



HAL
open science

Drépanocytose et polymorphismes génétiques : épidémiologie, prédiction de gravité et stress-oxydant

Fatou Gueye

► **To cite this version:**

Fatou Gueye. Drépanocytose et polymorphismes génétiques : épidémiologie, prédiction de gravité et stress-oxydant. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon; Université Cheikh Anta Diop (Dakar), 2019. Français. NNT : 2019LYSE1044 . tel-02310645

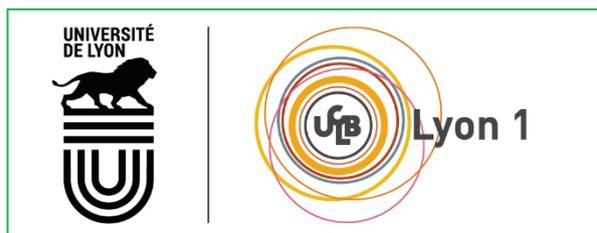
HAL Id: tel-02310645

<https://theses.hal.science/tel-02310645>

Submitted on 10 Oct 2019

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

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



N° d'ordre NNT : 2019LYSE1044

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

réalisée à

**l'Université Claude Bernard Lyon 1 en co-tutelle avec
l'Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal**

Ecole Doctorale ED 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie, Biologie, Santé

Discipline : Biochimie

Soutenue publiquement le 28/03/2019 par

Fatou GUEYE épouse TALL

Drépanocytose et polymorphismes génétiques : épidémiologie, prédiction de gravité et stress-oxydant

Devant le jury composé de :

Rapporteurs

Mme De Montalembert Mariane, Professeure des Universités, Université Paris-V
Mr Diatta Alassane, Professeur des Universités, Université Assane Seck
(Zighinchor)
Mr Wonkam Ambroise, Professeur des Universités, Université de Cape Town

Examineurs

Mme Canet-Soulas Emmanuelle, Professeure des Universités, Université Lyon 1
Mr Diagne Ibrahima, Professeur des Universités, Université Gaston Berger
(Dakar)

Co-Directeur et Directeur de thèse

Mr. Joly Philippe, Praticien hospitalier, Hospices Civils de Lyon
Mr Martin Cyril, MCU-HDR, Université Claude Bernard Lyon 1
Mme Sall Philomène Lopez, Professeure des Universités, Université Cheikh Anta
Diop (Dakar)

*« Se donner du mal pour les petites choses, c'est
parvenir aux grandes avec le temps »*

Samuel Beckett

*« La facilité avec laquelle nous renonçons,
souvent, à notre culture ne s'explique que par
notre ignorance de celle-ci, et non par une
attitude progressiste adoptée en connaissance de
cause. »*

Cheikh Anta Diop

Remerciements

Gloire et louange à DIEU, le Tout Puissant, qui m'a éclairée le bon chemin, et m'a donnée courage et persévérance pour l'accomplissement de ce projet, qui représente une étape conséquente dans mon parcours professionnel.

« Si j'ai vu si loin, c'est que j'étais monté sur des épaules de géants »

Isaak Newton

J'avoue qu'en écrivant ces lignes, de fortes émotions m'ont envahie, et de nombreux souvenirs se sont bousculés dans ma tête. Cet instant marque pour moi la fin d'une expérience exceptionnelle jalonnée de difficultés, que j'ai pu affronter grâce aux géants à qui j'ai le plaisir d'adresser mes remerciements.

A mes maîtres et directeurs de thèse

A notre maître le Dr Philippe Joly, Philippe nous ne savons pas par où commencer pour t'exprimer toute notre gratitude. En 2013, tu nous as autorisée à faire un stage dans ton laboratoire et tu as accepté de nous encadrer pour une thèse unique. Nous te remercions tout particulièrement d'avoir dirigé notre thèse avec beaucoup d'efforts et de patience. Tes qualités pédagogiques remarquables nous ont permis de profiter de tes connaissances et ont contribué à l'avancement de notre travail en ne négligeant ni tes conseils avisés, ni tes critiques constructives. Nous ne parlons même pas de tout ce que nous avons appris avec toi sur le

génomotypage des hémoglobinoopathies. Mais tu nous as initiée à des logiciels, des outils qui nous seront utiles durant toute notre carrière. Nous avons pu apprécier tes qualités humaines, ton savoir-faire et tes compétences scientifiques. Un grand MERCI. cher maître

A notre maître le Professeur Philoméne Lopez Sall, cher maître, l'occasion nous est encore donnée pour exprimer toute notre gratitude. Ce travail est de votre initiative et vous l'avez co-dirigé avec intérêt. Vous nous avez déchargée de nos principales tâches professionnelles, rien que pour nous permettre de mener à bien cette thèse. Nous avons la chance et le privilège de travailler sous votre direction, de profiter de votre culture scientifique, de vos compétences professionnelles incontestables ainsi que de vos qualités humaines qui vous valent l'admiration et le respect. Vous êtes un maître, une maman et une conseillère autant sur le plan professionnel que familial. Grâce à vos qualités scientifiques, vous nous avez donné l'envie d'aller plus loin et de connaître la richesse du métier d'Enseignant chercheur. Un grand merci cher maître.

A notre maître le Dr Cyril Martin, tu as accepté de co-diriger ce travail avec intérêt. Merci pour ton attention de tout instant sur nos travaux, ta disponibilité, tes conseils avisés et ton écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. Tu as su corriger le manuscrit avec rigueur et intérêt. Nous te promettons de ne plus mettre des taux à la place des concentrations. Un grand merci cher maître.

Aux membres du Jury

A nos rapporteurs de thèse, notre maître le Professeur Alassane Diatta, notre maître le Professeur Marianne De Montalembert, notre maître le Professeur Ambroise Wonkam, vous avez accepté de juger et d'évaluer ce travail. C'est un honneur pour nous de vous compter parmi les membres du jury. Recevez, chers maîtres, toute notre gratitude et notre reconnaissance.

A notre maître le Professeur Ibrahima Diagne, vous êtes une référence, le point focal dans la lutte contre la drépanocytose au Sénégal. C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans notre jury. Nous espérons que ce modeste travail contribuera à améliorer la prise en charge des patients atteints de drépanocytose. Merci cher maître.

A notre maître le Professeur Emmanuelle Canet-Soulas, c'est un honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans notre jury. Recevez cher maître toute notre reconnaissance. Merci.

A nos maîtres

A notre maître le Professeur Aynina Cissé, cher maître, l'occasion nous est encore donnée pour vous exprimer toute notre gratitude et notre reconnaissance. Vous avez guidé nos premiers pas et vous continuez à le faire. Que le Bon Dieu vous donne une longue vie et une santé de fer pour que vous puissiez nous accompagner encore et encore. Merci cher maître.

A notre maître le Professeur Pape Amadou Diop, vous nous avez toujours autorisée à venir faire nos manipulations à Lyon en acceptant de signer nos autorisations d'absence. Merci cher maître.

A notre maître le Professeur Papa Madiéye Gueye, merci pour tous les conseils que vous nous avez prodigués.

A notre maître le Professeur Rokaya Ndiaye Diallo, vous avez participé à cette thèse. Recevez à travers ce modeste travail toute notre gratitude et nos remerciements.

A mon collègue et Petit frère

Le Dr Elhadji Malick Ndour, merci cher frère pour tout ce que tu fais pour moi lorsque je sollicite ton aide. Tu me respectes beaucoup et je prie le Bon Dieu pour que tu puisses très rapidement soutenir ta thèse, inchallah.

A tout le personnel de l'UF34445 (ex UF 21429)

A Martine, j'ai connu une femme très douce, très posée. Je n'oublierai jamais l'aide que tu m'as apportée pendant ma grossesse et que tu as accepté de m'aider dans mes manipulations. J'espère que j'aurais toujours l'occasion de te suivre à travers ton blog « Martine met la table ». Merci Martine.

A Jojo, tu as été mon « mur des lamentations ». Tu trouvais toujours les mots pour me reconforter et m'encourager dans les moments difficiles. Tu es une personne très ouverte, toujours à l'écoute des autres. Une personne très généreuse, qui offrait toujours à mes filles des livres, des jouets, des habits et j'en passe. Je n'oublierai jamais notre journée shopping au centre commercial Confluence. Merci ma Jojo.

A Caro, grâce à toi j'ai pu faire toutes mes extractions sans problème car c'est toi qui m'as montré pour la première fois comment utiliser l'appareil d'extraction. Une femme de caractère qui sait ce qu'elle veut. Je n'oublierai jamais les bons moments passés avec toi au self. Le geste qui m'a le plus marquée chez toi c'est la manière dont tu me serrais dans tes bras chaque fois qu'on se revoyait. Merci Caro.

A Céline Masson, je t'ai connue plus tard mais nous avons très vite sympathisé. Merci pour le bon café que tu me proposais chaque matin. J'espère qu'à mon prochain séjour, je te retrouverai avec de belles tresses africaines. Merci Céline.

A Céline Renoux, une femme très compétente, très intelligente et très généreuse. Tu m'as aidée à la mise au point des différents gènes du stress oxydant. Mais ce qui m'a le plus marquée c'est lorsque tu as accepté de partager avec moi ton bureau lorsque

vous étiez encore à Edourd Herriot. Tu as offert beaucoup d'habits à ma fille et ça je ne l'oublierai jamais. Tu m'as gentiment passé ton manuscrit de thèse pour que je puisse m'en inspirer. Merci Céline.

A SALIMA, mon africaine. Grâce à toi je n'avais pas la nostalgie de mon cher continent lors de mon séjour à Lyon. Tu m'as agréablement gavée comme un petit bébé avec tes délicieux repas (j'ai même pris du poids à cause de toi). Tu es très généreuse et tu as un mari exceptionnel. Prends bien soin de lui et comme on dit en bonne africaine, toi même tu sais. Merci Salima.

A Philippe, merci pour toutes les commandes que tu as passées pour moi. Tu as toujours su trouver des solutions lorsque mes manipulations ne marchaient pas. J'espère qu'à mon prochain passage, je retrouverai le Philippe que j'ai connu à HEH, plein de vie et d'enthousiasme. Merci Philippe.

A Cécile, une femme de valeurs, conservatrice, une femme de principe. Même si nous n'étions pas toujours d'accord sur certains sujets, nous avons des discussions très intéressantes et très instructives. Merci Cécile.

Aux membres du LIBM

A notre Maître le Professeur Philippe Connes, merci de nous avoir accueillie au sein du LIBM. J'ai eu la chance de bénéficier de vos connaissances. Vous avez suivi ce travail avec intérêt. Merci pour toutes les corrections que vous avez apportées à nos différentes productions scientifiques. Merci cher Maître.

A nos maîtres le Professeur Vincent PIALOUX et le Dr Camille FAES, merci de nous avoir initiée et formée à l'évaluation du stress oxydant.

A Pauline, Emmanuelle, Etienne, Emeric, Romain, Mélanie, Lidia, Mathilde, Elie et Sarah. Je ne connais pas certains d'entre vous, mais j'aurais peut-être l'occasion de vous rencontrer. Merci.

A mes collègues

A Díama pour l'aide que tu m'as apportée dans mes manipulations. Tu es plus qu'une collègue, tu es une confidente et une conseillère. Nous avons vraiment des rapports privilégiés. Merci Díama.

A tout le personnel du laboratoire de l'Hôpital d'Enfants Albert Royer (HEAR), merci pour vos encouragements.

A tout le personnel de l'Unité de Soins Ambulatoires pour adolescents et adultes Drépanocytaires (USAD), avec le Dr Indou Dème Ly, merci pour tout.

A tout le personnel du laboratoire Prodiamed avec notre maître le Professeur Niama Diop Sall, merci pour l'aide apportée pour le dosage des marqueurs biochimiques.

A tout le personnel du laboratoire de Biochimie Pharmaceutique de l'UCAD, merci.

A ma famille

A ma mère, ma petite maman chérie que j'aime tant. Mon ange gardien, ma puissance, ma vie. Maman chérie, tu as toujours été là pour moi dans les bons et mauvais moments. Malgré ta santé précaire, tu t'occupes tellement bien de tes petites filles, que je suis tranquille quand je suis à des milliers de kilomètres d'elles. Je t'aime ma petite maman, je n'ai qu'une chose à demander au

Bon Dieu, c'est de te donner une très longue vie avec une santé de fer.

A mon père, tu as su nous donner une bonne éducation, tes bénédiction m'ont toujours été bénéfiques. Merci papa.

A mon adorable époux Mamadou, mon amour merci pour ta compréhension, ta patience, tes encouragements, ton affection. Tu as toujours été là pour moi, tu es un mari et un papa exceptionnels. Merci mon chéri, je t'aime très fort.

A mes frères et sœurs, Amy, Serigne, Bouso, Salio, Lahat, Cheikh, merci pour vos encouragements.

A mes fils et filles, Binta, Ass, Codou, mon petit ange Momo et Amy, je vous aime très fort.

A mon frère Christophe et à sa petite famille, je ne parle même pas de tout ce que tu as fait pour moi, mais la manière dont tu t'occupes de ta sœur Mame et de tes neveux, me comble de joie au plus profond de moi. Merci mon frère.

A ma belle famille, merci pour vos encouragements.

Dédicaces à tous les malades de la drépanocytose. J'espère que ce modeste travail constituera une avancée positive dans la recherche sur la drépanocytose.

Table des matières

Introduction Générale	27
<i>PARTIE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE</i>	<i>31</i>
Chapitre 1. Généralités sur la drépanocytose	32
1.1. Historique et épidémiologie	32
1.2 Génétique	35
1.2.1 Mode de transmission	35
1.2.2 Génétique moléculaire.....	35
1.2.3 Polymorphisme génétique	36
1.3 Physiopathologie moléculaire de la drépanocytose	38
1.3.1. La gélification de l'hémoglobine S	38
1.3.2 Les modifications de la membrane érythrocytaire	39
1.3.3 Falciformation et déshydratation du globule rouge	42
1.3.4 Synthèse.....	43
1.4 Interactions des globules rouges SS avec l'endothélium vasculaire.....	44
1.5 Modulateurs du tonus vasculaire	48
1.5.1 Endothéline-1 (ET-1)	48
1.5.2 Monoxyde d'azote (NO).....	49
1.6 Physiopathologie clinique	51
1.6.1 Modèle des sous-phénotypes drépanocytaires	51
1.6.1.1 Principe.....	51
1.6.1.2 Sous-phénotype visqueux vaso-occlusif.....	52
1.6.1.3 Sous-phénotype hémolytique	53
1.7. Diagnostic phénotypique de la drépanocytose	53
1.7.1 Techniques utilisables	53
1.7.1.1 Principe général.....	53
1.7.1.2 Frottis sanguin.....	54
1.7.1.3 Test de falciformation d'Emmel	55
1.7.1.4 Test de solubilité d'Itano.....	56
1.7.1.5 Electrophorèse de l'Hb à pH alcalin	56
1.7.1.6 Electrophorèse sur agarose à pH acide.....	57
1.7.1.7 Focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide	57
1.7.1.8 Chromatographie liquide par échange de cations.....	58
1.7.1.9 Electrophorèse capillaire	59
1.7.1.10 CLHP en phase inverse des chaînes de globine	60
1.7.2 Diagnostic néo-natal de la drépanocytose.....	61
1.7.2.1 Dans les pays occidentaux.....	61
1.7.2.2 En Afrique.....	62

1.8 Diagnostic génotypique de la drépanocytose.....	63
1.8.1 Diagnostic différentiel drépanocytose / thalasso-drépanocytose	63
1.8.2 Confirmation moléculaire des autres SDM composites.....	64
1.9 Prise en charge médicale de la drépanocytose	64
1.9.1 L'accompagnement dans la prévention comportementale.....	65
1.9.2 Le traitement symptomatique	65
1.9.3 Le traitement préventif.....	65
1.9.4 La gestion avortée.....	67
1.9.5 La thérapie curative	68
1.10 La drépanocytose au Sénégal	70
1.10.1 Epidémiologie	70
1.10.2. Diagnostic clinique et biologique	71
1.10.2.1 Circonstances de découverte et diagnostic clinique	71
1.10.2.2 Diagnostic biologique	71
1.10.3 Suivi et évolution clinique	73
1.10.4 Recherche	75
Chapitre 2 : Les modulateurs génétiques de la drépanocytose	76
2.1 Gènes modificateurs de la drépanocytose déjà validés	76
2.1.1. Les 'Quantitative Trait Loci' (QTLs) de l'HbF	76
2.1.1.1 L'HbF dans la drépanocytose	76
2.1.1.2 Polymorphisme γ - <i>XmnI</i> et haplotypes β -globine.....	78
2.1.1.3 Gène <i>BCL11A</i>	79
2.1.1.4 Espace inter-génique <i>HBS1L-MYB</i> (HMIP).....	81
2.1.1.5 Corrélation QTLs HbF et clinique de la drépanocytose	82
2.1.2 Génotype alpha-globine.....	83
2.1.3 Le déficit en G6PD	85
2.1.3.1 Une association longtemps controversée avec la vasculopathie cérébrale.....	85
2.1.3.2 Quel mécanisme physiopathologique ?	85
2.1.4 Le gène UGT1A1.....	87
2.1.5 Autres gènes modificateurs	88
Chapitre 3 : Le stress oxydant, acteur majeur de la drépanocytose	90
3.1 Généralités sur le stress oxydant.....	90
3.1.1. Définition du stress oxydant et des espèces réactives de l'oxygène	90
3.1.2 Mécanismes de formation des ROS	92
3.1.2.1 Système Xanthine oxydo-réductase.....	96
3.1.2.2 Systèmes NADPH oxydase.....	97
3.1.2.3 Myéloperoxydase	98
3.1.3 Les principaux systèmes anti-oxydants.....	100
3.1.3.1 Superoxyde dismutase	103
3.1.3.2 Catalase	104

3.1.3.3 Les Gluathion peoxydases (GPx)	105
3.1.3.4 Systèmes anti-oxydants non enzymatiques.....	107
3.2 Stress oxydant et drépanocytose.....	108
3.2.1 Rôle du stress oxydant dans le cercle vicieux drépanocytaire.....	108
3.2.2 Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose.....	111
3.2.2.1 L'auto-oxydation de l'HbS	111
3.2.2.2 Système Xanthine oxydo-réductase	112
3.2.2.3 Système NADPH oxydase	113
3.2.2.4 Myéloperoxydase (MPO).....	113
3.2.2.5 Autres sources.....	114
3.3 Les systèmes de défense anti-oxydants dans la drépanocytose	114
3.3.1 Systèmes anti-oxydants enzymatiques	114
3.3.1.1 Généralités	114
3.3.1.2 Les superoxyde dismutases (SOD).....	116
3.3.1.3 Catalase	117
3.3.1.4 Les glutathions peroxydase (GPx)	118
3.3.2 Systèmes anti-oxydants non enzymatiques.....	118
3.3.2.1 Glutathion	118
3.3.2.2 Ubiquinones, cytochrome c	119
3.3.2.3 Vitamine E et vitamine C.....	119
3.4 Les gènes impliqués dans le stress oxydant.....	120
3.4.1 Gène de la myéloperoxydase.....	120
3.4.1.1 Description du gène et de la protéine.....	120
3.4.1.2 Polymorphismes génétiques	122
3.4.2 Gènes des superoxydes dismutases.....	123
3.4.2.1 Description du gène et de la protéine.....	123
3.4.2.2 Polymorphismes génétiques	126
3.4.3 Gène de la xanthine oxydo-réductase	127
3.4.3.1 Description du gène et de la protéine.....	127
3.4.3.2 Polymorphismes génétiques	130
3.4.4. Gène NFE2L2	131
3.4.4.1 Description du gène et de la protéine.....	131
3.4.4.2 Polymorphismes génétiques	134
<i>PARTIE 2 : ASPECTS METHODOLOGIQUES.....</i>	<i>136</i>
Chapitre 1 : Concepts méthodologiques des études de corrélation phénotype-génotype	137
1.1 Stratégie 'gènes-candidats' et études pangénomiques.....	137
1.1.1 Principe et avantages / inconvénients de chaque stratégie	137
1.1.1.1 Stratégie 'gènes-candidats'	137
1.1.1.2 Approche GWAS "Genome Wide Association Study"	138
1.1.2 Notion de déséquilibre de liaison	139

