de

## Synthèse bibliographique

s'associer avec la chaîne alpha-globine normale et rapidement détruite dans l'érythroblaste. Cette destruction précoce va entraîner un certain degré de dysérythropoïèse mimant une thalassémie intermédiaire (Efremov, 2007).

### 3.5.2. Les formes délétionnelles :

Ces formes sont plus rares dans le groupe des bêta-thalassémies mais peuvent toutefois être rencontrées. Elles emportent le gène bêta-globine de façon isolée ou en association avec d'autres gènes du locus. Ainsi, on a décrit des délétions responsables de bêta<sup>0</sup>-thalassémie, de delta-bêta-thalassémie ou de gamma-delta-bêta-thalassémie (Katsantoni *et al.*, 2004). Ces délétions peuvent aussi ne concerner que la région régulatrice située en amont du locus et indispensable à l'expression correcte du gène de beta-globine, le LCR (Bonello-Palot *et al.*, 2010).

Un certain nombre de grandes délétions ont été successivement identifiées, englobant les gènes  $\delta$  et  $\beta$ , parfois le gène  $A\gamma$ . Il en résulte une classification en PHHF  $G\gamma A\gamma (\delta\beta)^0$ , thalassémie  $G\gamma A\gamma (\delta\beta)^0$  et thalassémie  $G\gamma (A\gamma\delta\beta)^0$  (figure 8) (Wood WG, 2001).

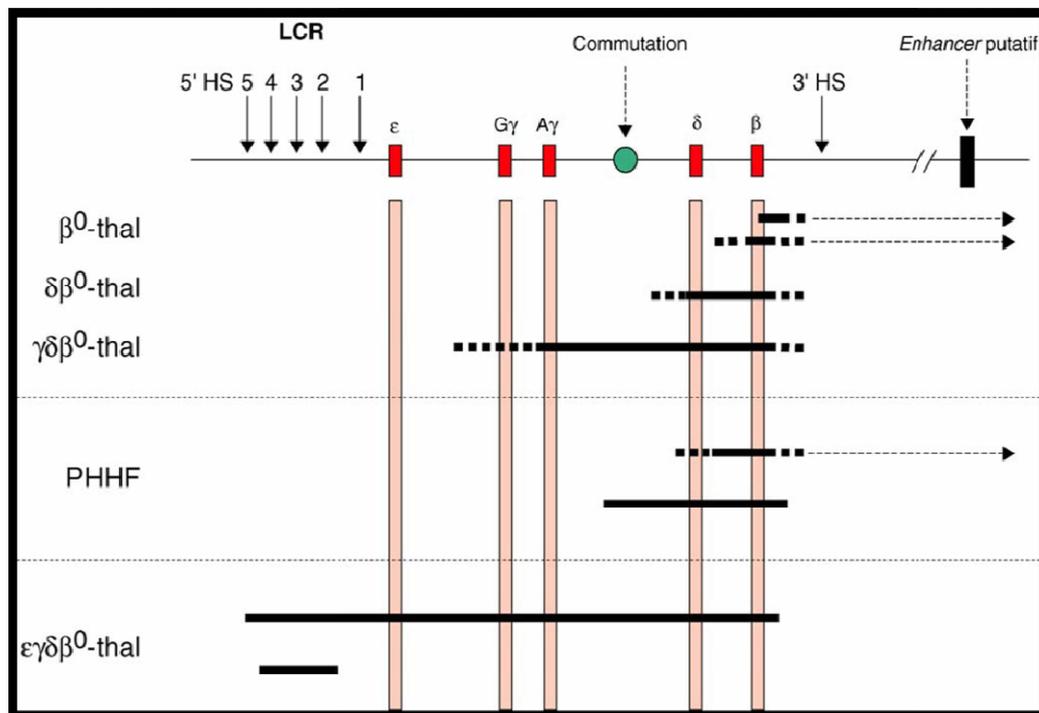
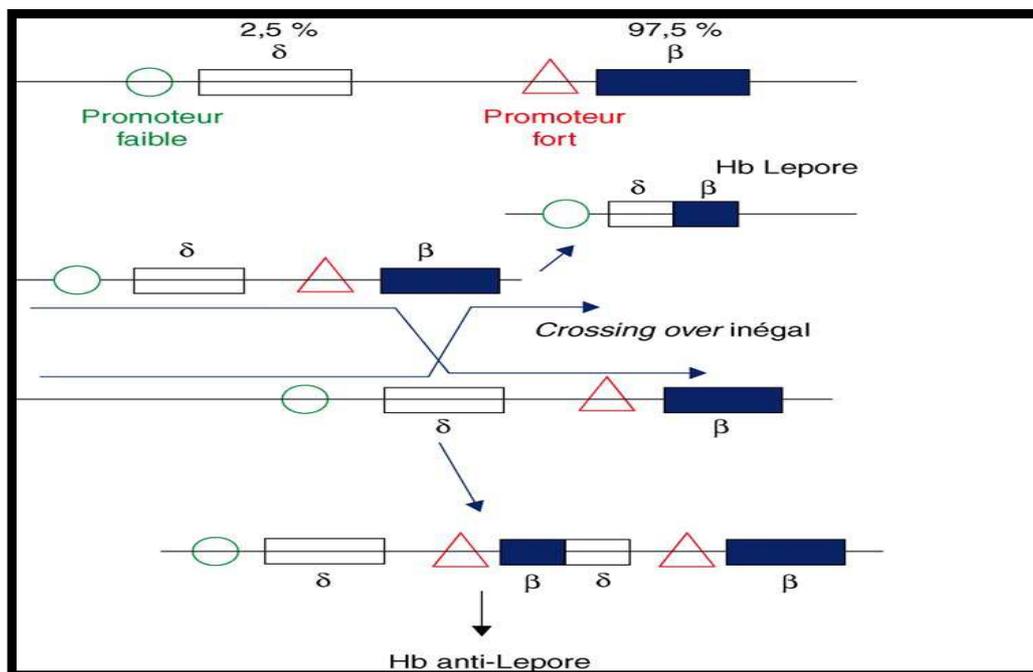


Figure 8 :  $\beta$ -thalassémies et de PHHF délétionnelles (Labie *et al.*, 2005).

D'autres délétions conservent un cadre de lecture entre 2 gènes et aboutissent à des gènes hybrides. C'est le cas de la délétion de l'Hb Lepore responsable de la formation d'un gène hybride delta-bêta (figure 9). La chaîne protéique exprimée est fonctionnelle mais le gène de fusion étant sous le contrôle du promoteur delta, elle n'est que très peu exprimée. A l'état homozygote ou en association avec un allèle bêta-thalassémique, elle produit un tableau de thalassémie intermédiaire (Bonello-Palot *et al.*, 2010).



**Figure 9 :** Hémoglobines Lepore. Représentation du mécanisme par lequel se produisent les gènes de fusion : *crossing-over* inégal au niveau de séquences identiques dans deux gènes de la même famille. (Lapie et Elion; 2005).

### 3.6. Les facteurs modulateurs d'origine génétique de la beta thalassémie :

Si le tableau clinique de la bêta-thalassémie est relativement homogène, on observe des variations importantes dans la sévérité d'expression clinique de cette pathologie. La sévérité dépend en premier lieu de la nature des mutations causales dans les gènes de bêta-globine mais aussi de l'association à un variant alpha-globine qui va influencer directement l'équilibre entre les deux chaînes protéiques alpha et bêta-globine. Elle dépend aussi de la capacité du patient thalassémique à produire de l'Hb fœtale à l'âge adulte, production qui viendra compenser partiellement ou en totalité, l'absence d'Hb adulte (Weatherall et Clegg, 2001).

### 3.6.1. Facteurs influençant l'équilibre entre les chaînes :

- L'Alpha hemoglobin stabilising protein (AHSP):

L'AHSP est une protéine chaperone de la chaîne alpha-globine de description (Kihm *et al.*, 2002). Elle forme un complexe stable avec la chaîne alpha-globine et prévient ainsi la précipitation des chaînes libres. Son rôle éventuel dans la modulation de la sévérité du phénotype chez le sujet bêta thalassémique a été suggéré (Luzzatto et Notaro, 2002) mais les études visant à le démontrer ont donné des résultats contradictoires (Viprakasit, 2004, Lai *et al.*, 2006, Dos Santos *et al.*, 2008).

- Modulation par association de variant alpha-globine :

Les signes cliniques de la bêta-thalassémie étant autant liés à l'absence des chaînes bêta-globine qu'à l'excès de chaîne alpha-globine restant libre, l'association d'un défaut thalassémique alpha, en corrigeant dans une certaine mesure l'excès de chaîne libre, peut moduler l'expression de la bêta-thalassémie. Si elle n'a que peu d'effet sur la forme majeure, l'association d'une alpha-thalassémie à une bêta-thalassémie intermédiaire en atténue la sévérité (Kannavakis *et al.*, 2004, Thein 2008).

### 3.6.2. Modulation de la sévérité par persistance d'HbF :

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 (Bonello- Palot *et al.*, 2010).

Il est actuellement admis que plusieurs déterminants génétiques interviennent dans la modulation de l'expression de l'Hb fœtale (Zertal-Zidani *et al.*, 2002) certains appartiennent au cluster  $\beta$  d'autres sont localisés sur des chromosome différents. Garner *et al.*, 2000 ont montré que 89% des variations des taux d'Hb F et du nombre

## Synthèse bibliographique

---

de cellule F étaient génétiquement contrôlés. Un tiers étant lié au polymorphisme *Xmnl* C >T en position 158 en amont du gène *Gγ* et plus de la moitié due à des facteurs QTL non liés au locus globine (Garner *et al.*, 2000).

- Déterminants PHHF liés au locus  $\beta$ -globine :

Ces PHHF résultent de larges délétions dans le cluster  $\beta$  globine ou de mutations ponctuelles dans les promoteurs des gènes  $\gamma$  globine. L'augmentation d'expression des gènes fœtaux s'expliquerait par une modification des systèmes de régulation et une variation dans la nature des différentes interactions. Il en résulte alors la perte d'éléments silenciers et l'importation à proximité des gènes  $\gamma$  de séquences activatrices éloignées à l'origine. (Zertal-Zidani 2002).

- Déterminants génétiques situés sur d'autres loci :

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. Ces études de liaison ont réussi à cartographier des QTL (Quantitative Trait Loci) contrôlant les taux de cellules F pour les affecter à 4 régions du génome : le chromosome Xp 22.2 (Chang *et al.*, 1995), le chromosome 6q 23 (Craig *et al.*, 1996), le chromosome 8q 11 (Garner *et al.*, 2002) et le chromosome 2p 15 (Menzel *et al.*, 2007).

### 3.7. Traitement des $\beta$ -thalassémies :

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

Le traitement conventionnel des  $\beta$ -thalassémies est essentiellement palliatif. Il repose sur :

- Transfusions concentrées de globules rouges de façon régulières pour maintenir l'hémoglobine au-dessus de 9-10g/dl, appauvrie en leucocytes afin de réduire le risque de sensibilisation HLA et de transmission d'une maladie, par exemple le cytomégalovirus. Ce traitement est soutenu par chélation du fer pour éviter les complications de la surcharge en fer.
- La prévention de l'hépatite B est réalisée par immunisation précoce.
- La splénectomie est nécessaire si les besoins de sang sont excessifs.

### **3.8. Les nouvelles approches thérapeutiques pour les thalassémies :**

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

#### **3.8.1. La transplantation de moelle osseuse :**

Le seul traitement qui puisse guérir définitivement la maladie est la transplantation de la moelle osseuse, appelée également « transplantation de cellules souches hématopoïétiques ». La transplantation de moelle osseuse provenant d'un frère ou d'une sœur HLA compatible permet d'obtenir une survie à long terme sans maladie chez 90% des patients

#### **3.8.2. Réactivation pharmacologique de l'hémoglobine fœtale:**

Pour compenser la synthèse de la chaîne  $\beta$ -globine réduite ou absente chez les patients atteints de type  $\beta$  hémoglobinopathies, on utilise des agents pharmacologiques qui ont été montrés pour être capable d'induire la production d'Hb F à des niveaux thérapeutiques :

- Les agents de type chimiothérapie (Costello, 2009).
- L'érythropoïétine (EPO) présente un intérêt dans les  $\beta$ -thalassémies, puisque l'élévation du taux d'Hb au-dessus de 9 g/dl rend le patient pratiquement asymptomatique.
- Le butyrate et autres acides gras à chaînes courtes (*short chain fatty acid*), qualifiés aussi d' « Hémokines » agissent directement sur le promoteur de la chaîne  $\gamma$  de la globine (Costello, 2009).

Cette approche a un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, la réactivation de l'expression des gènes humains de globine fœtale est transitoire. Deuxièmement, les mécanismes sous-jacents de l'induction pharmacologique de la synthèse d'Hb F restent obscures, complexes et susceptibles d'entraîner de multiples voies, y compris l'altération de la structure de la chromatine, par exemple, par inhibition de l'activité de l'histone déacétylase (HDAC) , l'hypométhylation des

## Synthèse bibliographique

---

promoteurs des gènes de globine fœtale, et l'accélération de la différenciation des cellules érythroïdes (George *et al.*, 2010).

### **3.8.3. La thérapie génique des hémoglobinopathies :**

Aujourd'hui, le transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques autologues est une approche profondément étudiée très prometteuse et a déjà démontré son efficacité dans des modèles animaux. Les hémoglobinopathies ont été considérées comme les premières maladies à étudier par la thérapie génique depuis le transfert d'un seul gène pourrait théoriquement susciter un effet thérapeutique (Peter *et al.*, 2003).

En 2000, May *et al.* ont rapporté qu'un vecteur lentivirus portant un grand fragment du gène humain  $\beta$ -globine sous le contrôle de la LCR  $\beta$ -globine pouvait rendre niveaux thérapeutiques l'expression du gène  $\beta$ -globine stable (May *et al.*, 2000).

La stratégie de thérapie génique pour les hémoglobinopathies a quatre objectifs:

- (1) le transfert d'un gène unique dans la lignée particulière de cellules souches hématopoïétiques;
- (2) expression endogène du transgène à des niveaux élevés;
- (3) l'entretien permanent de l'expression du gène transféré;
- (4) l'utilisation d'un vecteur non pathogène sûr.

### **3.9. Le conseil génétique et diagnostic prénatal :**

Le conseil génétique fournit des informations pour les individus et les couples à risque (c'est à dire les deux porteurs) concernant le mode de transmission, le risque génétique d'avoir des enfants atteints et l'histoire naturelle de la maladie, y compris le traitement et les thérapies disponibles de la maladie (Galanello *et al.*, 2010). Le diagnostic prénatal pour les grossesses à risque accru est possible par l'analyse de l'ADN extrait de cellules fœtales obtenues par amniocentèse, habituellement réalisée environ 15 à 18<sup>ème</sup> semaines de gestation ou sur des villosités chorales à 11 semaines de la gestation. Les deux allèles responsables de la maladie doivent être identifiés avant que le test prénatal ne soit effectué. L'analyse de cellules fœtales dans le sang maternel et l'analyse de l'ADN fœtal dans

le plasma maternel sont actuellement en cours (Mavrou *et al.*, 2007; Lo, 2005). Le diagnostic préimplantatoire peut être disponible pour les familles dans lesquelles les mutations responsables de maladies ont été identifiées. Il consiste à la recherche de l'anomalie génétique responsable de la maladie sur des embryons obtenus par fécondation *in vitro*.

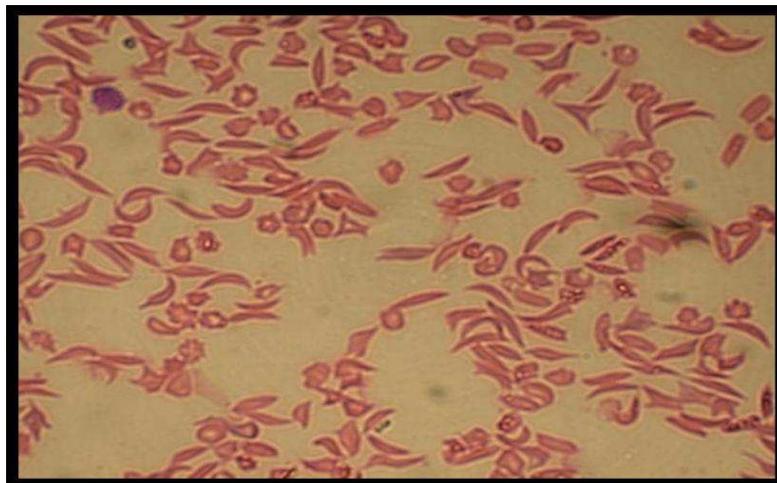
### 4. La drépanocytose:

#### 4.1. Présentation de la drépanocytose :

La drépanocytose est une maladie génétique, transmise selon le mode autosomique récessif et est caractérisée par la présence d'hémoglobine S. Il s'agit d'une anémie hémolytique chronique provoquée par une mutation ponctuelle du gène de la globine entraînant une substitution de l'acide glutamique en position 6 sur la chaîne de la bêta globine par la valine. Ceci rend l'Hb insoluble sous sa forme désoxygénée. Les chaînes insolubles cristallisent dans les érythrocytes en provoquant une déformation de lame de faux (figure 10).

On distingue cliniquement:

- la forme hétérozygote ou trait drépanocytaire qui est typiquement asymptomatique sur le plan clinique;
- et les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) qui regroupent la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par association de l'hémoglobine S à d'autres hémoglobinopathies (SC, S $\beta$  thalassémie, etc...).



**Figure 10** : Frottis sanguin d'un sujet drépanocytaire (Robert Girot, 2003).

### 4.2. Historique :

En 1904, **James Herrick** décrit pour la première fois cette pathologie suite à l'observation d'un frottis sanguin qui montre des hématies inhabituelles en forme de faucille ou feuille d'acanthé.

En 1949, **James Neel** démontre que la transmission de cette maladie est mendélienne. La drépanocytose a été la première maladie moléculaire identifiée il y'a plus de 50 ans, **Pauling** en, 1949, met en évidence la migration électrophorétique anormale de l'hémoglobine Hb S. **Ingram** en 1956, caractérise la structure primaire de la chaîne d'Hb S et révèle la substitution d'un acide glutamique par une valine expliqué ultérieurement par une mutation GAG→GTG au niveau du 6<sup>ème</sup> codon du gène  $\beta$ -globine. Cette mutation autosomique récessive sur le chromosome 11 a été trouvé identique dans tous les cas explorés. **Purtez**, met en évidence, en 1950, la solubilité diminuée de l'Hb S désoxygéné, puis, en 1960, la structure tridimensionnelle de l'Hb, déterminée par la cristallographie de rayon X et, enfin, celle des modifications stéréochimiques induites par la fixation, puis la libération d'oxygène (Robert Girot, 2003).

### 4.3. Prévalence de la drépanocytose :

Chaque année, quelque 300 000 enfants naissent avec une anomalie majeure de l'hémoglobine et l'on recense plus de 200 000 cas de drépanocytose en Afrique.

La drépanocytose est particulièrement fréquente chez les personnes originaires d'Afrique subsaharienne, d'Inde, d'Arabie saoudite et de pays méditerranéens. Les migrations ont accru la fréquence du gène incriminé dans les Amériques. La prévalence du trait drépanocytaire atteint 10 à 40 % en Afrique équatoriale, alors qu'elle n'est que de 1 à 2 % sur la côte de l'Afrique du Nord et de moins de 1 % en Afrique du Sud. Cette répartition reflète le fait que le trait drépanocytaire confère un avantage en termes de survie face au paludisme et que la pression de sélection due au paludisme a rendu le gène mutant plus fréquent, surtout dans les zones à forte transmission palustre (OMS, 2006).

## 4.4. Génétique et physiopathologie de la drépanocytose :

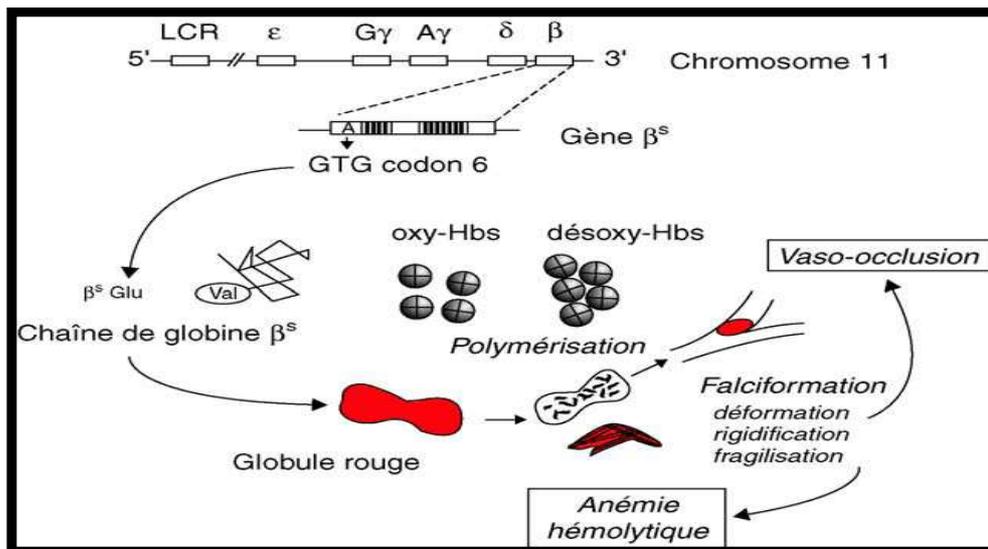
### 4.4.1. Mode de transmission :

La drépanocytose est une affection génétique qui se transmet selon le mode autosomique récessif, car seuls les homozygotes sont considérés comme malades.

Ainsi dans un couple de sujets hétérozygotes (AS), à chaque grossesse, la probabilité de naissance d'un enfant homozygote SS est de 25 %, celle d'un homozygote AA de 25 % et celle d'un hétérozygote AS de 50 %.

### 4.4.2. Physiopathologie:

Première maladie moléculaire décrite en 1949, son étude a été entreprise par des abords multiples. Son mécanisme physiopathologique de base a été très précisément décrit, centré sur la polymérisation de l'Hb S désoxygénée et les déformations cellulaires subséquentes observées chez les homozygotes SS (figure 11) (Bunn, 1997). Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, la molécule d'Hb S subit un changement de conformation. Celui-ci permet à la valine  $\beta 6$  d'établir des liaisons hydrophobes avec la chaîne  $\beta$  d'une autre molécule d'Hb, en particulier avec la phénylalanine  $\beta 85$  et la leucine  $\beta 88$ . Une seule des deux valines opère ce contact, de sorte que l'interaction  $\beta$ - $\beta$  entraîne la formation d'un polymère qu'on a pu représenter comme l'enchaînement de deux rangées de molécules (fig 11).



**Figure 11 :** Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose.. (Lalie *et al.*, 2005)

## Synthèse bibliographique

---

Le processus met toujours un certain temps à s'amorcer (*delay time*), et ce délai est inversement proportionnel, à une puissance élevée, à la concentration intracellulaire de l'hémoglobine.

Ce phénomène de base entraîne une cascade d'autres anomalies qui participent au mécanisme physiopathologique. Une dérégulation de l'homéostasie des cations, avec activation des canaux ioniques, cotransport K/Cl et canal potassique dépendant du calcium, ou canal Gardos, entraîne la perte de potassium et une déshydratation cellulaire qui favorise la polymérisation de la désoxy-HbS. Il y a simultanément dénaturation de l'Hb, dont les hémichromes s'agglomèrent à la face interne de la membrane avec les protéines du cytosquelette, en particulier la bande 3. Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération de Fe<sup>3+</sup>, qui favorise l'existence d'un microenvironnement oxydant (Stuart *et al.*, 2004).

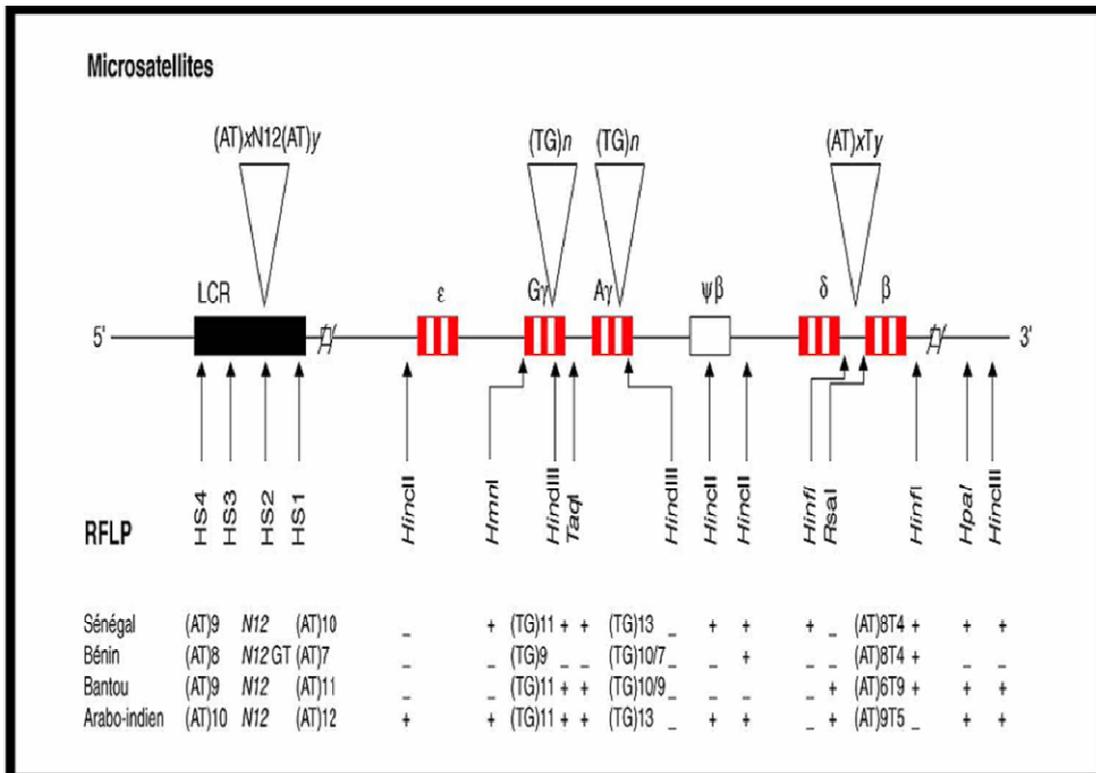
### 4.4.3. Effets modulateurs de la drépanocytose :

Pourquoi la drépanocytose, maladie due à une mutation unique, se présente-t-elle sous des phénotypes éminemment variables ? L'association à une  $\alpha$ -thalassémie diminue la concentration intraérythrocytaire d'Hb et donc la polymérisation de la désoxy-HbS ; de même, l'Hb F forme des molécules hybrides  $\alpha 2\beta^S\gamma$  qui interrompent la formation du polymère.

