



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

**PROFIL GENETIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE
LA DREPANOCYTOSE :**

EXPERIENCE DU CHU HASSAN II DE FES.

Présenté par : QIRAOUANI BOUCETTA Salma

Encadré par : Pr GUISSI Sanae (FST Fès)

Dr ABBASSI Meriame (CHU-FES, Laboratoire central)

Soutenu le : 05/07/2022

Devant le jury composé de :

- **Pr GUISSI Sanae**
- **Pr ABBASSI Meriame**
- **Pr TLEMCANI Rachida**

Stage effectué à : Centre Hospitalo Universitaire Hassan II

Unité : Génétique Médicale et Oncogénétique

Année universitaire 2021-2022

Dédicace :

À MES CHERS PARENTS : aucun hommage ne pourrait être à la hauteur d'exprimer mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien, l'effort, l'encouragement et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Que Dieu, le tout puissant, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

À MON FRERE ET MA SŒUR : Amine et Chaimae pour leur amour, vous comptez beaucoup pour moi.

À MES GRAND-MERES ET MON GRAND-PERE: qui ne cessent de prier pour moi.

À MES PROFESSEURS: sans exception, pour leurs efforts afin de nous assurer une excellente formation, merci pour votre patience, vos conseils et vos encouragements.

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.

Remerciements :

Je tiens à exprimer mes remerciements et mes sentiments de gratitude à :

Dieu, le tout-puissant, qui m'a donné la force pour supporter et affronter les difficultés que j'ai rencontrées pour arriver à ce jour-là.

Pr GUISSI Sanae, mon encadrante interne, pour sa disponibilité, la qualité de son encadrement spécial, qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport pour arriver à ce résultat. Merci énormément pour vos orientations, informations, et conseils. J'ai eu le privilège de bénéficier de votre savoir et de votre grande expérience qui, jumelés à vos qualités humaines, resteront pour moi un modèle.

Mme ABBASSI Meriame, mon encadrante externe, qui m'a accueilli avec bienveillance et a accepté de diriger ce travail et de répondre à toutes mes questions. Merci pour les jolis moments qu'on a passé ensemble, le sérieux travail, et l'énergie positive que vous nous avez donné.

Mr HALOTI Saïd, coordinateur de la LST Sciences Biologiques Appliquées et Santé, de ses efforts pour nous trouver un stage.

Mes remerciements s'adressent aussi à **Mme TLEMCANI Rachida** pour sa présence, sa lecture attentive de mon rapport, ainsi que pour les remarques quelle m'adressera lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail.

Merci également à toute l'équipe du laboratoire central d'analyses médicales CHU Hassan II de Fès pour leur accueil, leur sérieux travail, leur aide à chaque opportunité et surtout pour leur esprit d'équipe.

Table de matières :

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Présentation de la structure d'accueil

	Page
Introduction	01
Chapitre 1 : Etude Bibliographique	02
I. Les hémoglobines :	02
1. Définition :	02
2. Structure :	02
3. Fonction :	03
4. Synthèse :	03
5. Evolution ontogénique des hémoglobines humaines :	03
6. Taux normal de l'hémoglobine :	05
7. Gènes de globine :	05
a. Structure :	05
b. Localisation :	06
c. Le cluster beta-globine :	06
II. La drépanocytose :	07
1. Historique :	07
2. Définition :	07
3. Epidémiologie :	08
4. Génétique et physiopathologie :	08
a. Génétique et mutation :	08
b. Mécanisme de falciformation :	10
c. Mode de transmission :	10
5. Diagnostic :	11
6. Traitement :	11

Chapitre 2 : Matériel et méthodes	12
I. Matériel	12
II. Méthodes utilisées	12
1. Prélèvement sanguin :	12
2. Extraction d'ADN :	12
a. Principe :	12
b. Protocole expérimentale :	13
3. Dosage de l'ADN :	13
4. La technique PCR :	14
a. Principe :	14
b. Protocole expérimentale :	14
5. Electrophorèse des produits de PCR :	16
6. Séquençage d'ADN :	16
a. Principe :	16
b. Protocole expérimentale :	16
c. Les outils bioinformatiques :	19
Chapitre 3 : Résultats et discussion	20
I. Résultats :	20
1. Données épidémiologiques :	20
2. Données cliniques :	21
3. Résultats de biologie moléculaire :	22
II. Discussion :	25
Conclusion :	27
Références bibliographiques :	28

Liste d'abréviations :

Abréviation	Signification
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BET	Bromure d'éthidium
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
dNTP	Désoxyribonucléotide
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
GR	Globule rouge
Hb	Hémoglobine
Hb A	Hémoglobine adulte
Hb F	Hémoglobine fœtale
Hb S	Hémoglobine S
HLA	Human leucocyte antigen
LCR	Locus Control Region
O ₂	Oxygène
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
T	Thymine
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> polymérase
TBE	Tris, Borate, EDTA
T _m	Température d'hybridation

Liste des figures :

Figure	Titre	Page
Figure 01	Structure de la molécule d'hémoglobine.	02
Figure 02	Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines précédant et suivant la naissance.	03
Figure 03	Structure des gènes de la globine du groupe α et β	05
Figure 04	Localisation chromosomique des gènes codant les différentes globines humaines.	06
Figure 05	Localisation du cluster bêta-globine (chromosome 11).	06
Figure 06	Différence entre GR normal et GR anormal.	08
Figure 07	La drépanocytose au niveau du génotype	09
Figure 08	La drépanocytose au phénotype moléculaire	09
Figure 09	Falciformation d'un globule rouge.	10
Figure 10	Transmission héréditaire de la drépanocytose	11
Figure 11	Spectre d'absorption relatif à un dosage d'ADN.	14
Figure 12	Séquenceur Applied Biosystems (Laboratoire de génétique médicale-CHUF).	18
Figure 13	La fréquence de la maladie selon les tranches d'âges.	20
Figure 14	Répartition de la maladie selon le sexe.	21
Figure 15	Profils électrophorétiques des produits d'amplification de l'exon1 du gène <i>HBB</i> sur gel d'agarose 2 % des 21 patients étudiés, avec un témoin négatif (T).	22
Figure 16	Chromatogramme de la séquence F d'un patient normal.	23
Figure 17	Chromatogramme de la séquence R d'un patient normal.	23
Figure 18	Chromatogramme de la séquence F d'un patient montrant une mutation homozygote c.20 A>T.	23
Figure 19	Chromatogramme de la séquence R d'un patient montrant une mutation homozygote c.20 A>T.	24
Figure 20	Chromatogramme de la séquence F d'un patient montrant une mutation hétérozygote c.20 A>T.	24
Figure 21	Chromatogramme de la séquence R d'un patient montrant une mutation hétérozygote c.20 A>T.	24

Liste des tableaux :

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Hémoglobines humaines normales en fonction du stade de développement.	04
Tableau 02	Les valeurs normales d'hémoglobine selon l'âge et le sexe.	05
Tableau 03	La taille, la composition en bases et la température d'hybridation (T_m) d'amorce sens et anti-sens, et la taille du gène à amplifier.	15
Tableau 04	Les composants du mélange réactionnel d'une réaction PCR.	15
Tableau 05	Le programme de PCR.	15
Tableau 06	Protocole de purification des produits PCR.	17
Tableau 07	Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquençage.	17
Tableau 08	Programme du thermocycleur de la réaction de séquençage.	17
Tableau 09	Protocole de purification des produits de la réaction de séquence.	18

Présentation de la structure d'accueil :

Unité de génétique médicale et d'oncogénétique Laboratoire central d'analyses médicales CHU Hassan II Fès

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J. Il représente un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales. Ce bâtiment comprend :

- Une salle de réception
- Une salle de prélèvements
- Plusieurs laboratoires, à savoir :
 - Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie
 - Laboratoire d'hématologie
 - Laboratoire de bactériologie /Immunologie
 - Laboratoire de parasitologie
 - Laboratoire de génétique
 - Laboratoire d'anatomie pathologique.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est située au deuxième étage du laboratoire central d'analyses médicales. Elle représente une première expérience dans un CHU au Maroc. Elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009 et subdivisée en 3 disciplines : génétique clinique (centre diagnostic), génétique chromosomique classique et moléculaire, génétique moléculaire.

Le laboratoire est composé d'un plateau technique spécialisé, comportant 5 salles climatisées :

- Une salle de culture dédiée à la cytogénétique,
- Une salle de préparation des Mix pour PCR avec une hotte PCR,
- Une salle de PCR : complètement automatisée.
- Une salle de migration et d'analyse des produits de PCR
- Une salle de lecture dotée de deux microscopes couplés à des systèmes de capture et de traitement d'image.

Introduction :

Les hémoglobinopathies ou hémoglobinoses sont les maladies mono-génétiques les plus répandues dans le monde, qui se caractérisent par une anomalie héréditaire touchant la partie protéique de l'hémoglobine [1,13]. Les hémoglobinopathies sont de deux types. Dans les anomalies de structure, une hémoglobine anormale est présente, entraînant ou non des signes fonctionnels. Ainsi, l'hémoglobine S responsable de la drépanocytose, a une place prépondérante. Les anomalies de synthèse, partielles ou totales des chaînes α et/ou β , s'expriment dans le groupe très hétérogène des thalassémies [2].

La drépanocytose est une maladie génétique qui se transmet sur le mode autosomique récessif. La maladie résulte d'une mutation ponctuelle du sixième codon du gène β -globine, le gène *HBB*. La mutation provoque la synthèse d'une hémoglobine anormale qui va perturber la fonction des globules rouges [6,8].

Ce type d'anémie présente un problème de santé publique au Maroc, on estime qu'il y a environ 15.000 nouveaux cas de drépanocytose au Maroc chaque année, d'après les données publiées par l'OMS [20]. Ainsi, la drépanocytose est une urgence médicale imposant dans la majorité des cas des sanctions transfusionnelles sanguines mensuelles.

En effet, notre projet réalisé au Laboratoire central d'analyses médicales CHU Hassan II-Fès, **unité de Génétique et d'oncogénétique** s'inscrit dans ce cadre et a pour objectif l'étude du profil génétique des patients présentant des signes de la drépanocytose. Il s'agit de déterminer la mutation du gène *HBB* par séquençage de l'ADN génomique, à partir des produits d'amplification de l'exon 1 de ce gène.