1.2 Démarches théoriques dans le choix des SNPs à tester en gène-candidat	140
1.2.1 Fréquence allélique dans la population considérée.....	140
1.2.2 Evaluation du pouvoir pathogène présomptif	142
1.2.2.1 Principe général.....	142
1.2.3.2 Variants affectant l'épissage	142
1.2.3.3 Variations faux-sens	143
1.2.3.4 Variations affectant la régulation de la transcription	144
1.3 Application aux SNPs de notre étude	144
1.3.1 Gène MPO – rs2333227	144
1.3.2 Gène SOD2 – rs4880	146
1.3.3 Gène XDH – rs207454	147
1.3.4 Gène NFE2L2 – rs35652124	149
1.4 Analyse critique et exploitation des résultats de génotypage obtenus.....	150
1.4.1 Equilibre de Hardy-Weinberg.....	150
1.4.1.1 Principe.....	150
1.4.1.2 Exemple	152
1.4.2 Analyse statistique : modèle dominant, récessif ou additif	153
1.4.3. Notion de cohorte de confirmation	154
Chapitre 2 : Stratégie et techniques de génotypage utilisées	155
2.1 Contexte et stratégie globale.....	155
2.2 Définition et validation d'un couple d'amorces de PCR	155
2.2.1 Recherche de la carte d'identité d'un SNP.....	155
2.2.2 Définition d'un couple d'amorces sur primer 3.0	156
2.2.3 Vérification de la spécificité du couple d'amorces à l'aide du logiciel Primer Blast .	157
2.2.4 Vérification de l'absence de SNP parasite au niveau des amorces	158
2.3 Description de la gap-PCR 'Multiplex alpha'	159
2.3.1 Principe de la gap-PCR multiplex	159
2.3.2 Application à la recherche des principales délétions alpha-thalassémiques.....	160
2.3.2.1 Introduction – Amorces utilisées	160
2.3.2.2 Matériels et réactifs	161
2.3.2.3 Mode opératoire - Révélation du gel	162
2.4 Description de la technique FRET sur Light Cyclers 480.....	163
2.4.1 Principe théorique.....	163
2.4.2. Application au génotypage XmnI	165
2.4.2.1 Définition des amorces et des sondes.....	165
2.4.2.2 Matériels et réactifs	165
2.4.2.3 Mode opératoire et révélation des résultats	166
2.5 Description de la technique HRM (High Resolution Melting).....	167
2.5.1 Principe général.....	167
2.5.2 Application à notre travail.....	169

2.5.2.1 Définition des amorces	169
2.5.2.2 Matériels et réactifs	169
2.5.2.3 Mode opératoire et révélation des résultats	169
Chapitre 3 : Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant	171
3.1 Produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP)	171
3.2 Malondialdéhyde (MDA).....	172
3.3 Catalase.....	173
3.4 Glutathion Peroxydase (GPx)	174
3.5 Superoxyde Dismutase (SOD)	175
3.6 Xanthine oxydase (XO).....	175
3.7 Myéloperoxydase (MPO)	176
<i>PARTIE 3: CONTRIBUTION PERSONNELLE.....</i>	<i>177</i>
Article 1 : Profil génétique de la population drépanocytaire sénégalaise et caractérisation d'une nouvelle mutation β^0 -thalassémique.	179
1.1 Contexte scientifique de l'étude – Présentation de l'article	179
1.2 Article.....	181
1.3 Principaux résultats obtenus - Conclusion.....	187
Article 2 : Effets combinés des QTLs de l'HbF et de l'alpha-thalassémie sur la sévérité clinique de la drépanocytose dans une population pédiatrique sénégalaise – Soumis dans British Journal of Haematology (bjh)-2018.....	189
2.1 Contexte scientifique de l'étude – Présentation de l'article	189
2.2 Article.....	191
2.3 Résultats obtenus- Conclusion.....	210
Etude 3 : Relations entre stress oxydant, principaux gènes modificateurs de la drépanocytose et sévérité clinique de la maladie.	212
3.1 Contexte scientifique de l'étude.....	212
3.2 Matériels et méthodes	213
3.2.1 Données cliniques de la cohorte.....	213
3.2.2 Alpha-thalassémie, QTLs de l'HbF et statut en G6PD	213
3.2.3 Dosage des marqueurs du stress oxydant	214
3.2.4 Analyses statistiques	215
3.3 Résultats	216
3.3.1 Marqueurs du stress oxydatif chez les drépanocytaires et les témoins AA.....	216
3.3.2 Influence des modulateurs génétiques sur les marqueurs du stress oxydant.....	216
3.3.3 Influence des marqueurs du stress oxydant sur l'expression clinique de la drépanocytose.	219
3.4 Discussion	223
3.5 Conclusion.....	227
Etude 4 : Evaluation des effets de certains polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant sur l'expression clinique et biologique de la drépanocytose.....	228

4.1 Contexte scientifique de l'étude.....	228
4.2 Matériels et méthodes	Erreur ! Signet non défini.
4.2.1 Données cliniques de la cohorte	Erreur ! Signet non défini.
4.2.2 Génotypage des polymorphismes des gènes MPO, SOD, XO et NFE2L2 .	Erreur ! Signet non défini.
non défini.	
4.2.3 Dosage des paramètres biologiques	Erreur ! Signet non défini.
4.2.4 Analyses statistiques	Erreur ! Signet non défini.
4.3 Résultats	Erreur ! Signet non défini.
4.4 Discussion	Erreur ! Signet non défini.
4.5 Conclusion.....	Erreur ! Signet non défini.
 <i>PARTIE 4 : CONCLUSION GENERALE</i>	 242
 Annexes	 248
Annexe 1. Test d'Emmel a l'USAD	248
Annexe 2. Protocole expérimental de multiplex alpha	250
Annexe 3. Protocole expérimental de FRET <i>XmnI</i>	251
Annexe 4. Exemple de protocole experimental d'HRM	252
Annexe 5. Amorces utilisees pour les genotypages HRM de notre thèse	253
Annexe 6. Valorisation nationale et internationale de l'étude 1	254
Annexe 7. Valorisation nationale et internationale de l'étude 2	258
Annexe 8. Comparaison des marqueurs du statut oxydant de nos patients avec ceux d'autres etudes.....	261
Annexe 9. Publications sur la drépanocytose.....	263

Liste des figures

Figure 1.	Répartition géographique du paludisme et de la drépanocytose	34
Figure 2.	Origine géographique et dissémination des 4 premiers haplotypes drépanocytaires majeurs.	37
Figure 3.	Détermination des 5 principaux haplotypes βS par PCR-RFLP	38
Figure 4.	Interactions conduisant à la formation des fibres de désoxy-HbS	39
Figure 5.	Aiguilles de désoxy-HbS en microscopie électronique.....	39
Figure 6.	La bicouche lipidique du globule rouge drépanocytaire	40
Figure 7.	Altérations membranaires au cours de la drépanocytose	42
Figure 8.	Synthèse de la physiopathologie moléculaire de la drépanocytose.....	44
Figure 9.	Molécules permettant l'adhérence des érythrocytes à l'endothélium vasculaire.....	45
Figure 10.	Différentes sortes de GR SS	47
Figure 11.	Modèle des sous-phénotypes de la drépanocytose	52
Figure 12.	Frottis sanguin d'un sang drépanocytaire.....	55
Figure 13.	Test de falciformation d'Emmel.....	55
Figure 14.	Test de solubilité d'Itano	56
Figure 15.	Electrophorèse sur acétate de cellulose – pH alcalin (8,4 – 8,6)	56
Figure 16.	Electrophorèse sur citrate d'agar – pH acide (6,0 – 6,2)	57
Figure 17.	Focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide.....	58
Figure 18.	Exemples de profils en CLHP cations sur automate Variant II (Biorad).....	59
Figure 19.	Exemples de profils électrophorétiques obtenus sur automate Capillarys 2.....	60
Figure 20.	CLHP en phase inverse des chaînes de globine	61
Figure 21.	Séquence des complications de la drépanocytose de la naissance à la vie adulte.....	64
Figure 22.	Multiplés effets bénéfiques de l'hydroxycarbamide	66
Figure 23.	Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis®	72
Figure 24.	Exemple d'un gel à pH alcalin obtenu après migration sur Helena SAS-1 plus	72
Figure 25.	Appareil d'isoélectrofocalisation de l'USAD.....	73
Figure 26.	Processus d'interruption de la polymérisation de l'HbS par l'HbF.	77
Figure 27.	Localisation chromosomique Polymorphisme $\epsilon\gamma$ - <i>XmnI</i> , rs7482144.....	79
Figure 28.	Localisation chromosomique du gène <i>BCL11A</i> . (220).....	80
Figure 29.	Rôle de <i>BCL11A</i> dans l'expression séquentielle des gènes de globine.....	80
Figure 30.	Organisation de la région inter-génique HBS1L-MYB	81
Figure 31.	Influence de l'alpha-thalassémie dans les sous-phénotypes de drépanocytose.....	84
Figure 32.	Mécanismes physiopathologiques de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire.....	87
Figure 33.	Représentation schématique de la théorie du stress oxydant.	91
Figure 34.	Les Espèces Réactives de l'Oxygène.....	92
Figure 35.	La production de ROS et ses conséquences lors de l'hypoxie/ reperfusion.....	93
Figure 36.	Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde	95
Figure 37.	Enzymes impliquées dans la génération et l'inactivation des ROS	96
Figure 38.	Effet de l'ischémie-reperfusion sur le système xanthine oxydoréductase.....	97

Figure 39.	Systèmes antioxydants dans une cellule endothéliale	102
Figure 40.	Activation des gènes antioxydants par le stress oxydant activant Nrf2	103
Figure 41.	Fonction de la SOD2 mitochondriale	104
Figure 42.	Mécanismes de défense anti-oxydant	106
Figure 43.	Sources et rôle physiopathologique du stress oxydant dans la drépanocytose (371).....	109
Figure 44.	Réactions associées à l'auto-oxydation de la désoxy-hémoglobine.	112
Figure 45.	Rôle supposé de Nrf2 suite à un stress d'ischémie/reperfusion drépanocytaire.....	115
Figure 46.	Caractéristiques moléculaires du gène <i>MPO</i>	120
Figure 47.	Structure biochimique de la protéine MPO	122
Figure 48.	Structure cristalline humaine de MnSOD.....	124
Figure 49.	Caractéristiques moléculaires du gène <i>SOD2</i>	125
Figure 50.	Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase.....	128
Figure 51.	Caractéristiques moléculaires du gène <i>XDH</i>	129
Figure 52.	Structure et domaines fonctionnels de la protéine Nrf2	131
Figure 53.	Rôle de NRF2 dans le cancer.....	133
Figure 54.	Localisation chromosomique du gène <i>NFE2L2</i>	134
Figure 55.	Mutations affectant l'épissage	143
Figure 56.	Gène <i>MPO</i> avec la mutation NM_000250.1(<i>MPO</i>):c.-643G>A (rs2333227).....	145
Figure 57.	Fréquence allélique du polymorphisme rs2333227 dans la population africaine.....	145
Figure 58.	Gène <i>SOD2</i> avec la mutation NM_001024465.2(<i>SOD2</i>):c.47T>C (rs4880)	146
Figure 59.	Fréquence allélique polymorphisme rs4880 dans la population africaine.....	147
Figure 60.	Gène <i>XDH</i> avec la mutation NM_000379.3(<i>XDH</i>):c.3352-30A>C (rs207454).....	148
Figure 61.	Fréquence allélique du polymorphisme rs207454 dans la population africaine.....	148
Figure 62.	Gène <i>NFE2L2</i> avec la mutation NM_006164.4(<i>NFE2L2</i>):c.-769A>G (rs35652124).....	149
Figure 63.	Fréquence allélique du polymorphisme rs35652124 dans la population africaine.	150
Figure 64.	Risque de maladie en fonction du génotype et du modèle statistique considéré.	154
Figure 65.	Carte d'identité du SNP rs207254 du gène <i>XDH</i> sur dbSNP.....	156
Figure 66.	Exemple de couple d'amorces défini dans Primer 3.....	157
Figure 67.	Vérification de la spécificité du couple d'amorces <i>XDH</i> sur Primer Blast	158
Figure 68.	Recherche de SNP sur les amorces grâce au logiciel SNP check.	158
Figure 69.	Technique de Gap-PCR	159
Figure 70.	Appareil Gel Doc™ de Biorad pour la révélation des produits PCR.....	162
Figure 71.	Révélation d'un gel de référence en multiplex alpha.....	163
Figure 72.	Principe des sondes FRET en tandem.....	164
Figure 73.	Appareil LightCycler 480 de Roche.....	166
Figure 74.	Exemple de résultat de génotypage de "Xmnl" en technique FRET sur Light Cyler 480®	167
Figure 75.	Représentation graphique d'une HRM	168
Figure 76.	Variation de la cinétique de fusion due à une variant, un mutant ou une délétion.....	168
Figure 77.	Exemples de courbes obtenues par HRM	170
Figure 78.	Gamme standard de chloramine T utilisée pour le dosage des AOPP	171

Figure 79.	Complexe rose dérivé du MDA	172
Figure 80.	Gamme standard de MDA utilisée pour le dosage de MDA de nos échantillons	173
Figure 81.	Droite d'étalonnage pour la détermination de l'activité catalase	173
Figure 82.	Pente de mesure de l'activité GPx	174
Figure 83.	Pente d'inhibition de l'activité SOD	175
Figure 84.	Pente de mesure de l'activité XO.....	176
Figure 85.	Pente de mesure de l'activité MPO	176
Figure 86.	Technique du test d'Emmel	248

Liste des tableaux

Tableau 1.	Effet d'une alpha-thalassémie sur certaines complications cliniques de la drépanocytose.	83
Tableau 2.	Expression de la MPO au sein de différents organes, tissus et cellules	121
Tableau 3.	Expression du gène SOD2 au sein de différents organes, tissus et cellules	126
Tableau 4.	Expression du gène XDH au sein de différents organes, tissus et cellules.	130
Tableau 5.	Expression du gène <i>NFE2L2</i> au sein de différents organes, tissus et cellules.....	132
Tableau 6.	Bases de données de populations, de maladies et séquences	141
Tableau 7.	Loi du khi-deux avec le nombre de degrés de liberté.....	151
Tableau 8.	Amorces utilisées en multiplex alpha et amplicons générés	161
Tableau 9.	Amorces et sondes utilisées pour le génotypage <i>Xmnl</i> par FRET.....	165

Liste des abréviations

O ₂ ⁻	Anion superoxyde
¹ O ₂	Oxygène moléculaire singulet
2,3 BPG	2,3 biphosphoglycérate (anciennement appelé 2,3 DPG)
2,3 DPG	2,3 diphosphoglycérate
<u>A</u>	
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFDPHE	Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant
AO	Aldéhyde oxydase
AOPP	Advanced oxidation protein product
APOL-1	Apolipoprotein-1
ARE/EpRE	Antioxydant / electrophile response element
Asp159	Acide aspartique en position 159
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
<u>B</u>	
BCAM/Lu	Lutheran blood group protein, récepteur des Laminines
BET	Bromure d'éthidium
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
<u>C</u>	
CAT	Catalase
CAT	Capacité antioxydante totale
CERPAD	Centre de recherche et de prise en charge précoce des enfants drépanocytaires
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CNTS	Centre National de Transfusion Sanguine
CO	Monoxyde de carbone
CVO	Crise vaso-occlusive
<u>D</u>	
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
DNN	Dépistage néonatal
DTC	Doppler transcranien
dTTP	Désoxythymidine triphosphate

<u>E</u>	
eNOS	NO synthase endothéliale
ERA	Antioxydant response element
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ESL-1	E-selectin ligand-1
ET-1	Endothéline-1
<u>F</u>	
FA	Fréquence allélique
FBN	Fibronectin
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
<u>G</u>	
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
Gln143	Glutamine en position 143
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Globule rouge
GSH	Glutathion réduit
GSR	Glutathion réductase
GSSG-GSH	Glutathion oxydé / glutathion réduit
GWAS	Genome wide association studies
<u>H</u>	
H ₂ B	Dihydrobioptérine
H ₂ O ₂	Péroxyde d'hydrogène
H ₄ B	Tétrahydrobioptérine
Hb	Hémoglobine
HbF	Hémoglobine fœtale
HbS	Hémoglobine S
His26	Histine en position 26
His30	Histidine en position 30
Hist16	Histine en position 16
Hist74	Histine en position 74
HO-1	Hème oxygénase 1
HRM	High resolution melting
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire

HU	Hydroxyurée
<u>I</u>	
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 4
IEF	Isoélectrofocalisation
IFNg	Interféron gamma
IL-1 β	Interleukine 1 β
IL-6	Interleukine 6
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
ISC	Irreversible sickle cell
<u>K</u>	
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KI	Iodure de potassium
<u>L</u>	
LDH	Lactate deshydrogénase
LOO-	Acide gras peroxydé
LOOH	Acide gras réduit
LPC	Lysophosphatidyl-choline
LPE	Lysophosphatidyl-éthanolamine
<u>M</u>	
MDA	Malondialdéhyde
MLCP	Myosin light chain phosphatase
MMO	Système microsomal mono-oxygénase cytochrome P450 dépendant
MPO	Myéloperoxidase
<u>N</u>	
NBT	Tétrahydrotétrazolium
NFE2L2	Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2
NO	Monoxyde d'azote
NOO ⁻	Peroxynitrite
NOX	Oxyde d'azote
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2
<u>P</u>	
PAF	Platelet activating factor
PC	Phosphatidylcholine
PGL2	Prostacycline 2
PHHF	Persistance héréditaire de l'hémoglobine F

PRx	Peroxyredoxine
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
<u>Q</u>	
QTL	Quantitative trait loci
<u>R</u>	
RBC	Red blood cell
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (oxygen reactive species)
<u>S</u>	
SA	Sialic acid
SDM	Syndrome drépanocytaire majeur
SNP	Single nucleotide polymorphism
SO	Stress oxydant
SO	Sulfate oxydase
SOD	Superoxyde dismutase
STA	Syndrome thoracique aigu
<u>T</u>	
TNF	Facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor)
TSP	Thrombospondin
TXN	Thioredoxine
Tyr166	Tyr en position 166
Tyr34	Tyrosine en position 34
<u>U</u>	
UFR	Unité de formation et de recherche
UGT1A1	Uridine diphosphate-glucuronosyl transférase 1A1
ULvWF	Ultra-large von Willebrand factor
USAD	Unité de soins ambulatoires pour enfants et adolescents drépanocytaires
USD	Unsickable SS discocyte
<u>V</u>	
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
Vit C	Vitamine C réactive
Vit E	Vitamine E réactive
vWf	Facteur de von Willebrand
<u>W</u>	
WBC	White blood cell

<u>X</u>	
XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase
XOR	Xanthine oxydoréductase
γ -GCL	γ -glutamyl cysteine ligase

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La drépanocytose est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive caractérisée par la présence dans les globules rouges (GR) d'une hémoglobine (Hb) mutée appelée hémoglobine S. Cette dernière est responsable de crises douloureuses, pouvant provoquer des dommages organiques sévères pouvant aller jusqu'à la mort du patient. L'HbS résulte de la mutation ponctuelle du septième codon du gène β -globine, GAG, qui est remplacé par GTG. Cette nouvelle nomenclature est disponible sur le site web <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>. Cette mutation va provoquer le remplacement de l'acide glutamique par la valine dans la chaîne β de la globine. La drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente dans le monde avec près de 7% de la population mondiale porteuse d'un gène drépanocytaire et/ou thalassémique (Organisation mondiale de la santé (Fifty-ninth world health assembly (A59/9, 24 April 2006. September 2017)). Elle constitue un véritable problème de santé publique en Afrique où sa prévalence varie de 10 à 40% de porteurs hétérozygotes selon les régions. En réponse à des stress physiques tels que l'hypoxie, l'acidose, la déshydratation ou l'hyperthermie, l'HbS a tendance à polymériser, ce qui aboutit à la déformation en forme de faucille des GR: ce processus est appelé la falciformation érythrocytaire (1). La répétition des cycles de polymérisation et dépolymérisation de l'HbS altère la forme saine des érythrocytes (2, 3) et conduit aux manifestations cliniques principales de la drépanocytose, à savoir les crises vaso-occlusives (CVO) et les épisodes hémolytiques qui sont responsables d'une anémie chronique. Parmi les complications cliniques majeures associées à ces désordres hématologiques et vasculaires, sont recensés des dysfonctions rénales, de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), des accidents vasculaires cérébraux (AVC) et des crises algiques paroxysmiques dont les syndromes thoraciques aigus (STA) (4). Alors que ces complications sont fréquentes et à l'origine d'un phénotype clinique très sévère chez les patients drépanocytaires, le trait drépanocytaire (forme hétérozygote de la maladie caractérisée par un génotype AS) est généralement considéré comme un désordre bénin et asymptomatique même si une plus grande prévalence de complications rénales a récemment été mise en évidence (5).

L'expression clinique de la drépanocytose peut être radicalement différente selon les patients. Certains développent très peu de complications et atteignent ainsi l'âge de 60 ou 70 ans, tandis que d'autres développent de nombreux STA et CVO très précocement. Enfin,

une troisième catégorie de patients présente une vasculopathie cérébrale pouvant aller jusqu'à l'AVC pendant l'enfance ou l'adolescence. Ceci accrédite l'idée que de nombreux gènes, en dehors du gène *HBB* codant la chaîne β -globine, influent sur l'évolution clinique de la drépanocytose. Il s'agit de gènes qui, en fonction de leur allèles, influent positivement ou négativement sur un ou plusieurs des processus physiopathologiques de la maladie. Il est d'usage de parler de 'gènes modificateurs' dont de très nombreux ont été décrits dans la drépanocytose. Certains semblent jouer un rôle sur la sévérité globale de la maladie comme les Quantitative Trait Loci (QTLs) de l'HbF et l'alpha-thalassémie tandis que d'autres seraient plus spécifiques d'une complication clinique particulière. Au Sénégal, il n'y a à l'heure actuelle quasiment aucune étude portant sur la description génétique de la population drépanocytaire. Le diagnostic de confirmation pose ainsi problème, surtout pour les patients hétérozygotes composites de type S/ β -thalassémie, S/D-Punjab et S/O-Arab. La détermination du statut alpha-globine, incontournable pour les patients atteints de drépanocytose suivis dans les pays occidentaux, n'est également pas faite habituellement au Sénégal et il en est de même pour les deux autres principaux gènes modificateurs de la maladie que sont les QTLs de l'HbF et le statut G6PD. Les corrélations génotype-phénotype entre ces 3 facteurs modificateurs et les caractéristiques clinico-biologiques des patients seraient pourtant particulièrement intéressantes à faire dans la population drépanocytaire sénégalaise qui ne bénéficie en règle générale ni d'un traitement à l'hydroxyurée (HU), ni du dépistage néo-natal (DNN). On peut donc observer une évolution naturelle de la maladie, contrairement à ce qui se passe dans les pays occidentaux.