Les gènes  $\gamma$  étant proches du gène  $\beta$ , la question s'est posée de savoir si la variabilité de l'environnement génique de la mutation en cause pourrait participer à la variabilité d'expression de l'Hb F. Une avancée fondamentale a été, en 1978, la découverte par Kan et Dozy d'un polymorphisme de restriction (*restriction fragment length polymorphism* ou RFLP) affectant un site de l'enzyme *HpaI* en aval de la mutation  $\beta S$  (Kan *et al.*, 1978). Il s'agissait de la première description d'un polymorphisme de l'ADN humain, qui indiquait également que la mutation  $\beta S$  avait pu apparaître dans des contextes génétiques différents. L'identification d'autres RFLP dans le locus  $\beta$ -globine a ensuite permis de définir des haplotypes de restriction, souvent spécifiques d'une population, et d'établir l'origine pluricentrique de la mutation (figure 12) (Pagnier *et al.*, 1984). L'association statistique, entre un haplotype donné et la gravité de l'expression phénotypique est un fait d'observation. Une certaine corrélation a été trouvée, concernant en particulier la présence d'un site *XmnI* et une expression élevée du gène  $\gamma^G$  (Gilman *et al.*, 1985; Labie *et al.*, 1985).

## Synthèse bibliographique

Certains microsatellites pourraient être le site de fixation de facteurs *transactivateurs* et intervenir dans la structure chromatinienne du locus (Labie *et al.*, 1985). Plusieurs de ces polymorphismes ont été identifiés dans la région promotrice du gène  $\beta$ , dans le deuxième intron des gènes  $\gamma$ , et enfin au niveau du site HS2 du LCR. L'« haplotype étendu » regroupant RFLP et microsatellites se présente dans chacun des groupes ethniques comme spécifique du chromosome porteur de la mutation  $\beta$ S, et pourrait intervenir dans l'expression phénotypique de la maladie (Périchon *et al.*, 1993). L'haplotype « Sénégal » s'accompagne d'un taux élevé d'HbF, de même que l'haplotype « indien » auquel est associé, en outre, un taux abaissé de production de la chaîne  $\beta$ S (Elion *et al.*, 1992) Cependant, il a été montré que les haplotypes ne participent que très partiellement à la variabilité d'expression de l'HbF (Chang *et al.*, 1997) et qu'en aucun cas ils ne permettent un pronostic individuel.



**Figure 12 :** Haplotypes du locus  $\beta$ -globine. Les polymorphismes de restriction (RFLP) sont représentés par le signe + ou - indiquant la présence ou l'absence d'un site de clivage pour l'enzyme concernée du locus  $\beta$ -globine. Le polymorphisme des séquences microsatellites concerne le plus souvent le nombre de répétitions de (AT) ou de (TG). Ensemble, RFLP et microsatellites forment les haplotypes étendus qui constituent l'environnement génique du gène muté. Sont représentés ici les 4 haplotypes majeurs liés à la mutation  $\beta$ S. (Labie *et al.*, 2005)

## Synthèse bibliographique

### 4.5. Autres troubles drépanocytaires :

Le tableau clinique de l'anémie drépanocytaire est également constaté chez des personnes qui présentent des mutations génétiques autres que l'Hb SS.

- Des personnes présentant la maladie S/C: qui ont hérité simultanément de l'HbS et de l'HbC, ces patients sont habituellement moins gravement affectés que ceux qui présentent une Hb SS (sylvie *et al.*, 2008).
- Des personnes présentant S/ $\beta$ -thalassémie: qui ont hérité simultanément de l'Hb S et de la  $\beta$ -thalassémie, ces personnes dépendent du type de mutation  $\beta$ -thalassémie. Si le patient est S/ $\beta^0$ , les constatations cliniques et hématologiques sont comparables à celles de l'anémie drépanocytaire. Lorsque le patient est plutôt S/ $\beta^+$ . Ces patients présentent un syndrome de falciformation plus bénin que celui de ceux qui présentent une Hb SS ou une S/ $\beta^0$  (sylvie *et al.*, 2008).

Des syndromes de falciformation surviennent également chez des personnes qui héritent simultanément de l'Hb S et d'autres hémoglobinopathies, telles que l'HbD.

### 4.6. Diagnostic biologique :

Bien que le diagnostic de certitude de ces affections repose sur la mise en évidence de l'Hb S, la numération des hématies, le taux de l'Hb, le volume globulaire moyen, la numération des réticulocytes et l'examen du frottis sanguin sont des éléments essentiels pour l'orientation du diagnostic (Tableau 1).

**Tableau I:** Caractéristique biologique des principaux syndromes drépanocytaires (Robert Girot, 2003).

	Hb (g/dl)	VGM (fl)	Réticulo cyte (x10 <sup>9</sup> /l)	Morphologie érythrocytaire	Etude de l'Hb			
					HbA %	HbS %	Hb F%	Hb A2 %
AS	N	N*(80-100)	N(50-100)	Normal	60-65	30-40	<1	V
SS	6-10	N*(80-100)	200-600	Drépanocyte (+à+++), C. cible (+), Pas de microcytes, c.de Jolly(±)	0	80-95	5-20	V
SC	10-12	↓(70-90)	100-200	Drépanocytes (rare), C. cible (50%)	0	50 C	1-7	V

## Synthèse bibliographique

				Poikilocytes avec cristal d'Hb C.		(45)		
S/ $\beta^+$ thal assémie	9-12	↓(65-95)	100-250	Drépanocytes (rare), C. cible (+à++) Microcytes (+à++), poikilocytes.	1-25	55-90	5-15	V
S/ $\beta^0$ thal assémie	7-11	↓(60-80)	200-400	Drépanocytes (+), C.cible (+à++) Microcytes (+à++), poikilocytes.	0	80-90	5-15	V
S/PHH F	N	N*(80-95)	N	C. cible ( $\pm$ ), microcytes ( $\pm$ ).	0	$\geq 70$	15-35	V

**N**:normal; **VGM**: volume globulaire moyen; **C.cible** : cellule cible ; **c.de Jolly** : corps de Howell. Jolly. \* : valeur abaisse en cas d'association avec une  $\alpha$ -thalassémie. **V** : le dosage de l'HbA2 est ininterprétable en raison d'une contamination constante par l'hémoglobine S. C'est le motif pour lequel les valeurs d'HbA2 ne figurent pas dans le tableau.

### 4.7. Les caractéristiques cliniques :

Tous les désordres de falciformation sont associés avec des caractéristiques cliniques similaires (Mehta *et al.*, 2003) :

- Anémie hémolytique : qui se traduit par une fatigue. Lorsque l'anémie est assez sévère, le malade peut avoir des difficultés à respirer (essoufflement) et une tachycardie. Parfois, les seuls signes visibles sont la pâleur, l'ictère, l'augmentation de la fatigue, les calculs biliaires, et une mauvaise croissance.
- Crises aplasiques consécutives à une infection par le parvovirus B19, ou à un manque en vitamine B9 (acide folique).
- Crise de séquestration viscérale provoquée par la déformation falciforme avec formation d'un pool d'érythrocytes dans le foie, la rate ou les poumons.
- Les crises douloureuses ou crises vaso-occlusives : qui sont dues à la « mauvaise » irrigation en sang de certains organes, se manifestent par des douleurs vives et brutales dans certaines parties du corps et peuvent, à la longue, entraîner la destruction de certains organes ou parties d'organes.
- Sensibilité accrue aux infections. La fonction splénique est réduite parce que l'infarctissement entraîne une auto-splénectomie dans les cas graves chez l'enfant.
- Les autres caractéristiques cliniques incluent les lithiases vésiculaires pigmentaires avec cholécystite, des ulcères de jambe chroniques, une nécrose

## Synthèse bibliographique

---

vasculaire des têtes fémorales et humérales ou d'autres os, une cardiomyopathie, une rétinopathie proliférative et une nécrose papillaire rénale.

### **4.8. Traitement de la drépanocytose :**

Les principaux traitements utilisés sont transfusion sanguine, la greffe de moelle osseuse, et les traitements pharmacologiques (Medkour, 2008).

La greffe de moelle osseuse (ou « greffe » de cellules souches hématopoïétiques) présente un pourcentage d'efficacité supérieure à 80% (Redding-Lallinger and Knoll 2006). Une alternative serait la thérapie génique malgré des résultats positifs avec les modèles de souris drépanocytaires (ex. exprimant l'HbS humaine (Pawliuk *et al.*, 2001 ; Kaul *et al.*, 2006)), la transposition à l'homme reste à réaliser (Sadelain et Coll. 2004). Il est d'ailleurs à noter qu'à ce jour aucun modèle de souris transgénique de la drépanocytose n'en reproduit fidèlement la pathologie humaine.

Les traitements pharmacologiques sont les plus fréquemment appliqués:

**1-Induction d'HbF** : hémoglobine non polymérisante (Steinberg, 2006, Mellouli and Bejaoui 2008).

**2- Modulation de la densité des érythrocytes** et inhibition de la déshydratation (Lew and Bookchin, 2005) ;

- Inhibition du cotransport K<sup>+</sup>- Cl<sup>-</sup> (magnésium oral ;(De Franceschi *et al.*, 1997)), et /ou du canal Gardos ( Mueller and Brugnara, 2001),
- Inhibition de la perméabilité anionique ; Inhibition des flux induits par la désoxygénation (Steinberg, 2006).

**3-Traitement visant la circulation et la microcirculation :**

- Anti-adhésion cellulaires (Telen, 2007)
- Thérapie(s) antioxydante et/ou anti-inflammatoire (Redding- Lallinger and Knoll, 2006).
- NO<sup>o</sup> et donneurs de NO<sup>o</sup> (Steinberg, 2006).

### **5. La DGGE:**

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est une technique de screening a pour objectif la détection des mutations ponctuelles qui a été utilisée depuis de nombreuses années. Cette technique repose en premier lieu sur une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet d'amplifier une région cible du génome.

La PCR-DGGE relève de la biologie moléculaire et trouve son origine dans le domaine médical et plus particulièrement dans le diagnostic des maladies génétiques. Initialement développée par Fisher et Lerman en 1983, elle connaît maintenant de multiples applications dans de nombreux autres domaines : en biochimie pour la caractérisation des protéines (Gianazza *et al.*, 1998), en agroalimentaire (Cocolin *et al.*, 2003), et dans le traitement biologique des effluents urbains (Boon *et al.*, 2002). L'utilisation de la DGGE en écologie microbienne aquatique est largement mise à profit depuis une dizaine d'années pour l'étude de la composition et de la structure des communautés microbiennes complexes (Volatier, 2004).

Cette technique conduit à la séparation de fragments d'ADN de taille identique mais de séquences variables. Elle consiste en une électrophorèse des fragments préalablement amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). L'électrophorèse, c'est-à-dire la migration de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique, s'effectue à travers un gel vertical de polyacrylamide. Ce gel, fortement réticulé et de porosité variable, contient un gradient linéaire de substances dénaturantes. Lorsque ce gradient de substances est remplacé par un gradient de température, la théorie et le principe de la méthode restent identiques mais la méthode est alors désignée par le terme TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis). En DGGE comme en TGGE, la séparation des fragments dépend de leur degré de mobilité dans le gel qui est fortement affectée par la conformation du fragment d'ADN.

#### **5.1. Fondement de la technique:**

La DGGE repose sur les propriétés physico-chimiques de l'ADN. Outre le fait que la molécule soit négativement chargée et permette ainsi la réalisation d'une électrophorèse, la DGGE exploite les conditions de rupture de sa structure bi-hélicoïdale.

### 5.1.1. Dénaturation de l'ADN:

La dénaturation de l'ADN, appelée aussi transition d'hélice en pelote statistique, consiste en la rupture des liaisons hydrogène et la séparation des bases appariées, c'est-à-dire la séparation des deux brins qui le composent, peut être aisément obtenue *in vitro* par un traitement chimique ou thermique. Cette séparation, due à la rupture des liaisons hydrogènes, conduit à la dénaturation de l'ADN. Le fragment adopte alors une conformation simple brin, partielle ou totale. La transition de la conformation double-brin à simple-brin est décrite comme la fusion de l'ADN. La température de fusion d'un fragment d'ADN ( $T_m$ ) est la température à laquelle 50% de l'ADN est sous la forme double brin et 50% sous la forme simple brin.

### 5.1.2. La température de fusion ( $T_m$ ):

La dénaturation d'un fragment n'est pas un phénomène continu, elle s'effectue au contraire étape par étape sur des zones distinctes du fragment caractérisées par des températures de fusion différentes. Ces zones constituent des domaines de fusion, elles contiennent généralement 50 à 300 paires de bases (Myers *et al.*, 1987). Selon sa longueur, un fragment d'ADN comprend un nombre variable de domaines de fusion. Ezra et Stanton (1992) estiment qu'une molécule contenant plus de 200 paires de bases comporte au moins deux domaines de fusion. La dissociation totale des deux brins est alors précédée de conformation(s) intermédiaire(s) où la fusion locale des deux brins peut être observée aux extrémités et/ou à l'intérieur de la molécule.

Le  $T_m$  varie en fonction de la composition en bases ainsi que des conditions expérimentales. Par exemple, il a été observé que la  $T_m$  augmente avec le pourcentage G+C. Ce résultat a été interprété en terme de nombre relatif de liaison hydrogène dans les paires G-C (trois liaisons) et dans les paires A-T (deux liaisons). La rupture d'une association G-C va nécessiter une plus grande température que la rupture d'une association A-T, car il faut rompre un plus grand nombre de liaison hydrogène. De plus, des agents qui augmentent la solubilité des bases dans l'eau, et par conséquent diminuent les interactions hydrophobes, baissent également la  $T_m$  (c'est le cas de l'urée ou de la formamide). Ces résultats montrent qu'une interaction hydrophobe stabilise l'ADN. Ainsi, ces deux interactions (hydrophobicité et liaisons

## Synthèse bibliographique

---

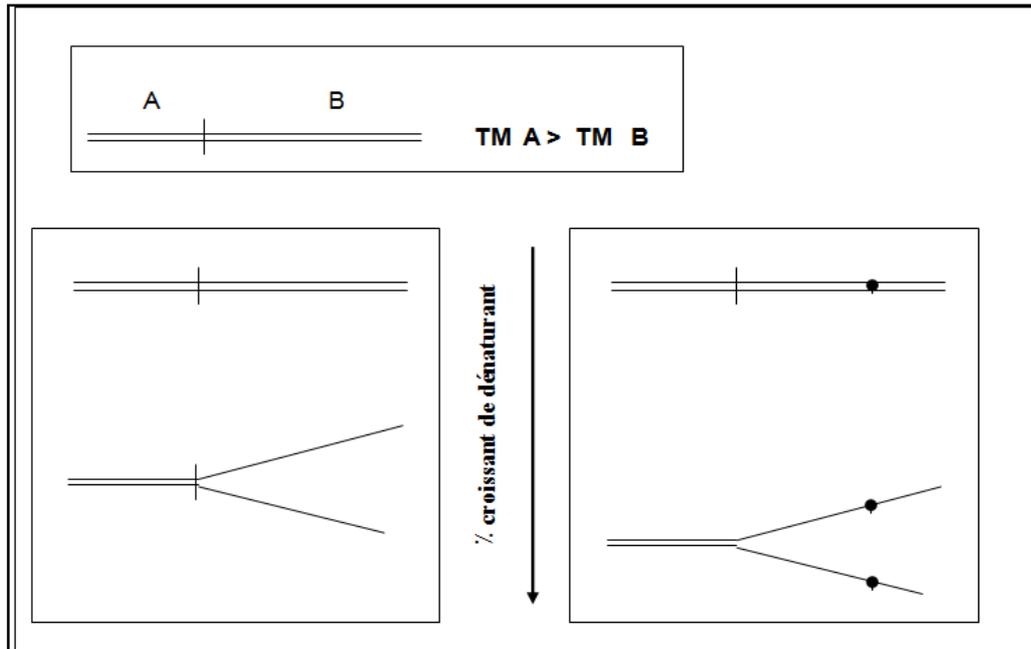
hydrogène) agissent de façon coopérative pour former une structure très stable. Si l'une des interactions est supprimée, l'autre est affaiblie. Ceci explique pourquoi la  $T_m$  décroît nettement après l'addition d'un réactif supprimant l'une ou l'autre de ces interactions.

### 5.2. Le principe de la DGGE:

La technique de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet de détecter des substitutions, de petites insertions ou délétions dans les séquences d'ADN de 200 à 700 bp. Son principe est basé sur la séparation de molécules d'ADN double brin obtenus par PCR, qui diffèrent par un ou plusieurs nucléotides, dans un gel de polyacrylamide supposé linéaire et croissant de substances dénaturantes (Urée et Formamide) (Fischer et Lerman, 1983).

Les fragments d'ADN de taille identique mais différents d'un seul nucléotide se déplacent dans le gel à vitesse constante. Lorsqu'ils parviennent à une concentration critique de dénaturant, des régions plus ou moins grande d'ADN, appelées domaine, sont dénaturé en bloc. En pratique, le domaine dont le  $T_m$  est le plus faible est dénaturé en premier. Le phénomène est accompagné d'une chute brutale de la mobilité électrophorétique du fragment, à l'endroit du gel où la concentration en dénaturant correspond à la température de fusion ( $T_m$ ) du domaine (Fernandez *et al.*, 1993).

Le  $T_m$  dépend de la séquence nucléotidique si bien que le changement d'un seul nucléotide au sein du domaine conduit à un  $T_m$  différent. La dénaturation d'un même domaine muté et sauvage surviendra à des positions différentes dans le gel dénaturant. Les molécules d'ADN seront alors séparées sur la base de très petites différences de  $T_m$  existant à l'intérieur du même domaine dénaturé (figure 13). Le domaine qui possède le  $T_m$  le plus bas (domaine B de la figure 13) gouverne la mobilité électrophorétique du fragment dans le gel dénaturant (Fernandez *et al.*, 1993).



**Figure 13 :** Comportement d'un fragment d'ADN à deux domaines A et B au cours de la DGGE:

- à gauche, le domaine B est non muté.
- à droite, il est le siège d'une mutation stabilisante (A ou T substitué à G ou C). Sa dénaturation dans le gel d'électrophorèse nécessite une concentration de dénaturant supérieure à celle requise pour la dénaturation du même domaine sauvage.

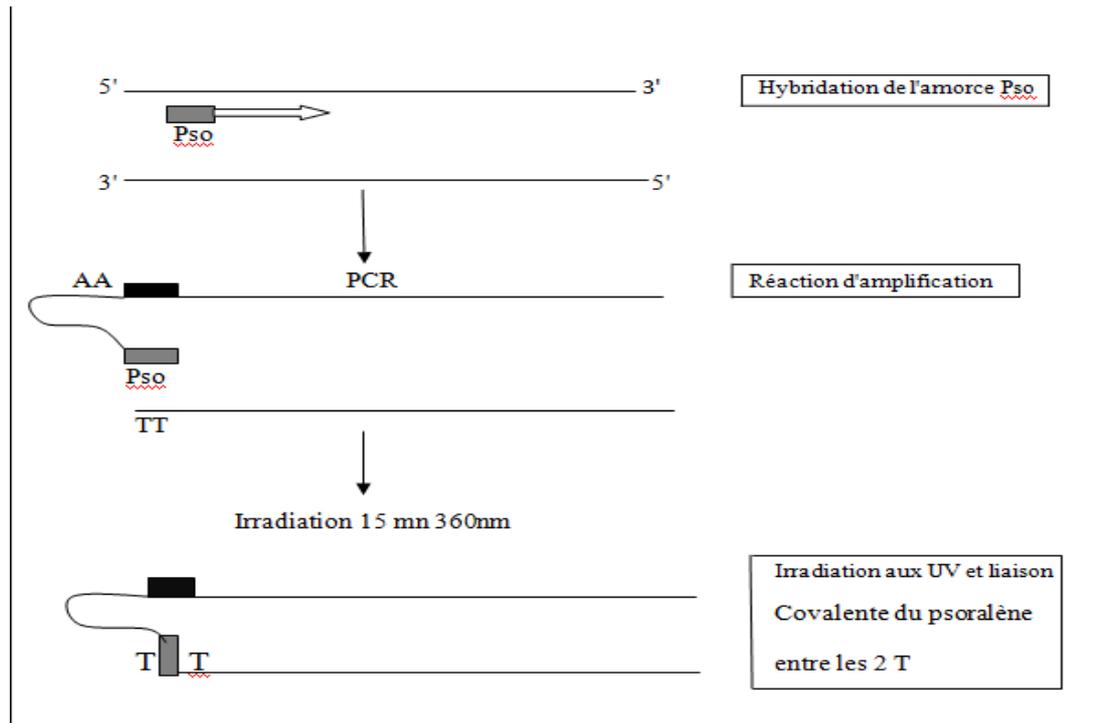
### 5.3. Conditions d'utilisation

Les meilleures conditions d'utilisation de la technique sont réunies lorsque le fragment analysé présente un domaine de haute  $T_m$  et un domaine de faible  $T_m$ . Si ces domaines ne sont pas individualisables au sein du fragment, on peut artificiellement les créer par deux méthodes, en vertu de la loi de coopérativité entre bases : (Sheffield *et al.*, 1989)

- La mise en place lors de la PCR d'un polynucléotide riche en GC clamp, peu sensible aux concentrations de dénaturant utilisées. La proximité d'une région riche en GC participe presque toujours à définir un domaine adjacent de faible stabilité avec une  $T_m$  moyenne variant très peu d'une base à l'autre. 30 à 80 nucléotides GC étant nécessaire à la création du GC clamp, le procédé est très onéreux car il augmente le coût d'une des amorces et diminue son rendement de synthèse. D'autre part, la cohésion du GC clamp ne tient qu'aux liaisons hydrogènes moins stables que la liaison covalente.

## Synthèse bibliographique

- L'utilisation d'une amorce couplée à une molécule de psoralène. L'amorce est incorporée par PCR à l'extrémité du fragment amplifié. L'amplicon est ensuite exposé aux rayons ultraviolets. Sous leur action, le psoralène se lie de façon covalente à deux molécules de thymine appartenant au brin complémentaire (Figure 14). La liaison covalente formée ne peut être rompue par les dénaturants. Ce type de clamp chimique, d'apparition récente sur le marché, est moins cher que le CG clamp, aussi l'avons-nous expérimenté dans notre travail.



**Figure 14:** Mécanisme de clampage réalisé par la molécule de psoralène.

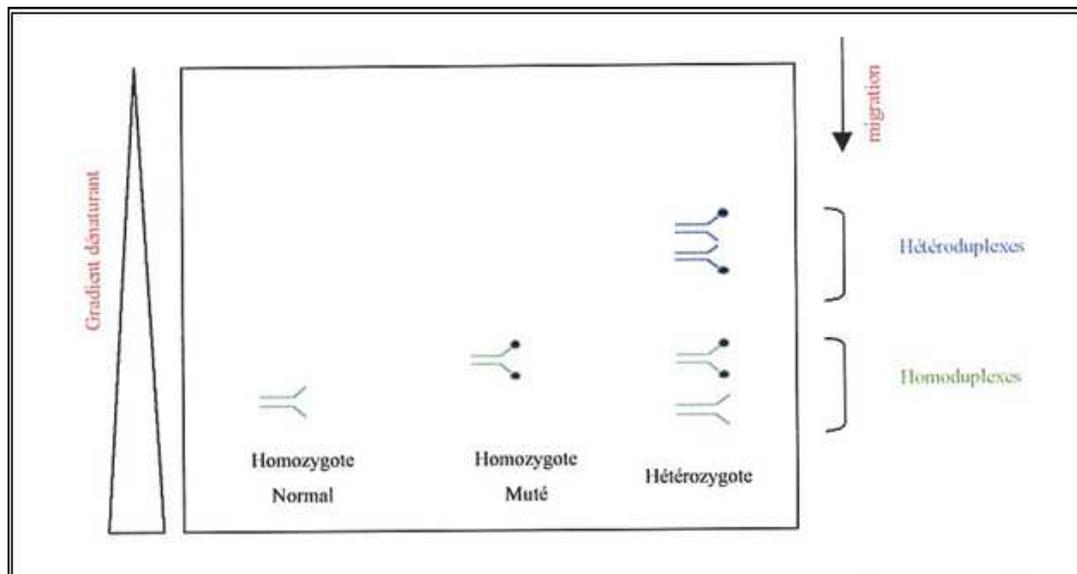
### 5.4. La formation d'hétéroduplex: comportement des allèles normal et muté:

La fiabilité de la technique se trouve accrue par l'existence d'hétéroduplex. Ceux-ci se définissent l'association d'un brin correspondant au fragment de type sauvage avec le brin complémentaire du fragment muté. Chez les sujets hétérozygotes, des hétéroduplex (doubles brins hétérologues) se forment par combinaison des matrices provenant des deux allèles normal et muté. On obtiendra quatre types de fragments: un homoduplex normal, un homoduplex muté, et deux hétéroduplex. Lors de l'électrophorèse sur le gel en gradient de dénaturation, chaque type de fragment porteur d'un mésappariement particulier sera dénaturé à une

## Synthèse bibliographique

concentration de dénaturant spécifique et donc à une position spécifique. Le gel révélera quatre bandes distinctes (figure 15).

L'hétéroduplex présente un mésappariement qui tend à le déstabiliser, le rendant plus accessible à la dénaturation. Dans certains cas le mésappariement d'un nucléotide entraîne une diminution de  $T_m$  pouvant atteindre  $6^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 15 :** Migration électrophorétique d'un ADN double-brin dans un gel dénaturant.

Après amplification par PCR, l'ADN d'un sujet malade homozygote fournira une seule espèce d'homoduplex. Celle-ci migrera en DGGE sous la forme d'une bande unique dont la position peut être perçue comme étant sensiblement la même que celle de l'homoduplex témoin normal. Pour éviter cette confusion, des hétéroduplex sont réalisés artificiellement en mélangeant à volume égal un amplicon contenant des fragments normaux et un amplicon contenant des fragments issus de l'ADN du sujet supposé homozygote pour une mutation; le profil d'hétérozygote obtenu en DGGE permet d'affirmer l'homozygotie.