Chapitre I : Etude bibliographique.

I. Les hémoglobines :

1. Définition :

L'hémoglobine [Hb], est un pigment des globules rouges, auxquels il donne sa couleur rouge. Elle représente 95% des protéines intracellulaires et se trouve essentiellement chez tous les vertébrés ainsi que dans les tissus de certains invertébrés [19]. Ce terme a été mis en place en 1862 par le physiologiste allemand Hoppe-Seyler [18] et grâce aux avancées de ces dernières années, l'hémoglobine humaine est aujourd'hui l'une des protéines les plus connues.

2. Structure :

L'hémoglobine possède une structure quaternaire de poids moléculaire 64 500 KDa. Elle comprend une portion protéique, **la globine**, partie variable de la molécule et un pigment porphyrrique, **l'hème**, fraction semblable chez les différentes hémoglobines humaines normales, anormales et animales [9,10].

La globine comporte quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes α avec 141 acides aminés et deux chaînes non α (β , δ , γ) avec 146 acides aminés. Chacune est attachée à un groupement hémique par un atome de fer [9]. La molécule complète d'hémoglobine comporte donc, quatre chaînes globiniques et quatre groupements d'hème avec quatre noyaux de fer et par la suite peut fixer quatre molécules d'oxygène.

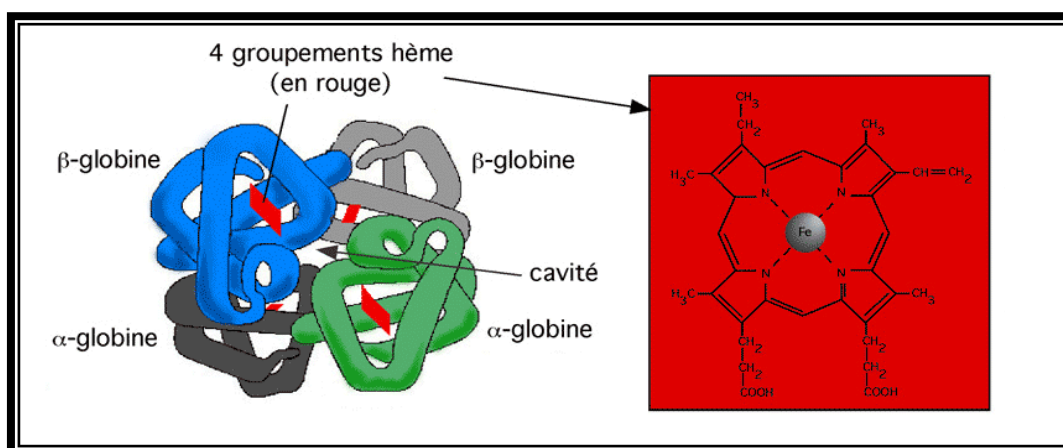


Figure 1 : Structure de la molécule d'hémoglobine [22].

3. Fonction :

La fonction principale est de **transporter l'oxygène des poumons vers les organes**, les muscles et tous les tissus grâce à la circulation artérielle. Après avoir délivré l'oxygène aux tissus, elle retourne aux poumons en y transportant le dioxyde de carbone de l'organisme, et se charge de nouveau en oxygène afin d'assurer le cycle de respiration cellulaire [9].

4. Synthèse :

L'hémoglobine est une molécule dont la production s'effectue séparément. La formation de la globine est dépendante de deux gènes autosomiques. En effet, comme chez tous les eucaryotes, la synthèse des chaînes débute par celle des transcrits primaires d'ARN, leur maturation nucléaire et leur transport vers le cytoplasme où se fera la traduction de l'ARNm. La production de l'hème commence dans la mitochondrie, se poursuit dans le cytosol et s'achève dans la mitochondrie [17]. Cette synthèse est dépendante de la disponibilité de certains substrats (fer, pyridoxine ou vitamine B6, vitamine B12, acide ascorbique ou vitamine C, acide folique, cuivre) et s'effectue à partir de la glycine et de l'acide succinique [17]. L'assemblage des deux unités s'effectue dans les différents compartiments du GR. Ainsi, environ 300 millions de molécules d'hémoglobines sont synthétisées de façon quotidienne.

5. Evolution ontogénique des hémoglobines humaines :

L'assemblage des chaînes de globines est à l'origine des différents types d'hémoglobines. Deux chaînes α (ζ ou α) s'apparient systématiquement à deux chaînes non α (ϵ , γ , δ , ou β) tout en permettant la production successive de diverses hémoglobines présentes à chaque stade de la vie.

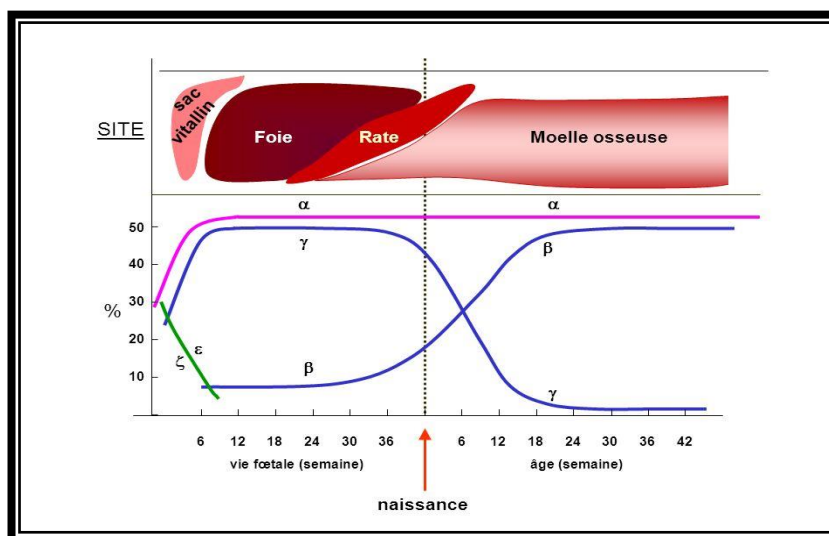


Figure 2 : Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines précédant et suivant la naissance [26].

✓ **Chez l'embryon :**

L'érythropoïèse a lieu dans le sac vitellin et les GR contiennent totalement l'Hb embryonnaire. Deux chaînes de la famille alpha coexistent : ζ qui apparaît la première, puis α . De même, il existe deux chaînes de type β : ϵ spécifique à cette période initiale de la vie et les chaînes γ (ou fœtales). Ces diverses sous-unités permettent de réaliser les trois Hb de l'embryon : l'Hb Gower1 ($\zeta_2\epsilon_2$), L'Hb Gower 2($\alpha_2\epsilon_2$) et L'Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) [12].

✓ **Chez le fœtus :**

L'érythropoïèse se déroule au niveau du foie et de la rate. L'hémoglobine fœtale (Hb F) de structure $\alpha_2\gamma_2$ est détectable à partir de la 5^{ème} semaine de la vie intra-utérine. A ce stade, le taux de l'Hb F est faible. Durant la 8^{ème} et 10^{ème} semaine, son taux s'élève jusqu'à 90% et c'est aussi à partir de ce moment-là que commence la synthèse d'hémoglobine adulte A ($\alpha_2\beta_2$) et de l'hémoglobine A2 ($\alpha_2\delta_2$) avec des taux faibles [14].

✓ **A la naissance et chez l'adulte :**

La synthèse des hémoglobines se poursuit dans la moelle osseuse.

Chez le nouveau-né, on retrouve principalement l'Hb fœtale avec un taux avoisinant les 85%, et l'Hb A et de l'Hb A2 avec un taux avoisinant 0,3 à 0,7%.

Chez l'adulte (au-delà de 2 ans), il ne subsiste plus d'Hb F (<1 %). Les GR sont donc constitués essentiellement de l'Hb A avec un taux voisin de 97%, associée aux hémoglobines dites minoritaires notamment l'hémoglobine A2 et l'Hb F [12].

Tableau 1: Hémoglobines humaines normales en fonction du stade de développement.

Stade de la vie	Type d'hémoglobine
Stade embryonnaire	Hémoglobine Gower1 ($\zeta_2\epsilon_2$) Hémoglobine Gower 2($\alpha_2\epsilon_2$) Hémoglobine Portland ($\zeta_2\gamma_2$)
Stade fœtale	Hémoglobine F (80-95 %) Hémoglobine A (5-10 %)
Stade adulte	Hémoglobine A (95 %) Hémoglobine A2 (2,5 - 3%) Hémoglobine F (<1%)

6. Taux normal de l'hémoglobine :

Le taux normal d'hémoglobine varie selon l'âge et le sexe de l'individu. Les valeurs de référence varient selon les tranches d'âge. Elles sont listées ci-dessous :

Tableau 2 : Les valeurs normales d'hémoglobine selon l'âge et le sexe [27].

Le taux normal d'hémoglobine	Age	Valeur d'Hb (g/l)
Chez les nouveaux nés	1 jour	170 – 200
	7 jours	170 – 210
	21 jours	130 – 180
	3 mois	100 – 130
	6 mois	110 – 140
	1 an	110 – 150
Chez les enfants	6 ans	125 – 150
	10 ans	135 – 150
	Sexe	
Chez l'adulte	Féminin	120 – 160
	Masculin	140 – 180

Remarque : Le taux d'hémoglobine chez une femme enceinte est 110 g/

7. Gènes de la globine :

a. Structure :

Les gènes de la globine de type α et β sont relativement petits, respectivement de 1kb et 2 kb et leur structure est pratiquement identique : **trois exons séparés par deux introns**, et un **promoteur** contenant une séquence de régulation spécifique. Cependant, le second intron est plus long que le premier dans la famille des gènes β globine [10].