En parallèle, la drépanocytose est aussi reconnue comme une maladie inflammatoire et le stress oxydatif joue un rôle important dans sa physiopathologie (6, 7). Un déséquilibre entre la production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (EROS) peut endommager les structures cellulaires (lipides, membranes, protéines et acides nucléiques), avec pour conséquence la mort de la cellule ou une altération de sa fonction. Il est maintenant bien établi que les EROS interviennent dans le processus inflammatoire et peuvent être impliqués dans des réactions oxydatives telles que la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines (8). Normalement, les globules rouges sont soumis à un stress oxydatif résultant de la production continue de EROS qui favorisent l'auto-oxydation de l'Hb (9). Ce phénomène est exacerbé dans la drépanocytose (10), entraînant ainsi une réponse inflammatoire continue associée à un dysfonctionnement endothélial et à des lésions multiples des organes. Bien que de nombreuses publications aient montré l'implication du

stress oxydant dans la physiopathologie de la drépanocytose, très peu de travaux ont en revanche porté sur l'étude des gènes modulant ce dernier dans cette maladie.

Au Sénégal, l'ensemble des études sur la drépanocytose s'est concentré sur les aspects phénotypiques de l'affection (notamment les marqueurs associés), le volet moléculaire n'ayant quasiment pas fait l'objet de travaux. Il en est de même pour les marqueurs et les gènes du stress oxydant. Au regard de ces constats, les objectifs principaux de ce travail de thèse réalisé sur une population pédiatrique de 301 enfants atteints de drépanocytose recrutés à l'hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar étaient les suivants :

- 1/ Déterminer les fréquences alléliques des principaux gènes modificateurs de la drépanocytose au Sénégal (**Etude 1**) ;
- 2/ Déterminer les effets isolés et combinés de ces gènes dans un contexte d'évolution naturelle de la maladie (**Etude 2**) ;
- 3/ Déterminer les inter-relations entre le stress oxydant systémique, les principaux gènes modificateurs de la drépanocytose et la sévérité de la maladie. (**Etude 3**) ;
- 4/ Déterminer les effets de certains polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant sur l'expression clinique et biologique de la drépanocytose. (**Etude 4**).

Notre manuscrit débutera par une partie de rappels bibliographiques afin que même les lecteurs non spécialistes de la drépanocytose puissent lire sans difficulté la thèse. Après une présentation des généralités sur la maladie et sur la situation actuelle de la drépanocytose au Sénégal, l'étude des gènes modificateurs de la drépanocytose sera abordée. Nous tâcherons d'y détailler les principaux gènes modificateurs déjà validés dans la drépanocytose (à savoir le génotype α -globine, les QTLs de l'HbF, les haplotypes β -globine et le déficit en G6PD) puis une présentation non exhaustive des autres gènes modificateurs récemment décrits dans cette pathologie clôturera ce chapitre. Le chapitre 3 de notre revue bibliographique portera sur les sources du stress oxydant et sur les systèmes de défense anti-oxydante dans la drépanocytose. Une attention particulière sera apportée sur l'étude des polymorphismes des gènes du stress oxydant qui constituent le cœur de notre 4^{ème} étude (à savoir les gènes *MPO*, *XO*, *SOD* et *NFE2L2*).

Nous présenterons ensuite, dans une seconde partie méthodologique, les techniques et stratégies de génotypage et d'analyse biochimique utilisées au cours de la thèse.

Enfin, dans une troisième partie intitulée « Contribution personnelle », nous présenterons les résultats obtenus au cours de nos 4 études et une discussion globale sera faite relativement aux apports de cette thèse et aux nouvelles questions qui en découlent.

PARTIE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS SUR LA DRÉPANOCYTOSE

**CHAPITRE 2 : LES MODULATEURS GÉNÉTIQUES DE LA
DRÉPANOCYTOSE**

**CHAPITRE 3 : LE STRESS OXYDANT, ACTEUR MAJEUR DE LA
DRÉPANOCYTOSE**

Chapitre 1. Généralités sur la drépanocytose

1.1. Historique et épidémiologie

La première observation établissant un lien entre une maladie hyperalgique et une anomalie érythrocytaire est due au Dr. James Herrick (11). En 1910, ce médecin de Chicago a observé dans le sang d'un étudiant noir âgé de 20 ans, originaire de Grenade et souffrant d'une anémie chronique, la présence de GR allongés. Ils avaient une forme comparable à une faucille, *sickle* en anglais. En 1917, Emmel et *al.* mettaient en évidence la falciformation des GR au cours de leur passage dans des solutions salines (12).

En Afrique, la maladie était connue de longue date et était le plus souvent désignée par ses manifestations douloureuses. En 1927, apparaît une notion majeure : la déformation en faucille des GR est liée à un faible taux d'oxygène et est généralement réversible (13). Quelques années après, Diggs et Ching observent à l'autopsie que la mort des patients est induite par des événements ischémiques de la microcirculation (14). Une découverte majeure a été faite en 1949 par Pauling et ses collaborateurs qui mettent en évidence la différence de migration électrophorétique entre l'hémoglobine drépanocytaire (HbS) (pour "slow") qui porte une charge positive supplémentaire et l'hémoglobine normale A (HbA) (15). Il est ainsi montré pour la première fois qu'une molécule anormale est à l'origine d'une maladie. Chez les sujets malades, seule l'HbS existe alors que les Hb A et S coexistent chez les porteurs du trait drépanocytaire, preuve du caractère héréditaire de la maladie (16). Peu après, Harris démontre la capacité de gélification de l'HbS et Perutz met en évidence la faible solubilité de l'HbS sous forme désoxygénée, ce qui expliquerait la falciformation du GR (17, 18).

Dans les années 1956-1959, Ingram démontre que la maladie est due à une substitution de l'acide aminé glutamate en position 7 par une valine au niveau de la chaîne β de l'Hb (β^S) (19-22). Cette notion fait de la drépanocytose la première maladie élucidée comme due à un défaut moléculaire en médecine. La découverte de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et, plus tard, le déchiffrement du génome humain ont permis d'asseoir les bases génétiques de la maladie. Les nombreux travaux menés dans les décennies suivantes se sont orientés vers l'élaboration des méthodes diagnostiques, la compréhension de la physiopathologie et le traitement de la maladie. La drépanocytose est la première maladie moléculaire et vraisemblablement une de celles qui a fait l'objet du plus

grand nombre de travaux à ce jour. Cependant, une des caractéristiques majeures de cette maladie mondialement répandue, à savoir la très grande variabilité de sa présentation phénotypique, reste très largement incomprise, malgré des avancées importantes, notamment avec la greffe de moëlle osseuse et la thérapie génique.

Sur le plan épidémiologique, la drépanocytose est une des maladies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, avril 2006), environ 300.000 enfants naissent chaque année dans le monde avec la drépanocytose dont 200.000 en Afrique sub-saharienne et une majorité d'entre eux n'atteignent pas l'âge de 5 ans. Une revue détaillée publiée dans Lancet a rapporté les mêmes prévalences : Piel *et al.* estiment à plus de 5 millions le nombre de naissances annuelles d'individus hétérozygotes A/S et à 312.000 le nombre de nouveau-nés homozygotes S/S à travers le monde (23). La prévalence de la mutation β^S est maximale en Afrique tropicale sub-saharienne où elle peut atteindre 30 à 40 % dans certains pays. Un dépistage néonatal expérimental de la drépanocytose a été réalisé dans 5 états africains (Congo, Mali, Maroc, Sénégal, Tunisie) (24) Les résultats ont été mis en commun et analysés : 5046 prélèvements de sang ont été réalisés et 26 nouveau-nés atteints de SDM ont été dépistés soit 1 pour 207 naissances. Du fait des flux migratoires associés au commerce triangulaire ayant caractérisé les XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècles (commerce entre l'Afrique, l'Amérique et l'Europe du temps de l'esclavage), la drépanocytose se retrouve également dans d'autres régions, particulièrement aux Etats-Unis d'Amérique, au Brésil et aux Caraïbes. On trouve également des foyers dans tout le Moyen-Orient, l'Inde et le pourtour méditerranéen. L'augmentation des flux migratoires ces dernières décennies en direction des pays industrialisés a également fortement participé à la dissémination de l'allèle β^S sur une très grande partie du globe. Concernant la France, dans un bulletin publié en décembre 2014, l'INSERM fait état de 441 nouveau-nés atteints d'un SDM au cours de l'année 2013. Ce chiffre correspond à environ à une naissance sur 1900, faisant de la drépanocytose la maladie génétique la plus fréquente en France et ce bien au-delà des maladies génétiques plus connues du grand public, telles que la myopathie de Duchenne (1/3500) ou la mucoviscidose (1/4500).

Cette répartition très particulière de la mutation β^S décrite par Lehmann sous le terme de 'Ceinture sicklémique' (*Sickle belt*) dessine une large bande qui traverse le continent africain d'Est en Ouest et qui est superposée à la distribution géographique du paludisme (25). Dès 1949, comparant la carte de la répartition de l'infestation palustre à celle de la drépanocytose, une concordance frappante a été notée (26) (Figure 1). Cette

concordance a fait émettre l'hypothèse que le trait drépanocytaire conférait une résistance à *Plasmodium falciparum* (le parasite responsable du paludisme) pendant la période critique de la petite enfance. En effet, une telle mutation qui détermine à l'état homozygote une maladie peu compatible avec la vie (la majorité des malades meurent avant d'avoir pu assurer leur descendance) devrait disparaître au fil des générations ; or cela n'est pas le cas. Certains auteurs expliquent son maintien par l'avantage sélectif de l'hôte hétérozygote AS (porteur sain) qui permet la transmission ultérieure de la mutation en milieu impaludé. En effet, si le patient à l'état homozygote (SS) succombe de la drépanocytose, celui à l'état hétérozygote (AS) résisterait mieux à l'infestation palustre que le sujet normal AA (27, 28). Cette protection serait liée aux propriétés physiques et biochimiques particulières des GR AS, en l'occurrence :

- l'invasion, la croissance et le développement du *Plasmodium falciparum* seraient réduits dans les cellules AS (Friedman 1978, Pasvol 1978) ;
- les GR AS infectés par les parasites ont tendance à falciformer et seraient détruits prématurément dans la rate (29, 30).

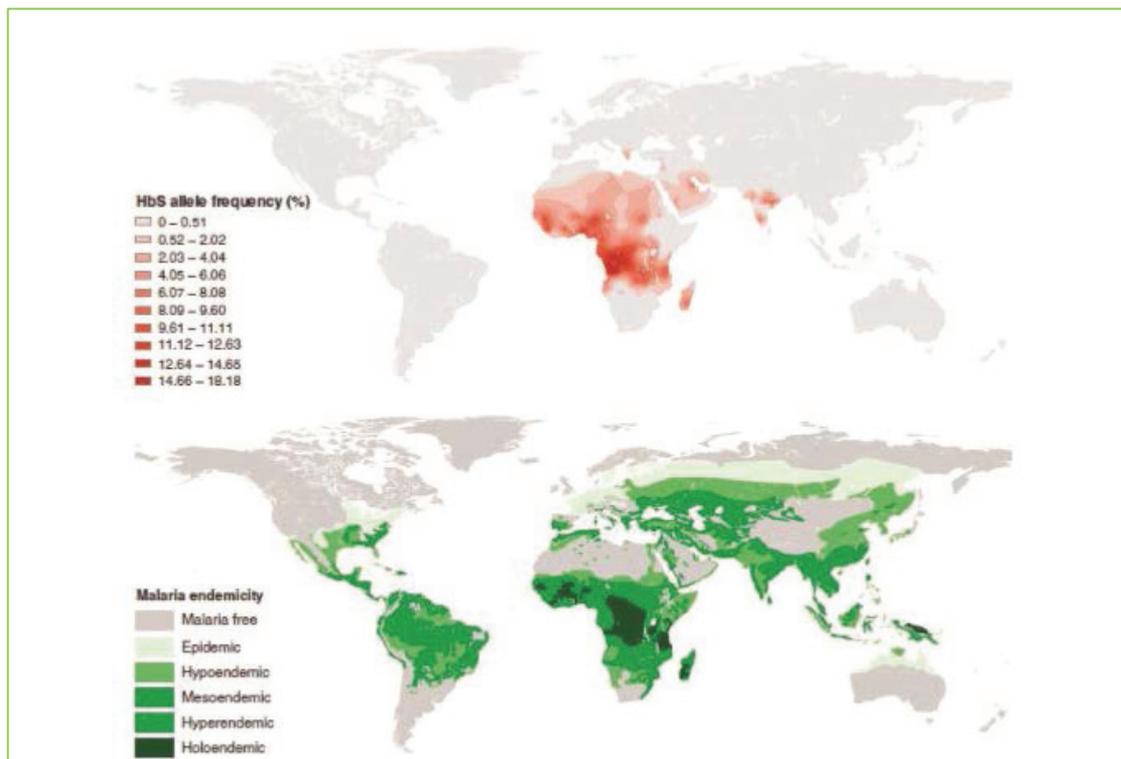


Figure 1. Répartition géographique du paludisme et de la drépanocytose
 En rouge, la fréquence de l'allèle HbS : en vert, la distribution du paludisme. Extrait de (31).

1.2 Génétique

1.2.1 Mode de transmission

La drépanocytose se transmet selon le mode autosomique récessif pour les cliniciens, car seuls les sujets homozygotes sont considérés comme malades. Par contre, pour les biochimistes, il s'agit d'une affection à transmission codominante car l'hémoglobine S est observée chez les sujets hétérozygotes. La transmission se fait selon les lois de Mendel. Ainsi, dans un couple de sujets hétérozygotes AS, la probabilité à chaque grossesse de naissance d'un enfant homozygote SS est de 25%, celle d'un enfant homozygote AA 25%, et celle d'un enfant hétérozygote AS de 50%.

1.2.2 Génétique moléculaire

La drépanocytose est due au remplacement d'un acide glutamique par une valine en position 7 de la chaîne β -globine (β^7 Glu \rightarrow Val). Avec le code génétique, il a été établi que cette substitution était liée à la mutation ponctuelle d'une seule base transformant le codon 7 de GAG en GTG. L'hémoglobine qui en résulte est appelée hémoglobine S. Les patients souffrant de drépanocytose présentent deux copies de cet allèle anormal. Les sujets AS sont qualifiés de « porteurs du trait drépanocytaire ». Le syndrome drépanocytaire est également observé lorsque l'allèle β^S coexiste avec un allèle β -thalassémique puisque ceci a pour conséquence l'absence ou la réduction de synthèse des chaînes β -globine normales. On parlera alors de thalasso-drépanocytose (forme $S\beta^+$ ou $S\beta^0$) qui est fréquente dans les populations d'origine méditerranéenne. Les formes homozygotes SS et hétérozygotes composites $S\beta^0$ constituent les formes les plus sévères de la maladie drépanocytaire.

Plus de 1000 variants de l'hémoglobine sont aujourd'hui répertoriés dans la banque de données HbVar accessible sur internet (<http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>). Moins d'un tiers d'entre eux ont des répercussions cliniques, la mutation intervenant dans une zone critique pour le fonctionnement de la molécule. Cinq Hb anormales autres que l'HbS occupent une place prépondérante vis-à-vis de la drépanocytose : l'HbC est la plus fréquente, notamment en Afrique(32, 33), l'HbE se rencontre surtout dans les populations du sud-est asiatique (34) tandis que l'Hb O-Arab (β^{122} Glu \rightarrow Lys) et l'Hb D-Punjab (β^{122} Glu \rightarrow Gln) sont moins fréquentes. Enfin, l'Hb Lepore est le résultat d'un crossing-over non homologue entre les gènes δ et β (35). L'effet pathologique de ces 5 Hb à l'état hétérozygote est minime, mais en association avec l'HbS (hétérozygotie composite), elles conduisent à des syndromes

drépanocytaires majeurs (SDM). Il existe aussi certains variants de l'Hb assez rares qui sont caractérisés par une double mutation en cis sur le même allèle β -globine: l'allèle $\beta^{\text{S-Oman}}$ ($\beta 7 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ associée à $\beta 122 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$) et l'allèle $\beta^{\text{S-Antilles}}$ ($\beta 7 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$ associée à $\beta 24 \text{ Val} \rightarrow \text{Ile}$) en sont deux exemples. Cette double mutation conduit à une expression clinique de SDM même à l'état hétérozygote et on parlera de 'syndrome drépanocytaire dominant' (36-38).

1.2.3 Polymorphisme génétique

Toutes les variations de séquence au niveau de l'ADN ne sont pas pathologiques. Il existe, d'un individu à l'autre, des variations neutres sans aucune expression phénotypique. Lorsque la fréquence de ces mutations silencieuses est supérieure à 1%, on parle de polymorphisme ou single nucleotide polymorphism (SNP). Lorsque le polymorphisme porte sur un site reconnu spécifiquement par des enzymes de restriction (endonucléases de restriction), on parle de "polymorphisme de restriction" détectable par technique RFLP pour *restriction fragment length polymorphism*. Le premier site de restriction polymorphe décrit dans le cluster β -globine a été le site de l'enzyme *HpaI* en 3' du gène β -globine. Il a été décrit comme étant en déséquilibre de liaison avec la mutation β^{S} chez des patients afro-américains mais cette association, qui a été la base du premier diagnostic prénatal (DPN) de drépanocytose, n'était pourtant pas absolue (39).

Un haplotype correspond à plusieurs SNPs proches l'un de l'autre sur le même chromosome et qui sont donc souvent transmis ensemble. Au cours de l'évolution, sont ensuite apparues les différentes mutations du gène β -globine, chacune se faisant donc sur un fond génétique particulier selon le groupe d'individus concernés. Comme les brassages de populations n'étaient pas ce qu'ils sont aujourd'hui, cette liaison génétique entre une mutation donnée et un haplotype β -globine particulier a perduré jusqu'à nos jours (notion d'effet fondateur). D'un point de vue épidémiologique, ceci permet ainsi de déterminer si une mutation a une origine unique (un seul haplotype β -globine associé) ou est apparue plusieurs fois dans l'évolution dans des régions géographiques bien distinctes (plusieurs haplotypes associés) (40). La mutation β^{S} est présente sur 5 haplotypes distincts du cluster β -globine, chacun étant spécifique d'une région géographique donnée. Ceci signifie que cette mutation est apparue au moins à 5 reprises dans l'évolution et ce, de façon indépendante. Ces haplotypes β^{S} majeurs sont dénommés 'Bantu', 'Senegal', 'Benin', 'Cameroon', et 'Arab-Indian' (41). L'origine géographique des 3 principaux haplotypes africains (Bantu, Senegal et Benin) et de l'haplotype de la péninsule arabique est représentée sur la Figure 2.

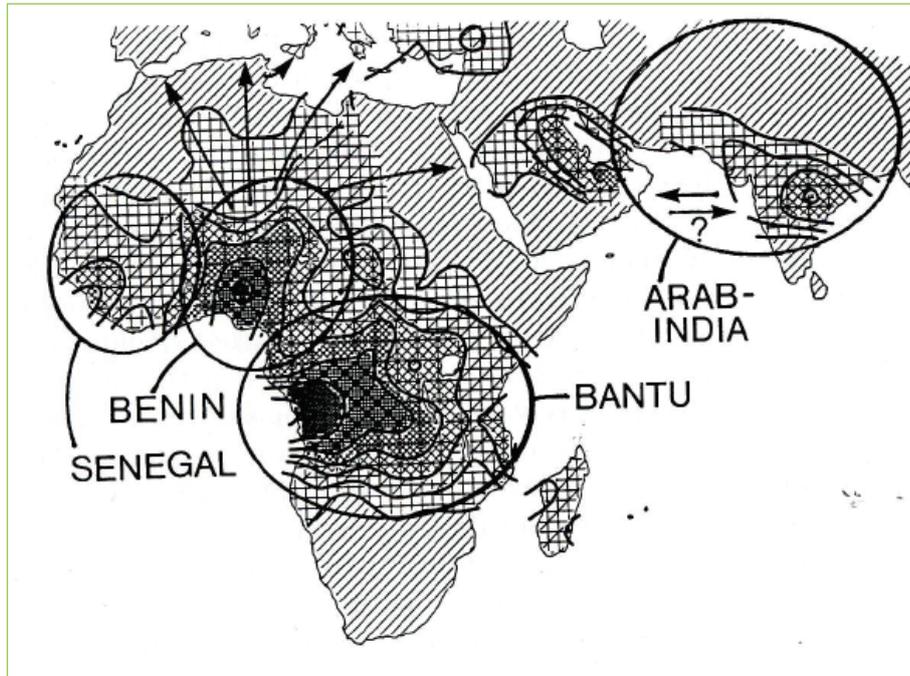


Figure 2. **Origine géographique et dissémination des 4 premiers haplotypes drépanocytaires majeurs.**

Tiré de (42). L'haplotype Cameroon est apparu plus tard dans l'évolution et a une répartition géographique moins délimitée.