### 5.5. Les fragments d'ADN analysés:

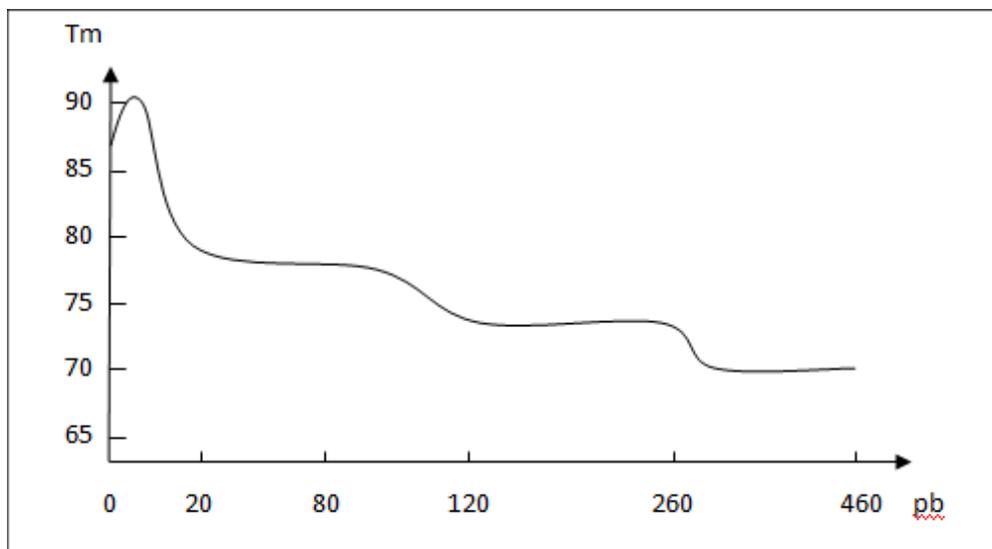
Pour explorer tout le gène de la  $\beta$ -globine, et identifier les régions d'ADN génomique accessible à l'analyse en DGGE, un programme informatique *Melt Map* (Lerman et Silvertstein, 1987) a été utilisé à fin d'établir la carte de fusion des 3 fragments d'ADN analysés: fragment I: PsoB1/G2, fragment II: PsoG1/IVS2, fragment III: PsoE3/Ps2, d'une longueur respectivement de 460 pb, 283 pb, et 366 pb .

## Synthèse bibliographique

La carte montre que la fusion de paires de bases contiguës, malgré leur différence de stabilité individuelle, est la même sur une certaine longueur de la molécule. Les régions d'ADN longues de 25 à plusieurs centaines de paires de bases et présentant une température de fusion très proche sont identifiées comme étant les domaines. La comparaison des cartes de fusion du même fragment normal ou muté met en évidence, les effets des mutations sur le  $T_m$  d'un domaine. Autrement l'introduction d'une séquence riche en GC clamps en 5' des amorces doit être envisagée pour créer un domaine artificiel de haute stabilité différent de celui de la séquence à analyser (Sheffield *et al.*, 1989).

La figure (16) correspond à la carte de fusion du fragment PsoB1/G2 (460pb). Celui-ci présente trois domaines de fusion.

- Les vingt premiers nucléotides appartenant à l'amorce constituent le clamp.
- Les nucléotides 20 à 90 constituent le premier domaine C dont le  $T_m$  est environ 77°C.
- Les nucléotides 120 à 260 encadrent un domaine B dont le  $T_m$  est de 74°C.
- Les nucléotides 260 à 460 correspondent au domaine A de plus faible  $T_m$  72°C.



**La figure 16:** la carte de fusion du fragment PsoB1/G2

### 1. Patients

#### 1.1. Recrutement:

Notre étude a porté sur une population de 64 malades venant des différentes régions de l'Est Algérien; 37 patients atteints de  $\beta$ -thalassémie, 18 patients ayant la  $\beta$ -thalasso-drépanocytaire et 9 patients drépanocytaires, diagnostiqués et traités à l'EHS de Pédiatrie du Mansourah- Constantine.

#### 1.2. Analyses phénotypiques:

Le diagnostic phénotypique de la  $\beta$ -thalassémie et la drépanocytose est établi après un examen clinique, une analyse des paramètres hématologiques ; taux d'hémoglobine (Hb), nombre de globule rouge par  $\text{mm}^3$  (GR), volume globulaire moyen (VGM), et l'électrophorèse sur acétate de cellulose et/ou isoélectrofocalisation de l'hémoglobine (ampholines 6-8) ainsi que le dosage de l'Hb A2. Ces deux méthodes permettent d'analyser les fractions hémoglobiniques et identifier le caractère  $\beta^0$  ou  $\beta^+$  et le caractère drépanocytaire.

#### 1.3. Questionnaire:

Un recueil de données a été effectué au niveau du service de pédiatrie; à partir des dossiers des patients, compléter par une enquête menée par nous même. (Annexe 3).

#### 1.4. Prélèvement sanguin:

Le prélèvement sanguin a été réalisé pour chaque patient. La collecte de sang a eu lieu dans un à intervalle du temps de transfusions (1 moins). Le prélèvement sanguin a été fait sur des tubes contenant un anticoagulant comme l'EDTA qui est en plus un inhibiteur des nucléases, permettant ainsi à l'ADN de rester intact et non dégradé.

### 2. Méthodes:

#### 2.1. Extraction de l'ADN:

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN des cellules ou de tissus. Les leucocytes sanguins représentent la source majeure d'ADN. Dans notre étude la méthode utilisée est celle de l'extraction d'ADN par la technique au NaCl.

### 2.1.1. Principe :

L'extraction de l'ADN consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges ; ils seront ensuite traités par un détergent (SDS) et une protéinase K. Dans le lysat, l'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au NaCl. Le surnageant ainsi récupéré et traité par l'éthanol dans lequel une pelote de l'ADN se forme par précipitation. L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (Tris EDTA 10 :1) (voir Annexe 4)

### 2.1.2 Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN :

La concentration et la pureté de l'ADN est déterminé par dosage spectrophotométrique.

#### ➤ *La pureté de l'ADN :*

- L'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10ul de l'ADN solubilisé dans 990 ul de l'eau stérile).

-Les DO sont lues à 260 et 280 nm (longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile).

-Le rapport  $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$ , permet de nous renseigner sur la pureté de l'ADN.

On considère que :

- L'ADN est suffisamment pure lorsque le rapport  $R = DO_{260} / DO_{280}$  est compris entre 1.6 et 2 ( $1.6 < R \leq 2$ ).
- L'ADN est contaminé par les protéines si  $DO_{260} / DO_{280} < 1.6$
- L'ADN est contaminé par les ARN si  $DO_{260} / DO_{280} > 2$ .

La pureté de l'ADN est essentielle pour une action efficace des enzymes de restriction utilisées par la suite. Dans le cas où l'ADN est contaminé, il est indispensable de procéder une re-purification de la pelote d'ADN. Les ADN purs sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### ➤ *La concentration de l'ADN :*

Elle est calculée à partir de l'équation:

**1 unité de DO260 nm = 50µg/ml d'ADN double brin.**

Sachant que l'ADN obtenu est dilué à 1/100, la quantité obtenue est multipliée par 100.

**La concentration de l'ADN en µg/ml = facteur de dilution x DO260 x 50µg/ml.**

### **2.2. Amplification enzymatique d'ADN in vitro (PCR, Polymérase Chain Reaction):**

Dans notre étude, nous avons recherché les mutations β-thalassémiques sur le gène β-globine de 27 patients β-thalassémique homozygotes, 2 patients atteints de la β-thalasso-drépanocytose et 3 individus porteurs de β-thalassémie mineur, originaire de l'Est Algérien. Au total 64 chromosomes appartenant à 32 sujets ont été analysés par la technique PCR-DGGE par clamp chimique de psoralène, précédée ou non par une digestion enzymatique.

Les ADN génomiques extraits et contrôlés sont soumis à une amplification par PCR. La PCR est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Karry Mullis et développée par Henri A. Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (Californie, USA).

#### **2.2.1. Principe:**

La PCR permet une amplification exponentielle d'un fragment d'ADN délimité par deux séquences connues sur lesquelles s'hybrident spécifiquement deux oligonucléotides de synthèse (amorces ou *primers*).

Pour tout nos PCR, un mélange réactionnel (volume final de 100µl), constitué de 10µl d'ADN génomique, de tampon sans MgCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> à 25mM, d'amorces sens et anti-sens (200 ng/µl), des dNTP (25 mM) et d'une unité de Taq polymérase à été utilisé. Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur (voir Annexe 5).

#### **2.2.2. Les amorces utilisées:**

Au cours de notre exploration du gène β-globine nous avons utilisé essentiellement trois couples d'amorces qui délimitent trois domaines d'amplification I, II, III englobant la quasi-totalité de la séquence de ce gène (Fernandez *et al.*, 1993).

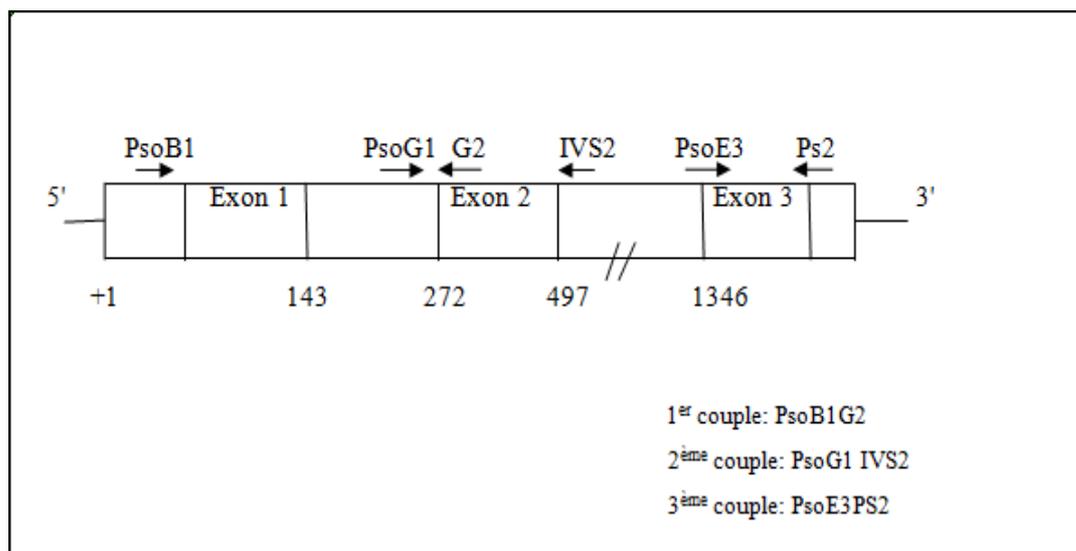
Ces amorces d'amplification ont été sélectionnées à l'aide d'un algorithme informatique qui définit les domaines de fusion du gène en fonction de sa séquence. Ce qui permet aussi de prévoir les conditions optimales du gradient de dénaturation et la vitesse de migration.

### Trois domaines ont été explorés: figure 17

**Domaine PsoB1-G2;** le fragment de PCR obtenu est constitué de 459 pb (-120 à +339 par rapport au site cap). L'amorce PsoB1 est située au niveau du promoteur, l'amorce G2 au niveau du premier tiers de l'exon 2.

**Domaines PsoG1-IVS2;** le fragment de PCR obtenu est constitué de 288 pb (+234 à +522). L'amorce PsoG1 est située à la fin de l'intron 1, l'amorce IVS2 au début de l'intron 2.

**Domaines PsoE3-Ps2;** le fragment de PCR obtenu est constitué de 367 pb (+1299 à 1666). L'amorce PsoE3 est située à la fin de l'intron 2, Ps2 à l'extrémité 3' comprend l'exon 3 et le signal de polyadenylation.



**Figure 17:** Le gène  $\beta$ -globine avec les amorces utilisées pour son amplification, puis l'analyse par DGGE.

Le tableau II donne les dénominations ainsi que les séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour l'amplification de ces différentes régions.

Les amorces PsoB1, PsoG1, PsoE3 se caractérisent par une extrémité 5' couplée à un psoralène (furocoumarine), agent intercalent photosensible qui aura pour rôle de créer en DGGE des domaines de fusions artificiels de haute stabilité.

**Tableau II:** Séquences des amorces utilisées en PCR-DGGE.

Fragment	Amorces	Séquences des amorces
Fragment I	Pso B1	5' Pso AATCATCACTTAGACCTCACCC 3'
	G2antisense	5'ATCAGGAGTGGACAGATCCC 4'
Fragment II	Pso G1	5' Pso TATGACTCTCTCTGCCTATTGG 3'
	IVS2 antisens	5' AAAACATCAAGGGTCCCATA 3'
Fragment III	Pso E3	5' Pso AAGGCCCTTTTGCTAATCATG 3'
	PS2 antisens	5' CACTGAACCCACATTCCC 3'

### 2.2.3. Le déroulement de la PCR:

Les ADN sont soumis à 40 cycles d'amplification dans un thermocycleur qui est programmé au préalable pour la réalisation d'une PCR comprenant: une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 minute, suivi de 40 cycle de PCR, comprenant chacun une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation à 56°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10minutes.

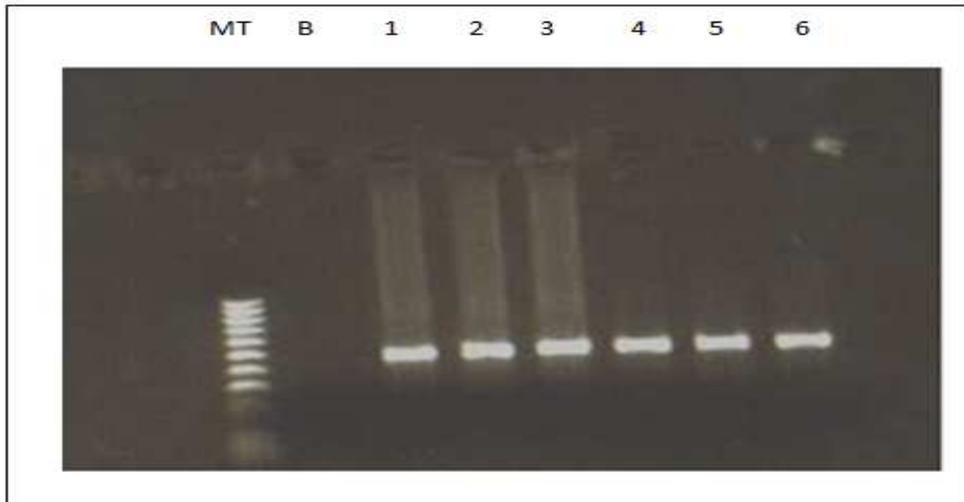
Par ailleurs et afin de favoriser la formation des hétéroduplex, les échantillons ont été ensuite chauffés 10 minutes à 99 °C et 30 minutes à 50°C.

### 2.2.4. Visualisation de l'amplicon (contrôle de la PCR):

Elle est effectuée par une migration électrophorétique des produits amplifiés. La visualisation de l'amplicon est importante, pour le contrôle de la taille des fragments amplifiés, le contrôle de la PCR est également indispensable pour s'assurer de l'inexistence d'une contamination.

Après les 40 cycles de la PCR, le produit de la réaction est soumis à la migration électrophorétique en Tampon TBE 1X, l'ADN migre en fonction de sa charge. Pour cela, 10µl d'amplicon sont déposés, en présence d'un colorant BBP (Bleu de Bromophénol) qui permet de suivre le front de la migration, sur un gel d'agarose à 1.5% contenant 10µl de BET (Bromure d'éthidium), ce dernier est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases des acides nucléiques à l'intérieur de la double hélice rendant les ADN fluorescents par

exposition au U.V. Un marqueur de taille (PM 100 pb) est également déposé, diluée au 1/2. Les dépôts se font du coté de la cathode (-). Le système est soumis à une migration sous un courant de 80 à 120 volts pendant 30 minutes. Après la migration, le gel est photographié après transillumination aux U.V. Les fragments amplifiés sont visualisés sous forme d'une bande fluorescente orange (figure 18).



**Figure 18:** Profil électrophorétique sur un gel d'agarose 1.5% des fragments amplifiés (460pb) par PCR du gène  $\beta$ -globine.

### 2.3. L'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE):

La technique de la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) permet de détecter des substitutions, de petites insertions ou délétions dans les séquences d'ADN de 200 à 700 bp.

#### 2.3.1. Mise au point du *clamp* chimique:

Les produits de PCR (20 à 30 $\mu$ l) sont irradiés sous l'U.V par une lampe couramment employée en biologie moléculaire (Spectroline®, Bioblock, France) à 365 nm pendant 15 minutes. Cette étape dite de clampage chimique a pour but de permettre à la molécule de psoralène, agent intercalent photosensible chimiquement fixé par le fournisseur (EUROBIO) à l'extrémité 5' de l'amorce, de créer un appariement entre deux brin d'un fragment bicaténaire d'ADN, suffisamment stable pour le rendre insensible aux pourcentages de dénaturants utilisés. Le clamp doit résister à des conditions de dénaturation qui entraînent la fusion de tous les domaines du fragment.

### 2.3.2. Digestion par les enzymes de restriction:

La digestion des fragments I PsoB1 G2 et fragment III PsoE3Ps2 par des enzymes de restriction permet l'investigation complémentaire de la séquence de cette région en étudiant le domaine de fusion le moins stable du fragment généré par la coupure (Laradi *et al.*, 2000).

Ainsi PsoB1/ G2 sans digestion permet l'exploration par DGGE de l'intron I et début de l'exon II. Toutefois, lorsqu'il est digéré par *MboII* (fragment de 270pb), il permet l'exploration de l'exon I et la première moitié de l'intron I. Ce même fragment soumis à l'action de *Nla III* (fragment de 170pb) permet l'analyse de la région promotrice. Pour le fragment PsoE3 Ps2, le signal de polyadenylation est exploré sans digestion alors l'exon 3 est analysé après digestion par *Nla IV*.

Au cours de notre travail nous avons exploré que la région PsoB1/ G2 sans digestion et la région PsoB1/G2 digéré par *Mbo II* (voir tableau IV), car elles permettent la recherche de la majorité des mutations  $\beta$ -thalassémiques maghrébines. Nos mutations ont été identifiées par rapport aux témoins pathologiques (hétérozygote simple) qui porte des mutations connues, disponibles dans notre laboratoire.

#### - Mélange réactionnel de la digestion enzymatique:

**Tableau III:** préparation de milieu réactionnel de la digestion

Réactifs	Volume en $\mu$ l
H2O	5
Tampon 1\10volume finale	3
Enzyme de restriction	2

- La quantité des différents réactifs du milieu réactionnel de la digestion est multipliée par le nombre de tubes voulu + un témoin.
- Le mélange réactionnel est incubé pendant 2 à 3heures à 37°C.
- L'arrêt de la digestion est obtenu par adition de 5 $\mu$ l de bleu de DGGE (bleu de bromophenol- Xylène- Cyanol).

### 2.3.3. Préparation du gel de polyacrylamide:

Pour l'analyse des fragments des gènes de la  $\beta$ -globine, nous employons un gel de polyacrylamide à 6%. Ce gel résulte de la polymérisation d'une solution d'acrylamide-bisacrylamide (19:1) supplémentée en dénaturants. Elle est coulée entre deux plaques de verre (16x18 cm) parfaitement dégraissées par l'éthanol à 70%, séparées par deux espaceurs de 1mm d'épaisseur. Le moule ainsi constitué est solidarisé par des pinces, étanchéifié avec un joint en caoutchouc, et maintenu en position verticale.

- La solution d'acrylamide est préparée à partir de deux solutions mères filtrées: 0% dénaturant et 90% dénaturant.

**Solution 0%:** Acrylamide 40% → 75 ml.

TAE 50% → 10 ml.

H2O distillée QSP → 500 ml.

**Solution 90%:** Acrylamide à 40% → 75 ml.

Formamide désionisée → 180 ml.

Urée → 191.26 ml.

TAE 50% → 10 ml.

H2O distillée QSP → 500 ml.

Les solutions entrant dans la composition du gradient 30- 80% (gradient du fragment I voir le tableau IV) sont obtenues en mélange les solutions mères selon les proportions suivantes:

	30%	80%
Solution mère à 0% dénaturant	10 ml	1.7 ml
Solution mère à 90% dénaturant	5 ml	13.3 ml

**Le tableau IV:** Les conditions de migration respectives à chaque fragment.

Région étudiées	PCR	Digestion enzymatiques	Gel DGGE	Vitesse de migration
Exon1-début intron 1	PsoB1/G2	Mbo II	30-80%	2200. VH
Intron1-partie Exon 2	PsoB1/G2	Directe	30-80%	2200. VH

Ces deux solutions de travail sont préparées, sous agitation continue, dans les cuves d'un formeur de gradient. Pour initier et entretenir la polymérisation de l'acrylamide on ajoute, au moment de couler le gel, 12  $\mu$ l de TEMED et 72  $\mu$ l de persulfate d'ammonium à 10% dans chaque chambre à gradient.

### **2.3.4. Formation du gradient de dénaturant:**

Le gradient de dénaturant est réalisé grâce à un préparateur de gradient (formeur de gradient). Ce dispositif est constitué de deux chambres cylindriques munies chacune à l'intérieur de barreaux magnétiques, qui assureront l'homogénéité des solutions. Ces réservoirs présentent à leur base un orifice de communication commandé par une vanne. L'une de ces chambres (cylindre droit) est munie d'une deuxième vanne qui est reliée aux plaques de verre par l'intermédiaire d'un robinet connecté à une tubulure. Celle-ci est engagée dans les galets d'une pompe péristaltique qui assurera le pompage de la solution d'acrylamide jusqu'aux plaques. Après avoir initié la polymérisation dans chaque cuve, on actionne simultanément le robinet et la pompe ; les solutions d'acrylamide de concentration différentes en dénaturant se mélangent dans la cuve droite. Le liquide progresse à une vitesse d'environ 4 ml/mn qui, sans perturber le gradient, est suffisamment rapide pour éviter une polymérisation complète dans la tubulure. Le gel est prêt à l'emploi une heure environ après avoir été coulé.

### **2.3.5. Dépôt des échantillons et système électrophorétique:**

La cuve à électrophorèse utilisée (C.B. S Scientific, California, USA) est semblable à un aquarium rectangulaire. Elle contient 17 litres de tampon. Un thermostat régule la température du tampon brassé en permanence par une turbine. L'anode est fixée au fond de la cuve.

Après une heure de polymérisation de l'acrylamide, le gel coulé est installé sur un support vertical. Les puits du gel sont rincés abondamment avec du TAE 1X, et le dépôt des échantillons constitué par 20  $\mu$ l de produit de PCR et de 5  $\mu$ l de solution de dépôt (bleu de DGGE: bleu de bromophénol- xylène- cyanol) est effectué. L'ensemble plaque et support est immergé dans la cuve préalablement chauffée à 60°C. Le circuit de recirculation du tampon et l'agitation étant en marche; la température de 60°C est maintenue jusqu'à la fin de la migration par l'intermédiaire d'un bain thermostaté. Elle contribue au maintien de l'effet dénaturant. Les conditions relatives à chaque fragment sont résumées sur le tableau I, Annexe 6.

### **2.3.6. Révélation au BET:**

A l'issue de l'électrophorèse, les plaques contenant le gel sont désolidarisées de leur support. Le gel est prudemment démoulé et déposé dans une solution de BET à 0.6 µg/ml. On laisse agir 20 mn, après quoi le gel est photographié après transillumination par des rayons U.V.

## Résultats

Notre étude a été effectuée sur une population d'enfants atteints d'hémoglobinopathies âgés entre 4 mois et 16 ans avec une moyenne d'âge de  $7.3 \pm 4.3$  ans, recrutés au service de pédiatrie du Mansourah- Constantine.

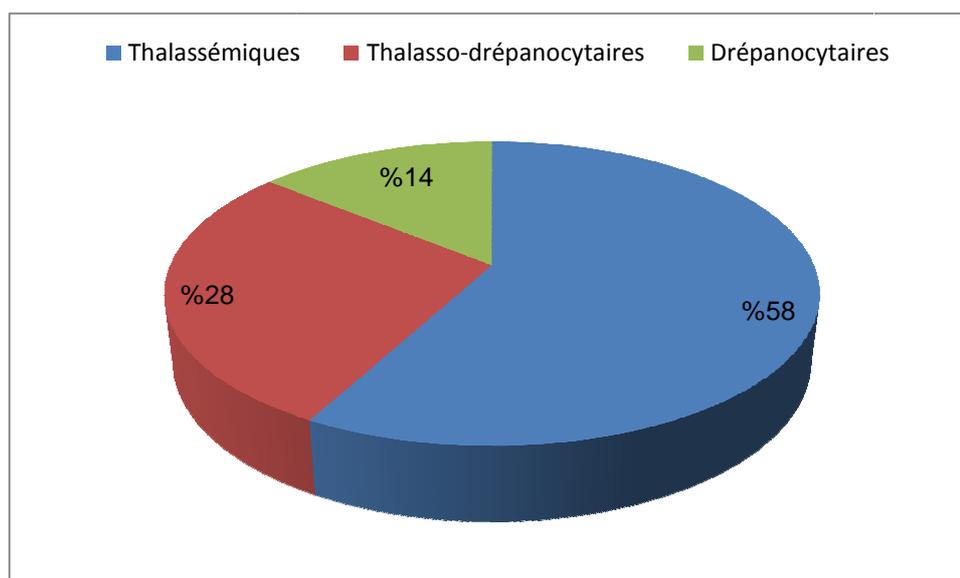
### 1. Répartition de la population générale:

#### 1.1. Répartition de la population selon le type d'hémoglobinopathies:

Nos résultats confirment l'existence de différents types d'hémoglobinopathies dans la population de l'Est Algérien, parmi 64 patients qui ont été recensés au cours de cette étude, 37 sujets  $\beta$ -thalassémiques homozygotes, 18 atteints de la forme composite  $\beta$ -thalasso-drépanocytose et 9 patients drépanocytaires. Les patients thalassémiques représentent 58% de notre échantillon.