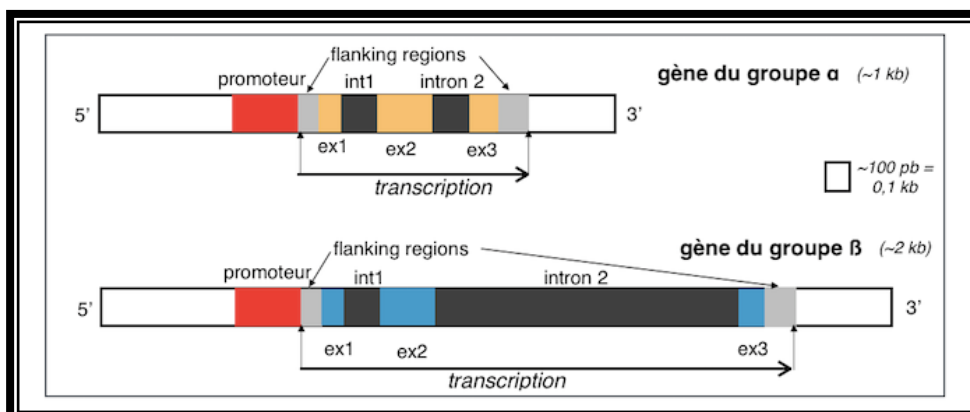


Figure 3 : Structure des gènes de la globine du groupe α et β [10].

b. localisation :

Les gènes de la globine α et β sont situés respectivement sur le bras court (p) des chromosomes autosomiques 16 (16p13.3) et 11 (11p15.5) et il occupe environ 30 kb pour le premier et 60 kb pour le dernier [10].

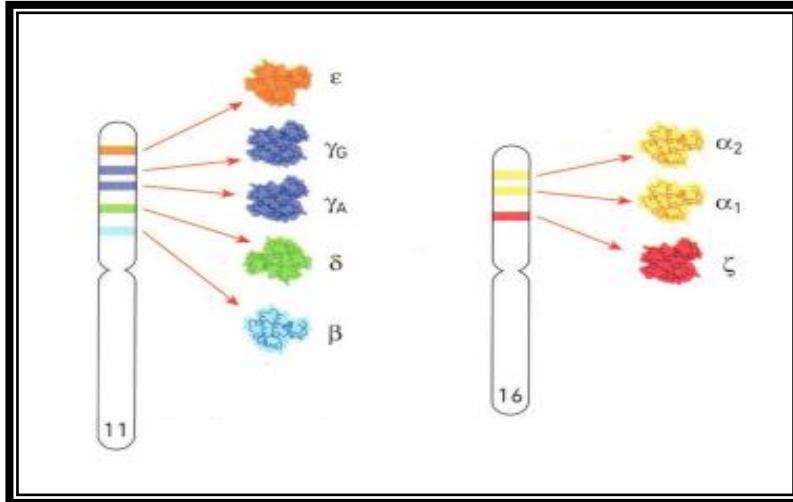


Figure 4 : Localisation chromosomique des gènes codant les différentes globines humaines [23].

c. Le cluster beta-globine :

Le cluster bêta-globine comprend 6 gènes organisés de 5' vers 3' selon leur ordre d'expression durant les différents stades de la vie : les gènes *HBE* (ϵ) embryonnaire, *HBG2* ($G\gamma$) et *HBG1* ($A\gamma$) fœtaux, *HBD* (δ) (minoritaire) et *HBB* (β) adultes sont les seuls exprimés et le gène *HBBP1* qui est un pseudo-gène non codant [10].

Il comporte une région régulatrice majeure appelée LCR (Locus Control Region) située à l'extrémité 5'. Elle est composée de cinq sites hypersensibles à l'ADNase (HS1 à HS5, numérotés de 3' vers 5') et dont le rôle crucial a été démontré dans le déroulement de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes au cours du développement [10,15].

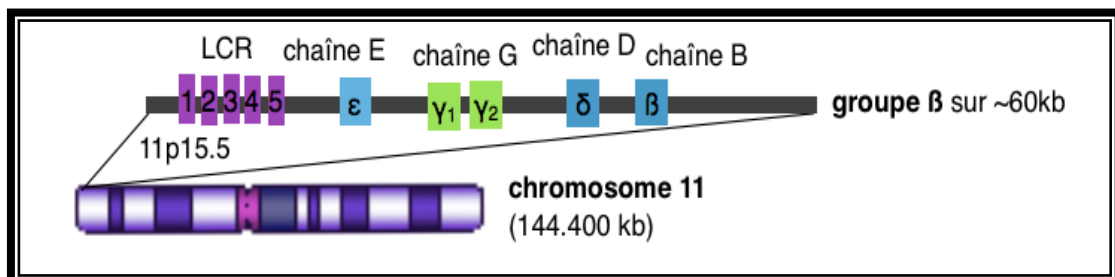


Figure 5 : Localisation du cluster bêta-globine (chromosome 11) [10].

II. La drépanocytose :

1. Historique de drépanocytose :

James HERRICK, médecin de Chicago, fait la première description médicale de la drépanocytose en 1910. Il examine alors un jeune étudiant noir de 20 ans, souffrant d'une anémie, une déformation caractéristique en « faucille » des globules rouges [3,16]. En 1917, Emmel a démontré que la falciformation in vitro des globules rouges des sujets drépanocytaires était possible. Cette falciformation pouvant être provoquée chez des sujets cliniquement sains, il concluait à l'existence de deux formes de la maladie [3]. En 1949, James Neel et Beet, par de nombreuses études familiales, confirmèrent l'hypothèse de l'existence de deux formes de la maladie : la forme homozygote SS, symptomatique, et la forme latente ou hétérozygote AS [3].

Dans la même année, Pauling, Itano, Singer et Wells font accomplir un progrès en effectuant l'électrophorèse de l'hémoglobine d'un patient possédant des hématies falciformes. Celle-ci montre une hémoglobine A normale (notée Hb A) et une autre hémoglobine, notée Hb S. Un tel patient est dit porteur du trait drépanocytaire, il est hétérozygote HbA/HbS [3].

En 1956, Vernon Ingram démontra que la différence entre Hb A et Hb S est due à la substitution d'un seul acide aminé : l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une valine [3]. Dans les années 60, on découvre que le gène codant la production de la chaîne β se trouve sur le chromosome 11. Pour l'anémie falciforme, il y a remplacement sur le codon 6 d'une adénine par un uracile : GAG devient GUG [3].

Au début des années 70, des études ont montré que la population américaine d'origine africaine est en effet très touchée. Tom MANIATIS, docteur à l'Institut de Technologie de Californie, isole le gène bêta globine [3]. En 1988, la création de la première association de lutte contre la drépanocytose : l'**A.P.I.P.D.**, l'**A**ssociation **P**our l'**I**nformation et la **P**révention de la **D**répanocytose [3].

2. Définition :

La drépanocytose aussi appelée **anémie falciforme**, est une maladie génétique, héréditaire de transmission autosomique récessive mono-génique et mono-mutationnelle [8]. C'est une maladie du sang, et particulièrement de l'hémoglobine qui entraîne la destruction rapide des hématies et modifie ainsi les propriétés physiques de l'hémoglobine. A l'état homozygote, cette anomalie entraîne en cas d'hypoxie, une polymérisation de l'hémoglobine provoquant une déformation des hématies en faucilles. Cette anomalie d'hémoglobine donne une nouvelle molécule : l'**hémoglobine S (Hb S)** [8].

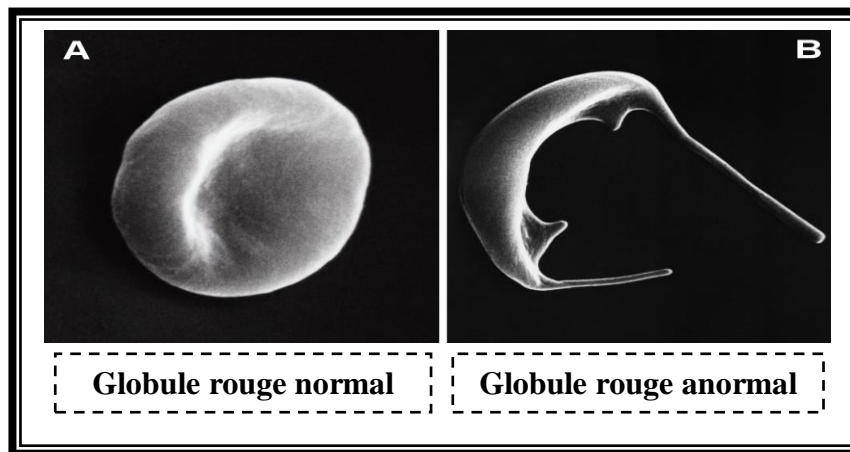


Figure 6 : Différence entre GR normal et GR anormal [4].

3. Epidémiologie :

La drépanocytose est l'hémoglobinopathie qualitative la plus répandue dans le monde. Selon l'OMS, 300 000 naissances par an dans le monde ont une hémoglobinopathie grave, dont 200 000 enfants atteints de la drépanocytose [13]. L'allèle S est surtout répandu en Afrique, notamment en Afrique noire, et en Amérique (Etats Unis, Antilles, Brésil) [5,16].

Il est également observé dans les pays du bassin méditerranéen (Maghreb, Sicile, Grèce), dans tout le Moyen-Orient jusqu'en Arabie Saoudite et en Inde [5].

4. Génétique et physiopathologie :

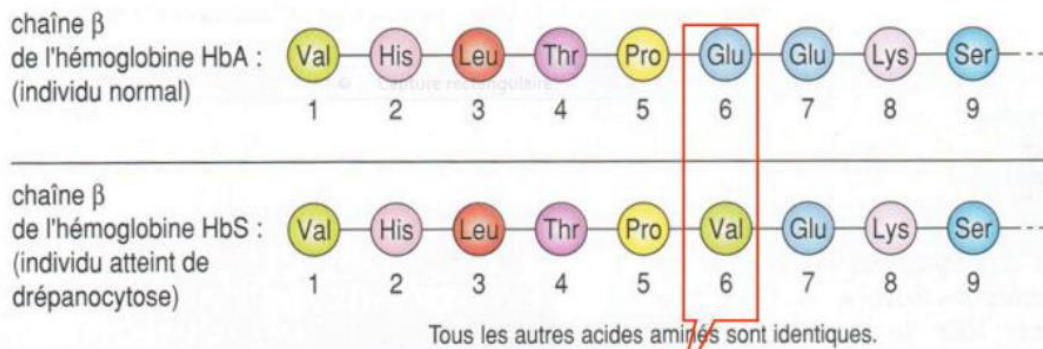
a. Génétique et mutation :

La drépanocytose est due à la mutation du gène *HBB* qui code pour la chaîne Bêta de l'hémoglobine et qui est porté sur le chromosome 11p15.5, la version mutée de ce gène est appelée l'allèle "S". La mutation de cet allèle correspond à la substitution du nucléotide en dix-septième position [8]. Sur l'allèle de l'individu sain, il s'agit d'une adénine, tandis que sur l'allèle de l'individu drépanocytaire, ce dix-septième nucléotide est une thymine [11].