La Figure 3 ci-dessous détaille les caractéristiques de chacun de ces haplotypes selon 8 SNPs majeurs parmi ceux définis par Orkin (43). Comme, historiquement, on utilisait la RFLP pour génotyper ces SNPs, chacun est défini par le nom de l'enzyme de restriction utilisée suivi du symbole du gène β -globine le plus proche. Par exemple, 'HincII ϵ ' désigne le SNP rs116970755 qui est localisé en amont du gène β -globine.

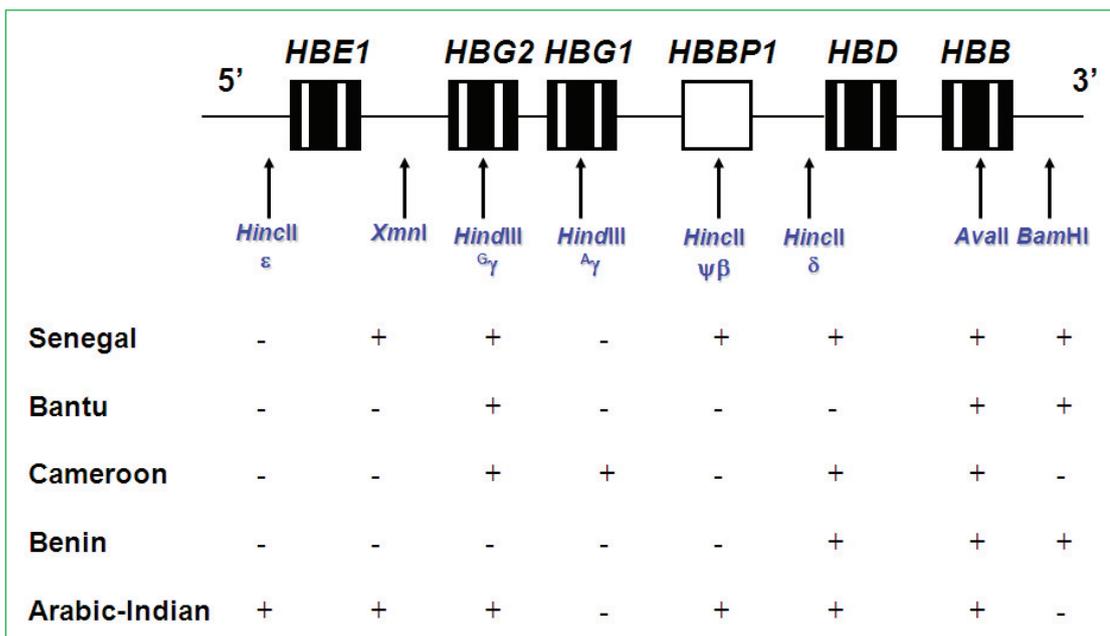


Figure 3. Détermination des 5 principaux haplotypes βS par PCR-RFLP

Le signe (+) indique que l'enzyme de restriction utilisée coupe; le signe (-) indique le contraire.

A côté de ces haplotypes 'majeurs', il existe bien sûr des haplotypes secondaires consécutifs à des phénomènes de conversion génique. Il existe par exemple 7 sous-types Bantu. Les haplotypes dits 'atypiques' correspondent à des recombinaisons entre un haplotype drépanocytaire et un haplotype non porteur de la mutation β^S . Il existe au moins 11 haplotypes atypiques manifestement dérivés d'haplotypes Bantu : tous ont une région 3' commune mais leur région 5' est retrouvée dans différents haplotypes du bassin méditerranéen (44, 45). De nos jours, avec les techniques de séquençage haut débit, des haplotypes beaucoup plus précis (c'est-à-dire utilisant beaucoup plus de SNPs qui couvrent une région beaucoup plus large du cluster β -globine) ont pu être déterminés, ce qui a permis de montrer qu'il s'agissait d'une région du génome avec un très fort taux de recombinaison (46, 47).

1.3 Physiopathologie moléculaire de la drépanocytose

1.3.1. La gélification de l'hémoglobine S

L'hémoglobine drépanocytaire est un hétéro-tétramère comportant 2 globines alpha normales et 1 ou 2 globines bêta mutées (Glu7Val). Cette mutation ne modifie ni la structure tertiaire ni la structure quaternaire de la molécule d'HbS à l'état oxygéné. En revanche, à l'état désoxygéné, des contacts hydrophobes peuvent s'établir sur des tétramères d'HbS adjacents (48-51). Les structures denses désoxygénées entrent en collision, interagissent, et des contacts hydrophobes s'établissent entre sous-unités β impliquant la valine $\beta 7$ d'un brin et un site accepteur hydrophobe sur l'autre brin (Figure 4). Ainsi un polymère se forme et s'allonge en fibres hélicoïdales qui, groupées, se raidissent et induisent le changement caractéristique de forme du GR drépanocytaire en forme de faucille (3, 52). Ceci favorise secondairement la déshydratation des drépanocytes, ce qui aboutit à des altérations mécaniques et rhéologiques majeures de ces cellules (53, 54). Ce processus nécessite un certain temps d'amorçage, que l'on appelle "temps de retard" ou « delay time » en anglais, et qui est inversement proportionnel à la concentration intracellulaire en HbS.

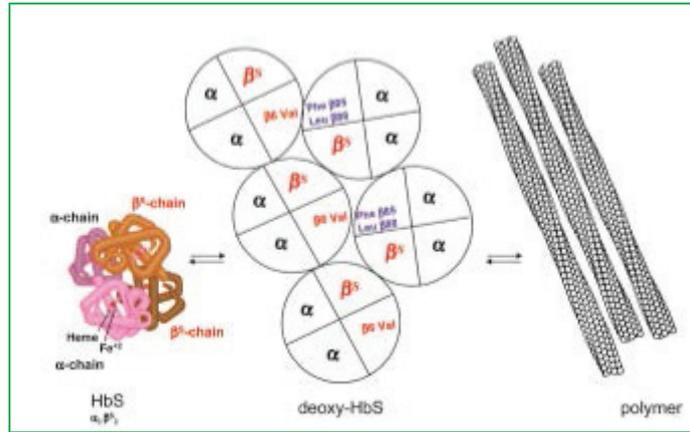


Figure 4. **Interactions conduisant à la formation des fibres de déoxy-HbS**

Tiré de (55).

Vu au microscope électronique, le GR drépanocytaire désoxygéné apparaît rempli d'un gel formé par des cristaux allongés longs de 1 à 15 μm . Ces cristaux sont constitués par des polymères d'HbS. Les longs polymères d'HbS s'alignent en fibres qui forment ensuite des bâtonnets parallèles. Le polymère a une structure hélicoïdale avec 14 molécules d'HbS dans chaque section (56-58).

Le globule rouge, déformé par ces structures fibreuses tubulaires, prend une forme caractéristique en faucille ou feuille de houx. Ces cristaux allongés vus au microscope électronique sont représentés par la Figure 5.

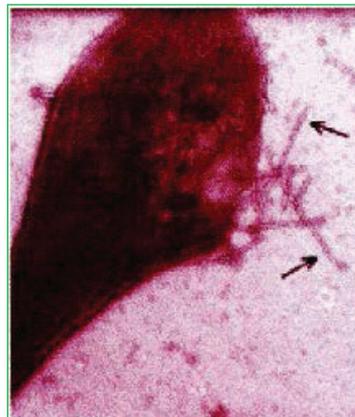


Figure 5. **Aiguilles de déoxy-HbS en microscopie électronique**

1.3.2 Les modifications de la membrane érythrocytaire

Les membranes cellulaires sont principalement constituées d'une double couche de phospholipides et de protéines. Les protéines périphériques sont maintenues sur les faces interne et externe via des liaisons faibles ou encore attachées de manière covalente à des

acides gras ou à des phospholipides de la bicouche. Ces phospholipides sont répartis de façon asymétrique entre la couche externe et la couche interne et comprennent principalement : la sphingomyéline, l'acide phosphatidique (PA), le lysophosphatidylethanolamine (LPE), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyl-éthanolamine (PE) et la lysophosphatidyl-choline (LPC), la phosphatidyl sérine (PS) (Figure 6).

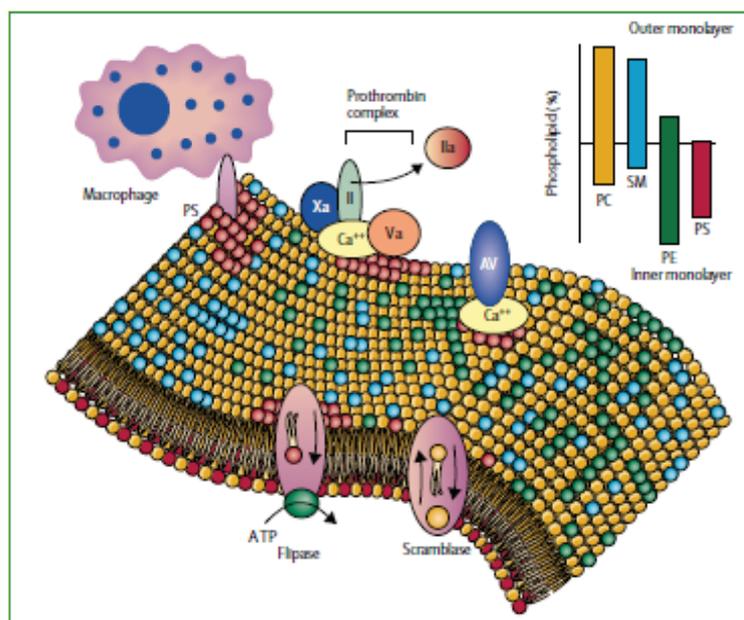


Figure 6. La bicouche lipidique du globule rouge drépanocytaire

SM: sphingomyéline; PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidyléthanolamine; PS: phosphatidylsérine; AV: annexine V. La PS exposée à la surface du globule rouge forme un site de fixation pour le complexe prothrombinique. Elle est de plus reconnue par les macrophages et interagit avec des protéines telles que l'annexine V.

La polymérisation de l'HbS altère directement ou indirectement la bicouche lipidique typique et les protéines de la membrane érythrocytaire, ce qui conduit à une hydratation cellulaire réduite, à une hémolyse accrue et à des interactions anormales avec d'autres cellules sanguines, contribuant à l'apoptose précoce des érythrocytes (57, 59-61). L'analyse par chromatographie liquide haute-performance (CLHP) en phase inverse a mis en évidence chez le sujet drépanocytaire une déplétion de phosphatidylcholine (PC) contrastant avec une accumulation d'acide phosphatidique, de sphingomyéline et de lysophosphatides (62). Le déséquilibre de ces constituants majoritaires explique une partie de la physiopathologie de la drépanocytose. En effet, les lysophosphatides contribuent fortement à l'hémolyse et aux

troubles hémorhéologiques du sujet drépanocytaire de par leurs propriétés cytolytiques et leur potentiel pro-coagulant médié par une désorganisation péroxydative de la membrane érythrocytaire (63). En outre, la phosphatidylsérine (qui est habituellement confinée à la couche interne de la membrane) est exposée à la surface de l'érythrocyte. Les érythrocytes circulants exposant leur phosphatidylsérine jouent un rôle dans de nombreux événements physiopathologiques importants : hémolyse accrue, activation endothéliale, interaction globules blancs et plaquettes et activation des voies de coagulation (64, 65).

La lipido-péroxydation due au stress oxydant apparaît comme le principal processus morbide impliquant la membrane du globule rouge dans la pathogénie de la maladie drépanocytaire (66). Outre des pertes lipidiques et une désorganisation structurale et fonctionnelle de la membrane érythrocytaire, elle attaque les doubles liaisons maloniques des acides gras polyinsaturés générant ainsi des radicaux libres. Ces acides gras sont ensuite hydrolysés par les phospholipases (en particulier la phospholipase A2) et relégués dans le milieu extracellulaire. Les pertes lipidiques résultantes altèrent l'asymétrie bi lamellaire de la membrane érythrocytaire, ses propriétés isodynamiques et sa stabilité. Les conséquences de la lipido-péroxydation se traduisent par une perte de la perméabilité sélective, de la plasticité de la membrane ainsi que de la morphologie normalement discoïde de l'hématie mature. Il s'ensuit des altérations des propriétés fonctionnelles membranaires (récepteurs, enzymes, transporteurs). La perturbation chimique de la barrière cytoplasmique se traduit quant à elle par une entrée importante de sodium (3 ions Na^+) contre une sortie de deux ions potassium (K^+) de la cellule. L'intrusion concomitante de calcium (Ca^{2+}) stimule les canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants : c'est l'effet Gardos. A côté de cet effet Gardos, d'autres canaux ioniques membranaires sont dysfonctionnels, tels que les co-transporteurs érythroïdes KCC1, KCC3 et KCC4 (67). Ces troubles de l'homéostasie ionique intra-érythrocytaire entraînent une déshydratation érythrocytaire qui va favoriser la polymérisation de l'hémoglobine S (62) (Figure 7).

Cette lipido-péroxydation va entraîner aussi la formation d'hémichromes qui se concentrent à l'intérieur de la membrane avec les protéines du cytosquelette, en particulier la protéine bande 3. Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération d'ions ferriques Fe^{3+} , contribuant ainsi à l'existence d'un microenvironnement oxydant. De plus, les IgG anti-bande 3 s'accumulent sur les agrégats de la bande protéique 3, induisant l'érythro-phagocytose par les macrophages (3). Enfin, tous ces changements de membrane donnent lieu à la production de microparticules d'érythrocytes (68, 69). Ces microparticules uni-

lamellaires submicroniques sont expulsées de la membrane plasmique sous contrainte cellulaire vers la membrane et le cytosquelette. Chez les patients drépanocytaires, elles sont dérivées en grande quantité des érythrocytes (70) mais aussi des plaquettes, des monocytes et des cellules endothéliales. Ces microparticules possèdent des marqueurs de surface cellulaire, des protéines cytoplasmiques et des microARN dérivés de leur cellule d'origine et peuvent affecter la coagulation, l'adhérence vasculaire, l'inflammation et la fonction endothéliale (71, 72).

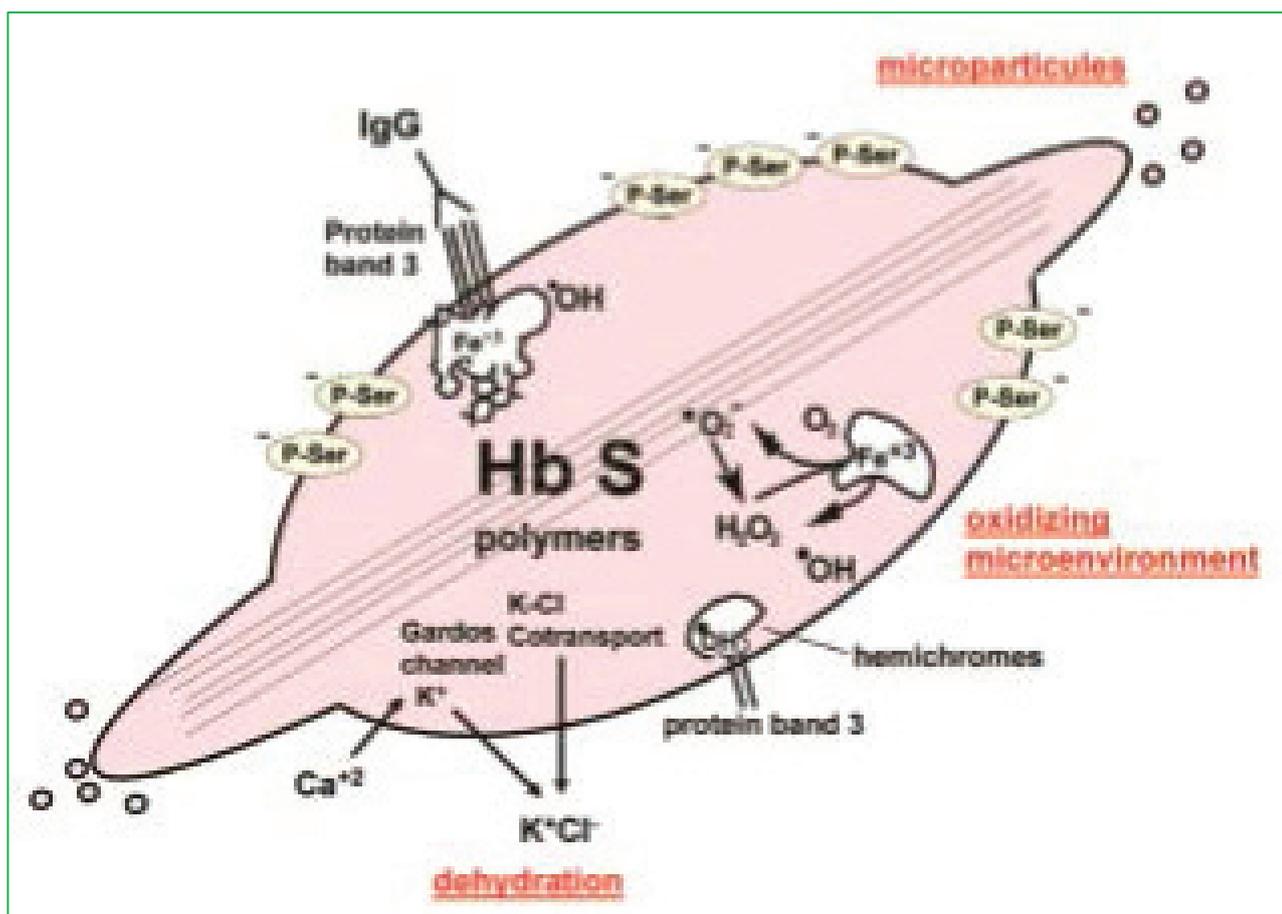


Figure 7. Altérations membranaires au cours de la drépanocytose

Tiré de (73).

1.3.3 Falciformation et déshydratation du globule rouge

L'homéostasie anormale des cations dans les hématies falciformes conduit à la déshydratation des cellules, ce qui conduit aussi à une augmentation de la concentration et de la polymérisation de l'HbS. Cette dernière est à l'origine de la falciformation, tout d'abord réversible en cas de ré-oxygénation. Des épisodes répétés de polymérisation de l'HbS et de falciformation érythrocytaire dans des conditions de faible pO₂ et de dépolymérisation dans des conditions de forte pO₂ peuvent entraîner de graves altérations de la structure et de la

fonction membranaire et une compartimentation calcique anormale. La déformation de la membrane et la déshydratation des érythrocytes aboutissent finalement à la formation d'une cellule falciforme irréversible qui ne peut plus revenir à sa forme (74-76).

Quelle que soit la pression partielle en oxygène (pO_2), la faible affinité de HbS pour l'oxygène favorise une augmentation de la fraction désoxygénée de l'HbS ce qui favorise la polymérisation de l'HbS et la formation d'érythrocytes falciformes (77). Le 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG) participe également à cette baisse d'affinité. Il s'agit d'un intermédiaire glycolytique qui est physiologiquement présent à des niveaux très élevés dans les érythrocytes falciformes et qui interagit avec les sous-unités des chaînes β -globine désoxygénées (78). Des études ont aussi rapporté que les érythrocytes falciformes augmentent l'activité de la sphingosine kinase, conduisant à des niveaux élevés de sphingosine-1-phosphate qui diminuent l'affinité de l'HbS pour l'oxygène (79). La sphingosine kinase semble activée par des niveaux accrus d'adénosine plasmatique (résultant de l'hydrolyse des nucléotides de l'adénosine qui sont libérés des érythrocytes pendant l'hémolyse) via le récepteur de l'adénosine érythrocytaire A2b (80, 81).

Le concept de base de la cinétique de la polymérisation de l'HbS est le mécanisme de double nucléation. Avant la formation de tout polymère, il existe une période de latence (temps de retard) au cours de laquelle les molécules d'HbS désoxygénées forment un petit noyau, qui est suivi par une croissance et une formation rapide du polymère (82, 83). L'hème cytoplasmique libre peut augmenter l'attraction des molécules d'HbS et la vitesse de nucléation et de formation de polymère (84). La vitesse de polymérisation de l'HbS est corrélée de façon exponentielle avec la concentration de l'HbS dans l'érythrocyte et aussi avec celles d'autres hémoglobines anormales (HbO-Arab, HbD-Punjab) qui participent de manière variable aux polymères (85). La coexistence d'une α -thalassémie entraîne en revanche une production réduite de sous-unités α -globine ce qui favorise la formation de tétramères $\beta\delta$ instables (formés par quatre sous-unités β -globine drépanocytaires) secondairement protéolysés. La résultante est une plus faible concentration intra-cellulaire d'HbS, ce qui ralentit en retour le phénomène de polymérisation.

1.3.4 Synthèse

Les 3 étapes de la physiopathologie de la drépanocytose à savoir la gélification, les modifications de la membrane et la falciformation du GR sont représentées dans la Figure 8.