**Tableau V:** Répartition de la population selon les différents types des hémoglobinopathies.

	Nombre	Pourcentage
Thalassémiques	37	58%
Thalasso-drépanocytaires	18	28%
Drépanocytaires	9	14%
Total	64	100%

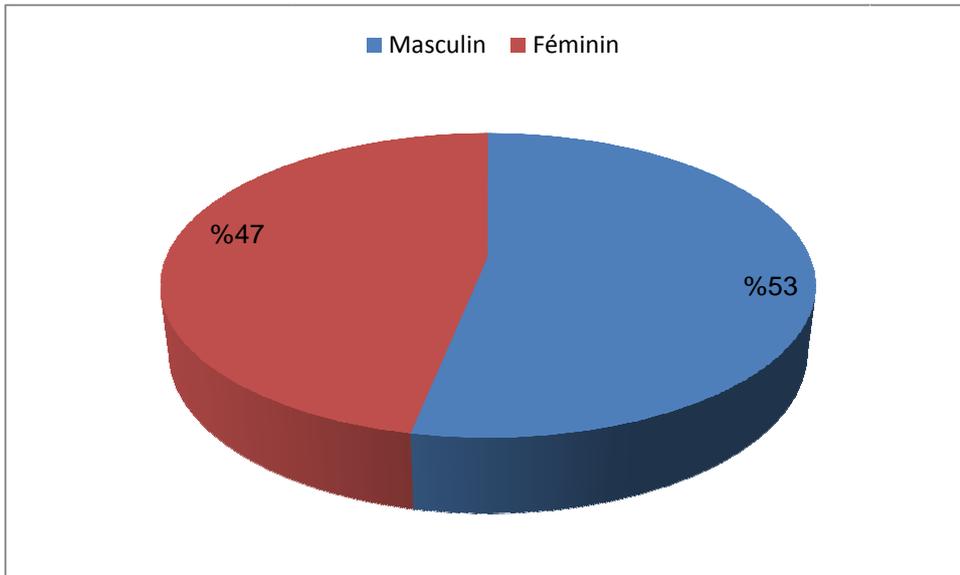


**Figure 19:** Répartition de la population selon les différents types d'hémoglobinopathies.

# Résultats

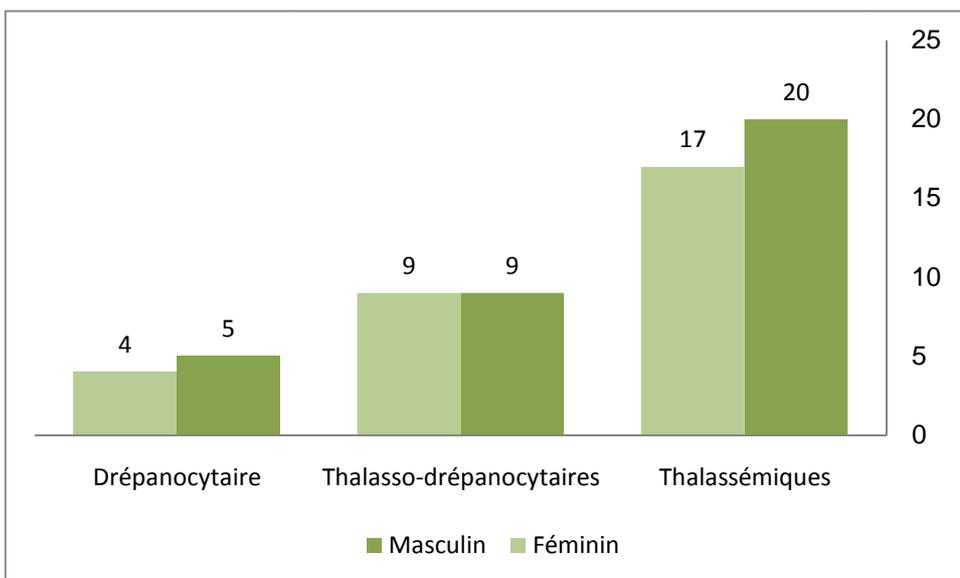
## 1.2. Répartition des patients selon l'âge et le sexe:

La population totale est répartie en 30 sujets de sexe féminin soit 47% et 34 de sexe masculin soit 53% avec un sex ratio de 1,12.



**Figure 20:** Répartition de la population totale selon le sexe.

La répartition par sexe des trois pathologies est en équilibre avec un sex ratio qui correspond pratiquement à 1:1.



**Figure 21:** Répartition des patients selon leur sexe.

## Résultats

La répartition de nos patients selon les classes d'âge d'amplitude 5 ans (Tableau VI) montre que toutes les classes d'âge compris entre 1 et 15 sont touchées par les trois types d'hémoglobinopathies.

L'âge moyen de l'apparition des premiers symptômes de diagnostic des patients thalassémiques est de  $17.08 \pm 16.28$  mois.

**Tableau VI:** Répartition des patients selon l'âge :

Classe d'âge	<1	1 - <5	5 - <10	10 - <15	≥15
Thalassémie homozygote	1	15	13	7	1
Thalasso-drépanocytose	0	5	6	5	2
Drépanocytose	0	4	4	0	1
Total	1	24	23	12	4

### 1.3. Répartition des patients par région :

Le tableau (VII) représente la répartition des patients selon leurs régions. Les résultats montrent que la région de Constantine comporte le plus grand nombre de patients (59%) suivie par la région de Mila (11%) et la région d'Oum el Bouaghi (11%), ceci s'explique par le fait que les autres villes ont leur propre service de pédiatrie.

**Tableau VII:** Représentation de la répartition des patients selon la région.

Région	Nombre	Pourcentage
Constantine	38	59 %
Mila	7	11%
Oum el Bouaghi	7	11%
Skikda	5	8%
Guelma	2	3%
Jijel	2	3%
Sétif	2	3%
Tebessa	1	2%
Total	64	100%

## Résultats

### 1.4. Répartition des patients thalassémiques et antécédents familiaux

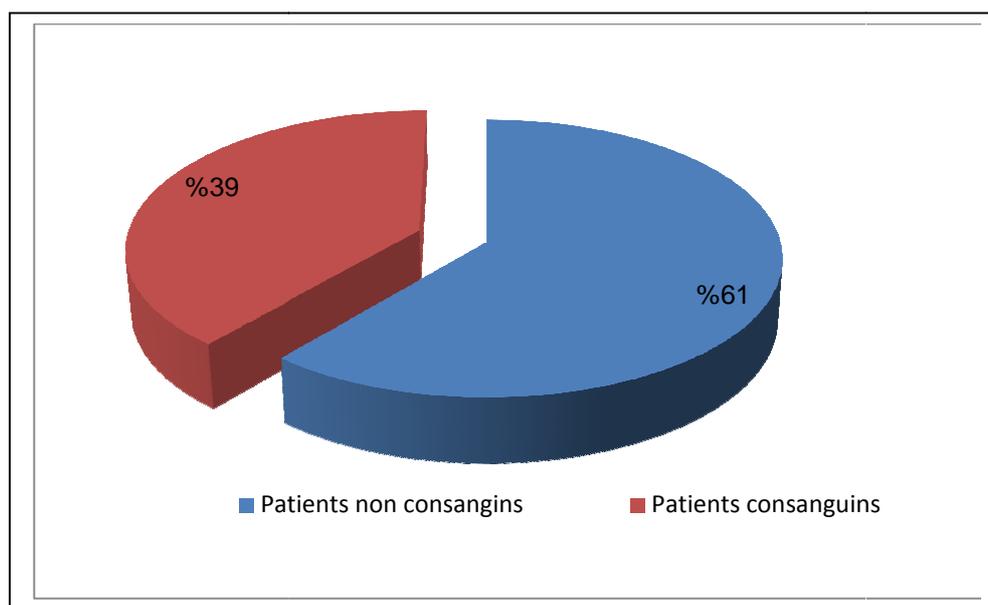
A partir des données recueillies à l'aide du questionnaire et les arbres généalogiques établis au cours de cette étude, nous avons pu classer nos patients thalassémiques selon leurs antécédents. Les résultats (tableau VIII) montrent que 57% de nos patients n'ayant pas des antécédents familiaux et 43% ayant au moins un antécédent familial.

**Tableau VIII:** Répartition des patients thalassémiques en fonction du nombre d'antécédents familiaux.

	Patients sans antécédents	Patients ayant des antécédents
Nombre	21	16
Pourcentage	57%	43%

### 1.5. Le taux de consanguinité chez les patients thalassémiques:

La répartition de nos patients thalassémiques en fonction de la consanguinité, a donné deux groupes de malades: le premier constitué de patients issus de mariage consanguin (61%) dont 55% au premiers degré (figure 22) , le second de patients issus de mariage non consanguin (39%).



**Figure 22:** Le taux de la consanguinité chez les patients thalassémiques

## Résultats

### 2. Qualité des gels et interprétations des profils:

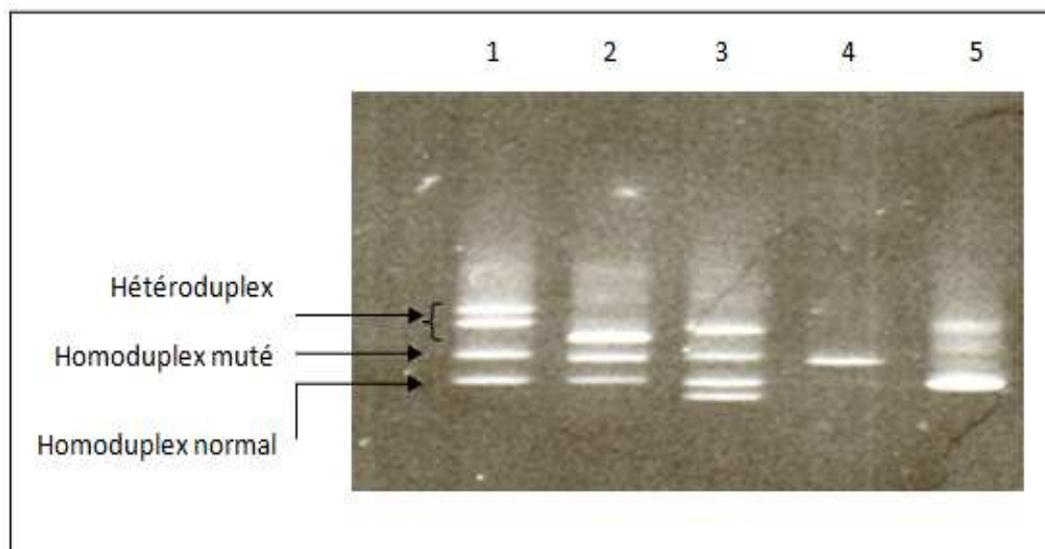
Pendant l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont soumis à un gradient dénaturant de croissance linéaire. Donc par rapport au témoin normal, et en fonction de la variation des bases, la mutation dans le fragment est stabilisante ou déstabilisante et s'arrête respectivement, après ou avant l'homoduplex normal dans le gel.

- Une mutation stabilisante (T ou A substitué par G ou C) provoque un accroissement de  $T_m$  du domaine atteint. La dénaturation du domaine muté se situera à une position dans le gel où la concentration en dénaturation est supérieure à celle nécessaire à la fusion du domaine normal. L'homoduplex muté migrera donc plus loin dans le gel que l'homoduplex normal.

Exemple figure 23, piste : 3 - mutation T→C du nucléotide 6 de l'intron 1.

- Une mutation déstabilisante (G ou C substitué par T ou A) conduit à la situation inverse de la mutation stabilisante. Le domaine atteint est dénaturé plus précocement au cours de la migration que le domaine non muté.

Exemple figure 23, piste 2: - mutation C→T du codon 39.



**Figure 23:** Analyse DGGE par clamp chimique des fragments PsoB1/G2 de 3 sujets hétérozygotes (**piste 1:** IVS1 nuc 110 G→A/N, **piste 2:** codon 39 C→T/N, **piste 3:** IVS1 nuc 6 T→C/N, **piste 4:** homozygote muté, **piste 5:** normal) (n°:1).

# Résultats

---

## 2.1. Qualité des gels:

La figure 23 (piste 1, 2, 3, 4, 5) est le résultat de l'analyse DGGE de 3 sujets hétérozygotes simples, un sujet homozygote muté et témoin normal, effectués selon les conditions que nous avons définies.

Les bandes larges et floues témoigneraient soit d'un gradient trop étalé, soit d'une mauvaise composition du tampon de migration (concentration en sel, PH). Les bandes sont toutes horizontales.

Les trainées (*smears en anglais*) visibles au dessus des bandes pourraient être imputées à la dégradation des fragments de PCR lors de l'activation de psoralène sous l'UV. Les *smears* sont également retrouvés sur les gels d'analyse DGGE par GC *clampe*. Les *smears* proviennent d'hétéroduplex formés durant les cycles de PCR ou de fragments comportant des mésappariement à la suite d'erreurs de la Taq polymérase. L'ensemble de ces fragments est dénaturé à des températures très inférieures à celles des fragments correctement amplifiés. L'interprétation du gel ne s'en trouve pas gênée.

## 2.2. Profils d'électrophorèse:

L'utilisation de 3 amorces d'amplification a permis d'obtenir des amplicons qui ont été soumis à la recherche de mutations par la DGGE. Seule les amplicons PsoB1/G2 ont permis d'observer les mutations. Nous avons ainsi mis en évidence différents cas d'homozygotes, d'hétérozygotes et d'hétérozygotes composites, ces profils sont interprétés de la manière suivante.

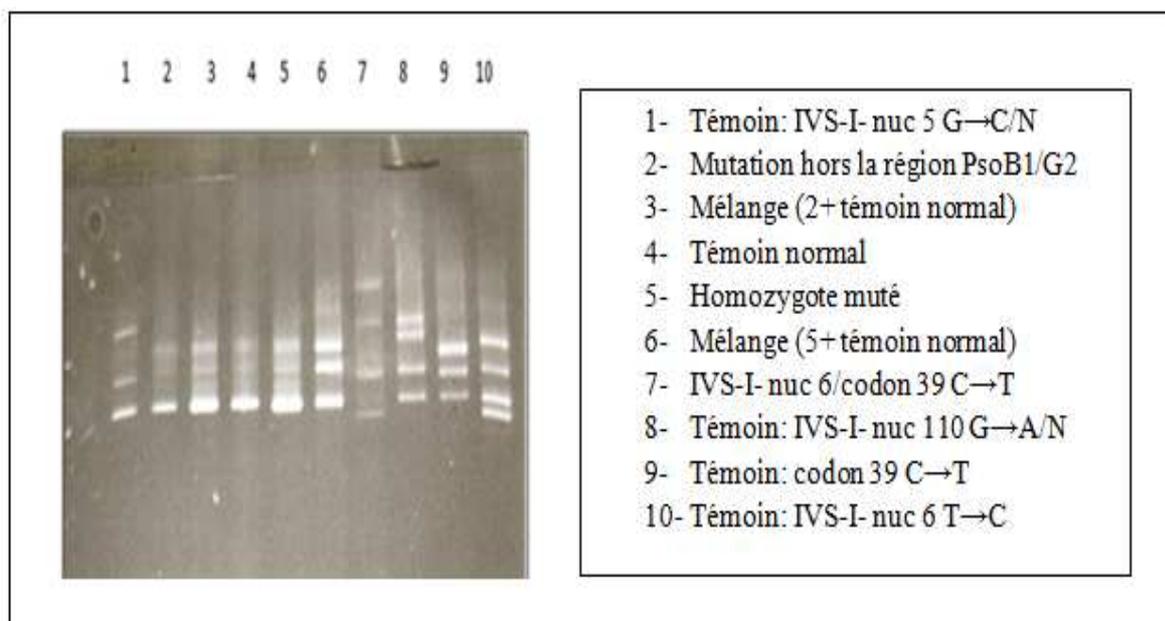
### 2.2.1. Homozygote:

La figure 23, piste 4 montre qu'après 18 heures de migration, des mutations homozygotes présentes sur le PsoB1/G2 sont révélées sous forme d'une seule bande sur le gel.

Les substitution constitués de transversions (AT→ TA ou bien GC→CG) montre que le mutant et le témoin normal migrent cependant à une position quasiment identique, donc l'homoduplex muté peut être confondu avec l'homoduplex normal (figure 24, piste 4: normal, piste 5: homoduplex muté), dans ce cas , il nécessite de créer des hétéroduplex artificiels entre le témoin normal et le mutant , seule la révélation des hétéroduplex sur le gel peut confirmer la présence de la mutation, et leur position de migration par rapport aux hétéroduplex des mutations connues permet de spécifier le type de mutation (figure 24, piste 6).

## Résultats

Dans le 2<sup>ème</sup> cas, piste 3: la création artificiels des hétéroduplex entre le témoin normal et le mutant, ne révèle pas les bandes d'hétéroduplex, ce ci s'explique que la mutation doit être dans autre région sur le gène  $\beta$ -globine.

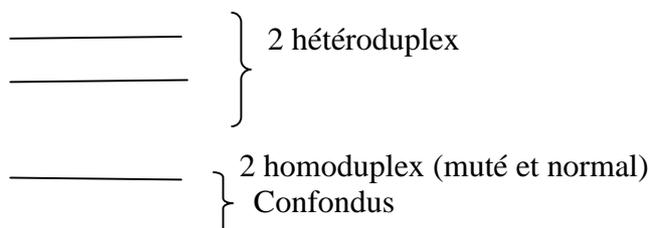


**Figure 24:** Analyse DGGE par clamp chimique des fragments PsoB1/G2 (n°: 2).

### 2.2.2. Hétérozygote simple et hétérozygote composite:

Dans les deux cas, on constate la présence des homoduplex et des hétéroduplex, la figure 25 piste (1, 2, 3, 8, 9,10) permet de distinguer individuellement le profil de chaque mutation hétérozygote simple, comparés au témoin normal en piste 5.

Exemple figure 25, piste 10; mutation hétérozygote simple: IVS1 nuc 5 G→C/N

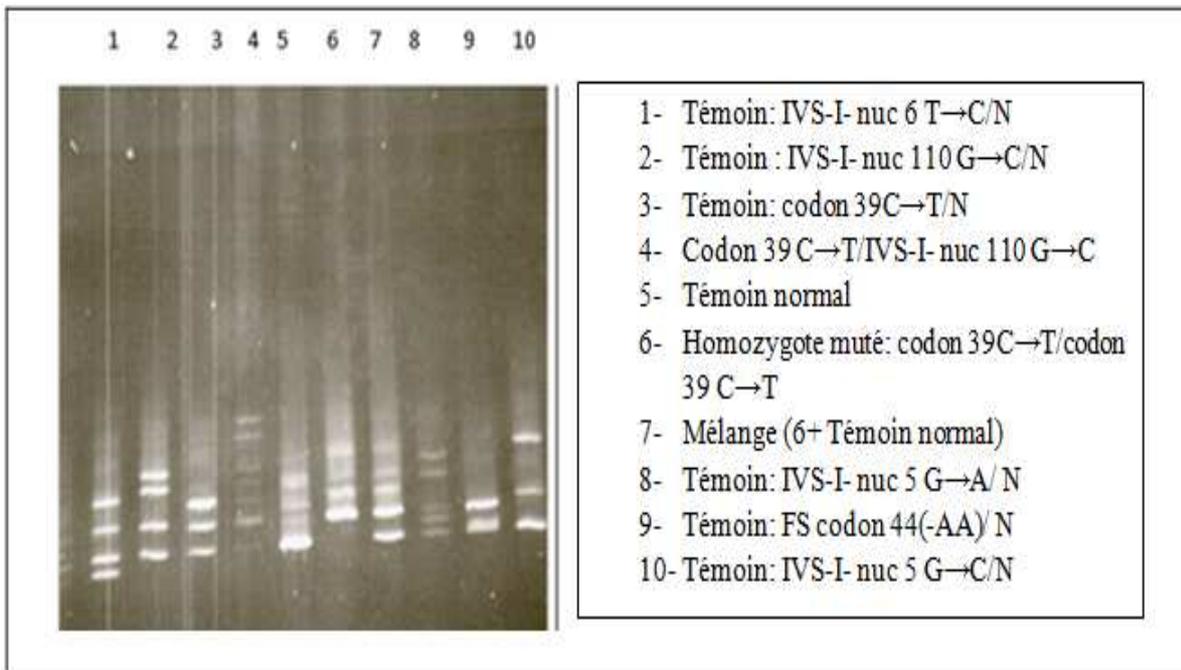
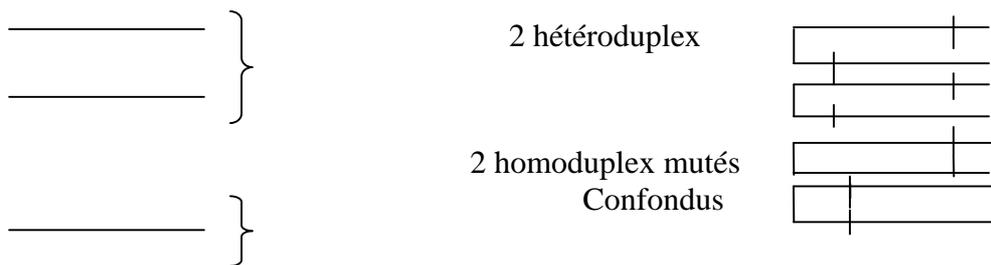


## Résultats

Exemple figure 25, piste 9: mutation hétérozygote simple FS cod 44 (-AA)/N.

Ici les hétéroduplex migrent à la même position, par contre, les homoduplex muté sur le codon 44 (-AA) se distingue de l'homoduplex normal.

Par ailleurs Le profile des mutations hétérozygotes composite est constitué de deux homoduplex muté caractéristiques de chacune des mutations et de deux hétéroduplex possédant deux mésappariements, il apparait au niveau de la piste 4: il s'agit d'un hétérozygote composite ; IVS1 nuc110/codon 39.



**Figure 25:** Analyse DGGE par clampe chimique des fragments PsoB1/G2 (n°:3)

Chaque mutation présente un profil spécifique. La séparation des homoduplex et des hétéroduplex dépend de la nature stabilisante ou non de la mutation ainsi que de sa localisation sur le domaine.

## Résultats

### 3. Interprétation de l'analyse moléculaire:

Au cours de cette étude, nous avons identifié les mutations sur le gène  $\beta$ -globine de 32 individus. Les fréquences respectives de chaque défaut moléculaire ont été déterminées. Les résultats obtenus pour chaque sujet sont présentés en annexe 7.

Parmi les 32 sujets étudiés, 2 chromosomes avec Hb S et 3 autres avec des allèles normaux, ont été exclus du calcul de la fréquence des mutations  $\beta$ -thalassémiques.

Le Tableau IX regroupe les fréquences relatives des allèles  $\beta$ -thalassémiques retrouvés.

**Tableau IX:** Fréquences alléliques des mutations  $\beta$ -thalassémiques (région PsoB1/G2)

Nature de la mutation	Phénotype	Nombre de chromosome (n)	Fréquence relative (%)
1. Codon 39 C→T	$\beta^0$	19	40%
2. IVS-I-110 G→A	$\beta^+$	19	40%
3. IVS-I-5 G→A	$\beta^+$	4	9%
4. Codon 8 (-AA)	$\beta^0$	4	9%
5. IVS-I-6 T→C	$\beta^+$	1	2%
Total: 5 mutations		47	100%
Inconnue		12	
Total		59	100%

L'analyse de ces résultats permet de trouver 5 défauts moléculaires à l'origine de phénotype  $\beta$ -thalassémique avec 9 génotypes différents (voir Tableau X).

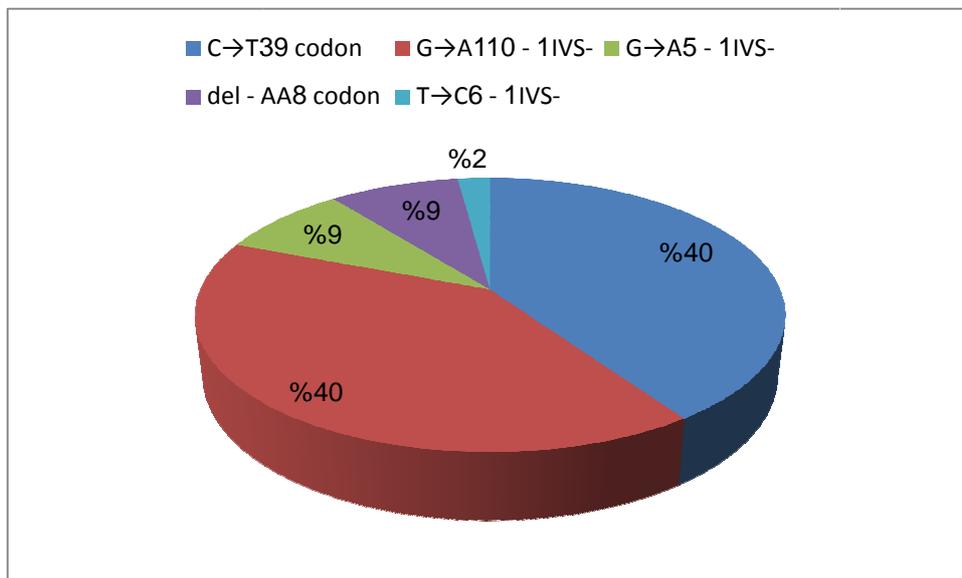
Deux mutations sont dominantes il s'agit de :

- La mutation  $\beta^0$ -thalassémique non sens (C→T) du codon 39 (19/47 chromosomes; 40%)
- La lésion moléculaire IVS-I-nt 110 (G→A) qui constitue la majorité des lésions  $\beta^+$ -thalassémiques (40%).

Trois autres mutations ont été décrites dans notre population : IVS-I-nt6 (T→C) qui représente une fréquence minoritaire (1 seul chromosome; 2%). Deux rares mutations ont été observées avec des fréquences identiques (9%) il s'agit du frameshift du codon 8 (-AA) et la mutation IVS-I-nt 5 (G→A).

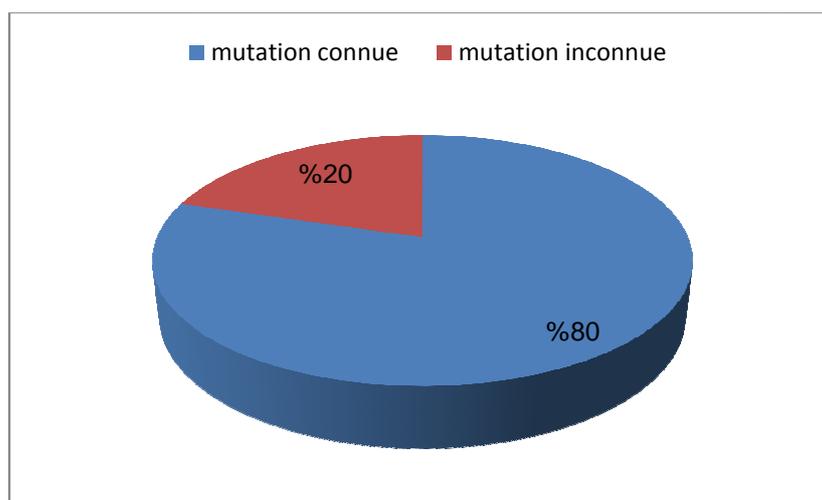
## Résultats

Les mutations codon 39 non sens (CT) et IVS-I- 110 (GA) représentent 80% de l'ensemble des lésions moléculaires.