Brin d'ADN normal antisens	3'	CAC	GTA	GAC	TGA	GGA	CTC	CTC	TTC	AGA	5'
Brin d'ADN normal sens	5'	GTG	CAT	CTG	ACT	CCT	GAG	GAG	AAG	TCT	3'
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Brin d'ADN muté antisens	3'	CAC	GTA	GAC	TGA	GGA	CAC	CTC	TTC	AGA	5'
Brin d'ADN muté sens	5'	GTG	CAT	CTG	ACT	CCT	GTC	GAG	AAG	TCT	3'
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	

Figure 07 : La drépanocytose au niveau du génotype [21].

Cette mutation faux-sens implique un changement du codon au niveau de l'ARN messager, qui sert à la production de la protéine : le codon GAG devient GUG. Ceci va entraîner aussi un changement de l'acide aminé en sixième position sur la protéine de l'hémoglobine : l'acide glutamique hydrophile est substitué par une valine qui est un acide aminé hydrophobe [11].



On note une différence d'un acide aminé : le numéro 6 est différent GLU → VAL

Figure 8 : La drépanocytose au phénotype moléculaire [21].

b. Mécanisme de falciformation :

La falciformation est la transformation d'une hématie discocyte en un drépanocyte.

L'Hb passe d'abord par la circulation générale pour transporter l'oxygène aux différents tissus d'organisme. Arrivant à la microcirculation dont laquelle la pression en oxygène diminue, l'Hb S va céder ses molécules d'O₂, ce phénomène s'appelle **la désoxygénation** [8].

Suite à cette désoxygénation, la valine mutée qui est un acide aminé hydrophobe va établir des liaisons avec des résidus hydrophobes situés sur une autre chaîne β d'une autre Hb S : **polymère d'Hb S** [8].

Ce polymère se lie sur la face interne de la membrane érythrocytaire, ce qui donne comme conséquence une modification morphologique du GR en une forme de **faucille** [4].

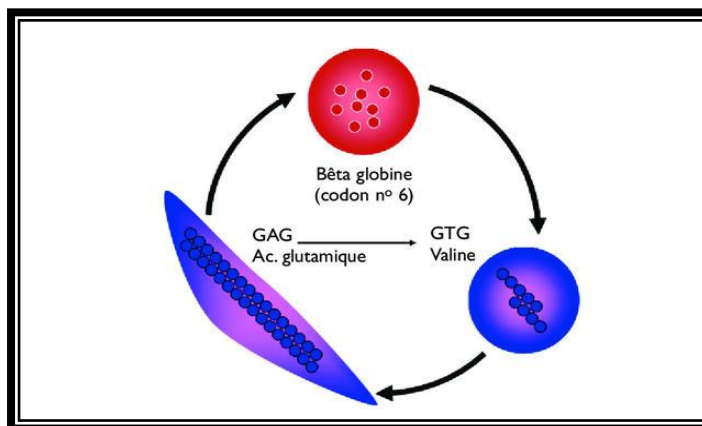


Figure 9 : Falciformation d'un globule rouge [24].

c. Mode de transmission :

La transmission de la drépanocytose se fait sur le mode **autosomique récessif** [13]. Ceci signifie que les deux sexes sont affectés avec la même fréquence car il ne concerne pas le chromosome sexuel [1].

Un enfant donc ne peut être malade que si les deux parents sont hétérozygotes porteurs, c'est-à-dire qu'ils possèdent dans leur patrimoine génétique, un gène normal (A) et un gène drépanocytaire (S). Les hétérozygotes ne ressentent aucun signe et ils peuvent transmettre le gène normal ou le gène drépanocytaire [7].

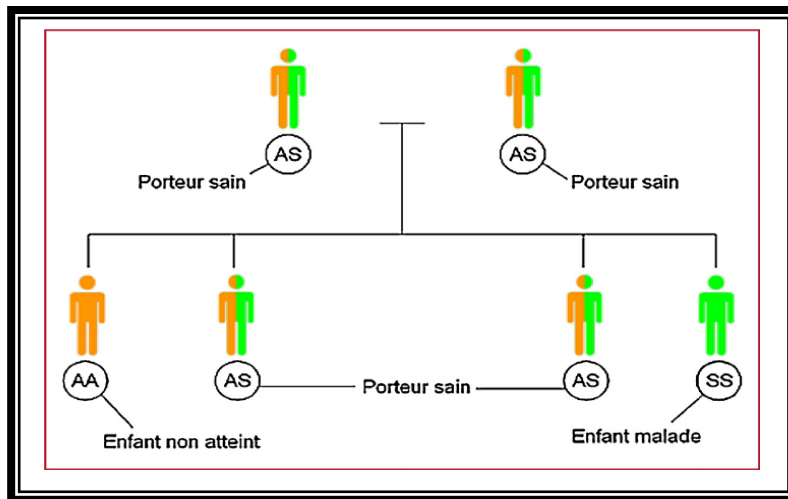


Figure 10 : Transmission héréditaire de la drépanocytose [25].

5. Diagnostic :

Le diagnostic est posé **en examinant la forme des globules rouges, en analysant l'hémoglobine, et en pratiquant des tests génétiques [1].**

- ✓ L'observation au microscope d'un frottis sanguin permet de mettre en évidence la présence de globules rouges falciformes.
- ✓ L'analyse précise de l'hémoglobine par la technique d'électrophorèse de l'hémoglobine, qui a comme but la détection des anomalies de l'hémoglobine, permet de mettre en évidence la présence de l'hémoglobine anormale S.
- ✓ Les tests génétiques, utilisant les différentes techniques de la biologie moléculaire, permettent d'identifier précisément la mutation du gène de la β -globine impliquée dans la maladie chez l'enfant et chez les deux parents.

6. Traitement :

Le seul traitement curatif actuellement disponible contre la drépanocytose est la greffe de la moelle osseuse. Cette moelle contient en effet des cellules souches qui donnent naissance aux cellules sanguines, dont les globules rouges. Concrètement, les cellules souches de la moelle du patient sont détruites et remplacées par celles d'un donneur sain compatible [4]. Cependant, ce traitement est limité par la disponibilité d'un donneur HLA compatible, de ce fait les traitements conventionnels tels la transfusion sanguine restent de références.

La transfusion sanguine est un outil important dans la prise en charge des patients drépanocytaires. Elle consiste à transfuser le malade avec le sang d'un donneur sain compatible, permettant ainsi de **rétablir un taux acceptable de globules rouges** et de « diluer » les **globules rouges falciformes avec des globules rouges normaux [4,13].**

Chapitre 2 : Matériel et méthodes.

I. Matériel :

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire central de CHU HASSAN II de FES, unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique (UGMO) durant une période de 8 semaines allant du 24/04/2022 au 24/06/2022. Ce travail porte sur **21 patients** diagnostiqués auparavant par la technique de biochimie (électrophorèse d'Hb) devant la présence des signes cliniques de la drépanocytose. Les patients ont été recrutés à l'unité d'hémato-oncologie du service de pédiatrie (CHOP).

II. Méthodes utilisées :

Le but de notre travail est de chercher la mutation du gène *HBB* responsable de la drépanocytose par les techniques de biologie moléculaire qui suivent :

1. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement sanguin a été réalisé pour chaque patient à partir du sang veineux dans des conditions stériles. Le sang est recueilli dans des tubes contenant l'anticoagulant EDTA qui est un inhibiteur de l'action des enzymes ADN ase ou nucléases, et préservateur de l'intégrité moléculaire.

2. Extraction d'ADN :

Au sein du laboratoire de génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction d'ADN se fait selon le KIT commercialisé (**invitrogen**). Cette technique permet l'isolement de l'ADN des cellules ou des tissus. L'ADN ainsi extrait peut être ensuite utilisé dans toutes les applications courantes de la biologie moléculaire tels que la PCR , le séquençage de l'ADN , le clonage , l'analyse par Southern Blot, etc....

a. Principe :

La technique par KIT est simple, rapide et avantageuse. Elle permet d'obtenir une meilleure qualité de l'ADN et aussi de gagner du temps afin de rendre un résultat rapide aux patients.

Quelle que soit la méthode utilisée, le principe de l'extraction d'ADN reste le même : la destruction des membranes par des réactions physico-chimiques et la centrifugation pour séparer les différents composant.

b. Protocole expérimental :

➤ Lyse des cellules avec la protéine kinase K et le tampon de lyse :

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, 200 µl de sang sont mélangés avec 20 µl de protéinase K et 20 µl de RNase. Le tube est vortexé pendant 15 secondes puis incubé 2 minutes à T° ambiante. 200 µl de pure link™ Genomic Lysis Binding Buffer sont ensuite ajoutés. Le tube est à nouveau vortexé pendant 15 secondes et incubé 10 minutes dans le bain marie à 55°C. 200 µl d'éthanol absolu sont finalement ajoutés et le tube est vortexé pendant 5 secondes.

➤ Adsorption de l'ADN :

Le mélange est placé dans la colonne Pure Link™ et centrifugé 1 minute à 8000 rpm. La colonne est ensuite mise dans un tube collecteur de 2 ml (fournit par le kit) et le tube contenant le filtrat est jeté.

➤ Elimination des contaminants résiduels :

400µl de tampon Wash Buffer 1 sont ajoutés et le tube est centrifugé 1 minute à 8000 rpm. La colonne est ensuite mise dans un tube collecteur de 2 ml (fournit par le kit) et le tube contenant le filtrat est jeté. 400µl de tampon Wash Buffer 2 sont ajoutés et le tube est centrifugé 3 minutes à 14000 rpm. La colonne est placée dans un tube eppendorf de 1,5ml et 70µl de tampon pure Link™ Genomic Elution Buffer sont ajoutés. Une incubation de 1 à 5 minutes à T° ambiante est ensuite réalisée suivie d'une centrifugation pendant 1 minute à 8000 rpm. L'ADN extrait peut être conservé à +4°C ou -20°C.