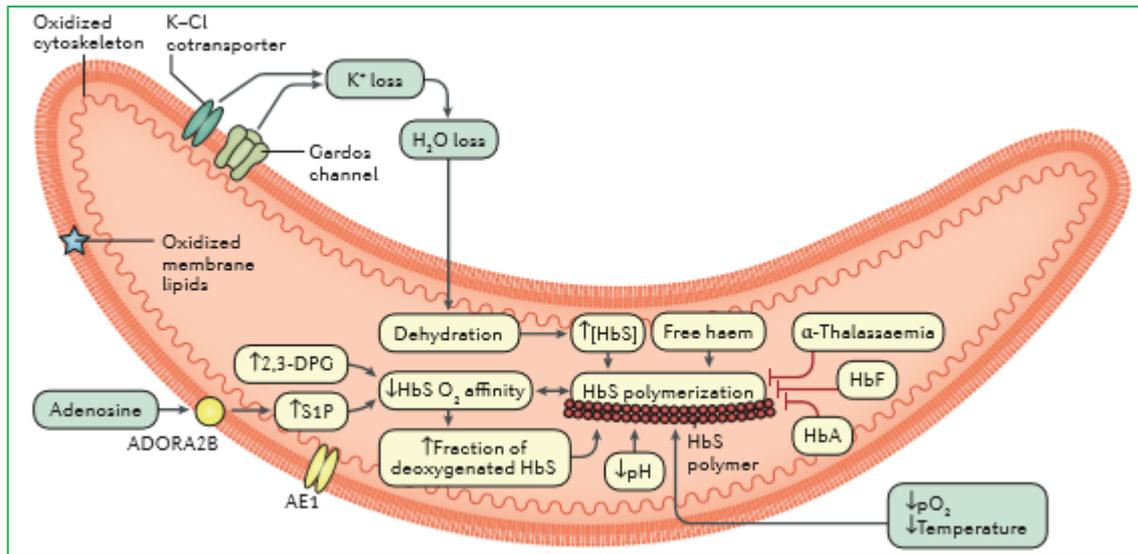


Figure 8. **Synthèse de la physiopathologie moléculaire de la drépanocytose**

Tiré et modifié de (67). 2, 3-DPG, 2, 3 Diphosphoglycérate; S1P, sphingosine-1-phosphate.

L'homéostasie des cations est anormale dans les érythrocytes falciformes, conduisant à la déshydratation des cellules. La perte de potassium se produit par l'intermédiaire de la protéine 4 du canal potassique activé par le calcium (également connu sous le nom de canal Gardos) et des co-transporteurs K-Cl (86, 87). La polymérisation de l'HbS dépend de nombreux facteurs, notamment la concentration en HbS, la pression partielle en oxygène (pO_2), la température, le pH, la concentration en 2,3-BPG et la présence de différentes molécules d'Hb (53, 82, 88, 89).

Au fur et à mesure que les fibres de polymère s'étendent, elles déforment les érythrocytes et diminuent leur flexibilité altérant ainsi leurs propriétés rhéologiques, ce qui peut mener finalement à une vaso-occlusion (90).

1.4 Interactions des globules rouges SS avec l'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire tapisse l'ensemble des vaisseaux de l'organisme et forme une barrière semi-perméable entre le sang et les tissus adjacents. Il est connu notamment pour son rôle dans la régulation du tonus vasculaire, l'hémostase et la coagulation (91). Diverse études ont montré l'importance de cette couche de cellules dans les réponses physiologiques inflammatoires et face à un corps étranger mais aussi dans le développement de maladies telles que le diabète, la néphrite glomérulaire et l'athérosclérose (92).

Bien que le dysfonctionnement des globules rouges soit le principal facteur de développement et de progression de la drépanocytose, d'autres types de cellules (cellules endothéliales, leucocytes, plaquettes) et protéines plasmatiques, non affectées par la

mutation génétique, sont également des acteurs clés de la physiopathologie de la maladie (Figure 9) (93-96).

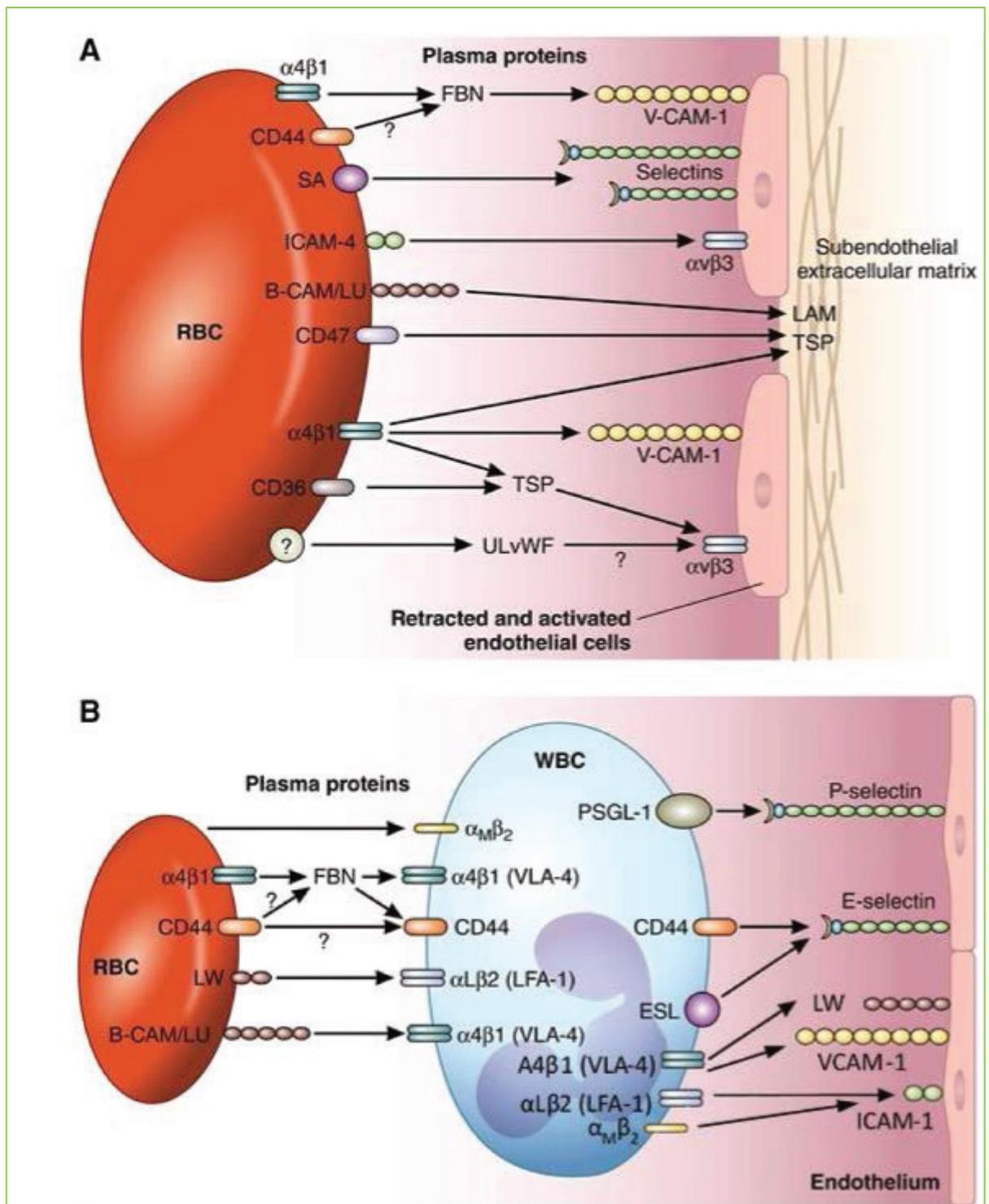


Figure 9. Molécules permettant l'adhérence des érythrocytes à l'endothélium vasculaire.

Tiré de (97). RBC, red blood cell; ICAM-4, intercellular adhesion molecule-4, SA, sialic acid; FBN, fibronectin; TSP, thrombospondin; ULvWF, ultra-large von Willebrand factor; BCAM/Lu, the Lutheran blood group protein, récepteur des laminines (LAM) contenant les protéines $\alpha 5$, SA, sialic acid; FBN, fibronectin; TSP, thrombospondin; ULvWF, ultra-large von Willebrand factor, WBC, white blood cell ; ESL-1, E-selectin ligand-1; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1.

En effet, la falciformation est nécessaire mais pas suffisante à elle seule pour initier un épisode vaso-occlusif. L'adhésion anormale des GR à l'endothélium vasculaire a attiré l'attention en tant que facteur déclenchant potentiel de l'obstruction vasculaire dans la drépanocytose. Ainsi, cette adhérence a fait l'objet de nombreux travaux, souvent difficiles à comparer, car utilisant des systèmes expérimentaux différents (94). Cette nouvelle perspective était évidente dans deux documents historiques publiés indépendamment et consécutivement par Hoover *et al.* et Hebbel *et al.* (87, 98). Ces deux études ont suggéré que l'adhésion anormale des GR falciformes à l'endothélium était un facteur contributif potentiel à la vaso-occlusion dans la drépanocytose. Cette relation était apparemment basée sur l'adhésion de populations de GR denses (99). En plus des drépanocytes, cette adhérence implique surtout les réticulocytes immatures, dits «de stress», sortis prématurément de la moelle chez les malades drépanocytaires, du fait d'une érythropoïèse stimulée en permanence (100). Ainsi ils adhèrent bien plus à l'endothélium vasculaire que les érythrocytes, qu'ils soient falciformés ou pas. Cette adhérence se fait directement à l'endothélium ou indirectement, c'est-à-dire dépendamment des leucocytes adhérents (101).

Des études ultérieures ont révélé que, dans des conditions de flux de cisaillement, l'adhérence à l'endothélium de populations de GR falciformes hétérogènes dépendait de leur déformabilité avec une plus grande prédisposition à l'adhésion pour les GR les plus déformables. En effet, Kaul *et al.* ont montré que les GRSS adhèrent dans des proportions différentes : réticulocytes > érythrocytes biconcaves > ISC (pour «irreversibly sickle cell» ou «érythrocytes irréversiblement falciformés») et USD (pour «unsickable SS discocyte» ou «discocyte non falciformable») (102). De plus, les réticulocytes sont présents en proportions défavorables pour les drépanocytaires : SS > SC > HbAA (103). Les principales formes de globules rouges drépanocytaires sont représentées sur la Figure 10.

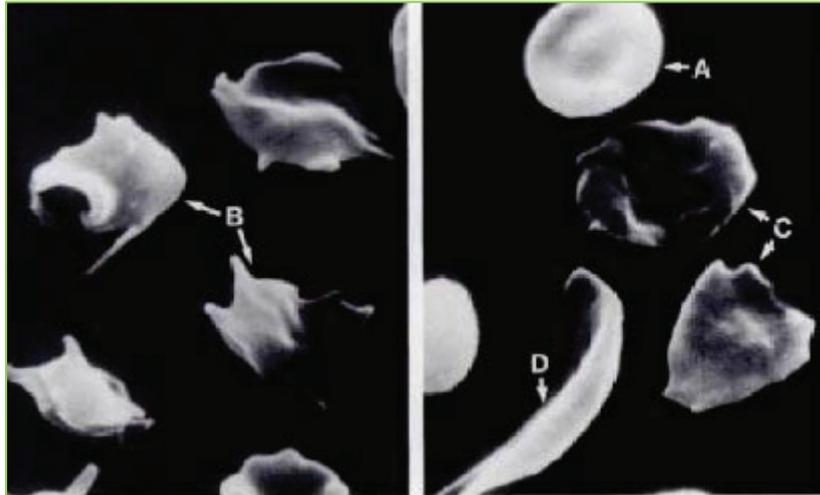


Figure 10. Différentes sortes de GR SS

A) érythrocyte biconcave, B) érythrocyte falciformé, C) USD, D) ISC.

Les globules rouges (GR) drépanocytaires jeunes expriment à leur surface la glycoprotéine CD36 et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (94). Cette dernière interagit directement avec VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule -1) à la surface de l'endothélium activé (104). Le récepteur CD36 du GR peut interagir indirectement avec une autre molécule de CD36 sur l'endothélium, par l'intermédiaire de la thrombospondine libérée par les plaquettes activées. L'activité pro-adhésive de l'endothélium s'exprime également sur les leucocytes par l'intermédiaire d'ICAM-1 et des sélectines et tout particulièrement sur les polynucléaires neutrophiles qui participent alors mécaniquement à l'obstruction du vaisseau. Cette dernière entraîne un ralentissement circulatoire suffisant pour permettre la polymérisation complète de la désoxy-HbS dans le GR et la falciformation caractéristique de celui-ci. Les cellules endothéliales circulantes participeraient aussi à ce mécanisme via l'expression de facteur tissulaire qui crée un contexte pro-coagulant global. Un aspect important à considérer à ce niveau est l'hétérogénéité des cellules endothéliales. Par exemple, la protéine CD36 et le facteur de von Willebrandt (vWF) sont tous les deux capables de promouvoir l'adhérence des globules rouges drépanocytaires à l'endothélium. Mais la première, induite par l'interféron (IFN)- γ , n'est exprimée que sur les cellules endothéliales de la micro-circulation, alors que le second est fixé aux cellules endothéliales des gros vaisseaux(105).

Les cellules endothéliales expriment aussi des protéines de la superfamille des immunoglobulines : (i) ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) qui est faiblement

exprimée de façon constitutive et à laquelle adhèrent des leucocytes, et (ii) VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) dont l'expression est induite par l'interleukine-1 (IL-1) ou le TNF (tumor necrosis factor) et qui constitue un mécanisme majeur de liaison avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ présente à la surface du réticulocyte drépanocytaire. Elles expriment également de façon inductible P- et E-sélectine, qui ont la capacité de fixer les polynucléaires neutrophiles (105).

Les cellules endothéliales sont soumises à un nombre considérable de stimuli et d'agents modulateurs, susceptibles de modifier leur état pro-adhésif. Différents agents inflammatoires tels que le TNF, les interleukines (en particulier IL-1) ou des médiateurs de type prostacyclines, sont souvent élevés chez les patients drépanocytaires, ce qui modifie l'activation des cellules endothéliales et favorise l'adhérence. Par ailleurs, un excès de production de thrombine crée un état que l'on peut qualifier de pro-coagulant. Les affections intercurrentes, infectieuses ou virales, enclenchent aussi ces stimulations. Il faut ajouter enfin le rôle central de l'endothélium vasculaire dans la régulation du tonus vasculaire. En effet, en réponse à des stimuli, l'endothélium vasculaire produit des substances vasoconstrictrices parmi lesquelles l'endothéline-1 (ET-1) et le platelet activating factor (PAF) ou à l'inverse des substances vasodilatatrices telles que l'oxyde nitrique (ou monoxyde d'azote : NO) et la prostacycline (PGI₂, lipide de la famille des eicosanoides). La régulation du tonus vasculaire est assurée, principalement par l'ET-1 et le NO aux effets antagonistes (106).

1.5 Modulateurs du tonus vasculaire

1.5.1 Endothéline-1 (ET-1)

L'endothéline-1, isolée en 1988 (107), est un puissant vasoconstricteur appartenant à la famille des endothélines. Il existe deux autres formes, ET-2 et ET-3, produits par deux autres gènes (108). ET-1 est également un stimulant de la prolifération cellulaire, de la fibrose (109) et de l'inflammation (110). L'expression des gènes des endothélines peut être stimulée par de nombreux facteurs tels que l'hypoxie, la présence de cytokines pro-inflammatoires, la thrombine, l'hémoglobine, les facteurs de nécrose tumorale TNF α et TGF β et peut être inhibée par le NO et GMPc (111, 112). Les effets des endothélines sont bien définis et passent par l'activation de deux types de récepteurs (ETA et ETB) qui ont une expression cellulaire différente. Le récepteur ETA est exprimé essentiellement dans le muscle lisse et participe à sa contraction. Le second récepteur ETB est aussi exprimé par le

muscle lisse mais se retrouve également au niveau endothélial. La stimulation de ces deux récepteurs dans la cellule musculaire lisse produit une contraction qui est dépendante de la concentration de calcium extracellulaire et active une protéine kinase C. Cette dernière va diminuer l'activité de la phosphatase des MLCP (Myosin-Light-Chain Phosphatase) favorisant l'état phosphorylé de la myosine et donc la contraction. En revanche, le récepteur ETB présent sur l'endothélium limite la contraction puisque sa stimulation active la NOS endothéliale et par conséquent produit et libère le NO. Par ailleurs, Rivera et collaborateurs ont démontré que des globules rouges de souris expriment des récepteurs à ET-1 et que l'ET-1 active les canaux Gardos dans ces cellules par le biais des récepteurs de type B (ETB) (113). Ces données ont ensuite été confirmées sur des globules rouges humains (114). Le processus d'activation des canaux Gardos par ET-1 est PKC-dépendant. L'autre acteur de cette vaso-régulation est le monoxyde d'azote.

1.5.2 Monoxyde d'azote (NO)

Le NO est une molécule endogène libérée notamment par les globules rouges, les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules du foie et les neurones. Il est synthétisé naturellement à partir de l'arginine grâce à la NO synthase (NOS) particulièrement la NO synthase endothéliale (eNOSIII).

La production de NO est régulée par des stimuli physiques, comme les contraintes de cisaillement exercées par le sang sur la paroi artérielle, les substances produites au cours de l'agrégation plaquettaire et la thrombine.

Dans l'organisme, le monoxyde d'azote remplit plusieurs fonctions. En effet, il agit au niveau des cellules musculaires lisses et provoque une stimulation de la guanylate cyclase, enzyme responsable de la synthèse de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), provoquant ainsi une vasodilatation et une augmentation du débit sanguin. Le NO est également un inhibiteur de l'expression des récepteurs d'adhérence et de la production d'ET-1 par l'endothélium vasculaire (111, 115). De plus, le NO participe à la suppression de l'agrégation plaquettaire (116). Il améliore aussi la déformabilité des globules rouges (117). Plus récemment, la production de NO au sein du globule rouge par une NOS de type endothélial a été mise en évidence sans que le lien avec la déformabilité du GR soit bien établi (118).

Dans la drépanocytose, le métabolisme de ces deux facteurs est perturbés et la vaso-régulation de l'endothélium est altérée en faveur d'un phénotype vaso-constricteur. En effet, plusieurs études évoquent le rôle de l'ET-1 dans la drépanocytose :

- ✓ des altérations du tonus vasculaire, caractérisées par des oscillations anormales du flux micro-vasculaire ont été observées chez les patients atteints de drépanocytose (119) ;
- ✓ l'adhérence des GR drépanocytaires aux cellules endothéliales *in vitro* stimule la transcription du gène de l'ET-1 (106) ;
- ✓ le taux plasmatique d'ET-1 est augmenté pendant les crises drépanocytaires (120) ;
- ✓ Lapoumériou et collaborateurs ont montré que le traitement des patients atteints de drépanocytose par l'hydroxyurée, entraîne une diminution du taux plasmatique d'ET-1 chez les enfants atteints de drépanocytose (121) ;
- ✓ Sabaa et collaborateurs démontrent qu'une inhibition pharmacologique des récepteurs de l'endothéline peut prévenir le déclenchement des CVO et l'atteinte des organes dans un modèle murin (122).

Ces observations sont à mettre en relation avec la diminution de l'expression du gène de l'ET-1 observée sur les cellules endothéliales en culture, en présence d'hydroxyurée (123).

Les études cliniques concernant le NO dans la physiopathologie de la drépanocytose se sont plutôt orientées sur les facteurs plasmatiques dérivés du NO à savoir les nitrites et les nitrates ainsi que sur les concentrations de L-arginine.

Plusieurs études ont montré une altération de la production et /ou de l'effet de NO dans la drépanocytose. Les métabolites de NO sont augmentés chez les patients drépanocytaires (124) ainsi que l'activité des enzymes NOS dans les organes vitaux de souris transgéniques drépanocytaires (125). D'autre part, ces auteurs ont également montré que l'adhérence de GR drépanocytaires aux cellules endothéliales *in vitro* inhibait la production de NO (125). D'autres travaux ont mis en évidence une diminution des métabolites de NO et de la L-arginine au cours des manifestations cliniques douloureuses et pulmonaires de la maladie (126, 127).

Différents facteurs participent à la diminution de cette biodisponibilité du NO :

- l'hémolyse intravasculaire, mécanisme majeur de la maladie, en conduisant à la libération d'arginase. En effet, l'arginase catalyse la réaction suivante :

Arginine + H₂O → ornithine + urée.

La L-arginine étant également le substrat des NOS, en la captant, l'arginase plasmatique diminue la concentration de la L-arginine et diminue de ce fait la synthèse du NO (128) ;

- L'hémolyse chronique qui augmente l'hémoglobine libre dans le plasma. Il s'ensuit alors une réaction directe entre l'hémoglobine libérée et le monoxyde d'azote, perturbant ainsi la réponse physiologique vasodilatatrice médiée par celui-ci. La capture du NO par l'hémoglobine libre aurait ainsi un rôle majeur dans les crises douloureuses de la drépanocytose.
- Le stress oxydant résultant d'un excès de radicaux libres non compensé par les systèmes antioxydants. La réaction entre le NO et des radicaux libres tels que l'ion superoxyde O₂⁻ produit l'anion peroxynitrite (ONOO⁻) qui donne deux radicaux :



Cette baisse de la biodisponibilité du NO participe aux dysfonctionnements de l'endothélium en limitant fortement les dilatations vasculaires nécessaires à l'ajustement de la pression sanguine et en favorisant les constriction via la levée de l'inhibition de l'ET-1.