**Figure 26:** Fréquence des mutations β-thalassémiques dans la population étudiée.

L'exploration de la région PsoB1/G2 (fragment I) du gène β-globine par la DGGE, nous a permis d'identifier le type de la mutation thalassémique sur 80% (47/59) des chromosomes analysés (figure 27) et 20% portent des mutations inconnues par rapport aux témoins disponibles dans notre laboratoire ou des mutations qui se trouvent sur l'un des deux régions du gène β-globine qui n'ont été pas explorés dans cette étude.



**Figure 27:** Pourcentage des mutations identifiées par la DGGE sur la région PsoB1/G2.

## Résultats

Par ailleurs 62% (26/42) de chromosomes sont à l'état homozygote pour une mutation donnée. Cette homozygotie est retrouvée pour les deux groupes de mutations: dominante 61% (20/33), et minoritaire 67% (6/9) et était prévisible vu le taux de consanguinité élevé (61%).

**Tableau X:** Les différents génotypes retrouvés dans notre étude

Génotype	Nombre d'individu	Nombre de chromosomes
IVS-I-110/IVS-I-110	6	12
Codon 39/codon 39	4	8
Codon 8/codon8	2	4
IVS-I-nuc 5/IVS-I-nuc 5	1	2
Codon 39/IVS-I-110	5	10
Codon 39/IVS-I- nuc 6	1	2
Codon 39/IVS-I- nuc 5	1	2
Codon 39/ inconnue	1	1
IVS-I- nuc 5/ inconnue	1	1

Il est à noter que 3 de nos échantillons avaient été dans un autre laboratoire pour analyse et le résultat obtenu après séquençage en utilisant la même amorce ont révélé les mêmes mutations que nous avons observé par notre technique, la DGGE. Ceci confirme la fiabilité de la technique et son intérêt du fait de son coût moindre par rapport au séquençage.

#### 4. Explication de nos résultats à travers quelques cas :

Nous représentons les résultats obtenus sur 4 patients de notre échantillonnage, avec les données hématologiques, biochimiques et arbres généalogiques.

##### ❖ Cas N°: 1

L'étude moléculaire donne une mutation sur l'exon 2 en position Codon 39 C→T.

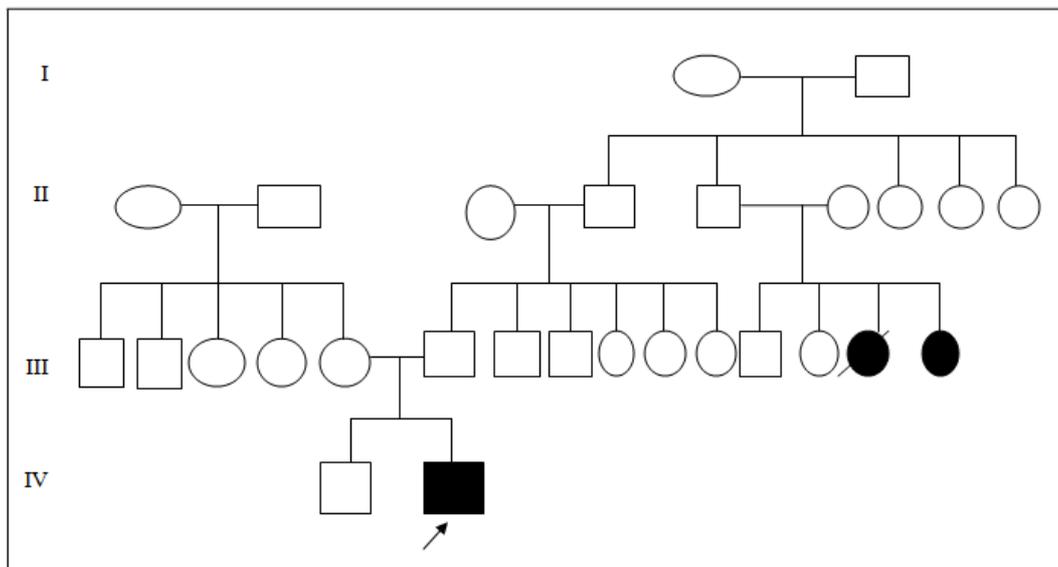
##### ➤ *Présentation du cas*

Il s'agit d'un enfant de sexe masculin âgé de 5 ans; originaire de Guelma atteint de la  $\beta$ -thalassémie majeure, diagnostiquée à l'âge de 13 mois. Ce patient est transfusé toutes les 4 semaines par du sang filtré. L'électrophorèse de l'hémoglobine a montré la présence de 2.8% de l'Hb A2 et 97.2% de l'Hb F. Le tableau XI résume les données hématologiques du patient.

## Résultats

**Tableau XI:** Données hématologique du cas n°1:

Malade	Mutation	GR ( $10^{12}/l$ )	HB (g/dl)	VGM (fl)	HT (%)	CCMH (%)	TCMH (pg)
Cas n°:1	CD39/CD39	3.17	7	73	23	30.4	22.2

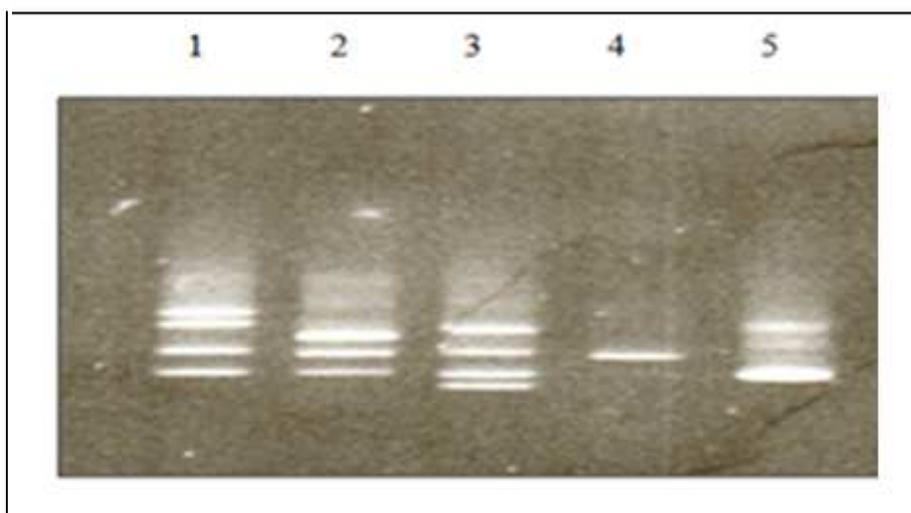


**Figure 28:** Généalogie du cas n°:1

➤ **Résultats moléculaires:**

Lors de l'exploration moléculaire du fragment PsoB1/G2, nous avons testé les ADN des témoins hétérozygotes pour différentes mutations connues (Figure 29; piste : 1, 2, 3) et l'ADN du propositus (piste: 4) avec un témoin normal (piste: 5). L'ADN de ce sujet se caractérise par un profil avec une seule bande homozygote à la même position d'homoduplex muté pour la mutation : codon 39 C→T. Ceci nous permet de conclure que le patient est homozygote pour la mutation codon 39 (génotype CD39/CD39).

## Résultats



**Figure 29:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°1) ;(1-Témoin: IVS-I- nuc 110/N, 2- Témoin: CD39/N, 3- Témoin IVS1 nuc 6 /N, 4- homozygote muté CD39/CD39, 5- Témoin normal).

### ❖ Cas N°:2

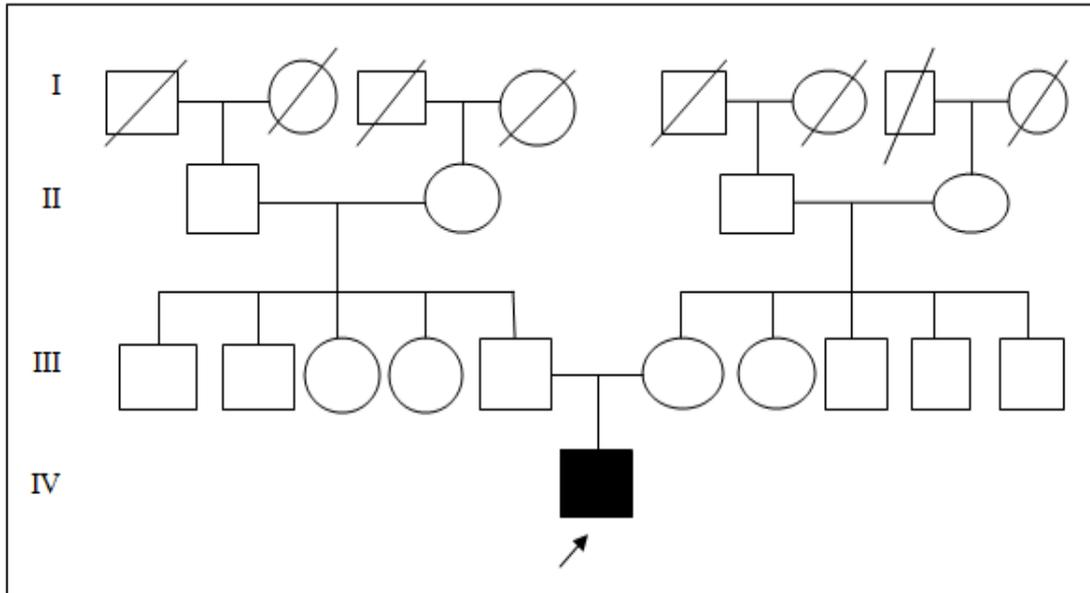
Hétérozygote composite; une substitution sur IVS1 nucléotide 110 G→A sur un allèle et une autre substitution sur l'exon 2 en position codon 39 C→T sur l'autre allèle.

#### ➤ *Présentation du cas:*

Il s'agit d'un patient de sexe masculin âgé de 4 mois originaire de Constantine. A cet âge il a commencé de présenter une anémie aigue. L'électrophorèse de l'Hb n'a pas confirmé le phénotype  $\beta$ -thalassémie, car le patient été transfusé avant de réaliser l'électrophorèse d'Hb. Leurs parents se caractérisent par un phénotype  $\beta$ -thalassémie hétérozygote. Le tableau XII résume leurs données hématologiques.

**Tableau XII:** Données hématologiques du cas n°:2.

Malade	Age-Sexe	Mutation	Hb	HT	VCM	TCMH	CCMH
Cas n°:2	M- 4 mois	IVS-1 nuc 110/CD39	5.2	18	69	19.9	28.9

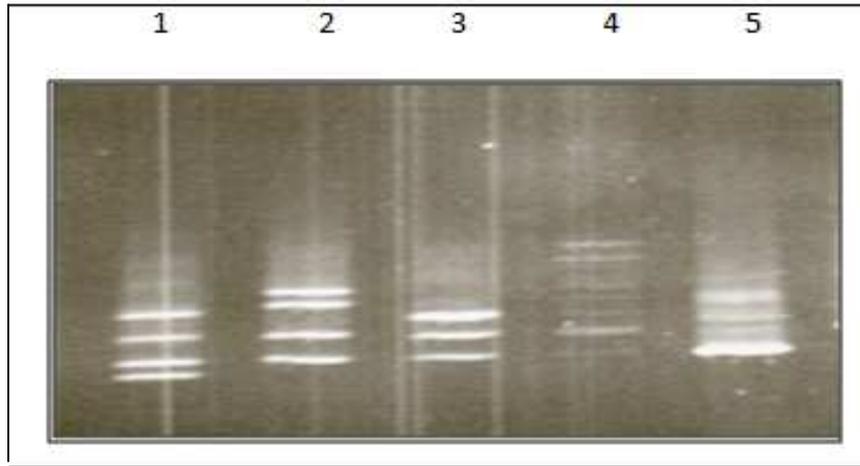


**Figure 30** : Généalogie du cas n°2

➤ **Résultats moléculaires:**

L'analyse de l'ADN de cet enfant par DGGE dans le domaine PsoB1/G2 a permis d'identifier la présence de deux mutations différentes, une mutation du **codon 39 C→T** sur un allèle et une autre mutation **IVS-1 nuc 110 G→A** sur l'autre allèle. Son profil sur le gel présente 3 bandes (figure 31, piste :4). Les deux bandes homoduplex mutés sont superposés l'une sur l'autre. L'une des deux bandes a migré à la même position que l'homoduplex muté de témoin hétérozygote pour la mutation IVS-1 nuc 110 (figure 31, piste: 2) et la deuxième a migré à la même position de l'homoduplex muté du témoin hétérozygote pour la mutation Codon 39 (figure 31: piste 3). Les deux hétéroduplex ont des positions différentes que celles des témoins hétérozygotes simples. Ceci nous permet de conclure que ce patient est atteint d'une  $\beta$ -thalassémie homozygote d'un génotype hétérozygote pour deux mutations (**IVS-1 nuc 110 G→A/CD 39 C→T**).

## Résultats



**Figure 31:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°2) ; (1-Témoin IVS 1 nuc 6 /N, 2- Témoin nuc 110/N, 3- Témoin CD39 /N, 4- Double hétérozygote CD 39/ IVS1 nuc 110, 5- TN).

### ❖ Cas N°:3

Double hétérozygote pour une substitution d'un T→C sur l'intron I en position nucléotide 6, et la deuxième mutation est sur le codon 39 C→T.

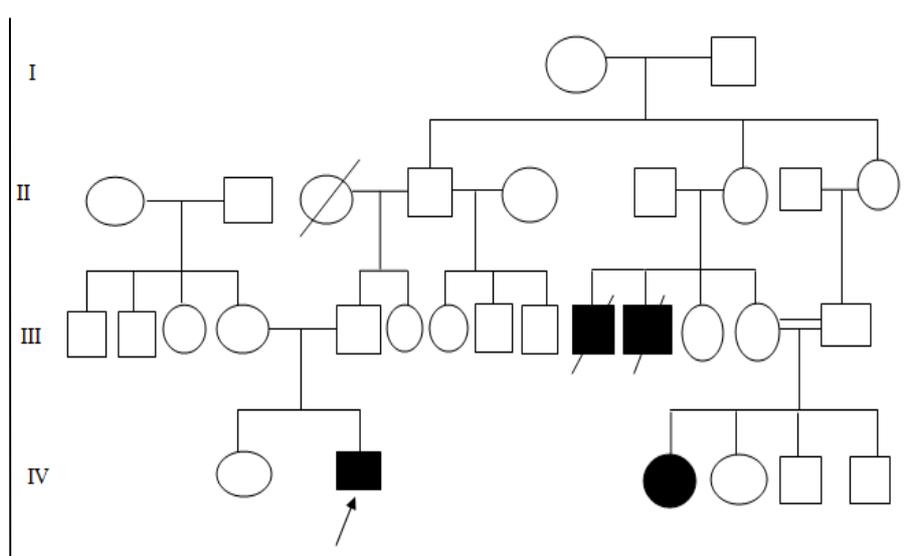
#### ➤ *Présentation du cas :*

Il s'agit d'un patient de sexe masculin âgé de 6 ans originaire de Skikda, qui présente une  $\beta$ -thalassémie homozygote avec un phénotype intermédiaire. Il a été diagnostiqué à l'âge de 6 mois. Le profil en électrophorèse montre la présence de 45% d'Hb A1, 7% d'Hb A2 et 47% d'Hb F. Les deux parents se caractérisent par un phénotype  $\beta$ -thalassémie hétérozygote. L'ensemble des paramètres hématologiques de ce patient est donné dans le tableau XIII.

**Tableau XIII:** Paramètres hématologique du cas n°:3.

Malade	Age- Sexe	Mutation	GR 10 <sup>12</sup> /l	Hb g/dl	HT %	VGM fl	TCMH pg	CCMH %	Régime transfusionnel
Cas n°:3	M- 6 ans	IVS-1 nuc 110/CD39	3.07	6.7	19.4	63	21.7	34.4	3 semaines

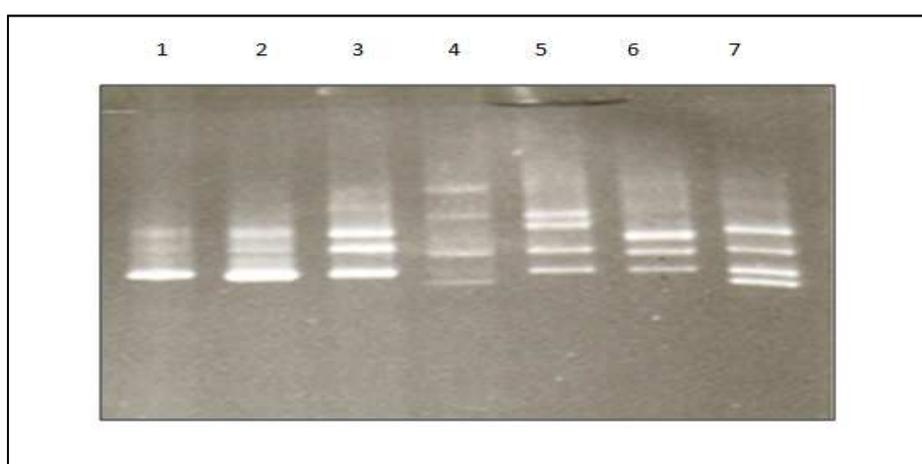
## Résultats



**Figure 32 :** Généalogie du cas n°3

### ➤ Résultats moléculaire:

L'exploration moléculaire du fragment PsoB1/G2 par DGGE, nous a permis d'identifier la présence de deux mutations différentes sur les deux allèles. Le profil électrophorétique de ce sujet présente 4 bandes horizontales (figure 33: piste 4), deux bandes homoduplex et deux bandes hétéroduplex. La bande la plus lointe sur le gel représente l'homoduplex muté pour la mutation **IVS-1 nuc 6 T→C** (figure 33: piste 7), et la bande suivante représente l'homoduplex muté pour la mutation **codon 39 C→T** (figure 33, piste 6). Nous avons conclu que cet enfant est doublement hétérozygote pour un génotype **IVS-1 nuc 6 /CD39**.



**Figure 33:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°:3); (1- *Témoin Normal*, 2- *Homozygote muté [mutation inconnue]*, 3- *2+ TN*, 4- *Double hétérozygote IVS1 nuc 6/ CD39*, 5- *Témoin nuc 110/N*, 6-*Témoin CD39 /N*, 7-*Témoin IVS 1 nuc 6 /N*).

## Résultats

### ❖ Cas N°4:

Double hétérozygote ; une mutation drépanocytaire **codon 6 A→T** sur un allèle et une mutation  $\beta$ -thalassémique du **codon 39 C→T** sur l'autre allèle, cet analyse a été réalisé par 2 techniques complémentaire DGGE et RFLP.

#### ➤ *Présentation du cas:*

Il s'agit d'une jeune fille âgé de 14 ans, originaire de Mila qui présente une  $\beta^0$ - thalasso-drépanocytaire (un phénotype composite), diagnostiquée à l'âge 2 ans. Le profil en électrophorèse d'Hb montre l'absence des traces d'Hb A1 indiquant une  $\beta^0$ -thalassémie, montre aussi la présence de 50% d'Hb F et 50% d'Hb S qui indique le phénotype drépanocytaire. Le père possédé un phénotype de drépanocytose hétérozygote alors que la mère est de  $\beta$ - thalassémique hétérozygote.

**Tableau XIV:** Données hématologique du cas n°4:

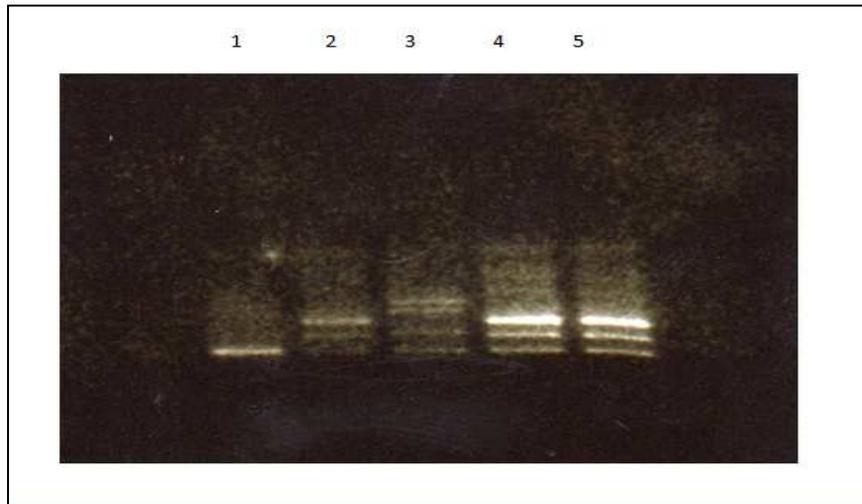
Malade	Sexe-âge	Mutation	GR (1012/l)	Hb (g/dl)	HT (%)	VGM (fl)
Cas n°4	F-14 ans	CD6/CD39	2.07	6.9	17.2	62.4

#### ➤ *Résultats moléculaires*

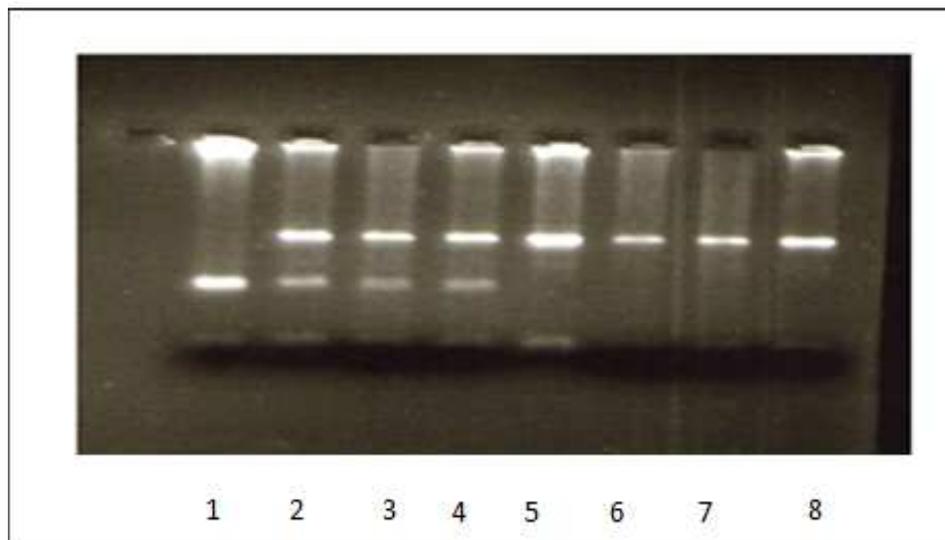
La recherche de mutations par DGGE directe (sans digestion) dans le domaine PsoB1/G1 (fragment I) donne un profil hétérozygote simple pour la mutation codon 39 C→T (figure 37, piste: 5). L'exploration de l'ADN de ce sujet par digestion enzymatique utilisant l'enzyme de restriction Eco 81 confirme la présence de la mutation drépanocytaire codon 6 A→T (figure 38, piste:4).

Ceci nous a permis de conclure que cet individu est doublement hétérozygote composite son génotype est: CD 6 A→T/CD 39 C→T.

## Résultats



**Figure 37:** Migration électrophorétique des ADN amplifiés dans le domaine PsoB1/G2 (cas n°:4); (1- TN, 2- Témoin CD39/N, 3- Témoin IVS 1 nuc 110/N, 4 et 5- Hétérozygotes simple CD 39)



**Figure 38:** Profil électrophorétique sur gel d'agarose des produits d'ADN digérés par Eco 81;  
- 1: Témoin normal  
- 2, 3, 4: hétérozygotes S/A  
- 5, 6, 7,8: Homozygotes S/S

### 1. La DGGE:

La capacité d'effectuer une analyse rapide de l'ADN pour la caractérisation du génotype est devenue une exigence de plus en plus importante pour le laboratoire en vue du diagnostic clinique. Actuellement, une grande variété de méthodes existe pour détecter des mutations ponctuelles sur une molécule d'ADN.

Dans les années 1980, la technique du Southern-blot a permis la détermination des polymorphismes des fragments de longueurs de restriction (RFLP) en utilisant la relation préférentielle entre les haplotypes et les mutations. Mais ce sont des techniques lourdes (utilisent beaucoup de radioactivité), lente, coûteuses et nécessitant beaucoup d'ADN génomique. De nos jours, la mise au point de la PCR a permis de fixer des stratégies diagnostiques plus rapides, plus spécifiques et n'utilisant qu'une très faible quantité d'ADN (Laradi *et al.*, 2000)

L'analyse par DGGE s'est avère être un outil très performant dans la détection des mutations ponctuelles. Cette technique tend à supplanter les méthodes jusqu'alors employées comme les oligonucléotides spécifiques d'allèles (ASO), la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) délicates à mettre en œuvre et détecte un nombre restreint des mutations par rapport au DGGE (correspondant aux plus fréquentes) ont pu être individualisées (Fernandez *et al.*, 1993). Des alternatives existent telles la technique du reverse dot-blot (Sutcharitchan *et al.*, 1995) où un même ADN est testé avec plusieurs ASO et la méthode des sondes froides type digoxine (Efremov *et al.*, 1991). Mais le prix de revient élevé de ces méthodes, le choix plus ou moins empirique des sondes utilisées et les conditions opérationnelles difficilement maîtrisables font que cette imprécision est peu acceptable dans le cadre d'un diagnostic moléculaire de routine (Laradi *et al.*, 2000).

Une étude comparative entre certains procédés d'analyse moléculaire avec la DGGE a montré que la technique des RFLP exige une étude familiale préalable et ne permet que la détermination d'un nombre limité de défauts moléculaires (Laradi *et al.*, 2000). En revanche, l'analyse par l'étude des polymorphismes conformationnels simple brin (SSCP) ou sa variante SSCP-ARN et l'analyse des hétéroduplex détectent 80 à 90% des mutations de la fraction du gène exploré. La taille des fragments à analyser est de 300 à 400 pb pour la SSCP et de 100 à 300 pb pour l'analyse des hétéroduplex (Bogard, Lamoril., 1998). Par ailleurs, la difficulté d'interprétation de certains profils de migration et le moindre pourcentage de détection

## Discussion

---

comparé à celui de la DGGE (80% *versus* 95%) limitent leur utilisation bien que leur prix de revient soit acceptable.