3. Dosage de l'ADN :

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrométrie qui mesure l'absorbance des acides nucléiques à 260 nm. Un ADN pur doit avoir un rapport **A260 /A280** compris entre **1,8** et **2**.

Au laboratoire, le **NANODROP** est utilisé pour réaliser le dosage, c'est un spectrophotomètre, qui mesure la concentration des acides nucléiques avec une grande précision en utilisant des micro-volumes. Il suffit de déposer dans l'appareil 2µl d'ADN extrait pour déterminer sa concentration.

Le spectre d'absorbance est montré dans la figure suivante :

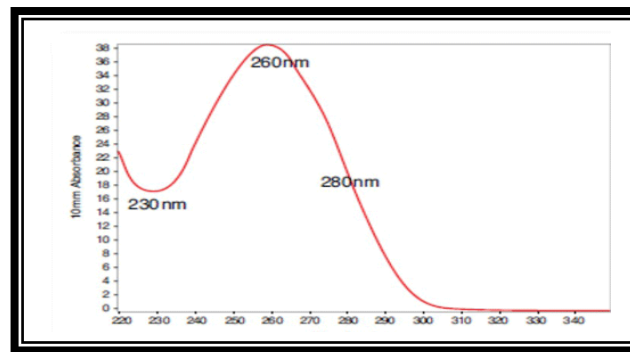


Figure 11 : spectre d'absorption relatif à un dosage d'ADN.

4. La technique PCR :

Le kit utilisé durant cette technique est « **DreamTaq green PCR Master Mix** ». Ce kit possède une solution prête à l'emploi contenant tous les éléments nécessaires pour la réaction PCR.

a. Principe :

La réaction PCR (**POLYMERASE CHAIN REACTION**) permet l'amplification génétique in vitro d'ADN en faible quantité afin d'obtenir un très grand nombre de copies de cette séquence d'ADN choisie pour l'étudier.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une Taq polymérase.

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence cible.

b. Protocole expérimental :

✓ Choix d'amorces :

Le choix des amorces est crucial car il permet d'assurer **la spécificité, la stabilité et la compatibilité** nécessaire pour la région cible.

Le logiciel **PerlPrimer** a été utilisé pour faire le design des amorces. Certains paramètres ont été vérifiés, comme par exemple :

- Éviter l'**autohybridation** des amorces et donc la formation des dimères.
- La différence de la T_m entre les 2 amorces qui ne doit pas dépasser 3 °C.

Ensuite, un **BLAST** des amorces choisies a été effectué pour vérifier leur spécificité. Les amorces sens et anti-sens ainsi que leur taille, leur composition en bases et leur température d'hybridation (T_m), et la taille de gène à amplifier sont indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 3 : La taille, la composition en bases et la température d'hybridation (Tm) d'amorce sens et anti-sens, et la taille du gène à amplifier.

Amorce	Séquence	Nbre de base	Tm °C	Taux de GC	Taille de gène
Sens	5'-CTGACACA ACTGTGTTC ACT-3'	20	60°C	45%	355 pb
Anti-sens	5'- TTCACCTTAGGGTTGCC C-3'	18	60°C	55,5%	

Les composants du mélange réactionnel d'une réaction PCR sont résumés dans le tableau 4

Tableau 4 : Les composants du mélange réactionnel d'une réaction PCR.

Réactifs	Volume nécessaire pour un échantillon μ l
Solution Green Taq (5UI/ml)	10
Eau (water nuclease free)	12
Amorce F 10 μ M	1
Amorce R 10 μ M	1
ADN 100ng/ μ l	1
Volume total	25

Le mélange est placé dans le thermocycleur pour l'amplification selon un programme bien déterminé (tableau 5) :

Tableau 5 : Programme de PCR

Étapes	Températures	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	3min	x1
Dénaturation	95°C	30s	
Hybridation	60°C	30s	x35
Elongation	72°C	1min	
Elongation finale	72°C	9mn	x1

5. Electrophorèse des produits de PCR :

Une électrophorèse est nécessaire pour la vérification que l'amplification a été passée dans les bonnes conditions sans aucune contamination, ainsi pour le contrôle de la taille des fragments amplifiés par la PCR.

La migration d'une molécule d'ADN dépend de sa taille et de sa charge.

Dans notre étude, l'électrophorèse est assurée dans une cuve horizontale sur un gel d'agarose à 2% (Tris-Borate-EDTA : TBE à 1X) auquel ont été incorporé 4µl de Bromure d'éthidium : BET à 10mg/ml (un agent intercalant se fixant entre les bases nucléiques, rendant l'ADN fluorescent sous UV pour visualiser les bandes résultantes). Dans chaque puit du gel et du côté cathode (-), 7µl du produit d'amplification a été déposé. Ensuite, le système est soumis à une migration sous un courant de 120 volts pendant 20 min. Après la migration, une visualisation des produits amplifiés est réalisée sous UV.

6. Séquençage d'ADN :

a. Principe :

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Afin de détecter les différentes mutations de l'exon 1 du gène *HBB*, le séquençage de Sanger automatisé a été appliqué.

Ce processus du séquençage est composé de trois étapes : une purification du produit PCR initial, une amplification de l'ADN en présence des nucléotides marqués, et une purification des produits de la réaction de séquence pour éliminer l'excès des réactifs.

b. Protocole expérimental :

➤ Purification du produit PCR initial par ExoSAP :

Avant de séquencer l'ADN, une purification du produit PCR est nécessaire. Pour notre étude, une purification enzymatique par l'ExoSAP-IT™ qui contient deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I et la phosphatase alcaline, a été utilisée. L'exonucléase I élimine les amorces et la phosphatase alcaline élimine les dNTP restant dans le mélange de la PCR.

Le mélange est ensuite placé dans le thermocycleur, selon un programme spécifique afin de dégrader les amorces restantes, les nucléotides et d'inactiver le réactif ExoSAP-IT™.

Pour la réalisation de cette purification, le protocole utilisé est le suivant :

Tableau 6 : Protocole de purification des produits PCR

Protocole expérimental		Programme du Thermocycleur		
Réactifs	Volumes (µl)	Température (°C)	Durée (min)	Cycle
ExoSAP	1,30	37 C°	5	1
Produit PCR	2,75	80 C°	1	1

➤ **Réaction de séquençage par BigDye® Terminator V3.1 :**

Pour la réaction de séquence, nous avons utilisé la technologie BigDye Terminator v3.1. Il s'agit d'un mélange contenant une Taq polymérase, des dNTP, des ddNTP marqués par un fluorochrome, du MgCl₂ et une solution tampon.

La composition du mélange réactionnel de la PCR séquencée ainsi que les conditions de programmation sont présentées dans les tableaux 7 et 8.

Tableau 7 : Volumes des réactifs du mix de la réaction de séquençage.

	BigDye	Amorces(R/F) 10µM	Produit PCR purifié	Eau stérile
Volume pour un échantillon	1µl	1µl	4µl	4µl

Tableau 8 : Programme du thermocycleur de la réaction de séquençage.

Étapes	Température	Temps
Incubation	96°C	3 min
Dénaturation	96°C	10 s
Hybridation	50°C	5 s
Elongation	60°C	3 min
25 cycles		

➤ **Purification des produits de la réaction de séquence :**

Après que la réaction de séquence soit terminée, la purification des produits séquencés est nécessaire en utilisant le kit BigDye® Xterminator™ qui contient deux réactifs et qui permet la purification des produits de séquençage en capturant les dNTP, les ddNTP non incorporés dans la réaction.

Les différents constituants utilisés pour la purification des produits de la réaction de séquence sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Protocole de purification des produits de la réaction de séquence.

Protocole expérimental		Centrifugeuse/Agitateur vortex		
Réactifs	Volumes (µl)	Programme	Vitesse (RPM)	Durée (mn)
SAM	45	Vortex	8000	30
Xterminator	10	Centrifugation	15000	3

Le surnageant contenant les fragments à séquencer est transféré dans les puits de la plaque du séquenceur.

➤ **Détermination de la séquence :**

La plaque est placée dans le séquenceur qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



Figure 12: Séquenceur Applied Biosystems (Laboratoire de génétique médicale-CHUF).

c. Les outils bioinformatiques:

○ **Logiciel BLAST (nucléotide BLAST)**

Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -).

○ **Logiciel NCBI (CCDS database)**

Ce logiciel permet de localiser la mutation au niveau de la partie codante du gène étudié et éventuellement de connaître l'acide aminé touché par la mutation sur la séquence protéique correspondante.

○ **Logiciel NCBI (CCDS variation viewer)**

Dès que la mutation est localisée, ce logiciel nous permet d'évaluer l'impact clinique de celle-ci (pathogénique ou pas), son origine (germinale ou somatique), son positionnement sur le génome entier et si elle a déjà été rapportée par d'autres auteurs.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

I. Résultats :

1. Données épidémiologiques :

Il s'agit d'une étude rétrospective, réalisée sur une série de 21 patients marocains présentant des signes cliniques de la drépanocytose.

a. Répartition des patients selon l'âge :

L'âge des patients faisant partie de notre étude, diagnostiqués drépanocytose, varie entre 2 et 18 ans, avec un âge moyen de 7,2 ans. La tranche d'âge située entre 0 et 5 ans est prédominante avec 11 cas (52,3%), suivie de la tranche comprise entre 6 et 10 ans avec 5 cas (23,8%). La tranche d'âge entre 11 et 15 ans est représentée par 4 cas (19,0%), alors que celle supérieure à 15 ans est représentée par 1 seul cas (4,7%).