1.6 Physiopathologie clinique

1.6.1 Modèle des sous-phénotypes drépanocytaires

1.6.1.1 Principe

Il existe une grande variabilité phénotypique chez les individus drépanocytaires avec souvent une distribution géographique spécifique, reflet indirect de variations génétiques connues ou soupçonnées (129). Certaines complications semblent pourtant plus fréquemment associées entre elles et unies par des biomarqueurs communs, comme un taux d'Hb particulièrement bas avec un taux élevé de réticulocytes ou une activité de lactate déshydrogénase (LDH) augmentée suggérant une hémolyse plus intense.

Deux sous-phénotypes de la drépanocytose ont ainsi été proposés il y a une dizaine d'années (Figure 11): (i) un sous-phénotype vaso-occlusif dans lequel les complications telles que la crise douloureuse vaso-occlusive, le syndrome thoracique aigu et l'ostéonécrose sont les manifestations les plus fréquentes, et (ii) un sous-phénotype hémolytique qui se caractérise plus volontiers par hypertension artérielle pulmonaire, priapisme, ulcère de jambe, accident vasculaire cérébral et éventuellement asthme (130-132).

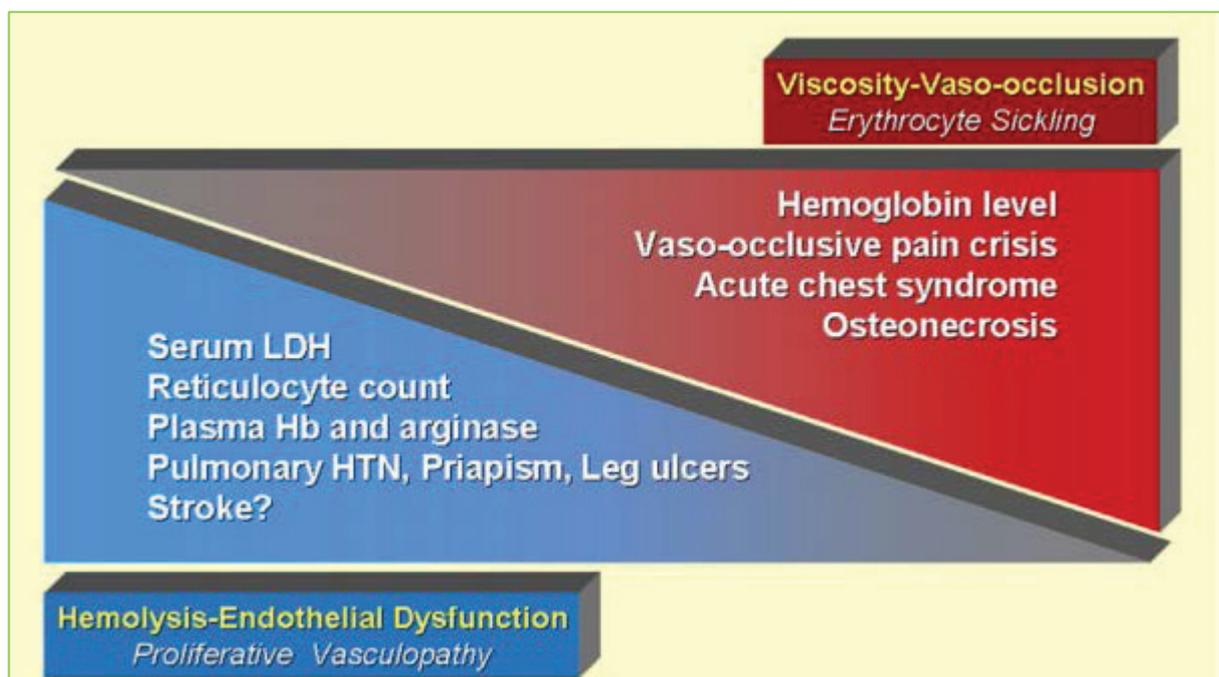


Figure 11. **Modèle des sous-phénotypes de la drépanocytose**

Tiré de (131).

Néanmoins, il est à noter que quelques auteurs comme Hebbel vont à l'encontre de ce paradigme qu'ils estiment trop simpliste et ne reflétant pas, loin s'en faut, toute la réalité expérimentale. Par exemple, il n'est pas possible de distinguer réellement un sous-groupe de patients drépanocytaires « hyper-hémolytiques » quand on s'intéresse de près aux taux de réticulocytes dans les cohortes décrites à ce jour (133).

1.6.1.2 Sous-phénotype visqueux vaso-occlusif

Ce sous-phénotype drépanocytaire serait caractérisé par un hématoците (Ht) supérieur à celui observé chez les autres patients. Ceci a pour conséquence une viscosité sanguine plus élevée, susceptible de favoriser l'apparition de crises vaso-occlusives. Paradoxalement, une alpha-thalassémie associée, en réduisant la concentration intracellulaire d'HbS, ralentit l'hémolyse des GR et augmente donc l'Ht des patients et la fréquence des CVO (134-137). Les patients présentant ce sous-phénotype vaso-occlusif

auraient globalement un meilleur pronostic et leurs complications semblent principalement améliorées par un taux d'HbF élevé associé (138).

I.6.1.3 Sous-phénotype hémolytique

Ce sous-phénotype serait caractérisé par un Ht inférieur à celui trouvé chez les individus du sous-phénotype vaso-occlusif avec une élévation du taux de réticulocytes, de l'activité LDH sérique et de la bilirubinémie ; reflets d'une anémie hémolytique plus sévère. Cette hémolyse chronique provoquerait une dysfonction endothéliale via l'hémoglobine et l'arginase intra-érythrocytaire libérées dans la circulation. Celles-ci diminueraient la biodisponibilité du NO par consommation directe et détournement de son substrat. La diminution du NO entraînerait une vaso-constriction et l'activation des cellules endothéliales, des plaquettes et du processus de coagulation (139).

Les individus de ce groupe auraient un risque élevé d'AVC ischémique, d'HTAP, d'ulcération des jambes, de calculs biliaires, de priapisme et probablement de néphropathie. Le sous-phénotype hémolytique est donc considéré comme plus sévère, du fait d'une morbi-mortalité accrue, principalement par le risque élevé d'AVC.

1.7. Diagnostic phénotypique de la drépanocytose

1.7.1 Techniques utilisables

1.7.1.1 Principe général

Un bilan biochimique standard de l'hémoglobine est prescrit devant des signes clinico-biologiques évocateurs comme une anémie (et par extension une pâleur, un ictère, une hépato-splénomégalie, une asthénie ou un essoufflement) et plus rarement une cyanose ou une polyglobulie (par extension devant des céphalées, des acouphènes ou des vertiges). Il peut aussi être effectué en raison de la constatation d'éléments purement biologiques comme une hémolyse ou une microcytose ou lors d'une enquête familiale ou du dépistage systématique chez une personne appartenant à une ethnie dite « à risque » (Afrique sub-saharienne, Afrique du Nord, Bassin méditerranéen, Antilles, Asie, Moyen-Orient et Proche-Orient). Enfin, il peut s'agir d'un test de confirmation d'un dépistage néonatal ou encore d'un contexte anesthésique, anténatal, pré-greffe.

Quelle que soit la forme génétique de drépanocytose, son diagnostic repose toujours sur l'identification formelle de l'HbS. Les examens de laboratoire seront le plus souvent les seuls arguments d'une forme hétérozygote (HbA/HbS), habituellement cliniquement muette. Dans les SDM, ils permettront de préciser s'il s'agit d'une forme homozygote (HbS/HbS) ou d'une hétérozygotie composite associant l'HbS à une β -thalassémie ou à une autre anomalie de l'hémoglobine (HbD-Punjab, HbC ou HbO-Arab, le plus souvent) et, dans une certaine mesure, de la ranger dans une catégorie pronostique. Chez les sujets hétérozygotes symptomatiques, le laboratoire s'appliquera à démontrer la coexistence d'une autre anomalie de l'environnement érythrocytaire : mutation additionnelle sur le gène de l'HbS (comme dans le cas de l'Hb S-Antilles) (36), déficit enzymatique facilitant la polymérisation de l'HbS ou maladie membranaire facilitant la déshydratation cellulaire.

L'HbS doit être détectée par au moins deux techniques électrophorétiques et/ou chromatographiques, un seul test n'étant pas suffisant pour affirmer son existence. Il est recommandé de confirmer sa présence par des tests fonctionnels (test de solubilité, test de falciformation) pour différencier l'HbS des autres variants migrant ou coéluant en même temps. Le dosage précis des différentes fractions est alors indispensable pour affiner le diagnostic.

1.7.1.2 Frottis sanguin

Dans la drépanocytose, l'examen du frottis sanguin révèle la présence d'hématies en forme de "faucille" ou drépanocytes, caractéristiques de la maladie. Les drépanocytes ont une forme allongée avec les deux extrémités pointues. Ils sont donc différents des ovalocytes ou elliptocytes dont les extrémités sont arrondies (Figure 12). La présence de corps de Jolly accompagne une atrophie splénique. On peut également retrouver une érythroblastose, une polychromatophilie et des ponctuations basophiles.

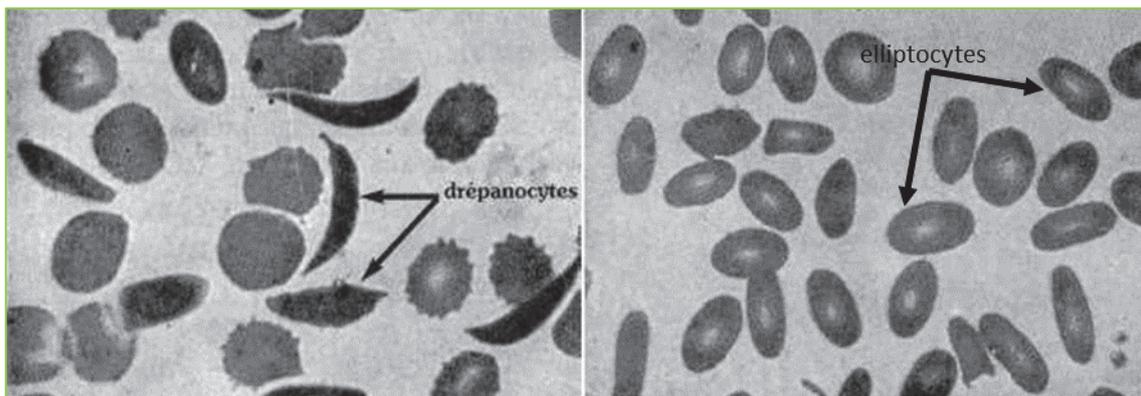


Figure 12. Frottis sanguin d'un sang drépanocytaire

1.7.1.3 Test de falciformation d'Emmel

Ce test repose sur la mise en évidence au laboratoire de la falciformation des hématies en hypoxie, témoin de la présence d'hémoglobine S. La désoxygénation est accélérée soit en ajoutant du métabisulfite de Na à 2% au sang du malade, soit en créant une atmosphère pauvre en oxygène en scellant les bords de la lamelle à la lame à l'aide de vernis. Si le test est positif, on observe alors au microscope, les hématies qui prennent progressivement une forme typique en 'faucille' ou en banane aux extrémités pointues, souvent dentelées (Figure 13).

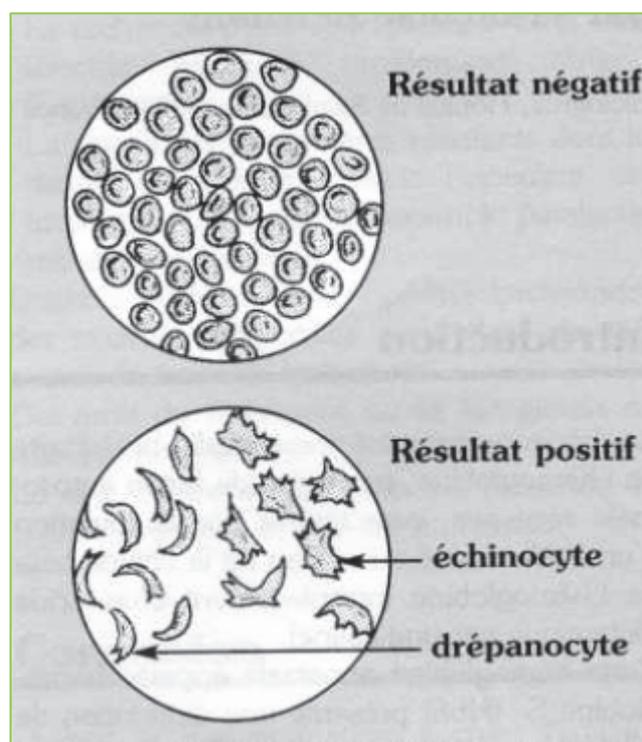


Figure 13. Test de falciformation d'Emmel

Il est recommandé d'examiner plusieurs zones car la falciformation ne s'effectue pas de façon homogène. Il ne faut pas confondre les hématies falciformes avec des hématies crénelées (échinocytes) qui n'ont pas les extrémités pointues. Il est capital de bien se souvenir que même les hétérozygotes AS sortent positifs à ce test, pas seulement les patients drépanocytaires. Un taux d'HbS trop faible (< 20 %) peut cependant donner un résultat faussement négatif.

1.7.1.4 Test de solubilité d'Itano

Le test Itano est également essentiel pour confirmer la présence d'HbS. Il repose sur le principe que seule l'HbS, réduite par action de l'hydrosulfite de Na, précipite dans une solution de phosphate de potassium à 2,24 mmol/L (140). C'est une technique manuelle facile à mettre en œuvre et rapide (< 10 minutes). Son interprétation est facile à condition de prendre les précautions suivantes : (i) travailler toujours par comparaison avec un échantillon témoin négatif (AA) et un échantillon témoin positif (AS) dans chaque série ; (ii) laver soigneusement le culot globulaire en sérum physiologique, afin d'éliminer tous les stromas cellulaires (risque de faux positifs).

En présence d'HbS, il se produit immédiatement un trouble net, le tube témoin devant en revanche rester limpide (Figure 14). Ce test présente les mêmes risques de faux négatifs que le test de falciformation quand le taux d'HbS est trop faible.

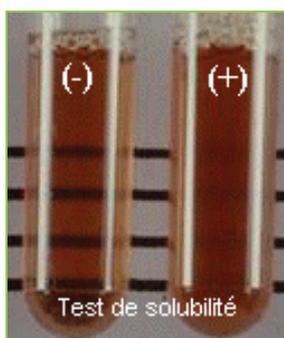


Figure 14. Test de solubilité d'Itano

1.7.1.5 Electrophorèse de l'Hb à pH alcalin

A l'électrophorèse à pH alcalin, l'HbS est caractérisée par une mobilité plus lente que l'HbA. Cependant, d'autres mutations ponctuelles de l'hémoglobine peuvent engendrer un changement de charge analogue et donc une migration identique à celle de l'HbS. Il faut donc au moins un autre critère pour pouvoir affirmer la présence d'HbS (Figure 15).

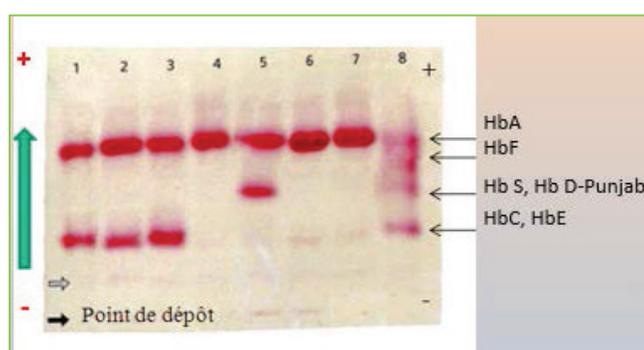


Figure 15. Electrophorèse sur acétate de cellulose – pH alcalin (8,4 – 8,6)

1.7.1.6 Electrophorèse sur agarose à pH acide

L'électrophorèse à pH acide (pH = 6) sur support solide (citrate agar ou agarose) est une technique de seconde intention. Son principal avantage est, qu'en complément de l'électrophorèse à pH alcalin, elle peut séparer l'HbS des mutants « S-like » en électrophorèse à pH alcalin, de même que l'HbC et l'HbE (Figure 16).

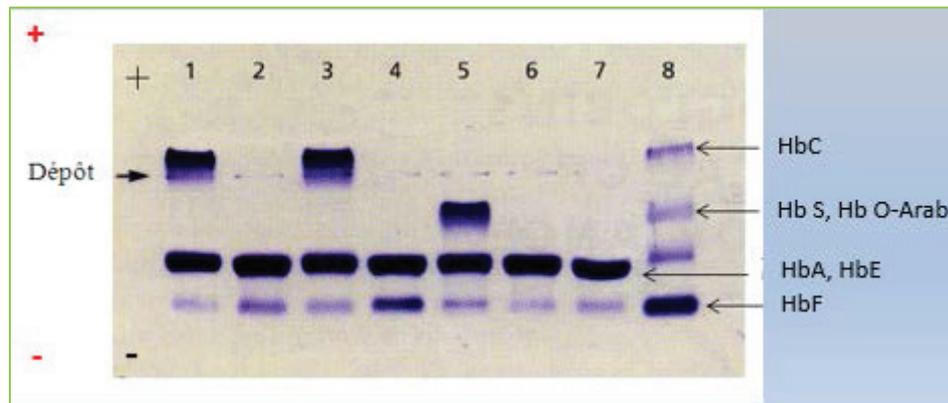


Figure 16. Electrophorèse sur citrate d'agar – pH acide (6,0 – 6,2)

Les différentes hémoglobines sont quantifiables par densitométrie optique du tracé électrophorétique, mais ces méthodes sont trop imprécises pour évaluer les faibles concentrations des fractions de l'HbF et de l'HbA2.

1.7.1.7 Focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide

L'isoélectrofocalisation (IEF) technique électrophorétique mise au point il y a très longtemps, a suivi depuis une évolution constante. En IEF, les protéines à analyser migrent dans un gel contenant des molécules électrolytiques de petite taille appelées ampholytes. Ces ampholytes ont une bonne capacité tampon et sont conductrices à leur point isoélectrique (pHi). Soumises à un champ électrique, elles migrent et se fixent à leur pHi respectif où leur charge nette est nulle, créant ainsi sur toute la longueur du gel un gradient de pH. La linéarité et les bornes de ce gradient de pH sont déterminées par la nature et la diversité des ampholytes incorporés au sein du gel. Les protéines à analyser vont être séparées le long de ce gradient de pH de manière analogue et elles s'arrêteront de migrer quand elles auront atteint leur pHi.

Dans le cas de l'hémoglobine, cette technique est plus résolutive que les deux électrophorèses décrites plus haut. Son principal inconvénient est que les HbA₂, C et E migrent à peu près dans la même zone (Figure 17). C'est une technique très coûteuse mais c'est la méthode de choix pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose.

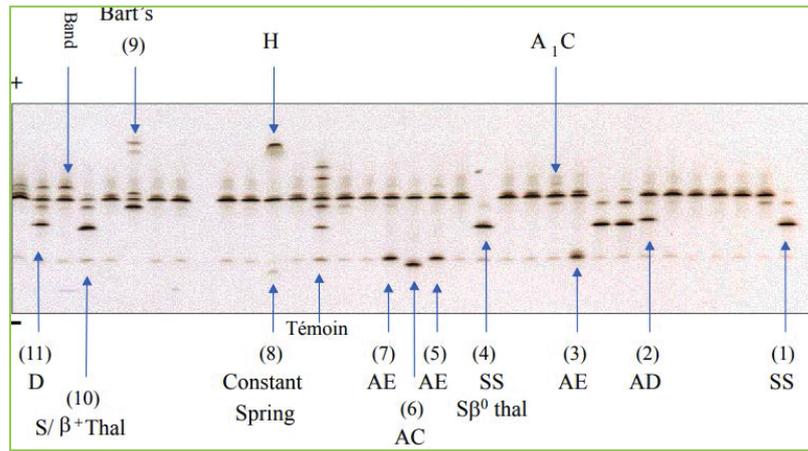


Figure 17. Focalisation isoélectrique sur gel de polyacrylamide

1.7.1.8 Chromatographie liquide par échange de cations

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) par échange de cations sépare les différentes fractions d'hémoglobines en fonction de la force de leurs interactions ioniques sur une colonne échangeuse de cations. Les molécules d'hémoglobine chargées négativement dans le tampon utilisé interagissent avec la colonne chargée positivement. Suite à l'injection d'un tampon d'électronégativité croissante, les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées au fur et à mesure que la force ionique du tampon devient supérieure à leur interaction avec la colonne. Les différentes fractions d'hémoglobines sont ainsi éluées à un temps donné qui leur est caractéristique. Une quantification des différentes fractions est réalisée par calcul de l'aire sous la courbe par rapport à l'aire totale du chromatogramme. Pour certaines fractions (HbA₂, HbF), une quantification est établie par rapport à une calibration. Cette technique est automatisée, rapide, reproductible et quantitative.

Les hémoglobines normalement présentes (HbA, HbA₂ et HbF), ainsi que les variants les plus fréquents (S, C, E, O-Arab, D-Punjab et G-Philadelphia) sont reconnus de façon présomptive tandis que les variants dont le temps de rétention n'est pas répertorié par le fournisseur sont dits « unknown » (Figure 18). Il faut savoir qu'en CLHP cations, l'HbE et l'Hb Lepore ne sont pas séparées de l'HbA₂.