Nous avons choisis le procédé de la DGGE pour détecter les défauts moléculaires chez la population de nos patients. Le choix de cette technique a été conforté par l'importante hétérogénéité moléculaire de l'Est Algérien.

Les concepteurs de l'analyse DGGE (Myers *et al.*, 1985) travaillaient sur des fragments d'ADN clonés qu'il révélaient avec une sonde marquée. Pour être analysables, ces fragments devaient naturellement posséder un domaine de faible  $T_m$  recélant la mutation. Ces restrictions cantonnaient la technique à la recherche fondamentale. Les développements de la PCR ont conduit à travailler avec de faibles quantités d'ADN matrice (jusqu'à 5 ng), réduisant corrélativement le volume de prélèvement biologique. La maîtrise technique de la PCR diminue le taux d'erreur d'incorporation (environ 0.25% en 30 cycles), augmente son rendement et évite l'apparition de contaminations. Elle permet de générer des hétéroduplex par association des allèles différents à la base du principe de la technique DGGE.

L'invention du GC clamp en 1989 (Sheffield *et al*) a introduit une grande souplesse dans l'utilisation de l'analyse DGGE. Il réside dans l'addition de séquences riches en GC à l'extrémité 5' des produits d'amplification. En effet, par un choix judicieux d'amorces, chaque gène peut être segmenté en autant de fragments devenus analysables parce qu'un domaine de faible  $T_m$  a été créé alors qu'il n'existait pas naturellement. La méthode est efficace mais augmente considérablement le coût des amorces. L'utilisation des clamps chimiques (molécules dérivées du psoralène) à la place des GC clamps constitue une alternative intéressante à cette contrainte budgétaire car elle permet de diminuer le prix de revient d'une analyse au cinquième tout en conservant la simplicité de mise en œuvre de la méthode. En fonction du choix des amorces, cette alternative permet d'identifier un grand nombre de mutations, et en particulier les mutations méditerranéennes les plus fréquentes. Ainsi, une seule amplification (un seul couple d'amorces: PsoB1/G2) permet la recherche de la majorité des lésions beta-thalassémiques maghrébines. Deux enzymes de restriction permettent de poursuivre l'exploration des autres domaines.

La stratégie de l'expérimentateur est orientée par l'emploi des programmes informatiques mis au point en 1987 (Lerman *et al*). La carte de fusion (programme

## Discussion

---

MELMAP) définit les domaines et leur  $T_m$  au sein du fragment. Elle précise la composition du gradient de dénaturant à utiliser. La modélisation (programme SQHTX) prévoit le comportement du fragment au cours de la migration électrophorétique dans le gel dénaturant. L'expérimentateur sur la base de ces informations peut néanmoins modifier certains paramètres en vue d'affiner la qualité du résultat.

Cette technique est sans danger, facilement réalisable et transposable. La sensibilité de détection de mutation est supérieure à 95% et la taille des fragments à analyser peut atteindre 500 pb (Bogard, Lamoril., 1998). La DGGE est relativement rapide (48h) (résultats souvent obtenus après une seule électrophorèse). Il n'y a pas d'utilisation d'isotopes radioactifs (diminuant ainsi le prix de revient et la toxicité de la manipulation). Peu d'enzymes de restriction sont utilisées.

La reproductibilité des résultats permet la caractérisation des mutations à la seule vue du profil obtenu sur le gel par rapport à des profils témoins de mutations connues. En cas d'une mutation homozygote, une seule bande d'ADN anormal a été généralement observées. Lorsque le segment d'ADN est hétérozygote pour une mutation ou double hétérozygote pour deux mutations différentes, deux homoduplex et deux hétéroduplex ont été révélés (Cai et Kan., 1990). Parfois, les homoduplex ou les hétéroduplex se chevauchent, et seulement trois bandes ont été observées. Même lorsque les différences entre les homoduplex étaient petites ou absentes, les hétéroduplex sont suffisamment caractéristiques pour permettre de différencier les mutations entre eux. Quand un homoduplex d'individu mutant migre à la même position d'un homoduplex d'individu normal, où l'état homozygote normal et celui de l'homozygote anormal est difficilement à distinguer, il nécessite de créer un mélange artificiel entre deux quantités d'ADN égales avant l'amplification (ADN normal+ ADN mutant). La migration sur le gel DGGE révèle un profil avec une seule bande pour l'individu normal, tandis que le profil de l'individu affecté montre l'appariation des bandes hétérozygotes supplémentaire.

La taille des fragments demeure la limite de l'analyse DGGE. Au dessus de 1000 paires de bases les fragments migrent lentement dans le gel de polyacrilamide; la séparation entre les types mutant et sauvage diminue. Cet obstacle est généralement contourné par l'emploi de plusieurs couples d'amorces qui délimitent chacun une portion du gène sur sa longueur (Fernandez *et al.*, 1993).

## Discussion

---

L'électrophorèse sur un gel de gradient dénaturant a l'avantage de découvrir des nouvelles mutations, parce que toutes les bandes qui ont des profils de migration atypiques en DGGE c'est-à-dire ne correspondant pas aux profils des témoins normaux et mutés utilisés (préalablement séquencés) pourraient être isolés du gel et détectés la mutation présente par un séquençage directe. L'analyse se fait par séquençage direct des simples brins amplifiés selon la méthode des didésoxyribonucléotides (Addour, 2008).

Récemment, certaines modifications ont été appliquées sur la DGGE, pour rendre cette technique plus facile à réaliser et plus reproductible dans le diagnostic moléculaire de routine. L'une de ces techniques est une électrophorèse sur un gel de température temporelle (TTGE) qui utilise un gradient de température temporelle au lieu du gradient chimique utilisée dans la DGGE. La TTGE a été utilisé avec succès pour la détection des mutations de la mucoviscidose et les gènes mitochondriaux. (Ramachandran *et al.*, 2003)

### 2. l'analyse moléculaire :

Les  $\beta$ -thalassémie en Algérie, constituent de par leur fréquence et de leur gravité un problème de santé publique, essentiellement dans la prise en charge transfusionnelle (Addour 2008). Selon Lemsaddek *et al.*, 2003, la prévalence de l'allèle  $\beta$ -thalassémique en Afrique du Nord, serait en augmentation de l'Ouest à l'Est des pays Méditerranéens (Maroc 0.94%, l'Algérie 1.4%, la Tunisie 3% et l'Egypte 4.5%. En Espagne la prévalence de la  $\beta$ -thalassémie est variée entre 0.4 et 5% dans les différentes régions (Barragan *et al.*, 2006). En Turquie est de 2.1% (Tadmouri and Basak, 2001).

Bien que les défauts moléculaires à l'origine de cette pathologie soit d'une extrême diversité, chaque population se caractérise par un groupe de 4 à 5 mutations qui lui est spécifique. Ces défauts moléculaires lorsqu'ils sont caractérisés sont ceux à rechercher en premier dans le cadre d'un diagnostic moléculaire et éventuellement un diagnostic anténatal.

Dans cette étude, nous avons pu identifier 5 défauts moléculaires de la  $\beta$ -thalassémie sur 47 chromosomes: codon non sens 39 (C→T), la substitution IVS-I-110 (G→A), IVS-I-5 (G→A), la mutation framshift codon 8 (-AA), et IVS-I-6 (T→C). Ces différentes mutations ont été déjà décrites dans la population Algérienne. (Addour *et al.*, 2009; Bennani *et al.*, 1994). Les deux mutations codon 39 et IVS-I-110 sont retrouvés à égale fréquence, représentent 80% des allèles  $\beta$ -thalassémique retrouvés dans notre étude.

Notre étude associée aux travaux antérieurs montre la grande hétérogénéité des défauts moléculaires à l'origine des  $\beta$ -thalassémie en Algérie. Le nombre de mutations  $\beta$ -thalassémique en Algérie est de 25 mutations (voir Tableau 3: Annexe 1), quatre mutations ont été récemment décrites en Algérie (Addour 2008) dont trois pour la première fois en Afrique du Nord. Il s'agit de la mutation -90 C→T dans la boîte CACCC proximale du promoteur du gène  $\beta$  globine, la seconde correspond à une substitution T→G en position 128 du premier intron, la troisième est une transversion dans le signal de polyadénylation A→G, la dernière décrite récemment en Tunisie, est une insertion d'une base +A dans le codon 47 au niveau du deuxième exon.

D'autre part, la population Algérienne se caractérise par quatre mutations prédominantes, qui représentent plus de 80% des allèles  $\beta$ -thalassémiques. Ce sont la

## Discussion

---

mutation codon non sens 39 C→T; la substitution IVS-I-110 G→A; le framshift du codon 6 (-A) et la mutation IVS-I-1 G→A.

Une question se pose, comment les données historiques et géographiques pourraient expliquer cette remarquable diversité moléculaire qui a été généralement limitée au mouvement d'immigration caractéristique de la grande métropole. L'Algérie est située au point de rencontre de deux continents et se présente comme un carrefour entre l'Afrique et l'Europe, et elle a subi plusieurs colonisations: les Phéniciens, les Romains, les Arabes, les Turques et plus récemment les français, et un mélange constitué par la population d'Afrique subsaharienne par les voies des caravanes. Ces occupations étaient souvent permanentes pendant des siècles favorisant un mélange important des populations (Lapie *et al.*, 1995).

L'hétérogénéité moléculaire des  $\beta$ -thalassémie en Algérie semble être une caractéristique commune des pays de l'Afrique du Nord et de la Méditerranée (Lapie *et al.*, 1995), elle est retrouvée en Tunisie avec 24 différentes mutations (Fattoum *et al.*, 2004; Chouk *et al.*, 2004) et au Maroc 21 différentes mutations (Lamsaddak *et al.*, 2004) avec néanmoins des différences dans la fréquence des mutations prédominantes et la nature des mutations rares (Tableau 3: Annexe 2). Le même niveau d'hétérogénéité est observé en Egypte (20 mutations) (Henderson *et al.*, 2009) et le Liban (18 mutations) (Makhoul *et al.*, 2005), mais le niveau le plus élevé de la variabilité génétiques des allèles  $\beta$ -thalassémique est observé en Turquie (45 mutations) (Tadmouri and Basak ., 2001). Une étude Britannique (Henderson *et al.*, 2009) avait un but de mettre à jour les données sur l'incidence des mutations  $\beta$ -thalassémiques dans diverses populations, a montré que la population Britannique se caractérise par 68 mutations  $\beta$ -thalassémique présentant la population la plus hétérogène par rapport au pays d'Europe du Nord, suivie pas le Danemark avec 40 différentes mutation, Pays-Bas (37 mutations), l'Allemagne (19 mutation) (tableau 4: Annexe 2).

La mutation codon non sens 39 (C→T) est très répandue en Algérie; 25.94% (Addour *et al.*, 2009), 27.6% (Bennani *et al.*, 1994) et elle est plus fréquente à l'ouest puis décroît au centre pour être prépondérante à l'est (Bouhass *et al.*, 1993). Dans notre étude cette mutation représente 40% des allèles bêta thalassémiques. Elle est majoritaire en Sardaigne (95.7%), en Espagne (35.5%), et en Italie (41%) (Henderson *et al.*, 2009). Elle est aussi fréquente en Portugal (19 %) (Cabeda *et al.*, 1999) et au Grèce (18.8%). Sa distribution en Algérie est en relation avec la présence des Romain qui a duré pendant plus de cinq siècles en Afrique du Nord avec ses deux principaux pôles d'entrée, l'Espagne de l'ouest et l'Italie à l'est. Au Maroc,

## Discussion

---

elle représente la mutation la plus fréquente (26.2%) (Lemsaddek *et al.*, 2004). Dans la population tunisienne deux séries de travaux ont permis de retrouver respectivement une fréquence de 48.6% (Fattoum *et al.*, 2003) et de 48.76% (Laradi *et al.*, 2000), ce qui s'expliquerait, dans ce cas particulier par les contacts plus étroits de cette population avec l'Italie. Cependant, cette mutation atteint également une fréquence élevée dans certains pays de la péninsule arabique: 25% en Arabie Saoudi (Al-Sultan *et al.*, 2011), et au Bahrin (24%) (Jiffri *et al.*, 2010).

La mutation IVS-I-110 retrouvé en Turquie (Perrin *et al.*, 1998), représente 40% des allèles bêta- thalassémique dans notre étude, elle est prédominante au centre de l'Algérie et se trouve à une faible fréquence à l'ouest (16%) (Bennani *et al.*, 1994). Sa distribution concorde avec l'étendue de l'empire Ottoman entre 16<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> siècle. En Tunisie, elle est de (21%) (Fattoum *et al.*, 2003) et en Egypte (26%) (Jiffri *et al.*, 2010). Elle est rare au Maroc (3.2%) (Lemsaddek *et al.*, 2004), les turques n'ayant jamais occupé le Maroc, mais atteint une faible fréquence dans les pays du Golf (0-0.2%) (Baysal, 2003; Al-Sultan *et al.*, 2011). D'autre part, la mutation IVS-I-110 est sous -représenté dans la partie occidentale du bassin de la Méditerranées, comme l'Espagne (10.2%) et le Portugal (11.5%) (Henderson *et al.*, 2009).

La mutation IVS-I-5(G→A) a été observée sur 4 chromosomes avec une fréquence minoritaire (9%). Bennani *et al.*, 1994 ont identifiés cette mutation pour la première fois en Algérie chez une grande famille (0.9%) associée avec un haplotype rare. Elle est présente avec des taux faibles en Tunisie (1.5%) (Fattoum *et al.*, 2003) en Italie (0.1%), en Turquie (0.1%) et avec des taux important au Bengladesh (10%) et la Guadeloupe (18.3%) (Henderson *et al.*, 2009).

La mutation framshift codon 8 (-AA) a été identifié en état homozygote chez deux sœurs avec un phénotype  $\beta^0$ -thalassémie majeur représentant (9%) des allèles  $\beta$ -thalassémique identifiés. Cette mutation a été déjà décrite en Algérie (0.94%) (Addour *et al.*, 2009) sur deux chromosomes indépendants associés respectivement avec le framshift codon 6 (-A) et la substitution (G→A) en IVS-I-110. Elle est aussi décrite en Turquie (4.9%) (Ince *et al.*, 2003), en Tunisie (0.2%) (Fattoum *et al.*, 2003), au Liban (2.5%) (Makhoul *et al.*, 2004), et récemment observée au Maroc avec une fréquence significative (9.6%) (Lamsaddak *et al.*, 2004).

## Discussion

---

La substitution T→C en IVS-I-6 décrite comme une mutation commune dans le bassin Méditerranéenne, est rare en Algérie (3.3%). Elle a été trouvée que dans des cas sporadique (Bennani *et al.*, 1994). Dans notre étude, cette mutation a été identifiée sur un seul chromosome (2%) associée avec la mutation codon 39 (C→T). Addour en 2008, a montré que l'allèle IVS-I-6 est retrouvé à une fréquence de (6%) chez des patients tous originaires de Médéa. Elle est présente avec des taux élevés au Maroc 13.7% (Lamsaddak *et al.*, 2004), en Sicile (32%) (Billis *et al.*, 2001), au Portugal (19%) (Cadeba *et al.*, 1999), en Italie (10%) (Hendreson *et al.*, 2009) et en Espagne (8.4%) (Villegas *et al.*, 2001), mais elle est majoritaire à Malte (71.4%). Sa fréquence est aussi importante dans la partie orientale de la méditerranée, en Egypte (36.3%) (Gawhary *et al.*, 2007), et au Liban (14.4%) (Makhoul *et al.*, 2005) où 74.6% des allèles sont à l'état homozygote. Une étude récente en Palestine (El-Latif *et al.*, 2002) a montré que cet allèle est plus fréquent (48.5%) et que 50% des allèles analysés porte la mutation IVS-I-6 à l'état homozygote. Cette situation particulière serait largement expliquée par le contexte actuel de cette région.

Dans notre étude nous avons trouvé que 12 chromosomes présentent des mutations qui n'ont pas été révélées par notre technique et qui pourraient correspondre à des mutations dans d'autres régions, qu'il serait intéressant d'explorées.

La proportion d'homozygote pour la même mutation est prédominante (62%), face à un taux faible d'hétérozygote composite (38%). Cette homozygotie est observée pour les mutations prédominantes et pour les mutations rares, elle est expliquée par le taux élevé de la consanguinité (61%). Cette situation a été déjà trouvée en Algérie (Addour. 2008; Bennani *et al.*, 1994) et aussi en Tunisie avec un taux élevé d'homozygotie (80.5%) dont la consanguinité est de (33%) (Fattoum *et al.*, 2004). En Egypte, l'homozygotie représente (43%), où (80%) des allèles IVS-I-110 sont à l'état homozygote et la consanguinité atteint (40%) dans certaines communautés (Jiffri *et al.*, 2011). La consanguinité est plus importante dans les pays des Golf Arabe, où elle dépasse (50%) (Jiffri *et al.*, 2011) et Liban (59.50%) (Makhoul *et al.*, 2005). Billis *et al.*, 2001 ont montré dans une étude comparative des structure génétiques de la population Algérienne et Sicilienne, une différence significatives des taux d'homozygotie liée étroitement aux niveaux de consanguinité dans ces deux pays. La proportion de génotypes homozygotes est de (15%) en Sicile et d'environ (60%) en Algérie; ces différences d'homozygoties s'expliquent par les niveaux de consanguinité relevés dans ces deux pays: (5%) en Sicile contre 30 à 32% en Algérie.

## Discussion

---

Il semble alors intéressant tant du point de vue médical que du point de vue anthropologique de comparer les résultats obtenus avec différentes séries effectuées sur des populations méditerranéennes. Le contexte historique et géographique de l'Algérie focalise l'attention sur la comparaison des peuples avec lesquels les contacts ont été prolongés. Le tableau XV résume les résultats de ces différentes séries pour les mutations prédominantes et met en relief similitudes et différences. La Sicile présente de fortes similitudes probablement parce qu'elle est plus proche de l'Afrique du Nord (Billis *et al.*, 2001). La distribution des mutations Codon 39 et IVS-I-110 le long du bassin Méditerranéen suit des gradients totalement opposés strictement liés à l'entendue des empires Romains et Ottoman. Leur fréquence égale en Algérie est donc doublement expliquée tant du point de vue historique et géographique (Addour., 2008).

Dans notre études, on trouve que le taux des mutations codon 39 (40%) et IVS-I-110 (40%) est très important et s'approche à l'Italie pour la mutation codon 39 et à la Turquie pour la mutation IVS-I-110. Ceci peut être expliqué par le nombre retreint des chromosomes étudiés (59 chromosomes) ou par la différence régionale ou ethnique de nos patients par rapport aux autres études.

## Discussion

**Tableau XV:** Fréquence allélique (%) dans les pays du bassin Méditerranéen des cinq mutations prédominantes.

Mutation	Maroc	Portugal	Espagne	Algérie	Algérie	Tunisie	Sicile	Italie	Turquie	Liban	Grèce	Chypre
CD 39	26.2	33	31.2	25.94	40	49.0	27	41.0	3.7	0.2	18.8	2.5
IVS-I-110	3.2	10	8.1	25.47	40	21.0	25	23.5	42.2	34.2	42.1	78.4
CD 6	13.3	8	0.3	12.73	-	2.6	-	1.2	0.5	-	1.7	0.1
IVS-I-1	8.5	22	29.5	8.96	-	4.5	2.8	10.4	4.5	15.0	12.8	6.0
IVS-I-6	13.9	17	8.4	6.13	2	0.6	32	10.1	10	14.4	8.1	6.4
Total	65.1	90	77.5	79.23	82	77.7	86.8	86.1	60.9	63.8	83.5	93.4
Autre et non identifiés	34.9	10	22.5	20.77	18	22.3	13.2	23.9	39.1	36.2	16.5	6.6
Référence	(a)	(b)	(c)	(d)	notre étude	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(j)	(g)

a) Lemsaddek *et al.*, 2004; b) Cadeba *et al.*, 1999; c) Villegas *et al.*, 2001; d) Addour *et al.* 2009; e) Fattoum *et al.*, 2003; f) Billis *et al.*, 2001; g) Henderson *et al.*, 2009; h) Ince *et al.*, 2003; i) Makhoul *et al.*, 2005; j) Boussiou *et al.*, 2008.

## Conclusion et perspectives

---

Au cours de cette étude nous avons développé la technique de screening moléculaire DGGE, pour la recherche des mutations chez les sujets atteints de la  $\beta$ -thalassémie et de la drépanocytose.

Cette technique demeure couteuse mais fiable, simple car sans danger et facilement transposable. Elle pourrait être aussi applicable à la détection et au diagnostic moléculaire d'autres maladies génétiques, sa sensibilité est très grande puisqu'on considère que 95% des mutations peuvent être détectées par cette technique.

Sur le plan de stratégie moléculaire, l'utilisation de la DGGE a permis de mettre un diagnostic moléculaire de routine pour la recherche des différentes mutations chez les  $\beta$ -thalassémiques dans notre laboratoire. Les résultats moléculaires complètent l'exploration phénotypique (FNS, électrophorèse de l' Hb, dosage de l'Hb A2) et seront utilisés en cas de demande de conseil génétique ou de diagnostic prénatal.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus a permis d'affirmer la variété génotypique ainsi que la variété phénotypique des  $\beta$ -thalassémies et argumente l'utilisation de la méthode PCR-DGGE dans la caractérisation de mutations ponctuelles responsables de nombreuses affections héréditaires.

Nos résultats ont contribué à caractériser la composante génétique de la population de l'Est Algérien, et démontrer les mutations prédominantes qui pourraient être recherchées en premier lieu dans le cas d'un diagnostic moléculaire.

Des études complémentaires sont nécessaires pour améliorer cette étude sur le diagnostic des  $\beta$ -thalassémies comme le séquençage d'ADN.

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la santé publique Algérienne et de la recherche, on propose dans les études ultérieures de :

- Augmenter le nombre d'échantillon de notre population et faire une étude génétique des différentes populations à l'échelle nationale pour compléter le spectre de la répartition des allèles  $\beta$ -thalassémiques en Algérie.
- Séquencer les mutations inconnues et qui ne sont pas détectées par la DGGE.
- Retracer l'histoire et l'origine génétique de nos populations par l'identification de leurs haplotypes sur le gène  $\beta$ -globine.

## Conclusion et perspectives

---

- Elaborer des modèles de prédiction Génotype/phénotype afin d'évaluer l'impact de la nature de l'anomalie moléculaire du gène  $\beta$ -globine sur la présentation du tableau clinique.
- Faire une analyse des mécanismes génétiques d'atténuation de la sévérité clinique des  $\beta$ -thalassémie, comme le polymorphisme -158 C→T du gène  $G\gamma$  et le silencer (AT) x (T)y en 5' de gène  $\beta$ -globine, a pour but de caractériser des marqueurs de pronostic de la sévérité clinique ainsi que l'identification de nouvelles thérapeutiques.

## Résumé:

Les hémoglobinopathies, principalement constituées par les thalassémies et drépanocytose, sont des affections héréditaires. Le diagnostic des thalassémies et de la drépanocytose requièrent la caractérisation de l'anomalie portée par le gène atteint. Les techniques mises au point sont différentes selon la nature du défaut moléculaire. Au cours de ce travail, nous avons étudié 64 allèles  $\beta$ -thalassémiques appartenant à 32 patients par l'électrophorèse sur un gel de gradient dénaturant (DGGE) utilisant des clamps chimiques de psoralène. Cette technique est sensible, fiable, relativement rapide, et n'utilise pas de radioactivité. La stratégie utilisée a permis de caractériser 80% des chromosomes étudiés et de retrouver 5 mutations différentes. Deux mutations sont prédominantes et représentent 80% des allèles étudiés: il s'agit de la mutation IVS-I-110 G→A (40%), codon non sens 39 C→T (40%). Deux rares mutations ont été observés avec des fréquences identiques (9%) : il s'agit de la framshift du codon 8 (-AA) et la substitution IVS-I-5 (G→A). La mutation IVS-I-6 T→C a été trouvée avec une fréquence minoritaire 2 %. Pour caractériser la drépanocytose et confirmer le diagnostic, nous avons employé la technique de PCR digestion, par l'identification du défaut moléculaire (codon 6 A→T).

**Mots clés :** Thalassémie- Drépanocytose- Mutation- DGGE.

## Abstract:

Hemoglobinopathies mainly constituted by the thalassemia and sickle cell anemia are hereditary disorders. The diagnosis of thalassemia and sickle cell anemia require the characterization of the gene carried by the anomaly reached. The techniques developed are different depending on the nature of the molecular defect. In this work, we studied 64  $\beta$ -thalassemia alleles in 32 patients by electrophoresis on a denaturing gradient gel (DGGE) using chemical clamps psoralen. This technique is sensitive, reliable, relatively fast, and does not use radioactivity. The strategy used allowed us to characterize 80% of chromosomes examined and found five different mutations. Two mutations are predominant and accounted for 80% of alleles studied: it is the mutation IVS-I-110 G → A (40%), non sense codon 39 C → T (40%). Two rare mutations were observed with similar frequency (9%): it is the framshift codon 8(-AA) and the substitution IVS-I-5 (G → A). Mutation IVS-I-6 T → C was found with a frequency minority (2%). To characterize sickle cell disease and confirm the diagnosis, we used the PCR digestion, by identifying the molecular defect (codon 6 A → T).

**Keywords:** Thalassemia, Sickle Cell Disease, Mutation, DGGE.

## ملخص:

أمراض خضاب الدم التي تتكون أساسا من الطلاسيميا وفقر الدم المنجلي هي عبارة عن أمراض وراثية و التشخيص الجزيئي لهذه الامراض يتطلب وصف الوضع الشاذ على المورثة المصابة. التقنيات المستعملة لهذا التشخيص تختلف تبعا لطبيعة الخلل الجزيئي تناولت هذه الدراسة تمييز الطفرات الوراثية  $\beta$ -thalassémique وذلك في 64 صبغي باستخدام تقنية PCR-DGGE المؤهلة بمشابك كيميائية من البسورالين Psoralène. هذه التقنية حساسة، موثوقة وسريعة نسبيا ولا تستخدم النشاط الإشعاعي. الإستراتيجية المستخدمة سمحت بوصف 80% من الصبغيات المدروسة و اكتشاف وجود خمس طفرات مختلفة في العينة المدروسة. اثنين منها هي الغالبة وتمثل 80% من الأليلات: و هي IVS-I-110 G→A (40%)، الشفرة 39 C→T (40%). وقد لوحظت اثنين من الطفرات النادرة بنسب متماثلة (9%) و هي IVS-I-5 (G→A)، framshift 8 (-AA). الطفرة IVS-I-6 T→C تم العثور عليها بنسبة 2% (الأقل ترددا). و لتمييز فقر الدم المنجلي و تأكيد التشخيص الظاهري بتعريف الخلل الجزيئي (الشفرة 6 A→T) استعملنا تقنية PCR-digestion.