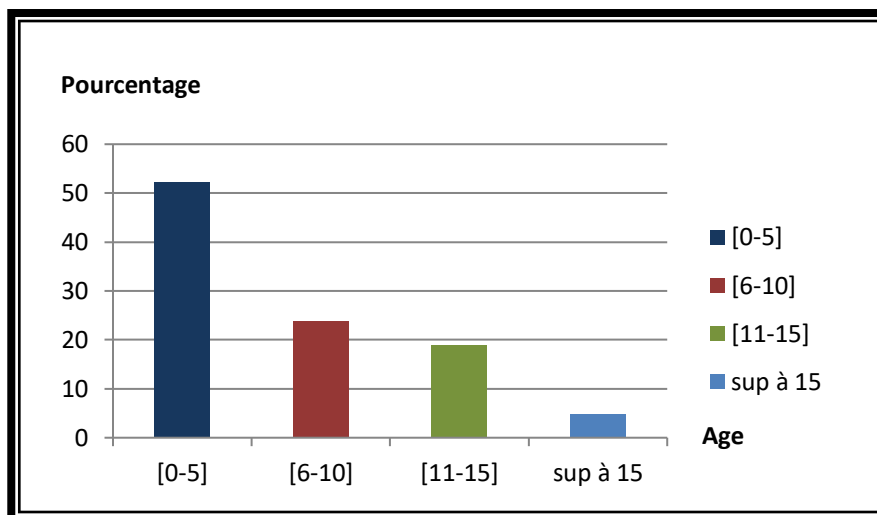


Figure 13 : Fréquence de la maladie selon les tranches d'âges.

b. Répartition des patients selon le sexe :

Les patients sont répartis en 10 garçons (47,6%), et 11 filles (52,3%). Une légère prédominance féminine est notée entre les deux sexes avec un sexe ratio M/F de 0,90.

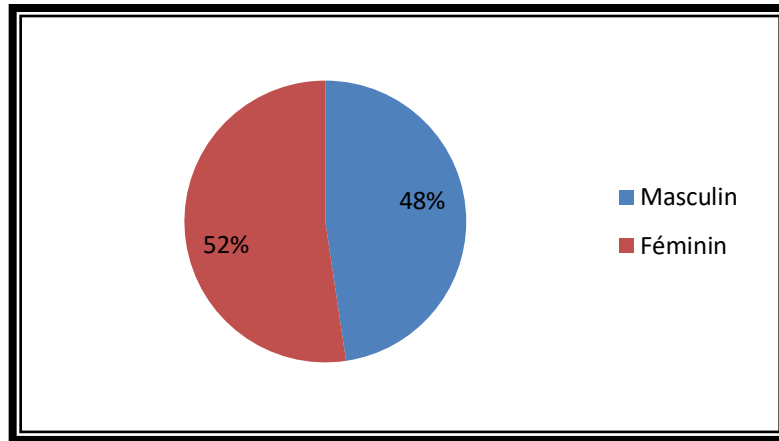


Figure 14: Répartition de la maladie selon le sexe.

2. Données cliniques :

a. La consanguinité :

Dans les antécédents familiaux des patients drépanocytaires, 8 cas avaient la notion de consanguinité du 1^{er} degré des parents (38,09%), 5 cas avaient la notion de consanguinité du 2^{ème} degré des parents (23,80%), 2 cas n'avaient pas de consanguinité des parents (9,52%), et les 6 cas restants ont une consanguinité non définie (28,57%).

b. Taux d'hémoglobine :

Le taux d'hémoglobine des patients varie entre 5,5 g/dl et 10,9 g/dl avec une moyenne de 8,8 g/dl. Ce taux est inférieur au taux normal d'une personne saine qui est compris entre 12,5 et 15 g /dl. Cette diminution d'hémoglobine se traduit par une pâleur cutanéomuqueuse et même des conjonctives.

c. Electrophorèse d'hémoglobine :

L'électrophorèse d'hémoglobine est le test de détection des anomalies d'hémoglobine. Ce test est fait habituellement suite à des résultats anormaux de la formule sanguine (taux d'hémoglobine par exemple). Dans notre cas, il nous permet la confirmation de l'existence de la drépanocytose (Hb S) chez les patients, le test a été réalisé pour 16 personnes/21. 12 cas ont été trouvés drépanocytose homozygote SS (75%), et 4 cas drépanocytose hétérozygote AS (25%).

3. Résultats de biologie moléculaire :

a. Analyse des produits PCR par électrophorèse :

Dans le cadre de la recherche de la mutation du gène *HBB*, une amplification de l'exon 1 de 21 échantillons d'ADN correspondant aux 21 patients de notre série d'étude a été réalisée par la technique de PCR classique. Ensuite, les produits d'amplifications ont fait l'objet d'une électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier la qualité des produits amplifiés en présence d'un témoin négatif. La visualisation des fragments d'ADN est réalisée après exposition du gel à la lumière ultraviolette (figure 15).

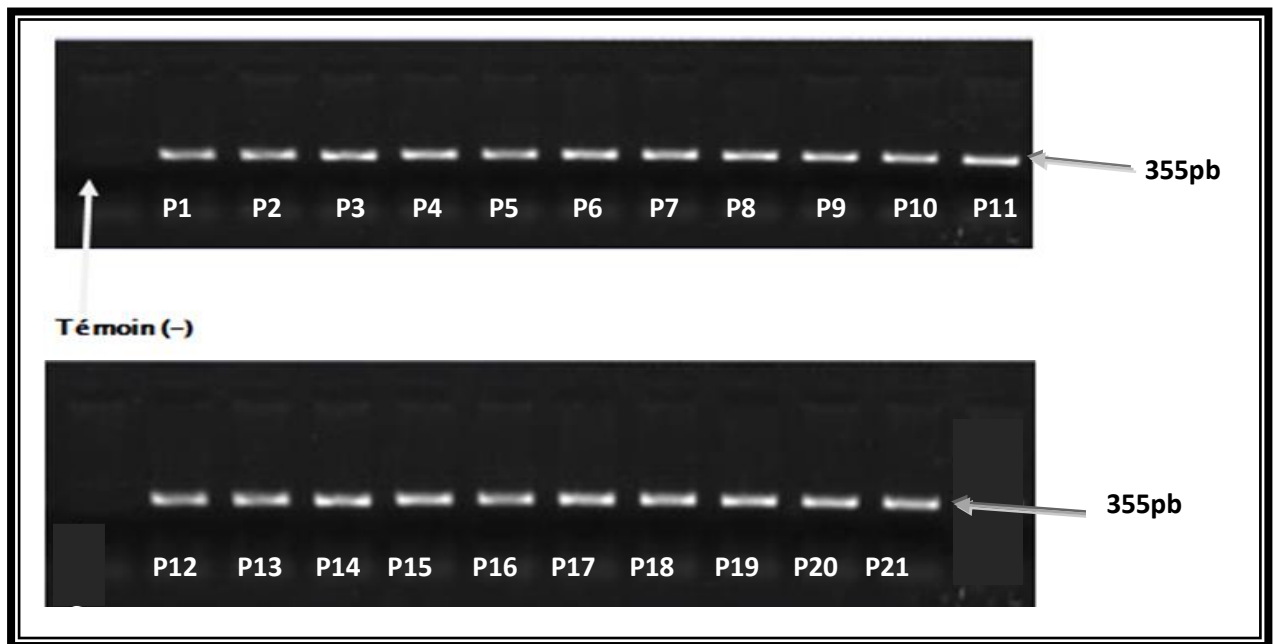


Figure 15 : Profils électrophorétiques des produits d'amplification de l'exon 1 du gène *HBB* sur gel d'agarose 2 % des 21 patients étudiés, avec un témoin négatif (T).

Le résultat du profil du gel d'électrophorèse de l'exon 1 du gène *HBB* montre que les produits amplifiés ne montrent aucune contamination. Cette observation est confirmée par le témoin négatif qui ne montre aucune bande au niveau du gel (figure15).

b. Résultat du séquençage de l'exon 1 :

Le séquençage de l'exon 1 du gène *HBB* des patients de notre série a été réalisé pour la détection de la mutation touchant ce gène.

Après l'obtention des différentes séquences du gène *HBB*, une lecture est faite pour l'identification de la mutation en comparant la séquence requête avec la séquence de la banque de données.

Les résultats ont permis d'obtenir un profil mutationnel à l'état homozygote chez 14 patients (66,6%) et un autre profil à l'état hétérozygote chez 7 patients (33,3%).

- **Séquence normale :** un exemple de l'électrophérogramme d'un patient normal est montré ci-dessous : il montre la base sauvage « A » à la position 20.

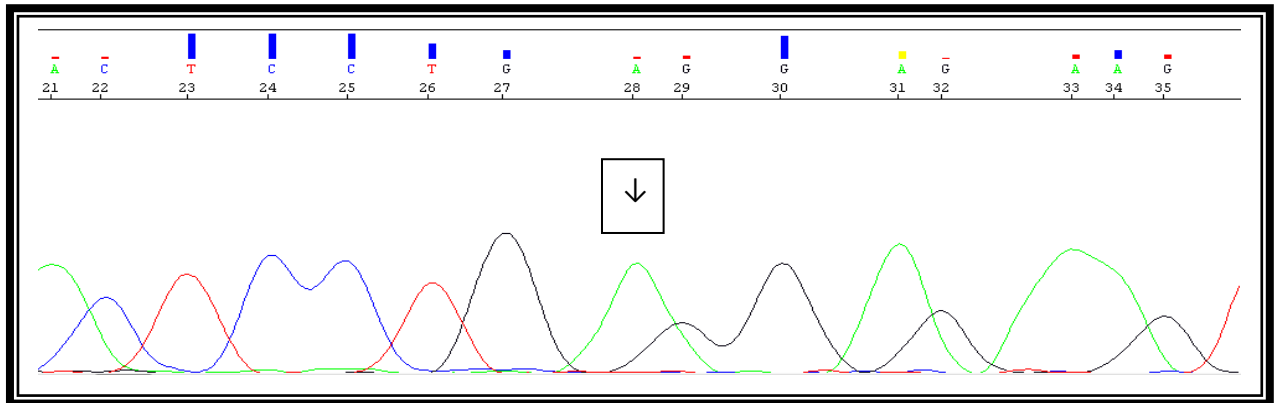


Figure 16 : Chromatogramme de la séquence F d'un patient normal.