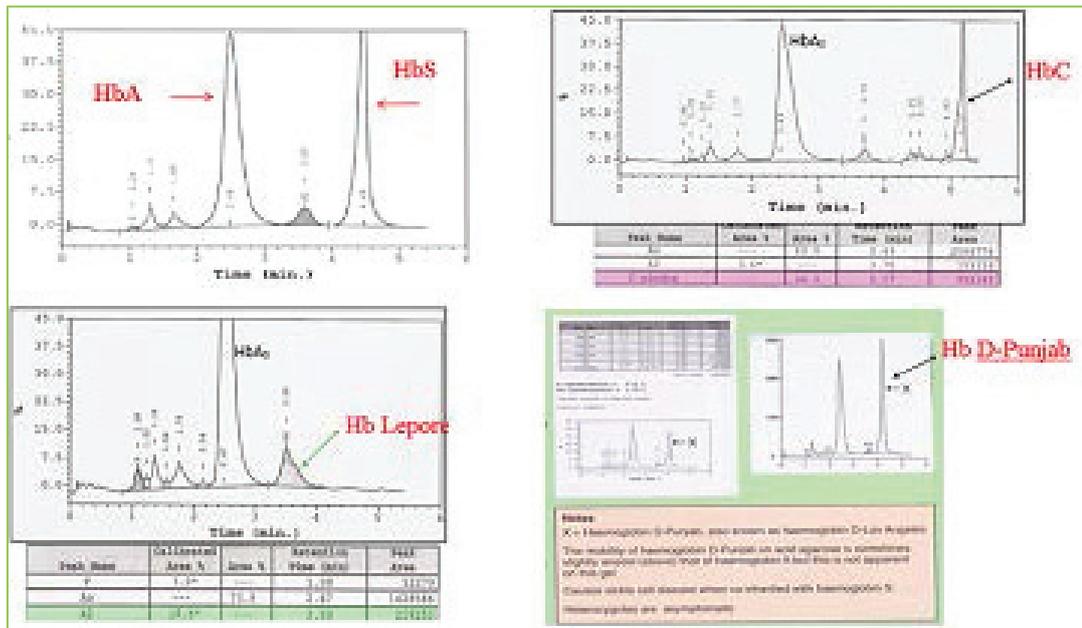


Figure 18. Exemples de profils en CLHP cations sur automate Variant II (Biorad)

1.7.1.9 Electrochromatographie capillaire

Cette technique, basée sur une séparation électrocinétique, est caractérisée par l'interface solide-liquide entre la paroi d'un capillaire en silice et l'électrolyte qui le remplit. En fonction du pH du tampon, les groupements silanols de la silice s'ionisent, conférant à la paroi des charges négatives à l'origine d'un flux électro-osmotique plus ou moins important orienté vers la cathode. Par ailleurs, chaque molécule chargée est caractérisée par sa propre mobilité électrophorétique, celle-ci étant fonction de la charge, de la taille et forme de la molécule mais aussi de la viscosité du tampon.

Les molécules d'hémoglobine, chargées négativement au pH utilisé, migrent néanmoins vers la cathode en raison du flux électro-osmotique. Mais cette migration sera d'autant plus 'retardée' que la charge négative de la molécule sera importante par rapport à sa taille. Les molécules d'Hb seront détectées en sortie à la cathode par spectrophotométrie à 415 nm et une quantification relative des différentes fractions est réalisée.

Un électrophorégramme est alors généré avec les différentes fractions d'Hb « normales » (HbA, HbF, HbA₂) et les fractions « anormales » de variants. Les plus fréquents sont caractérisés de façon présomptive en fonction de leur position relative dans des zones spécifiques: HbS, HbC, HbE, HbO-Arab et HbD-Punjab (141) (Figure 19). Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, reproductible et quantitative, avec des tracés simples à interpréter. Son gros avantage par rapport à la CLHP cations est que les HbA₂, E et Lepore sont cette fois séparés.

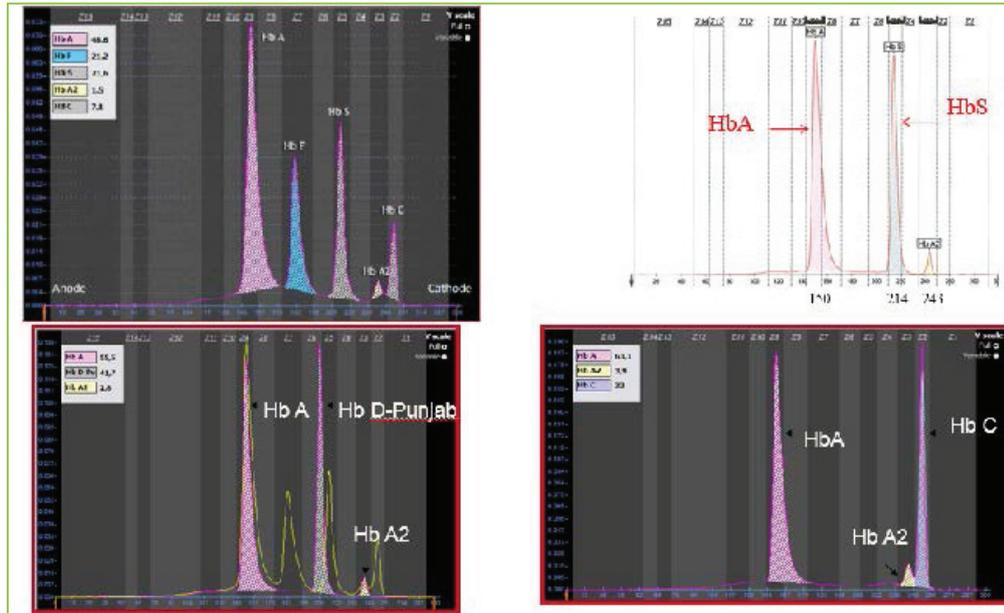


Figure 19. Exemples de profils électrophorétiques obtenus sur automate Capillary 2

1.7.1.10 CLHP en phase inverse des chaînes de globine

Une autre technique chromatographique est la CLHP en phase inverse, utilisée pour la caractérisation des chaînes de globines. Dans cette technique, les chaînes polypeptidiques sont séparées en fonction de leur hydrophobicité et non en fonction de leur charge électrique, ce qui la rend complémentaire par rapport aux deux précédentes (Figure 20). La CLHP en phase inverse est particulièrement intéressante pour la caractérisation des Hb embryonnaires et fœtale et elle contribue à la séparation et à la quantification de variants rares par l'analyse de leurs chaînes mutantes. Elle n'est pas automatisable et doit être montée de A à Z sur chaîne CLHP (142, 143). De ce fait, elle reste réservée aux laboratoires spécialisés dans l'étude de l'Hb.

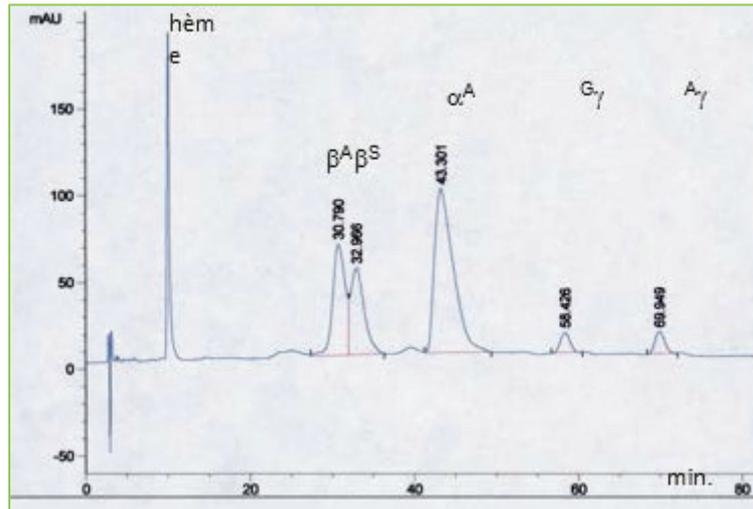


Figure 20. CLHP en phase inverse des chaînes de globine

1.7.2 Diagnostic néo-natal de la drépanocytose

1.7.2.1 Dans les pays occidentaux

Le dépistage néonatal (DNN) de la drépanocytose permet un diagnostic précoce de toutes les formes de SDM. Dès les années 1970, des programmes dédiés ont été organisés aux États-Unis. Ils se sont généralisés à la fin des années 1980, après la publication des conclusions d'essais cliniques mettant en évidence l'efficacité de la prise en charge précoce du nouveau-né atteint de SDM (144). L'antibiothérapie prophylactique et la vaccination anti-pneumococcique réduisaient de manière significative la mortalité et la morbidité de ces enfants, par rapport à ceux chez qui la maladie était découverte à l'occasion d'une complication révélatrice. La mortalité infantile a pu ainsi être réduite d'un facteur 10 chez l'enfant drépanocytaire de moins de 5 ans (145).

C'est sur la base de ces expériences et de ces enseignements qu'un DNN de la drépanocytose a été envisagé en France. L'importance, ces dernières décennies des flux migratoires provenant d'Afrique, d'Asie et du Moyen Orient associés à l'émergence de nouvelles générations issues de ces populations et des départements d'outre-mer (DOM) fait que les SDM ne sont plus rares en France. Réalisé d'emblée de manière généralisée chez tous les nouveau-nés dans les départements d'outre-mer (Guadeloupe et Martinique en 1984, Réunion en 1990, Guyane et Mayotte en 1992), le DNN s'est étendu progressivement en France métropolitaine pour atteindre toutes les régions entre 1995 et 2000 sous l'égide

de l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE). Cette prise en charge a permis la mise en place de mesures préventives chez l'enfant (vaccinations et antibiothérapie préventive pour éviter les infections) et éducatives auprès des parents : informations sur les signes cliniques et les complications de cette maladie génétique, conduites à tenir en cas de fièvre ou de crises douloureuses (146, 147). Cependant, la grande spécificité du DNN de la drépanocytose en France métropolitaine est qu'il n'est proposé par les sages-femmes qu'aux nouveau-nés dont les parents sont originaires de pays « à risque » pour la drépanocytose.

Outre les Etats-Unis et la France, le DNN de drépanocytose est aussi systématique au Brésil, au Royaume-Uni, en Jamaïque, aux Pays-Bas, à Bruxelles, à Liège et dans certaines maternités au Canada.

1.7.2.2 En Afrique

Dans la plupart des pays d'Afrique, où la drépanocytose est pourtant un problème majeur de santé publique, il n'existe pas de programme national systématique permettant de la combattre. Les structures de base nécessaires pour prendre en charge les patients font généralement défaut, le DNN systématique de la drépanocytose n'est pas une pratique courante et le diagnostic de la maladie n'est habituellement posé que lorsque survient une complication grave. En conséquence, plus de 50 % des enfants atteints de la forme la plus sévère de la maladie décèdent avant l'âge de cinq ans, le plus souvent d'une infection ou d'une anémie grave. Néanmoins, le DNN existe maintenant à Cotonou (Bénin) et au Ghana (148) et des expériences ponctuelles ont été menées, au Burkina-Faso (149), au Mali (150, 151), au Sénégal et en République démocratique du Congo (152). L'une des difficultés majeures rencontrées dans ces pays est celle de retrouver tous les bébés dépistés(153). Pour pallier de telles difficultés, il est indispensable d'assurer une forte sensibilisation de l'opinion publique, d'éduquer les familles et de trouver des systèmes de «rattrapage» lors des séances de vaccination obligatoire (154).

Les prélèvements de sang sont effectués chez les nouveau-nés au 3^e jour de vie par prélèvement capillaire au talon : les gouttes de sang sont déposées sur un support papier spécial appelé papier Guthrie. L'hémoglobine est éluée à partir d'un disque de 3 mm de diamètre prélevé sur une des gouttes de sang séché. La technique de première intention est l'isoélectrofocalisation mais une deuxième technique est indispensable pour confirmer la présence d'HbS. Deux techniques peuvent être utilisées selon les laboratoires : soit

l'électrophorèse sur agar à pH acide, soit la chromatographie liquide haute performance par échange de cations.

1.8 Diagnostic génotypique de la drépanocytose

1.8.1 Diagnostic différentiel drépanocytose / thalasso-drépanocytose

Le diagnostic biochimique de drépanocytose est habituellement simple et pose rarement problème. La génétique ne trouvera son utilité réelle que dans quelques circonstances précises comme le diagnostic différentiel drépanocytose / thalasso-drépanocytose.

Deux cas peuvent se présenter selon le taux d'HbS :

(i) Présence d'HbS associée à un taux variable d'HbF mais absence d'HbA. Il s'agit d'un profil en faveur d'un SDM de type β^S/β^S ou β^S/β^0 thalassémie. Le diagnostic différentiel peut se faire facilement par l'étude de l'hémoglobine des parents ou par biologie moléculaire en cas d'impossibilité d'étude familiale complète. Un séquençage Sanger du gène HBB répondra alors facilement à la question posée. La distinction entre homozygote β^S/β^S et hétérozygote composite β^S/β^0 thalassémie ne modifie en rien la prise en charge médicale des sujets atteints car la pathologie est aussi sévère dans un cas que dans l'autre. Cependant, cette distinction présente plusieurs intérêts :

- faire connaître au patient le risque génétique pour sa descendance ;
- caractériser, le cas échéant, le défaut β^0 thalassémique permet d'anticiper un éventuel futur diagnostic anté-natal à la fois au niveau technique et au niveau du conseil génétique.

En effet, un couple de parents tous deux β^S/β^0 thalassémie sera un couple à risque à la fois de drépanocytose et de β -thalassémie majeure.

(ii) Présence d'HbS et d'HbA avec taux HbS > taux HbA

Ce profil est en faveur d'un SDM homozygote β^S/β^S ou hétérozygote composite β^S/β^0 -thalassémie avec notion de transfusion sanguine. Ce profil est également observé chez les patients non transfusés atteints d'un SDM hétérozygote composite β^S/β^+ -thalassémie. Afin de conclure, il est important de bien se renseigner sur une éventuelle transfusion auprès du clinicien. La caractérisation moléculaire des SDM de type β^S/β^+ -thalassémie est recommandée afin de préciser le défaut β^+ thalassémique qui peut, en fonction de sa nature, expliquer une éventuelle modulation de l'expression clinique. Une classification clinique est ainsi proposée, en fonction du pourcentage d'HbA présent : SDM sévère si HbA présente de

1 à 5 %, SDM modéré si HbA présente de 6 à 15 %, SDM peu sévère si HbA présente de 16 à 30 % (155).

1.8.2 Confirmation moléculaire des autres SDM composites

En dehors de l'hétérozygotie composite β^S/β^C , facilement diagnostiquée au bilan biochimique de l'Hb, l'idéal serait une confirmation moléculaire les SDM composites de type S/E, S/D-Punjab, S/O-Arab.

1.9 Prise en charge médicale de la drépanocytose

La drépanocytose est caractérisée par trois principales complications que sont les crises douloureuses, l'anémie hémolytique et ses séquelles et les lésions / défaillances d'organes. La prévalence de ces complications varie avec l'âge, de la petite enfance à l'âge adulte, comme le montre la Figure 21. Cependant, la douleur, les infections et l'anémie nécessitant une transfusion sanguine surviennent tout au long de la vie des patients atteints.

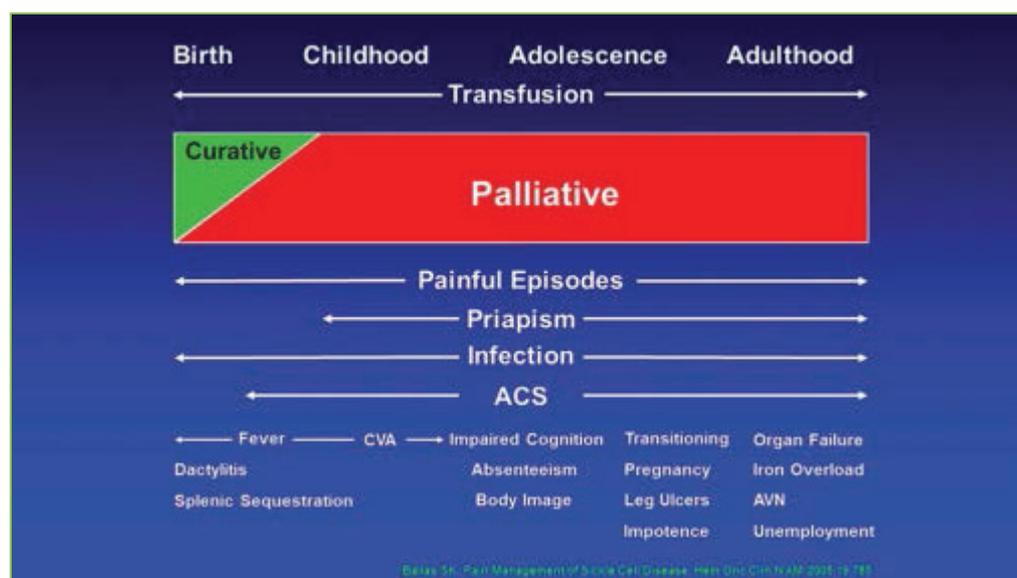


Figure 21. Séquence des complications de la drépanocytose de la naissance à la vie adulte.

La guérison est possible chez certains patients. Le pilier de la prise en charge chez la plupart des patients est palliatif, la gestion de la douleur étant la plus importante. ACS, acute chest syndrome ; AVN, avascular necrosis; CVA, cerebrovascular accident. Tiré de (156).

Les soins médicaux globaux dispensés aux patients atteints de drépanocytose dans les pays développés se sont améliorés de telle sorte que leur espérance de vie a presque doublé depuis 1951 (156). La prise en charge de la drépanocytose en général et de ses complications en particulier suit cinq approches majeures. Celles-ci incluent le traitement symptomatique, le soutien ou l'accompagnement, la prévention, la gestion avortée et la thérapie curative (157).

1.9.1 L'accompagnement dans la prévention comportementale

L'approche consiste à maintenir les exigences essentielles pour une bonne hygiène de vie, notamment une alimentation équilibrée, le sommeil, l'hydratation, éviter l'obésité, le tabagisme, l'alcool, les drogues illicites. L'hydratation orale devrait être avec de l'eau et non des boissons gazeuses.

1.9.2 Le traitement symptomatique

L'objectif de la gestion des symptômes de la maladie est de les atténuer au fur et à mesure qu'ils se produisent. Cette gestion comprend :

1) la prise en charge de la douleur avec des traitements non pharmacologiques et / ou pharmacologiques. Ces derniers comprennent les antalgiques opioïdes, les non-opioïdes et les adjuvants. Les opioïdes utilisés sont généralement à courte durée d'action pour la douleur aiguë et à action prolongée ou à libération prolongée ou prolongée \pm à courte durée d'action pour la douleur ;

2) une transfusion de globules rouges pour une anémie sévère, une crise aplasique, un syndrome thoracique aigu, un accident vasculaire cérébral aigu, une défaillance de plusieurs organes et pour la prévention des accidents vasculaires cérébraux primaires et secondaires. La transfusion sanguine peut être simple ou consister en un échange transfusionnel selon la nature de la complication clinique ;

3) la supplémentation en acide folique ;

4) des antibiotiques pour la prophylaxie ou le traitement des infections ;

5) pénicillinothérapie quotidienne, et la pratique systématique des dopplers trans-crâniens ;

6) des soutiens psychosociaux au besoin (156).

1.9.3 Le traitement préventif

Ce traitement consiste à prévenir l'apparition de complications de la maladie. Il inclut la vaccination, l'évitement des situations stressantes, l'induction de Hb F avec l'hydroxyurée ou d'autres agents, la transfusion pour prévenir la récurrence de l'AVC, etc.

Une attention particulière est portée depuis quelques années à l'induction de HbF avec l'hydroxyurée (Figure 22). En effet, des niveaux élevés de Hb F ont de nombreux effets bénéfiques chez les patients atteints de drépanocytose. Platt *et al.* (158) ont démontré une

corrélation inverse significative entre la fréquence des CVO et les taux d'Hb F supérieurs à 4% ; plus le taux d'Hb F est élevé, plus la maladie est atténuée. L'hémoglobine F interfère avec la polymérisation de Hb S ; plus le taux d'Hb F est élevé, plus la concentration intracellulaire de Hb S est faible. Les exceptions à cette règle incluent certains patients avec un taux élevé d'Hb F et une maladie grave.