**الكلمات المفتاحية:** الطلاسيميا، فقر الدم المنجلي، طفرة، DGGE

## Références bibliographiques

---

- ACOG Committee on Obstetrics.** 2007, « ACOG Practice Bulletin No. 78: hemoglobinopathies in pregnancy », *Obstet Gynecol*, vol. 109, 2007, p. 229–37.
- Addour NB;** 2008. Caractérisation moléculaire des  $\beta$ -thalassémies dans la population Algérienne : impact des mutations sur l'expression clinique. Thèse de doctorat, USTHB, Alger.
- Addour NB, Zidani N, Carion N, Labie D, Belhani M, Beldjord C;** 2009. Molecular heterogeneity of  $\beta$ -thalassemia in Algeria: how to face up a major health problem. *Hemoglobin*, 33 (1):24–36.
- Akhavan HN, Derakhshandeh PP, Banihashemi A, Mostafazadeh A, Asghari B, Ahmadifard MR, Azizi M, Youssefi A, Elmi MM;** 2011. A comprehensive molecular characterization of beta thalassemia in a highly heterogeneous population. *Blood Cells, Molecules , and Diseases* 47, 29 – 32
- Al-Sultan A, Phanasgaonkar S, Suliman A, Al-Baqushi M, Nasrullah Z, Al-Ali A;** 2011. Spectrum of  $\beta$ -thalassemia mutation in the eastern province of Saudi Arabia. *Hemoglobin* , 35(2):125–134.
- Antoniou M, deBoer E, Habets G, Grosveld F;** 1988, The human  $\beta$  globin gene contains multiple regulatory regions: identification of one promoter and two downstream enhancers. *Embo J*, 7, 2, 377-384.
- Barragan E, Bolufer P, Maria LP, Prieto F, Miguel. A. S;** 2006. Molecular detection of Spanish  $\delta\beta$ -thalassemia associated with  $\beta$ -thalassemia identified during prenatal diagnosis. *Clinica Chimica Acta* 368. 195 – 198.
- Baysal E;** 2001. Hemoglobinopathies in the United Arab Emirates. *Hemoglobin*, 25(2), 247-253.
- Behringer RR, Hammer RE, Brinster RI, Palmiter RD, Townes TM;** 1987, Two 3' sequences direct adult erythroid-specific expression of human  $\beta$ -globin genes in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 20: 7056-7060.
- Belhani M;** 2009. Epidémiologie de la  $\beta$ -thalassémie homozygote en Algérie. *Revue Algérienne d'hématologie*. Spt:N°1, p:22.
- Bellis G, Valentin C, Glavce C, Popescu I, Ciovica C, Vladareanu F, Gérard N, Krishnamoorthy R, De Braekeleer M;** 2001. Génétique des populations de la -

## Références bibliographiques

---

- thalassémie en Sicile et en Algérie – données comparées à la Roumanie. *Antropo*, 1, 1-5. [www.didac.ehu.es/antropo](http://www.didac.ehu.es/antropo).
- Bennani C, Bouhass R, Perrin- Pecontal P, Tamouza R, Malou M, Elion J, Trabuchet G, Beldjord C, Benabadji M, Labie D;** 1994. Anthropological approach to the heterogeneity of a thalassaemia mutations in northern Africa. *Hum Biol*, 1994; 66, 3: 369-382.
- Berg PE, Williams DM, Qian RL, Cohen RB, Cao SX, Mettelman M, Schechter AN;** 1989, A common protein binds to two silencers 5' to the human  $\beta$ -globin gene. *Nucleic Acids Res*, 17, 21: 8833-8852.
- Bodine DM, Ley TJ;** 1987, An enhancer element lies 3' to the human  $\Lambda\gamma$  globin gene. *Embo J*, 6, 10: 2997-3004.
- Bogard M, Lamoril J;** 1998. Analyse quantitative des acides nucléiques. In : Biologie moléculaire en biologie clinique. *Méthodes. Collection Option Bio. Elsevier*: 119-226.
- Bonello-Palot, N. Badens, C;** 2010, Bases moléculaires des syndromes thalassémiques et facteurs génétiques modulateurs de sévérité de la beta-thalassémie. *Rev Med Genet Hum*, 1:1-10.
- Boon N, DE Windt W, Verstraete W, TOP EM;** 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*.vol 39, pp. 101-112.
- Bouhass R, Perrin P, Trabuchet G;** 1993. The spectrum of  $\beta$ -thalassaemia mutations in the Oran region of Algeria. *Hemoglobin*; 18, 3: 211-219.
- Boussiou M, Karababa P, Sinopoulou K, Tsaftaridis P, Plata E, Anagnostou AL;** 2008. The molecular heterogeneity of  $\beta$  -thalassaemia in Greece. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 40, 317 – 319.
- Bunn HF.** 1997; Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med* 337:762–9.
- Cabeda JM, Correia C, Estevinho A, Simoes C, Amorim ML, Pinho L, Justic B;** 1999. Unexpected pattern of  $\beta$ -globin mutations in  $\beta$ -thalassaemia patients from northern Portugal. *Br J Haematology*, 105,68–74.
- Cai SP, Kan YW;** 1990. Identification of the Multiple  $\beta$ -Thalassaemia Mutations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *J. Clin. Invest.* Volume 85, 550-553.

## Références bibliographiques

---

- Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ; 1995;** An analysis of fetal hemoglobin variation in sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, beta-globin haplotypes, alpha-globin gene number, gender, and age. *Blood*. 85(4):1111-7.
- Chang YP, Maier-Redelsperger MS, Mith KD, Contu L , Ducrocq R, de Montalembert M, et al. 1997;** The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br J Haematol* , 96 : 806–14.
- Chouk I, Ben Daoud B, Mellouli F, Bejaoui M, Gerard N, Dellagi K, Abbes S; 2004.** Contribution to the Description of the  $\beta$ -Thalassemia Spectrum in Tunisia and the Origin of Mutation Diversity. *Hemoglobin*, Vol. 28, No. 3, pp. 189–195.
- Cocolin L, Innocente N, Biasutti M. et Comi G; 2003.**The late blowing in cheese : a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of food Microbiology*.
- Costello R; 2009,** Actualités sur les thalassémies. *La Revue de médecine interne*. 30: S22–S23.
- Craig JE, Rochette J, Fisher CA, Weatherall DJ, Marc S, Lathrop GM, Demenais F, Thein S; 1996;** Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. *Nat Genet*. 12(1):58-64.
- De Franceschi L, Bachar D, Galacteros F, Tchernia G, Cynober T, Alper S, Platt O, Beuzard Y, Brugnara C; 1997,** Oral magnesium supplements reduce erythrocyte dehydration in patients with sickle cell disease. *J Clin Invest*, 100 (7): 1847-52.
- Deisseroth A, Nienhuis A, Turner P, Velez R, Anderson WF, Ruddle FH, Lawrence J, Creagan R, Kucherlapati R; 1977,** Localisation of the human  $\alpha$ -globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids. *Cell*, 12: 205-216.
- Deisseroth, A., Nienhuis, A., Lawrence, J., Giles, R., Turner, P. et Ruddle, F. H. 1978,** Chromosomal localization of human  $\beta$ -globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 1456-1460.
- Dhondt JL, Farriaux JP; 2000,** La fabuleuse histoire du dépistage néonatal. *Ann. Bio/Clin*. 58: 267-276.
- Dos Santos CO, Zhou S, Secolin R, Wang X, Cunha AF, Higgs DR, Kwiatkowski JL, Thein SL, Gallagher PG, Costa FF, Weiss MJ; 2008;** Population analysis of the

## Références bibliographiques

---

alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene identifies sequence variants that alter expression and function. *Am J Hematol.* 83(2):103-8.

**Efremov GD;** 1973; Dominantly Inherited beta-Thalassaemia. *Hemoglobin.* x 31(2):193-207.

**Efremov DG, Dimovski AJ, Efremov GD;** 1991 Detection of betathalassaemia mutations by ASO hybridization of PCR amplified DNA with digoxigenin ddUTP labeled oligonucleotides. *Hemoglobin ;* 15 : 325-533.

**El-Gawhary S, El-Shafie S, Niazi M, Aziz M, El-Beshlawy A;** 2007. Study of  $\beta$ -thalassaemia mutation using the polymerase chain reaction- amplification refractory mutation system and direct DNA sequencing techniques in a group of Egyptian thalassaemia patients. *Hemoglobin,* 31 (1):63–69.

**Elion J, Berg PE, Lapoumeroulie C, Trabuchet G, Mittel-man M, Krishnamoorthy R, et al;** 1992. DNA sequence variation in a negative control region 5'to the  $\beta$  globin gene correlates with the phenotypic expression of the  $\beta$ S mutation. *Blood,* 79:787–92.

**El-Latif M, Filon D, Rund D, Oppenheim A, Kanaan M;** 2002. The  $\beta^{+}$ - IVS-6 (T→C) mutation accounts for half of the thalassaemia chromosomes in the Palestinian populations of the mountain regions. *Hemoglobin,* 26(1), 33-40.

**EZRA S, ABRAM S, STANTON VP;** 1992. Use of denaturing gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol.* vol 112, pp. 71-104.

**Fattoum S, Messaoud T, Bibi A;** 2004. Molecular Basis of  $\beta$  -Thalassaemia in the Population of Tunisia. *Hemoglobin,* Vol. 28, No. 3, pp. 177–187.

**Fernandez E, Bienvenu T, Desclaux F, Beldjord C;** 1993. Use of chemical clamps in denaturing gradient gel electrophoresis : application in the detection of the most frequent mediterranean beta thalassaemic mutations. *PCR : methods and applications :* 122-4

**Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB;** 1998, The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol ,* 11:1–51.

**Fisher SG, Lerman LS;** 1983. DNA differing by a single base-pair substitution are separated in denaturing gradient gels. Correspondance with melting theory. *Pro Acad Sci USA:* 80 1579-1783.

**Forget BG;** 2001, Molecular mechanisms of b-thalassaemia. In: Steinberg MH.

## Références bibliographiques

---

- Forget BG, Higgs DR, Nagel RL;** editors. *Disorders of hemoglobin* . Cambridge: Cambridge University Press; p. 252–76.
- Fritsh EF, Lawn RM, Maniatis T;** 1980, Molecular cloning and characterization of the human  $\beta$  globine gene cluster. *Cell*, 19: 959-972.
- Galanelo R, Origa R;** 2010. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5:11.
- Gale RE, Clegg JB, Huehns ER;** 1979; Human embryonic haemoglobins Gower 1 and 2. *Nature* 280 :162–4.
- Garner C, Menzel S, Martin C, Silver N, Best S, Spector TD, Thein SL;** 2005, Interaction between two quantitative trait loci affects fetal haemoglobin expression. *Ann Hum Genet*, 69, 6: 707-714.
- Garner C, Tatu T, Best S, Creary R, Thein SL.;** 2002, Evidence for genetic interaction between the beta-globin complex and chromosome 8q in the expression of fetal hemoglobin. *Am J Hum Genet*, 70: 793-799.
- Garner C, Tatu T, Reittie, JE, Littlewood, T, Darley J, Cervino, S, Farall, M, Kelly, P, Spector, T. D, Thein, SL.** 2000, Genetic influences on F cells and other hematologic variable: a twin heritability study. *Blood*, 95:342-346.
- George P, Patrinos. Stylianos E, Antonarakis;** 2010, Human Hemoglobin. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*.
- Gianazza E., Eberini I., Saniti O, Vignati M;** 1998. Denaturant-gradient gel electrophoresis: technical aspects and practical applications. *Analytica chimica acta* , 1998, vol 372, pp. 99-120.
- Gilman JG, Huisman TH;** 1985, DNA sequence variation associated with elevated  $G_{\gamma}$  globin production. *Blood*; 66 : 783–7.
- Han A, Fleming MD, Chen J;** 2005, Heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase modifies the phenotype severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and  $\beta$  thalassemia. *J Clin Invest*, 115, 6: 1562-1570.
- Haynes JJr, Obiako B, Hester RB, Baliga BS, Stevens T;** Hydroxyurea attenuates activated neutrophil mediated sickle erythrocyte membrane phosphatidylserine exposure and adhesion to pulmonary vascular endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294 (1): 4379-85.

## Références bibliographiques

---

- Henderson S, Timbs A , McCarthy J, Gallienne A, Mourik MV , Masters G , May A , Khalil M , Schuh A, Old J;** 2009. Incidence of haemoglobinopathies in various populations — The impact of immigration. *Clinical Biochemistry* 42, 1745 – 1756.
- Huissman TH J;** 1998, The  $\beta$  and  $\delta$  thalassemia repository. *Hemoglobin*, 22, 2: 169-195.
- Ince HH, Ayyildiz O, Kalkanli S, Batun S, Muftuoglu E;** 2003. Molecular Basis of  $\beta$ -Thalassemia Mutations in Diyarbakir in the Southeastern Region of Turkey. *Hemoglobin*. Vol. 27, No. 4, pp. 275–278.
- Jackson CE, O' Neill D, Bank A;** 1995, nuclear factor binding sites in human  $\beta$  globin IVS2. *J Biol Chem*, 270, 47: 28448-28456.
- Jiffri EH, Bogari N, Zidan KH, Teama S, Elhawary N;** 2010, Molecular updating of  $\beta$ -thalassemia mutation in the upper Egyptian population. *Hemoglobin*, 34(6):538–547.
- Kamuzora H, Jones RT, Lehmann H;** 1974; The zeta-chain, analpha-like c hain of human embryonic haemoglobin. *FEBS Lett* 46 :195–9.
- Kan YW;** 1977; Prenatal diagnosis of haemoglobin disorders. *Prog Hemat.* 10: 91-104.
- Kan YW, Golbus MS, Trecartin R;** 1976; Prenatal diagnosis of sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 294: 1039-1040.
- Kan YW, Dozy AM;** 1978; Polymorphism of DNA sequence adjacent to human  $\beta$ - globin structural gene: relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75 :5631–5.
- Kanavakis E, Traeger-Syndinos J, Lazaropoulou C, Liakopoulou T, Paleologos G, Matakotou-Mavrommati A, Papassotiriou I;** 2004, A rare example that coinheritance of a severe form of beta- thalassemia and alpha- thalassemia interact in a "synergistic" manner to balance the phenotype of classic thalassemia syndromes. *Blood Cells Mol and Diseases*, 32: 319-324.
- Katsantoni EZ, de Krom M, Kong-a-San J, Imam AM, Grosveld F, Anagnou NP, Strouboulis J;** 2004, An embryonic-specific repressor element located 3' to the Agamma-globin gene influences transcription of the human beta-globin locus in transgenic mice. *Exp Hematol.* 32:224-33.
- Kazazian HH, Antonarakis S;** 1997, Molecular genetics of the hemoglobin genes. In: SINGER M & BERG P (Eds) – Exploring genetic mechanisms. University Science Book, Sausalito, California, pp. 301-336.

## Références bibliographiques

---

- Kaul DK, Kollander R, Mahaseth H, Liu X, Solovey A, Belcher J, Kelm RJ, Vercelloti GM, Hebbel RP;** Robust vascular protective effect of hydroxamic acid derivatives in a sickle mouse model of inflammation. *Microcirculation*. 13 (6): 489-97.
- Kihm AJ, Kong Y, Hong W, Russell JE, Rouda S, Adachi K, Simon MC, Blobel GA, Weiss MJ;** 2002; An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature*. 417(6890):758-63.
- Khelil AH, Laradi S, Ferchichi S, Carion N, Béjaoui M, Saad A, Chaieb A, Miled A, Ben Chibani J, Perrin P;** 2003. Stratégie diagnostique des mutations beta-thalassémiques dans une famille tunisienne, application au diagnostic prenatal. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 61, Numéro 2, 229-33,
- Kollias G, Hurst J, deBoer E, Grosveld F;** 1987 The human  $\beta$  globin gene contains a downstream developmental specific enhancer. *Nucleic Acids Res*, 15, 14: 5739-5747.
- Kosche KA, Dobkin C, Bank A;** DNA sequences regulating human  $\beta$  globin, gene expression. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13, 21: 7781-7793.
- Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL;** 1985; The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. *Blood*. 66(6):1463-5.
- Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, Rouabhi F, Dunda-Belkhodja O, Chardin P, et al.** 1985; Common haplotype dependency of high Gc globin gene expression in b-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 :2111-4.
- Labie D, Benabadji M, Elion J;** 1995. Genetic disorders in North African Population of the Maghreb: Algeria and Tunisia. In Teeb,(eds): 290-321, **Oxford Oxford Press**.
- Labie D, Elion J;** 1996; Sequence polymorphisms of potential functional relevance in the b-globin gene locus. *Hemoglobin*, 20 :85-101.
- Labie D, Elion J;** 2005; Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC-Hématologie* 2, 220-239.
- La Flamme S, Acuto S, Markowitz D, Vick L, Landschultz W, Bank A;** 1987, Expression of chimeric human  $\beta$  and  $\delta$  globine genes during erythroid differentiation. *J Biol Chem*, 262, 10: 4819-4826.
- Lai MI, Jiang J, Silver N, Best S, Menzel S, Mijovic A, Colella S, Ragoussis J, Garner C, Weiss MJ, Thein SL.** 2006; Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 133(6):675-82.

## Références bibliographiques

---

- Laradi S, Haj Khelil A, Omri H, Chaieb A, Mahjoub T, Benlimam H, Amri F, Saad A, Miled A, Leturcq F, Ben Chibani J, Beldjord C;** 2000. Analyse moléculaire et diagnostic prénatal de la  $\beta$ -thalassémie: à propos de notre expérience en Tunisie centrale. *Annales de Biologie Clinique*. Volume 58, Number 4, 453-60.
- Lebo RV, Carrano AV, Burkhart-Schultz K, Dozy AM, Yu LC, Kan YW;** 1979. Assignment of human  $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$  globin genes to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and ADN restriction enzyme analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 5804-5808.
- Lemsaddek W, Picanc I, Seuanes F, Nogueira P, Mahmal L, Benchekroun S, Khattab M, Osorio L;** 2004. The  $\beta$ -Thalassemia Mutation/Haplotype Distribution in the Moroccan Population. *Hemoglobin*. Vol. 28, No. 1, pp. 25–37.
- Lerman LS, Silverstein K;** 1987. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. In : *Methods in enzymology*, Academic Press, New York; 482-501.
- Lew VL, Bookchin RM;** Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. *Physiol Rev* 85 (1): 179-200.
- Lo YM;** 2005, Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. *J Histochem Cytochem*, 53: 293-296.
- Lodish HF;** 1976. Translational control of protein synthesis. *Ann Rev Biochem*, 45: 39-72.
- Luzzatto L, Notaro R;** 2002 Jun, Haemoglobin's chaperone. *Nature*. 13;417 (6890):703-5.
- Makhoul NJ, Wells RS, Kaspar H, Shbaklo H, Taher A, Chakar N, Zalloua PA;** 2005. Genetic Heterogeneity of Beta Thalassemia in Lebanon Reflects Historic and Recent Population Migration. *Annals of Human Genetics*, 69,55–66.
- Mavrou A, Kouvidi E, Antsaklis A, Souka A, Kitsiou Tzeli S, Kolialexi A;** 2007, Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: a second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications. *Prenat Diagn* 27:150-153.
- May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, Sadelain M;** 2000, Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature*, 406:82–86.
- Medkour Terkia;** 2008. Modélisation mathématique et stimulation numérique de la polymérisation de l'hémoglobine drépanocytaire. *Thèse de doctoract*, Paris XII.

## Références bibliographiques

---

- Mehta AB, Hoffbrand AV;** 2003. Hématologie. Edition; *De Boeck*.
- Mellouli F, Bejaoui M;** The of hydroxyurea in severe forms of sickle cell disease: study of 47 Tunisian paediatric cases. *Arch Pediatr* 15 (1): 24-8.
- Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, Foglio M, Zelenika D, Boland A, Rooks H, Best S, Spector TD, Farall M, Lathrop M, Thein SL;** 2007, A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zing finger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics*, 39: 1197-1199.
- Menzel S, Jiang J, Silver N, Gallagher J, Cunningham J, Surdulescu G, Lathrop M, Farrall M, Spector TD, Thein SL.** 2007, The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood*. 15;110(10):3624-6. A.
- Muller BU, Brugnara C;** Prevention of red cell dehydration: a possible new treatment for sickle cell disease. *Pediatr Pathol Mol Med*, 20 (1): 15-20.
- Myers RM, Larin Z, Maniatis T;** 1985. Detection of single base substitution by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science (Wash. DC)*. 230:1242-1246.
- OMS.** Avril 2006, Rapport du secrétariat de l'Organisation Mondiale de la Santé, CINQUANTE-NEUVIEME ASSEMBLEE MONDIALE DE LA SANTE.
- Pagnier J, Mears JG, Dunda-Belkhodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, et al;** 1984. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:1771-3.
- Patrinos GP, Antonarakis SE;** 2010. Human Hemoglobin in; *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches*, 365 DOI 10.1007/978-3-540-37654-5\_11.
- Pawlink R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, Acharya SA, Ellis J, London IM, Eaves CJ, Humpharies RK, Beuzard Y, Nagel RL, Lebouch P;** Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 294 (5550): 2368-71.
- Perrin P, Bouhassa R, Mselli L, Garguier N, Victor-Marc Nigon VM, Bennani C, Labie D, Trabuchet G;** 1998. Diversity of sequence haplotypes associated with  $\beta$ -thalassaemia mutations in Algeria: implications for their origin. *Gene* 213, 169-177.

## Références bibliographiques

---

- Périchon B, Ragusa A, Lapoumeroulie C, Romand A, Moi P, Ikuta T, et al;** 1993. Inter-ethnic polymorphism of the  $\beta$ -globin gene locus control region (LCR) in sickle-cell anemia patients. *Hum Genet*, 91: 464–8.
- Peter, B;** 2003, Stathopoulos. Taking the good out of the bad: lentiviral-based gene therapy of the hemoglobinopathies. *Biotechnology Advances* 21. 513 – 526.
- Purucker M, Bodine D, Lin H, McDonagh K, Nienhuis AW;** 1990, Structure and function of the enhancer 3' to the Human  $\gamma$  globin gene. *Nucleic Acids Res*, 18, 24: 7407-7415.
- Raich N, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Enver T;**1992, Demonstration of a human  $\epsilon$  globin gene silencer with studies in transgenic mice. *Blood*, 79, 4: 861-864.
- Ramachandran VS, Edison ES, Poonkuzhali B, Srivastava A, Chandy M;** 2003. Rapid Detection of  $\beta$  globin gene mutations and polymorphisms by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Clinical Chemistry* 49:5, 777–781.
- Redding- Lallinger R, Knoll C;** Sickle cell disease-pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 36 (10): 346-76.
- Robet Girot, Pierre Bégué, Frédéric Galacteros.** 2003, La drépanocytose. Edition; *John Libbey, Eurotext, Paris*, p:1.
- Sadelain M, Rivella S, Lisowski L, Samakoglu S, Riviere I;** 2004, Globin gene transfer for treatment of the beta-thalassemias and sickle cell diseases. *Best Pract Res Clin Haematol* , 17 (3): 517-34.
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman L, Myers RM;** 1989. Attachment of 40 bases pair G+C rich sequence to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl Acad Sci*, 86: 232-236.
- Shih HC, Er TK, Tien-Jye C , Ya-Sian C, Liu TC , Gowth JC;** 2009, Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry*, 42; 1667 – 1676.
- Stamatoyannopoulos G;** 2000, Molecular and cellular basis of hemoglobin switching. In: Steinberg ML, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of hemoglobins, genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambridge University Press; p. 131–45.

## Références bibliographiques

---

- Steinberg MH;** 2006, Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *Trends Pharmacol Sci*, 27 (4): 204-10.
- Stuart MJ, Nagel RL;** 2004; Sickle-cell disease. *Lancet*, 364 : 1343–60.
- Sutcharitchan P, Saiki R, Huisman THJ, Kutlar A;** 1995. Reverse dot-blot detection of the African-American beta thalassemia mutations. *Blood* ; 4 : 1580-5.
- Sylvie Langlois , Jason C. Ford, David Chitayat;** 2008, Dépistage des porteurs de thalassémie et d'hémoglobinopathies au Canada. *Comité de diagnostic prénatal du collège Canadien des généticiens médicaux*.
- Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özcelik H, Özer A, Baig M, Senga EB, Başak AN;** 1998. Molecular and population genetic analyses of  $\beta$ -thalassemia in Turkey. *Am J Hemat*; 57,3:215-220.
- Tadmouri A, Basak N, Ghazi O;** 2001.  $\beta$ -thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiologie, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin*. 25(2), 227-239.
- Telen MJ;** 2007, Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 84-90.
- Thein SL;** 2005; Genetic modifiers of beta-thalassaemia. *Haematologica*. 90(5):649-60.
- Thein SL;** 2008; Genetic modifiers of  $\beta$ -haemoglobinopathies. *Br J Haematol*, 141: 357-366.
- Treisman R, Maniatis T;** 1985; Simian virus 40 enhancer increases number of RNA polymerase II molecules on linked DNA. *Nature*, 315, 6014: 73-75.
- Vichinsky EP;** 2005, Changing patterns of thalassemia worldwide. *Ann N Y Acad Sci* 1054:18-24.
- Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkla P, Weiss MJ, Higgs DR.** 2004; Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassaemia. *Blood*. 103(9):3296-9.
- Volatier L;** 2004. Réponses d'une communauté périphytique à un effluent complexe. *Thèse de doctorat*. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Vrettou C, Traeger JS, Tzetis M, Malamis G, Kanavakis E;** 2003. Rapid Screening of Multiple  $\beta$ -Globin Gene Mutations by Real-Time PCR on the LightCycler: Application to Carrier Screening and Prenatal Diagnosis of Thalassemia Syndromes. *Clinical Chemistry* 49:5 769 –776.

## Références bibliographiques

---

**Wajcman H, Lantz B, Girot R;** 1992. Les maladies du globule rouge. ISERM/ Médecine-Science Flammarion, Paris.

**Wall L, deBoer E, Grosveld F;** 1988, The human  $\beta$ -globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid specific protein. *Genes Dev.* 2, 9: 1089-1100.

**Weatherall DJ.** 2001; Phenotype-genotype relationships in mono-genic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet.* 2:245–55.