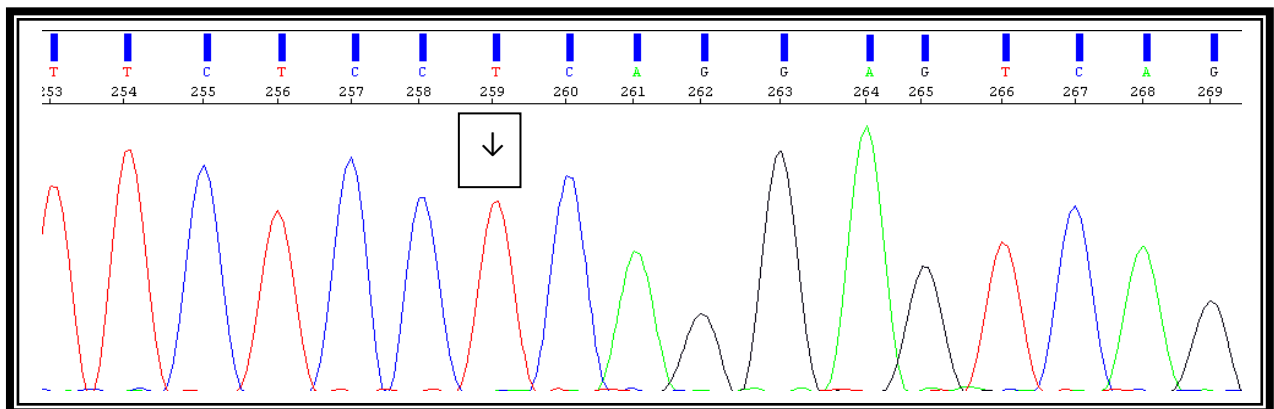


Figure 17 : Chromatogramme de la séquence R d'un patient normal.

- **Mutation c.20 A>T HOMOZYGOTE :** un exemple de l'électrophérogramme d'un patient présentant la mutation c.20 A>T homozygote est montré ci-dessous

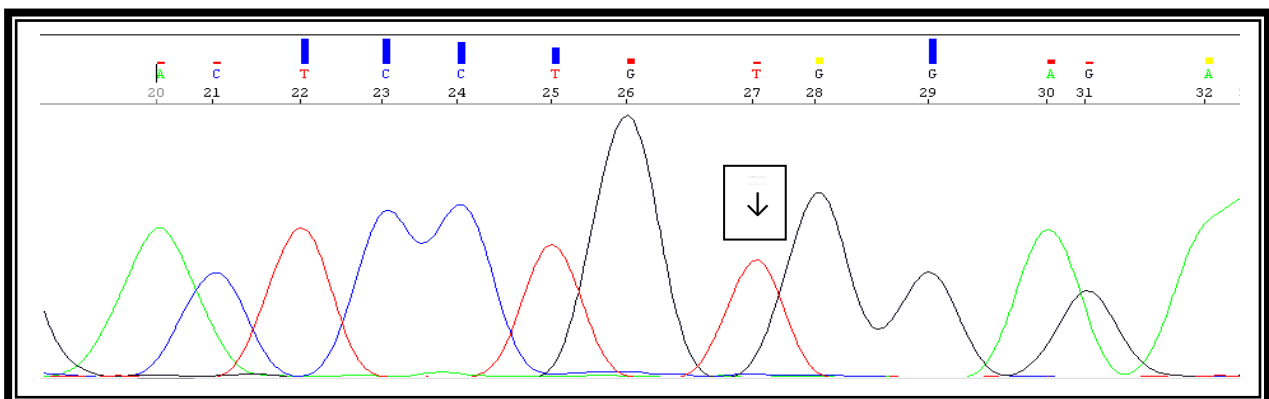


Figure 18 : Chromatogramme de la séquence F d'un patient montrant une mutation homozygote c.20 A>T.

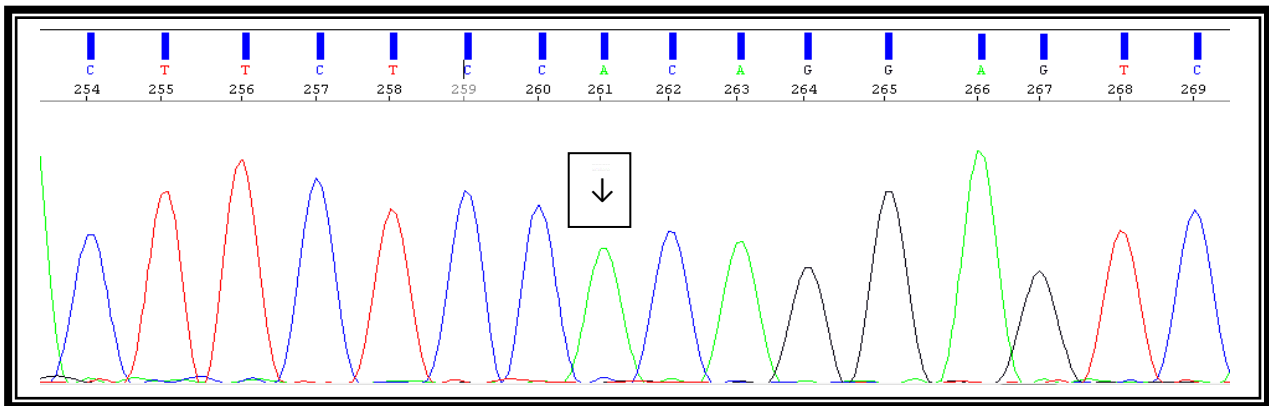


Figure 19 : Chromatogramme de la séquence R d'un patient montrant une mutation homozygote c.20 A>T.

➤ **Mutation c.20 A>T HETEROZYGOTE** : un exemple de l'électrophérogramme d'un patient présentant la mutation **c.20 A>T** hétérozygote est montré ci-dessous

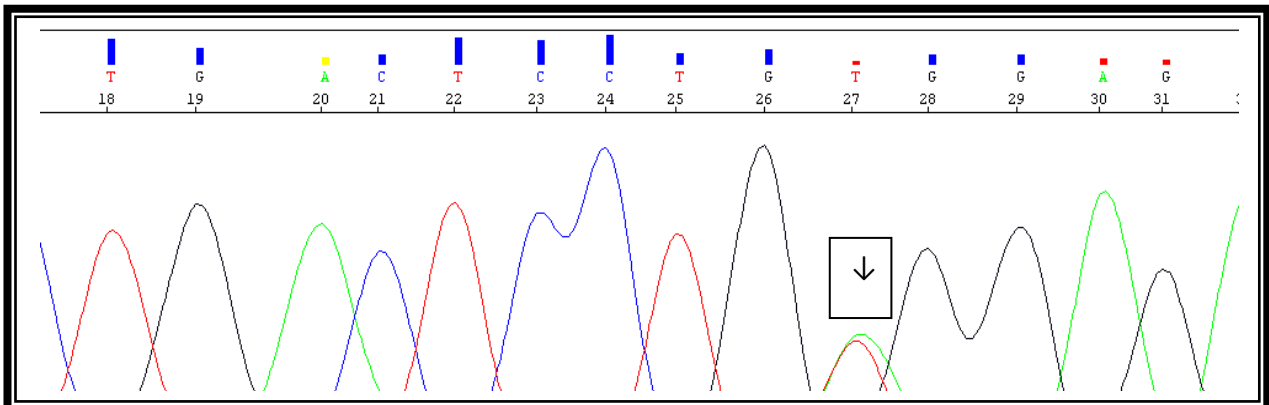


Figure 20 : Chromatogramme de la séquence F d'un patient montrant une mutation hétérozygote c.20 A>T.

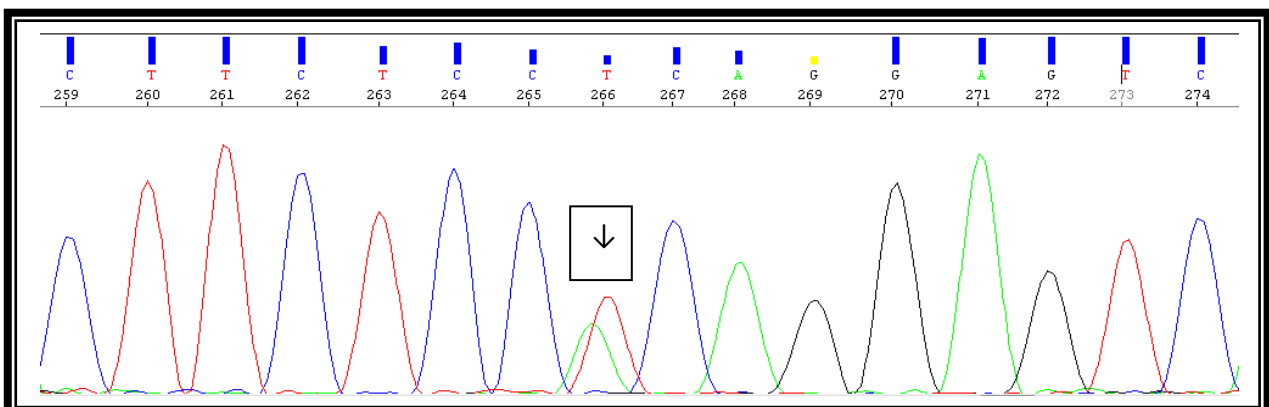


Figure 21 : Chromatogramme de la séquence R d'un patient montrant une mutation hétérozygote c.20 A>T.

II. Discussion :

La répartition des patients selon leurs tranches d'âges montre que la drépanocytose est une maladie à révélation pédiatrique, elle se déclare dès l'enfance. Cette répartition a été vérifiée par **The Pan African Medical Journal** en 2017 qui ont trouvé que la tranche d'âge la plus représentée dans leur étude est celle comprise entre 1 et 6 ans (32,52%) [28]. Ce résultat est de bon sens car cette hémoglobinose S, est une maladie génétique transmise par les 2 parents et dont les symptômes apparaissent généralement à un âge très jeune.

Les résultats obtenus concernant la répartition de la drépanocytose selon le sexe, sont analogues à ceux menés par **The Pan African Medical Journal** en 2019 soulignant une légère prédominance féminine (51,94%) et un sexe ratio M/F égale à 0,92 [29]. Par contre nos résultats diffèrent de ceux obtenus par **Diagne et al.**, [30] et **Bouzaid** [31], rapportant une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,02 et 1,2 respectivement. Dans ces dernières études, l'échantillon étudié ne contenait pas le même nombre de filles et de garçons, c'est pour cette raison que cette différence de résultats selon le sexe a été trouvée. En principe, dans une population donnée, la répartition de la drépanocytose selon le sexe doit être la même, car il s'agit d'une maladie autosomique récessive qui n'est pas liée au sexe et qui donc, doit toucher les deux sexes de façon égale.

Concernant les résultats des données cliniques, les patients drépanocytaires homozygotes SS ont représenté 75% de la population étudiée. Ces personnes présentent toutes un degré de consanguinité. En effet, d'après une étude réalisée sur la consanguinité dans une population marocaine [32], il a été montré que cette dernière augmente la fréquence des homozygotes dans la population et de là, le risque de défaut génétique bien que la maladie est récessive.

La consanguinité survient donc dans les gènes : si un gène anormal circule dans une famille, et de plus, les membres de cette famille se reproduisent entre eux, alors la probabilité pour que la descendance hérite ce gène augmentera, et donc le risque d'être atteint par la maladie augmentera aussi. Les patients hétérozygotes ont des parents non consanguins, cela peut être expliqué par la présence d'un seul allèle récessif à l'intérieur des populations non consanguines.

Les résultats concernant le séquençage de l'exon 1 du gène *HBB* ont montré l'existence de deux formes de mutations : une mutation c.20 A>T HOMOZYGOTE chez 14 cas (66,6%) et une mutation c.20 A>T HETEROZYGOTE chez 7 cas (33,3%).

Nos résultats sont proches de ceux de **DIALLO** [33] et de **KEITA** [34] qui trouvent respectivement 54,6% et 57% pour la forme homozygote SS : la drépanocytose homozygote se manifeste lorsque les deux exemplaires du gène portent l'anomalie.

Les parents ont donc chacun transmis un gène anormal à leur enfant qui, par conséquent, est drépanocytaire. La drépanocytose hétérozygote à une fréquence de 33,3%, d'après l'étude de **DIALLO** [33], c'est une forme d'anomalie bénigne, elle se déclare lorsque l'hémoglobine S n'est transmise que par un seul parent. Dans ce cas, l'enfant porte le gène mais ne développe pas la maladie car le gène normal domine le gène muté.

Conclusion :

La drépanocytose demeure aujourd'hui la principale maladie génétique présente au Maroc. La mutation ponctuelle β 6 glu \rightarrow val est responsable d'une anomalie qualitative de l'hémoglobine avec synthèse d'une hémoglobine anormale, l'hémoglobine S. cette mutation en homozygotie est la forme grave pour le malade.

Cliniquement, les personnes drépanocytaires présentent les symptômes d'un syndrome anémique : diminution de taux d'hémoglobine, pâleur cutanéomuqueuse et même des conjonctives. Le diagnostic se base sur l'électrophorèse de l'hémoglobine qui montre la présence de l'hémoglobine S.

Notre but était de définir le profil mutationnel des patients marocains présentant des signes cliniques de la drépanocytose. La connaissance de ces mutations est importante pour le conseil génétique et pour simplifier le diagnostic moléculaire. Cette démarche permettrait d'instaurer une prise en charge précoce et réduire la morbidité et la mortalité liées à cette maladie.

Malgré les progrès thérapeutiques récents, la drépanocytose reste une maladie sévère de l'enfant, son traitement reste conventionnel (transfusion sanguine), en raison de difficulté d'autres thérapies (la greffe de la moelle osseuse). La lourdeur de la greffe de moelle osseuse et la difficulté à trouver des donneurs compatibles, font en sorte que les perspectives de guérison de la drépanocytose reposent plus volontiers sur la voie de la thérapie génique et surtout la stratégie de : « remplacer un gène malade ». Cette stratégie consiste à importer la copie d'un gène fonctionnel dans une cellule cible, pour qu'elle s'y exprime et aboutisse à la production de la protéine qui fait défaut.

La prise en charge, diagnostique et thérapeutique, doit être effectuée dans des services spécialisés qui gèrent les protocoles thérapeutiques, avec des professionnelles de santé qui ont une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette maladie.

Références bibliographiques :

- [1] **Encyclopédie Orphanet.** La drépanocytose, Anémie falciforme. (Mars 2011).
- [2] **Nathalie Couque, Elisabeth Trawinski, Jacques Elion.** Génétique des maladies de l'hémoglobine, Molecular bases of haemoglobin diseases. Vol 2016 - N° 481. (Avril 2016).
- [3] **Association Pour l'Information et la Prévention de la Drépanocytose A.P.I.P.D..** L'historique de la drépanocytose. (Mai 2015).
- [4] **INSERM.** Drépanocytose : La maladie génétique la plus fréquente en France. Vol.51. (26 Octobre 2020).
- [5] **Association Pour l'Information et la Prévention de la Drépanocytose A.P.I.P.D..** Épidémiologie. (2015).
- [6] **Philippe Connes.** Physiopathologie de la drépanocytose. (2020).
- [7] **Baledent F.** Génétique et diagnostic biologique de la drépanocytose. Développement et santé, n° 150. (08 Décembre 2006).
- [8] **Sarah Mattioni, Katia Stankovic Stojanovic, Robert Girot, François Lionnet.** La drépanocytose en France Sickle Cell Disease in 2016. Vol.2016. (Avril 2006).
- [9] **Merita MUSTAFA.** Le sang. (20 Février 2016).
- [10] **Pierre Stouff.** De la structure à la fonction d'une protéine : l'hémoglobine ... et du délicat usage des notions de génotype et de phénotype pour cette molécule. (2012).
- [11] **Laboratoire d'hématologie cellulaire du CHU d'ANGERS- Hematocell.** La drépanocytose. (Octobre 2011).
- [12] **Bain BJ.** Hémoglobinopathie. 2° éd. (2006).
- [13] **Professeur Pierre Aubry .**Hémoglobinoses Actualités 2022. (2022)
- [14] **Aucourt J, Spas-Defasque E, Cotten A.** Hémoglobinopathies et autres anémies. Imagerie musculosquelettique: Pathologie générale. 2° éd. (2013).
- [15] **Labie D, Elion J.** Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. Vol. 2.(2005).
- [16] **Jacques Rochette.** Deux maladies génétiques: la drépanocytose et les thalassémies. Enquête en région parisienne. Revue européenne des migrations internationales. Vol.6,N°3.(1990).
- [17] **Le sang, Med1sang1– ppt.** (01 Mai 2010).
- [18] **Jean Rosa, Henri Wajcman, Yves Blouquit.** Hémoglobine.(1993).

- [19] **Jean Rosa.** L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme : un motif structural unique, des fonctions multiples Haemoglobin from microorganism to man: a single protein folding, a variety of functions. Vol.325. (Décembre 2002).
- [20] **Badr Kidiss.** Drépanocytose au Maroc : "on estime qu'il y a 15.000 nouveaux cas par an". (19 Juillet 2022).
- [21] **NAOUM SALAME.** Les phénotypes drépanocytaires. (29sept. 2021).
- [22] **Russell, Harper Collins.** Biochimie des protéines.(1996).
- [23] **Bordas.** Les familles multigéniques : exemple des chaînes de l'hémoglobine. (2020).
- [24] **Emmanuel Charbonney, Marianne Terrettaz, Nicolas Vuilleumier, Jean-François Lambert.** Drépanocytose: syndromes thoracique aigu et de détresse respiratoire. De la pathophysiologie au traitement. Vol.2. (13 Décembre 2006).
- [25] **Hôpital Robert-Debré.** Qu'est-ce que la drépanocytose. (06 Décembre 2019).
- [26] **Astor Jan.** Globules rouges. Taux d'hémoglobine (Hb). Hématocrite (Ht) Ht – ppt. (2014).
- [27] **Corinne Armari.** Hémogramme normal et pathologique chez l'enfant. (Novembre 2004).
- [28] **Lamine Thiam, Assane Dramé, Isabelle Zokébé Coly, François Niokhor Diouf, Ndiogou Seck, Djibril Boiro, Aliou Abdoulaye Ndongo, Idrissa Basse, Babacar Niang, Indou Deme/Ly, Assane Sylla, Ibrahima Diagne, et Ousmane Ndiaye.** Profils épidémiologiques, cliniques et hématologiques de la drépanocytose homozygote SS en phase inter critique chez l'enfant à Ziguinchor, Sénégal. Pan Afr Med J. Vol.28. (2017).
- [29] **Manix Ilunga Banza, Jules Panda Mulefu, Lire Ipani Lire, Yannick Tietie Ben N'dwala, Israel Badypwyla Tshiamala, et Vincent de Paul Kaoma Cabala.** Pathologies digestives associées à la drépanocytose à Lubumbashi: aspects épidémiologiques et cliniques. Pan Afr Med J. Vol.33. (2019).
- [30] **Bouzaid M.** Prise en charge de la drépanocytose homozygote au service d'hématoncologie pédiatrique de l'hôpital des enfants Rabat. Thèse de médecine Rabat N° : 207. (2007).
- [31] **I. Diagne, O. Ndiaye, C. Moreira, H. Signate-Sy, B. Camara, S. Diouf, A. Diack-Mbaye, M. Ba, M. Sarr, D. Sow, M. Fall.** Les syndromes drépanocytaires majeurs en pédiatrie à Dakar. Vol. 7. N°1. (Janvier 2000).
- [32] **Jalal Talbi , Abd Errazzak Khadmaoui , Abd El-Majid Soulaymani , Abd El-Aziz Chafik.** Etude de la consanguinité dans la population marocaine. Impact sur le profil de la santé. Vol.15. (2007).

[33] **Diallo D.** Suivi des enfants drépanocytaires de 0-15 ans dans le service de pédiatrie du CHU GT. Thèse méd. Bamako : 04 - M - 16. (12 Février 2009).

[34] **Keita I.** Aspects épidémiocliniques de la drépanocytose dans le service de pédiatrie de l'hôpital de SIKASSO. 20- M-10. (2020).