**Weatherall DJ, Clegg JB;** 2001; The thalassaemia syndromes. Oxford: *Blackwell Science*;

**Whipple GH, Bradford WL;** 1933, Mediterranean disease-thalassaemia (erythroblastic anemia of Cooley); associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *J Pediatr*, 9:279–311.

**Wood WG;** 2001; Hereditary persistence of fetal hemoglobin and  $\delta\beta$  thalassaemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of hemoglobin*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 356–88.

### Z

**Zertal-Zidani, S., Ducroq, R., Sahbatou, M., Satta, D., Krishnamoorthy, R;** 2002, Fœtal hemoglobin in normal healthy adults: relationship with polymorphic sequence cis to the  $\beta$  globin gene. *Eur J Hum Genet*, 10: 320-326.

## Annexe

### **Annexe N °: 01**

Tableau 1: Numération de globules rouges (résultats normaux en millions par mm<sup>3</sup>)

Homme	4.5 à 6.2
Femme et enfant jusqu'à la puberté	4 à 5.4
Enfant (1 an)	3.6 à 5
Nouveau- né	5 à 6

Tableau 2: Hématocrite normal (en %)

Homme	40 à 54
Femme et enfant jusqu'à la puberté	35 à 47
Enfant (1 an)	36 à 44
Nouveau- né	44 à 62

Tableau 3: Hémoglobine normale (pour 1dl)

Homme	13 à 18
Femme	12 à 16
Enfant (> 2 ans)	12 à 16
Nouveau-né	14 à 20

Tableau 4: Les valeurs normal du VGM (volume globulaire moyenne) exprimé généralement femtolitre (fl= 10<sup>-15</sup>L)

Adulte	82 à 98
Enfant	74 à 91

- TCMH (teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine) : La valeur de référence chez l'adulte se situe entre 27 et 38 picogrammes (pg).
- CCMH (concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine): Sa valeur normale est de 32 à 36 g/ 100 ml. Hypochromie : <32, Normochromie : 32 à 36

## Annexe

### Annexe N°: 02

**Tableau 1:** Les mutations  $\beta$  thalassémiques ( Huissman 1998).

Nature de la mutation	Type	Origine
<b><i>1-ARNm non foctionnel</i></b>		
<i>a) Mutation non sens</i>		
Codon 15 TGG→ TGA	$\beta^0$	Inde
Codon 15 TGG→TGA	$\beta^0$	Portugal
Codon 17 A→ T	$\beta^0$	Chine
Codon 39 G→ T	$\beta^0$	Méditerranée
Codon 90 G→ T	$\beta^0$	Japon
<i>b) Mutations décalantes</i>		
Codon 1 -G	$\beta^0$	Méditerranée
Codon 2/3 -9pb + 31pb	$\beta^0$	Algérie
Codon 6 -A	$\beta^0$	Méditerranée
Codon 8 -AA	$\beta^0$	Méditerranée
Codon 38/39 -CC	$\beta^0$	Belgique
Codon 41/42 -TTCT	$\beta^0$	Chine
Codon 71/72 +A	$\beta^0$	Chine
Codon 88 -TG	$\beta^0$	Japon
Codon 106/107 +G	$\beta^0$	Noirs USA
<b><i>2- Mutation de maturation</i></b>		
<i>a) Anomalie de la charnière exon/intron</i>		
IVS-I-1 G→A	$\beta^0$	Méditerranée
IVS-I-1 G→T	$\beta^0$	Inde, Chine
IVS-I-2 T→A	$\beta^0$	Algérie
IVS-I-2 T→C	$\beta^0$	Noir USA
IVS-I-2 T→G	$\beta^0$	Tunisienne
IVS-II-1 G→A	$\beta^0$	Méditerranée
IVS-I-129 A→G	$\beta^0$	Allemagne
IVS-I-130 G→A	$\beta^0$	Egypte
IVS-I-130 G→C	$\beta^0$	Turquie
IVS-II-849 A→C	$\beta^0$	Noirs USA
IVS-II-850 G→A	$\beta^0$	Angleterre
IVS-II-850 G→C	$\beta^0$	Yougoslavie
IVS-II-850 G→T	$\beta^0$	Japon
<i>b) Mutations des séquences consensus</i>		
IVS-I-5 G→A	$\beta^+$	Algérie, Méditerranée
IVS-I- 5 G→C	$\beta^+$	Inde, Chine
IVS-I- 5 G→T	$\beta^+$	Méditerranée, Noirs USA
IVS-II-4,5 -AG	$\beta^0$	Portugal
IVS-I-6 T→C	$\beta^+$	Méditerranée
IVS-I-128 T→G	$\beta^+$	Arabie Saoudite
IVS-II-837 T→G	?	Inde
IVS-II-843 T→G	$\beta^+$	Algérie
IVS-II-844 C→G	$\beta^+$	Italie
IVS-II-848 C→A	$\beta^+$	Noirs USA, Egypte, Iran
IVS-II-848 C→G	$\beta^+$	Japon

## Annexe

<i>c) Mutations dans les introns</i>		
IVS-I-110 G→A	$\beta^+$	Méditerranée
IVS-I-116 T→G	$\beta^0$	Méditerranée
IVS-II-654 C→T	$\beta^+$	Chine
IVS-II-705 T→C	$\beta^+$	Méditerranée
IVS-II-745 C→G	$\beta^+$	Méditerranée
<i>d) Mutations dans les exons</i>		
Codon 26 G→A	$\beta^+$	Asie du Sud Est
Codon 27 G→T	$\beta^+$	Méditerranée
Codon 24 T→A	$\beta^+$	Noirs USA
Codon 19 A→G	$\beta^+$	Malaisie
<b>3- mutations dans le promoteur</b>		
-101 C→T	$\beta^+$	Turquie
-92 C→T	$\beta^+$	Méditerranée
-90 C→T	$\beta^+$	Portugal
-88 C→T	$\beta^+$	Noirs USA
-32 C→A	$\beta^+$	Taiwan
-30 T→A	$\beta^+$	Turquie
-30 T→C	$\beta^+$	Chine
-29 A→G	$\beta^+$	Noirs USA, Chine
+10 -T	$\beta^+$	Grèce
<b>4- mutations dans le signal de poluadenylation</b>		
AATAAA→AATGAA	$\beta^+$	Méditerranée
<b>5- Mutants du site CAP</b>		
+1 A→C	$\beta^+$	Inde
<b>6- Mutation du codon d'initiation</b>		
ATG→GTG	$\beta^0$	Japon
ATG→AAG	$\beta^0$	Nord de l'Europe
ATG→ATA	$\beta^0$	Italie
ATG→ATT	$\beta^0$	Italie

**Tableau 2:** Les mutants des formes de  $\beta$  thalassémie dominante ( Addour, 2008)

Mutation	Phénotype	Population
CD 128/129, -4pb, +5pb, -11pb	TI +incl TI +incl	Irlandaise Suisse, Française, Grecque
CD 121 GAA→TAA	TI	Anglaise
CD 127 CAG→TAG	TI	Suisse, Française
CD 114 -CT +G	TI	Italienne
CD 126 -T	TI +incl	Italienne
CD 94 +TG	TI +incl	Japonaise
CD 123 -A	TI +incl+HbE	Thailandaise
CD 123-125 -8pb	TI	Anglaise
CD 127 Gln-Pro	TI	Coreenne
CD 33/34 -GGT	TI +incl	Anglaise
CD 28 Leu-Arg	TI	Italienne
CD 60 Val-Glu		

## Annexes

**Tableau 3:** Les mutations  $\beta$ -thalassémique dans les pays du Maghreb.

Mutation	Origine	Tunisie		Algérie		Maroc
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
<b>Promoteur+5'UTR</b>						
-29 G→A	Noirs USA, Chinoise	-	1.08	3.08	1.4	4.2
-30 T→A	Turque, Bulgare	0.8	-	0.4	-	1.0
-101 C→T	Méditerranéenne	-	-	-	0.47	0.5
-87 C→G	Méditerranéenne	1.7	-	-	-	-
+20 C→T	Marocaine	-	-	-	-	1.0
<b>Exon I</b>						
CD 6 (-A)	Méditerranéenne	2.6	7.0	17.01	12.7	13.3
CD 30 G→C	Tunisienne, Noirs USA	3.2	3.24	0.9	1.41	0.5
CD 8 (-AA)	Méditerranéenne	0.2	0.54	-	0.94	9.6
CD 5 (-CT)	Méditerranéenne	0.4	-	-	-	-
CD 25/26 (+T)	Tunisienne	0.6	-	-	-	-
CD 27 G→T	Méditerranéenne	-	-	0.4	-	-
CD 16 (-CT)	Marocaine	-	-	-	-	2.6
Del -inser (-9pb+3pb)	Algérienne	-	-	-	0.47	-
<b>Intron I</b>						
IVS-I-1 G→A	Méditerranéenne	4.5	4.3	11.7	8.96	8.5
IVS-I-2 T→C	Noirs USA, Algérienne	-	0.54	3.3	0.94	2.1
IVS-I-2 T→G	Tunisienne	3.0	0.54	-	-	0.5
IVS-I-2 T→A	Algérienne	-	-	1.3	-	-
IVS-I-5 G→T	Méditerranéenne	-	2.16	-	0.94	0.5
IVS-I-5 G→A	Algérienne, Méditerranéenne	1.5	-	0.9	-	-
IVS-I-5 G→C	Indienne	1.0	-	0.4	1.88	-
IVS-I-6 T→C	Méditerranéenne	0.6	0.54	3.3	6.13	13.9
IVS-I-110 G→A	Méditerranéenne	21.1	10.81	24.07	25.4	3.2
IVS-I-116 T→G	Méditerranéenne	-	0.54	-	-	-
IVS-I-128 T→G	Saoudienne	-	-	-	0.47	-

## Annexes

IVS-I-130 G→A	Egyptienne	-	-	-	-	1.0
Del 25pb3' IVS-I	Asiatique	-	-	-	-	0.5

<b>Exon II</b>						
CD 39 C→T	Méditerranéenne	48.6	43.7	27.6	25.94	26.2
CD37 G→A	Saoudienne	-	1.08	-	-	2.0
CD 44 (-C)	Kurde	3.8	1.62	-	-	-
CD 47 (+A)	Surinam	-	-	-	0.94	-
<b>Intron II</b>						
IVS-II-1	Méditerranéenne	0.6	1.62	-	0.94	3.2
IVS-II-745	Méditerranéenne	2.6	2.16	0.9	-	0.5
IVS-II-848	Noirs USA, Egyptienne	0.4	-	0.4	3.77	-
IVS-II-849	Noirs USA	0.4	4.32	-	-	-
IVS-II-843	Algérienne	-	-	0.4	0.94	-
<b>Poly A</b>						
ATA→ATG	Méditerranéenne	-	-	-	0.47	-
ATA→ACG	Noirs USA	-	-	-	-	0.5
Hb Lepore		-	-	-	0.47	-
Non identifiés		2.3	10.81	2.1	1.88	4.2
Totale des mutations		24		25		21

- a) Fattoum *et al.*, 2004; b) Chouk *et al.*, 2004; c) Bennani *et al.*, 1994; d) Addour *et al.*, 2009; e) Lemsaddek *et al.*, 2003

## Annexe

**Tableau 4:** Hétérogénéité moléculaire des allèles  $\beta$ -thalassémiques dans différentes population du monde.

Pays	Nb de mutations détectées	Références
1- UK	68	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
2- UAE	44	(Baysal <i>et al.</i> , 2001).
3- Turquie	43	(Tadmouri and Basak., 2001).
4- Inde	41	(Shaji <i>et al.</i> , 2003).
5- Danemark	40	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
6- Pays-Bas	36	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
7- Grèce	33	(Boussiou <i>et al.</i> , 2008).
8- Algérie	25	(Addour <i>et al.</i> , 2009; Bennani <i>et al.</i> , 1994).
9- Tunisie	24	(Fattoum <i>et al.</i> , 2004; Chouk <i>et al.</i> , 2004).
10- Iran	24	(Akhavan <i>et al.</i> , 2001).
11- Maroc	21	(Lemsaddak <i>et al.</i> , 2004).
12- Egypte	20	(El Gawhari <i>et al.</i> , 2007; Henderson <i>et al.</i> , 2009).
13- Allemagne	19	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
14- Liban	18	(Makhoul <i>et al.</i> , 2005).
15- Italie	18	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
16- Espagne	15	(Villegas <i>et al.</i> , 2001).
17- Portugal	14	(Cadeba <i>et al.</i> , 1999).
18- Arabie Saoudite	14	(Al-Sultan <i>et al.</i> , 2011).
19- Thaïlande	14	(Henderson <i>et al.</i> , 2009)
20- Roumanie	11	(Henderson <i>et al.</i> , 2009)
21- Chine	11	(Henderson <i>et al.</i> , 2009)
22- Palestine	10	(El-Latif <i>et al.</i> , 2002).
23- Tchèque	9	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
24- Chypre	8	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).
25- France	6	(Henderson <i>et al.</i> , 2009).

## Annexe

---

# Annexe

---

## **Annexe N°: 03** (Questionnaire)

Nom:

Prénom:

Date et lieu de naissance:

Adresse:

Diagnostique:

Age du diagnostique:

Symptômes de diagnostic:

Régime transfusionnel:

Chélation:

Régime alimentaire:

### **L'électrophorèse de l'Hb:**

Avant toute transfusion: A1%:      A2\_%:      F%:

### **Bilan hématologique:**

Hb:              GR:              Ht:              VGM:

TCMH:              CCMH:

### **L'électrophorèse d'Hb des parents:**

Père: A1:              A2%:              F%:

Mère : A1%:              A2%:              F%:

### **L'enquête familial:**

Consanguinité:              degré:

Nombre d'enfant par famille:

Nombre d'enfant atteint par famille:

Nombre des antécédents familiaux:

Nombre des décès:

## Annexe

---

### **Annexe N°:04**

Extraction de l'ADN (Technique au NaCl)

#### **1. Principe :**

Les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique et traités ensuite par un détergent (SDS) et une protéinase K. L'ADN nucléaire est libéré dans le milieu et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol.

L'ADN est solubilisé en phase aqueuse par le rapport de la DO à 260 nm sur la DO à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) qui doit être compris entre 1,5 à 2.

(Miller S.A, Dykes D.D. and Polesky H.F. (1988) Nucleic acid research 16(3) 1215)

#### **2. Préparation des leucocytes :**

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

#### **3. Extraction de l'ADN :**

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

## Annexe

---

8. Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).
9. Centrifuger 15 min à 2500 rpm.
10. Transvaser le surnageant dans un tube falcon de 15 ml, ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : La pelote d'ADN se forme.
11. Laisser éventuellement 30 min à -20°C si la pelote ne se forme pas.
12. Récupérer la pelote d'ADN avec une pipette Pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70%
13. Mettre la pelote dans un tube nunc.

#### **4. Solubilisation :**

1. Ajouter entre 300 et 1000 µl de TE 10:1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
2. Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

## Annexe

---

### **Annexe N°:04** (PCR)

Une pièce pour réaliser la PCR est recommandée ou à défaut choisir un endroit qui ne contient pas de produits amplifiés.

#### ➤ **Réactifs :**

- Eau distillée en ampoule ou eau osmosée.
- Tampon gold (-20°C ou +4°C)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mmolaire gold (-20°C ou +4°C)
- Dntp ou désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) :
- Oligos : on reçoit des oligos soit sous forme lyophilisée soit en solution de concentration connue et on réalise des solutions filles à **200ng/μl**.

**Les oligos lyophilisés** peuvent être gradés à +4°C mais les **solutions mères et filles** sont conservées à -20°C.

- La taq polymérase : Taq gold : conservée dans du glycérol à -20°C.

#### ➤ **ADN :**

- Echantillons et témoins entre 100 et 500 ng/μl.

On dilue les ADN à 20ng/μl et pour une PCR de 100μl finale on prendra 10μl de l'ADN dilué soit 200ng/tube.

#### ➤ **Matériel :**

- Tubes PCR microamp.
- Barettes de : ou 12 bouchons.
- Eppendorfs stériles.
- Micropipettes ne servant pas à prélever de produits amplifiés

## Annexe

---

P20, P100, P200, P1000

- Appareil PCR PerkinElmer 9700.

➤ **Méthode de travail appliquée à tous types de PCR :**

- Décongeler chaque réactif **sauf la taq** soit au BM à sec à 37°C soit à  $\theta$  ambiante.

Bien vortexer et pulser avant de s'en servir.

- Préparer un mix réactionnel (nombre d'échantillon + 1 de 10 à 20éch°, +2 de 20 à 30 etc...) **Toujours mettre un blanc pour vérifier une contamination éventuelle de la PCR.**

Dans l'ordre des conditions PCR ajouter réactif sortir la taq et l'ajouter en dernier.

Bien vortexer et pulser.

- Distribuer le mix dans chaque tube PCR préalablement identifiés. (90 $\mu$ l de mix pour une prise d'essai d'ADN de 20 $\mu$ l)
- Ajouter l'ADN en évitant de refouler avec la micropipette.
- Reboucher les tubes et bien vortexer.
- Placer les tubes dans l'appareil avec le portoir adapté et lancer le programme.

**USER NC ACCEPT METH EDIT DGGE START 100 $\mu$ l VMAX START**

## Annexe

---

### Annexe N°06: (DGGE)

- Matériel pour le montage des plaques
  - 2 grandes plaque de verre avec un bord supérieur découpé  
Avec un bord supérieur plein
  - 2 spacers 1 mm d'épaisseur
  - 1 peigne 16 ou 20 dents selon le nombre d'échantillons (1 mm d'épaisseur)
  - 6 pinces étroites
  - 6 pinces larges
  
- Matériel pour le coulage du gel
  - Pompe à recycler
  - Formeur de gradient + tuyau + aimants
  - Agitateur magnétique
  
- Matériel pour la migration
  - Cuve DGGE
  - Pompe à recycler si pas intégrée à la cuve
  - Portoir
  
- Matériel pour la révélation
  - Bac contenant une solution de BET 60 $\mu$ l + 500 ml d'eau distillée conservé à +4° C
  
- Mode opératoire
  - Dégraisser la partie intérieur des plaques à éthanol à 70% (les plaques ne doivent pas être ébréchées à l'intérieur : sujet à fuite) le scotch marque la partie extérieur de la plaque.

## Annexe

---

- Poser du joint sur la plaque à bord plein côté boudiné vers l'intérieur, faire le tour de la plaque en tendant bien en prenant comme repère de chaque côté la partie coupée du joint. Laisser dépasser d'1 ou 2 cm en haut de chaque côté.
- Poser l'ensemble joint + plaque sur le papier pailleuse cela évite que le joint ne se défasse pas
- Appliquer dessus la plaque bord découpé vers le haut en faisant correspondre les bords bien parallèlement.
- Poser les 2 pinces tout en haut du gel a mi-spacer 2 au milieu et 2 autres en bas pour faire tenir l'ensemble et couler le gel.

➤ Préparation des solutions :

- 2 solutions de base : Solution concentrée 90% dénaturant  
Solution 0% dénaturante

Cf + loin la préparation des solutions de base.

Selon un tableau on peut préparer les solutions dont on a besoin :

Solutions en 0%	0% dénaturant	90% dénaturant
5	14,2	0,8
10	13,3	1,7
15	12,5	2,5
20	11,7	3,3
25	10,8	4,2
30	10,0	5,0
35	9,2	5,8
40	8,3	6,7
45	7,5	7,5
50	6,7	8,3
55	5,8	9,2
60	5,0	10,0
65	4,2	10,8
70	3,3	11,7

## Annexe

---

75	2,5	12,5
80	1,7	13,3
85	0,8	14,2
90	0,0	15,0

- Polymérisants : persulfate d'ammonium 10% : 72 $\mu$ l  
TEMED pur : 12 $\mu$ l
  - Coulage du gel à l'aide d'une pompe à recycler ou minipuls ; on réalise un gradient dénaturant.

Vitesse moyenne sens de défilement ➤

Dans le formeur de gradient, évacuer l'eau de rinçage en ouvrant le robinet. Mettre en route la pompe boucher la côté + en l'inclinant pour retirer les bulles d'air puis stopper. Fermer le robinet. Commencer par mettre le mélange le moins concentré côté -. Boucher avec un parafilm et mélanger par retournement. Ouvrir doucement le robinet pour faire passer la solution à l'extrémité de l'autre compartiment Si de la solution passe dans le côté -.

Ajouter les polymérisants TEMED + persulfate puis mélanger par retournement. Placer le formeur sur l'agitateur de manière à ce que l'aimant du côté + ait une agitation régulière environ 250 (c'est là que ce fait le mélange et se forme le gradient).

Ouvrir le robinet et démarrer la pompe suivre le trajet du gel appliquer la pointe entre les deux plaques et vérifier qu'il n'y a pas de fuite.

Rmq 1 : si une bulle arrive dans le gel, arrêter la pompe attendre qu'elle éclate si le gel est trop avancé. Si c'est au début pencher légèrement les plaques jusqu'à ce que la bulle disparaisse et remettre en route.

Rmq2 : si il n'y a pas assez de gel en haut inf à 0,5 cm on peut rajouter le mélange le moins concentré à l'aide d'une micropipette pour cela on prépare environ 3 ml de mélange et on rajoute le tiers de polymérisants attention prend plus vite en masse !!

Une fois que le gel est coulé, appliquer le peigne bien droit ne pas hésiter à le relever si il y a des bulles entre les dents. Essayer à l'aide d'un sopalin l'excédent de gel au niveau des puits. Laisser polymériser à température ambiante ou activer à 37°C dans une étuve.

## Annexe

---

Une fois le gel polymérisé on peut le conserver en humidifiant le haut avec un sopalin mouillé à l'eau distillée et recouvert de papier d'aluminium. On peut ainsi réaliser des gels pour le lendemain en les mettant dans une pièce froide ou à +4°C.

### ➤ Dépôts :

Retirer les pinces puis le joint, essuyer les bords verticaux en faisant attention de ne pas bouger les spacers puis scotcher chacun des deux bords en évitant de faire des pliures.

Retirer le peigne bien droit. Retirer l'excès d'acrylamide avec un scalpel si besoin.

Bien rincer le haut du gel avec une pissette d'eau distillée. Monter les plaques sur leur support avec les pinces larges. Le bord découpé est face au joint. Les pinces sont bien vers le haut pour une meilleure étanchéité. Avant de déposer rincer de nouveau les puits avec du tapon TAE 1X de la cuve à l'aide d'une seringue.

Les dépôts se font en immersion pour des volumes >25µl ils peuvent se faire à l'extérieur pour des volumes inférieurs.

Plonger l'ensemble support + plaques dans la cuve en l'inclinant légèrement pour ne pas faire de bulles vers le bas.

Rmq : si il reste une bulle en bas des plaques laisser migrer jusqu'à ce que le bleu sorte et arrête la migration puis sortir le support pour le remplacer correctement.

Brancher la pompe à recycler de la cuve puis mettre la tuyau de recyclage au niveau du conduit le plus bas laisser le tampon monter jusqu'à débordement de l'autre côté.

Déposer en immersion en suivant les bords translucides des 2 puits vides de chaque côté du gel pour éviter les effets de bord.

### ➤ Migration :

Allumer le générateur et vérifier le mA il faut une correspondance 60mA pour 160 Volts.

Si le mA est un peu plus fort baisser légèrement le voltage sur la nuit et inversement.

Migrer dans les conditions données pour le fragment PCR étudié.

## Annexe

---

➤ Révélation du gel :

Arrêter le générateur débrancher la pompe retirer le tuyau de recyclage.

Retirer l'ensemble gel + support, vider le tampon du dessus défaire les pinces.

Refroidir les plaques. Retirer le scotch.

Mettre la plaque découpée vers soi.

Décoller la plaque de dessus en s'aidant avec le spacer et en faisant levier ou à l'aide d'une spatule.

Retirer les spacers selon de quel côté est resté le gel faire une découpe avec le spacer pour marquer le 1<sup>er</sup> dépôt.

Poser l'ensemble plaque + gel dans un bain de BET 10 à 15 minutes sous agitation douce.

Rincer brièvement à l'eau distillée dans un autre bac.

Prendre l'ensemble gel + plaque et faire glisser la table UV le gel en s'aidant d'une pissette d'eau distillée.

Faire la photo en indiquant la distance de migration et les conditions du gel en % la vitesse de la migration en volt\*heur et le mA.

## Annexe

### **Annexe N°: 07**

Les résultats moléculaires de nos patients

N° du Patient	Diagnostic	Génotype
1	Drépanocytose	CD 6/ CD 6
2	Drépanocytose	CD 6/ CD 6
3	Drépanocytose	CD 6/ CD 6
4	Thalasso-drépanocytose	CD 6/ inconnue.
5	Thalasso-drépanocytose	CD 6/ CD 39
6	Thalasso-drépanocytose	CD 6/ CD 39
7	Thalassémie	IVS-I-5 G→A/ inconnue
8	Thalassémie	CD 39/ CD 39
9	Thalassémie	Inconnue
10	Thalassémie	CD 39/ IVS-I-110
11	Thalassémie	CD 39/CD 39
12	Thalassémie	CD 39/CD39
13	Thalassémie	Inconnue
14	Thalassémie	Inconnue
15	Thalassémie	IVS-I-6/ CD 39
16	Thalassémie	IVS-I-110/ CD 39
17	Thalassémie	CD 39/ inconnue
18	Thalassémie	CD 39/CD 39
19	Thalassémie	Inconnue
20	Thalassémie	IVS-I-110/ CD 39
21	Thalassémie	Inconnue
22	Thalassémie	IVS-I-110/ IVS-I-110
23	Thalassémie	IVS-I-110/IVS-I-110
24	Thalassémie	IVS-I-110/IVS-I-110
25	Thalassémie	CD 39/ IVS-I-110
26	Thalassémie	IVS-I-110/ IVS-I-110
27	Thalassémie mineur	CD 39/ N
28	Thalassémie mineur	IVS-I-110/ N
29	Thalassémie mineur	IVS-I-110/ N
30	Thalassémie	CD 39/ IVS-I-5
31	Thalassémie	IVS-I-110/ IVS-I-110
32	Thalassémie	IVS-I-5/ IVS-I-5
33	Thalassémie	CD 39/ IVS-I-110
34	Thalassémie	IVS-I-110/ IVS-I-110
35	Thalassémie	IVSI110/ IVSI110
36	Thalassémie	Cod 8 (-AA)/ cod 8 (-AA)
38	Thalassémie	Cod 8 (-AA)/ cod 8 (-AA)