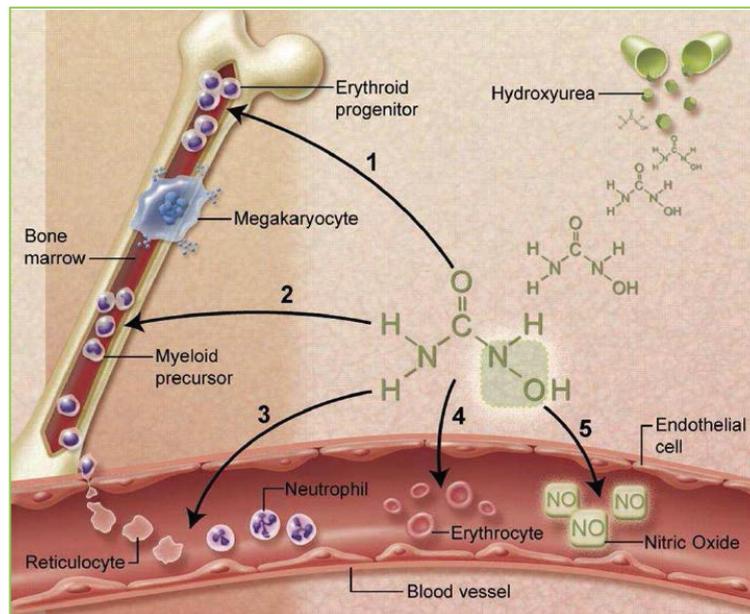


Figure 22. Multiples effets bénéfiques de l'hydroxycarbamide

Tiré de (159). (1) Induction de l'HbF ; (2) diminution du nombre réticulocytes et de neutrophiles circulants, et (3) diminution de leur adhérence à l'endothélium et donc des dommages de ce dernier ; (4) augmentation de l'hydratation érythrocytaire et réduction de l'hémolyse et de la falciformation ; (5) libération locale de NO.

Parmi les agents qui augmentent le taux d'Hb F chez l'homme, l'hydroxyurée (HU, aussi appelée hydroxycarbamide) administrée en monothérapie semble être la solution actuelle la moins toxique et la plus efficace (160, 161). De plus, HU est le seul médicament étudié pour son efficacité dans un essai clinique randomisé, contrôlé par placebo, à relativement grande échelle. Néanmoins, d'autres agents tels que la décitabine, le butyrate d'arginine, l'acide valproïque, etc., ont été rapportés comme des molécules pouvant augmenter les taux de Hb F. (156). Toutefois, le ou les mécanismes moléculaires par lesquels l'HU augmente la production de l'Hb F sont inconnus. Les mécanismes possibles comprennent des perturbations de la cinétique cellulaire et / ou la récupération de la cytotoxicité, le recrutement de progéniteurs érythroïdes précoces et le recrutement de progéniteurs érythroïdes primitifs qui conduisent à la production de réticulocytes contenant de l'HbF (réticulocytes F). La thérapie HU à long terme avec la dose maximale tolérée (dose moyenne 21,3 mg / kg) en ce qui concerne la myélosuppression augmente l'HbF de 15% à

20% (moyenne de 14,9%, intervalle de 1,9% à 26,3%) (162). Dans une étude multicentrique randomisée, Charache *et al.* (160) ont rapporté chez des patients atteints de drépanocytose et présentant au moins trois CVO par an et traités à l'HU, une réduction significative ($p < 0,001$) de l'incidence des CVO, du syndrome thoracique aigu et des besoins transfusionnels. L'hydroxyurée est le médicament qui est de plus en plus utilisé notamment en pédiatrie. (163). Il améliore aussi la qualité de vie des patients qui la prennent (164). Dans cette même étude, il n'y a pas eu de différence entre les groupes placebo et HU en ce qui concerne l'incidence des décès, des accidents vasculaires cérébraux ou de la séquestration hépatique. Bien qu'une augmentation de l'HbF semble être l'explication évidente et logique des effets bénéfiques de l'HU, d'autres facteurs interviennent, notamment les modifications du volume des globules rouges, l'hydratation cellulaire, la membrane cellulaire et un effet direct sur les cellules endothéliales (156).

En-dehors de l'hydroxyurée, un grand nombre de modalités thérapeutiques préventives novatrices pourraient jouer un rôle prometteur dans la prise en charge de la maladie. Il s'agit notamment des molécules anti-adhésion (165), des surfactants (166), de la lévocarnitine, du zileuton (inhibiteur de la 5-lipoxygénase), les anti-P sélectine (Crizanlizumab), du thé vert (167, 168) et des extraits de plantes (169). Certains de ces agents sont utilisés sur une base de recherche. Il existe des rapports anecdotiques de succès chez quelques patients utilisant certains de ces agents. Cependant, l'efficacité de l'un de ces agents doit être prouvée lors d'essais de phase III, randomisés, à double insu et contrôlés par placebo. Ces essais détermineront si un médicament donné est sûr, efficace et capable d'améliorer la qualité de vie des patients traités. Singh et Ballas ont récemment passé en revue environ 38 médicaments testés essayés ou sur le point de l'être dans plusieurs essais cliniques pour la prévention des CVO et des complications associées (170).

1.9.4 La gestion avortée

L'objectif principal de cette approche est d'interrompre les crises douloureuses, les empêchant ainsi de s'aggraver ou de provoquer d'autres complications. Dans ce sens, l'HU y est parvenu en partie en réduisant la durée d'hospitalisation de deux jours par rapport au groupe placebo (171). L'oxyde nitrique a été utilisé pour interrompre les crises douloureuses, mais il s'avère qu'il n'est efficace qu'au service d'urgence mais pas durant l'hospitalisation (172, 173).

1.9.5 La thérapie curative

Il existe deux formes de thérapies curatives applicables à la drépanocytose. La première est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, qui peut être actuellement réalisée dans la drépanocytose. La seconde est la thérapie génique, qui fait l'objet de plus en plus d'essais cliniques.

En effet, le seul traitement curatif disponible actuellement pour la drépanocytose est la greffe de cellules souches. En 1998, 70 patients atteints de drépanocytose avaient subi une transplantation de moëlle osseuse dans le monde entier. À la fin du XXe siècle, au moins 100 patients atteints de drépanocytose avaient subi une transplantation dans le monde entier (174). Malgré le risque très faible de mortalité par greffe de moëlle osseuse à HLA (~5%), il existerait des facteurs limitants tels que la toxicité à court terme et à long terme ou le manque de disponibilité de donneurs compatibles (175). Néanmoins, un rapport sur l'impact de la greffe de moëlle osseuse sur les formes symptomatiques de drépanocytose a montré que la greffe de moëlle osseuse allogénique établissait une érythropoïèse normale associée à une croissance accrue et à des résultats stables d'imagerie du système nerveux central et de la fonction pulmonaire (174). Les choses ont changé pour le mieux depuis 2000 ; certains des obstacles ont été surmontés et davantage de patients attendent des donneurs compatibles pour la transplantation. La mise au point du typage HLA à haute résolution, le choix des sources de cellules souches (moëlle osseuse, sang périphérique ou sang de cordon), des conditions moins toxiques, une nouvelle immunosuppression, les agents, la reconstitution immunitaire facilitée et l'amélioration des soins de soutien ont fait de la transplantation une option plus viable pour les patients atteints de drépanocytose (176). En 2010, selon la base de données du Centre international de transplantation de sang et de moëlle osseuse, moins de 500 patients atteints d'anémie falciforme et ayant subi une transplantation ont été répertoriés (156).

Ainsi, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques est actuellement le seul traitement curatif couramment utilisé de la drépanocytose. Il est efficace chez environ 90% des patients. Malheureusement, les approches conventionnelles de la transplantation sont associées à des comorbidités, y compris, entre autres complications, l'infertilité, l'insuffisance gonadique et la maladie chronique du greffon contre l'hôte (GVHD). L'utilisation de sang de cordon ombilical s'est avérée aussi efficace et peut-être plus sûre que la greffe de moëlle osseuse traditionnelle chez les enfants atteints de drépanocytose. L'utilisation de schémas thérapeutiques non myéloablatifs induit un chimérisme mixte chez

les greffés, entraînant une diminution des complications de la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte (177).

Bien que la greffe allogénique de moelle osseuse puisse guérir la drépanocytose, son utilisation généralisée est limitée par certains facteurs précédemment mentionnés. Ainsi, la thérapie génique est une approche alternative pour parvenir à une guérison de l'anémie falciforme. En termes simples, la thérapie génique consiste à introduire des gènes normaux dans des cellules anormales, *in vitro* ou *in vivo*. Une approche potentielle pour guérir la drépanocytose consiste à introduire un gène fonctionnel de la globine A dans les cellules souches hématopoïétiques de la personne atteinte pour remplacer le gène anormal de la S-globine (178). Il existe plusieurs méthodes pour réaliser une thérapie génique :

- Insertion ciblée du gène transféré dans le locus de globine endogène par recombinaison homologue, de sorte que le gène de la globine A transféré soit situé dans l'environnement chromosomique approprié et exprimé au même niveau que la globine endogène. Ce serait l'approche idéale, mais elle n'est pas encore réalisable dans les cellules souches hématopoïétiques (156) ;
- La chimioplastie ou la réparation génique, qui introduit des oligonucléotides chimériques composés d'ADN et des résidus d'ARN modifiés dans les cellules souches pour diriger la correction de la mutation du gène S (179) ;
- Transfert du gène normal de la globine A dans des cellules hématopoïétiques via des vecteurs rétroviraux modifiés de telle sorte qu'ils ne deviennent pas infectieux.

La troisième méthode mentionnée ci-dessus a connu ces dernières années des progrès significatifs. Fondamentalement, cette méthode consiste à un transfert de gène de cellules souches ou une greffe autologue, dans lequel les propres cellules souches du patient sont récoltées de la moelle osseuse ou du sang périphérique, génétiquement modifiées et transplantées chez le patient. La modification génétique implique l'utilisation de vecteurs portant des gènes de la β -globine pour les gènes drépanocytaires ou β -thalassémie. Cette approche a déjà été établie chez la souris et a été couronnée de succès dans une étude de phase I / II, avec un bénéfice attendu pour les troubles de l'Hb. Une conversion réussie d'un patient présentant une β -thalassémie majeure ne dépendant plus de la transfusion sanguine a été rapportée (180). Un autre patient atteint de drépanocytose a été traité avec l'ajout d'un gène antifalcémiant de la β -globine induit par le vecteur lentiviral dans des cellules souches hématopoïétiques autologues (181). Deux études sur une stratégie de regroupement de séquences de répétitions palindromiques courtes (CRISPR) et de protéines

associées à CRISPR (Cas9) (CRISPR / Cas9) ont donné des résultats prometteurs pour le traitement des β -hémoglobinopathies. En effet, ces répétitions palindromiques perturbent une région génomique de 13,6 kb englobant les gènes δ et β -globine et un putatif γ - δ silencieux de l'hémoglobine fœtale (HbF) intergénique. La perturbation du γ - δ silencieux de l'HbF entraîne une légère augmentation de l'expression de la γ -globine, tandis que la suppression ou l'inversion d'une région de 13,6 kb entraîne une réactivation robuste de la synthèse de HbF dans les érythroblastes adultes, associée à des modifications épigénétiques et à des modifications des contacts de la chromatine au sein du locus β -globine. Dans les cellules souches / progénitrices primitives hématopoïétiques dérivées du patient, cibler la région de 13,6 kb entraîne une forte proportion d'expression de la γ -globine dans les érythroblastes, une synthèse accrue de l'HbF et une amélioration phénotypique de la drépanocytose (182, 183).

1.10 La drépanocytose au Sénégal

1.10.1 Epidémiologie

Au Sénégal, 1 personne sur 10, sans distinction d'ethnie, d'origine géographique ou de classe sociale, porte le gène de la drépanocytose. La majorité ne l'a hérité que d'un des parents et est donc porteuse du trait drépanocytaire (AS). Environ 1700 enfants naissent, chaque année, avec la drépanocytose au Sénégal (184). Le nombre exact de porteurs du trait drépanocytaire n'est pas formellement établi, toutefois, l'effectif des patients suivis dans nos structures de santé est bien connu. Au Centre national de transfusion sanguine (CNTS), près de 2.000 adultes sont pris en charge ; au Centre hospitalier National d'Enfants Albert Royer, plus de 3.000 enfants sont suivis, et à Saint-Louis, près de 200 malades sont enregistrés, pour ne citer que ces exemples. Selon le point focal chargé de la lutte contre la drépanocytose au Sénégal, le Pr Ibrahima Diagne, le coût de la prise en charge par consultation par patient serait de 5000 francs CFA soit 7,62 euros. Les activités de lutte contre la drépanocytose sont coordonnées par le point focal. C'est ainsi que sous son impulsion, un programme national de prise en charge est mis en place. Ce programme repose essentiellement sur la formation du personnel et la sensibilisation des populations. Les activités de formation s'adressent à tous les niveaux de la pyramide sanitaire. Un plan stratégique et un manuel de formation du personnel de santé ont été également été proposés depuis 2008, suite à des ateliers réunissant des spécialistes. Les activités

d'information, de sensibilisation et de communication sont menées par l'Association sénégalaise de lutte contre la drépanocytose.

Des activités de dépistage réalisées grâce au concours de l'équipe du CNTS sur le terrain à Dakar et dans les régions sont également organisées. Ainsi, 9.167 personnes ont été dépistées entre 2011 et 2015. Plus récemment, un guide harmonisé de prise en charge de la drépanocytose a été élaboré au niveau sous régional (Sénégal, Burkina-Fasso, Madagascar, Mali, Mauritanie et Niger), grâce à l'appui de la Direction de la coopération internationale de la Principauté de Monaco qui est un partenaire commun dans la lutte contre cette maladie. Ce guide destiné au personnel soignant a pour objectif d'harmoniser les pratiques et d'optimiser la qualité de la prise en charge des patients, en tenant compte du contexte socio-sanitaire des pays respectifs.

1.10.2. Diagnostic clinique et biologique

1.10.2.1 Circonstances de découverte et diagnostic clinique

Dans notre pays à ressources limitées, on note un retard certain au diagnostic. Diagne *et al.* (185), en 1999, soulignaient la rareté du diagnostic précoce des SDM au Sénégal avec seulement 28% de diagnostic dans la première année de vie. Malheureusement ce retard au diagnostic perdure encore aujourd'hui avec seulement 39,9% de nos patients diagnostiqués à l'âge du nourrisson (185). Ce retard au diagnostic s'explique majoritairement par l'absence de dépistage néo-natal, les parents n'amenant leur enfant à l'hôpital qu'au décours de la première complication clinique sérieuse. En effet, d'après les travaux de Boiro *et al.* (186) effectués sur la cohorte pédiatrique de Dakar, les circonstances de découverte sont dominées à 43% par les CVO sous forme de douleurs ostéo-articulaires et de syndrome pieds-mains. D'autres circonstances de découverte reviennent aussi, fréquemment : anémie, ictère et infections à répétition. Les difficultés liées au diagnostic tardif devraient être résolues grâce à la création des centres de référence, notamment à travers les activités de dépistage néonatal intégrées dans les activités programmées et, in fine améliorer la prise en charge des patients. Une étude pilote sur le dépistage néonatal est en cours d'expérimentation.

1.10.2.2 Diagnostic biologique

Au Sénégal, du fait de nos réalités socio-économiques et de la prédominance de l'hémoglobine S du point de vue épidémiologique, l'analyse de première intention dans le

diagnostic d'une hémoglobinopathie est le test d'EMMEL. C'est à la suite des résultats du test d'EMMEL qu'une électrophorèse de l'Hb (capillaire, à pH alcalin et parfois à pH acide dans le cadre du diagnostic différentiel des mutants « S-like ») ou une chromatographie pourra être demandée. Actuellement, la chromatographie n'est pas vraiment prescrite car elle n'est pas ou très peu pratiquée. Mais avec l'acquisition récente d'équipements (don des Hospices Civils de Lyon), elle pourra être incluse dans la panoplie de tests réalisés.

L'appareil d'électrophorèse capillaire que nous utilisons est le MINICAP FLEX PIERCING de chez SEBIA (Paris, France) (Figure 23).

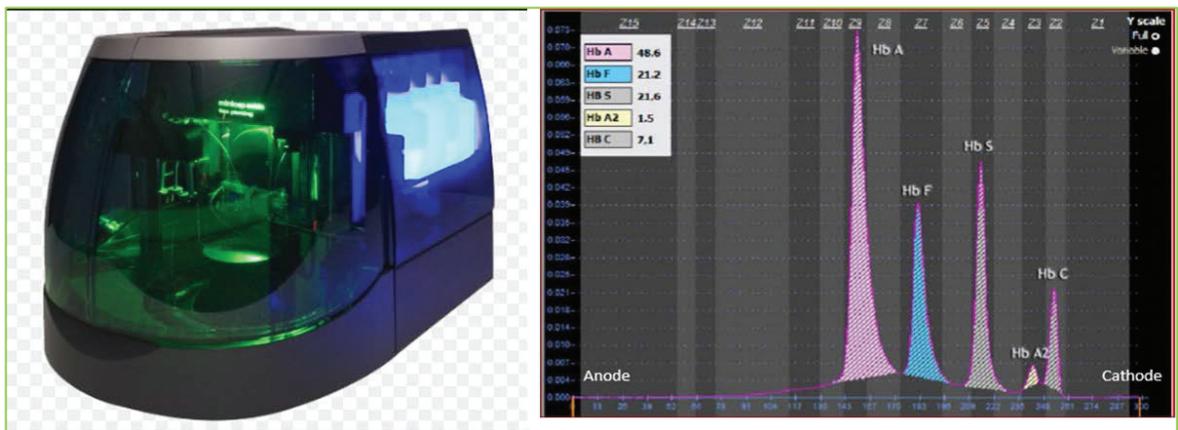


Figure 23. Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis®

Identification automatique des pics d'HbA, HbA₂, HbF, HbS et Hb C et découpage en 15 zones de migration.

Les résultats obtenus sur Minicap seront ensuite confirmés par une électrophorèse à pH alcalin ou acide. Nous utilisons le type **Helena SAS1-plus®** de Helena Biosciences Europe (Gateshead, Royaume-Uni). (Figure 24).



Figure 24. Exemple d'un gel à pH alcalin obtenu après migration sur Helena SAS-1 plus

En vue du dépistage néonatal de la drépanocytose, notre centre s'est procuré un appareil de focalisation iso-électrique (Figure 25) qui n'est pour le moment pas utilisé car ce projet est en voie de finalisation.



Figure 25. **Appareil d'isoélectrofocalisation de l'USAD**

1.10.3 Suivi et évolution clinique

Le suivi des patients est régulier et se fait tous les 3 à 6 mois selon l'âge avec un examen clinique et paraclinique. Ce suivi clinique comprend une ouverture de dossier avec des informations générales sur la maladie (définition, mode de transmission, manifestations cliniques, intérêt de la prise en charge, prévention, risque de complication). Pour les mesures préventives en dehors de l'hygiène, les enfants sont mis sous penicillino-prophylaxie avec mise à jour de leur carnet de vaccination. Le suivi paraclinique inclut les examens biologiques et d'imagerie médicale Cette prise en charge est importante pour prévenir les principales complications de la drépanocytose : AVC, lithiase biliaire, ostéonécrose, ulcères de jambe et priapisme. Malgré l'existence de l'unité de soins qui a nettement amélioré la prise en charge globale de la maladie, certains facteurs limitants persistent :

- l'insuffisance des moyens financiers pour la prise en charge des patients démunis ;
- l'absence de doppler transcrânien (DTC) pour le dépistage des risques d'accidents vasculaires cérébraux ;
- l'absence d'échange transfusionnel ;
- l'absence de programme national de lutte contre la drépanocytose.

Avec les progrès notés dans la prise en charge de la drépanocytose et l'amélioration de la qualité de vie des patients, l'espérance de vie est nettement prolongée pour ces patients. Lorsque l'enfant atteint l'adolescence, il est transféré au centre national de transfusion sanguine (CNTS) où se poursuit la prise en charge pour les adultes. ». Pour l'instant, il n'existe pas de programmes de transition enfants-adultes au Sénégal ; l'enfant est transféré juste avec le résumé de son dossier médical. Contrairement aux enfants chez qui les complications les plus fréquentes sont les AVC, la maladie se complique le plus souvent chez les adultes en ostéonécrose du fait de son caractère évolutif. Le syndrome thoracique aigu (STA) et les ulcères de jambe sont aussi fréquemment rencontrés chez les adultes.

Depuis quelques années, le Sénégal, pour poursuivre sur la lancée de l'amélioration continue et en vue d'assurer aux patients une prise en charge globale efficiente, s'est inscrit dans une dynamique de promotion des centres de référence pour le diagnostic précoce. C'est ainsi qu'en décembre 2015 le premier Centre de Recherche et de Prise en charge Ambulatoire de la Drépanocytose (CERPAD) a été créé. Il s'agit d'une infrastructure de l'UFR des Sciences de la santé de l'Université Gaston Berger de Saint-Louis, dont le financement a été octroyé par la Fondation Pierre Fabre en 2011. Le CERPAD comporte un laboratoire permettant le diagnostic néonatal de la drépanocytose et d'autres maladies de l'hémoglobine et des espaces de soins ambulatoires (consultations, vaccinations, hospitalisation de jour) en vue d'assurer le suivi des enfants. Il dispose également d'un personnel qualifié permettant de mener à bien ces activités.

Après le CERPAD, un autre centre a vu le jour à Dakar au niveau du Centre hospitalier national d'enfants Albert Royer. Il s'agit de l'unité de soins ambulatoire dédiée aux enfants et adolescents drépanocytaires (USAD), qui a été financée par l'état du Sénégal, en partenariat avec le Gouvernement Princier de Monaco, à travers la Direction de la Coopération Internationale (DCI). Ce centre est venu ainsi enrichir le dispositif de lutte contre cette maladie qui occupe la 4^{ème} place de consultation à l'hôpital d'enfants Albert Royer et la 3^{ème} en hospitalisation. Initié en 2010, le processus de construction de cette unité s'est poursuivi et son inauguration a eu lieu en 2017 lors de la journée africaine de lutte contre la drépanocytose célébrée le 10 mai de chaque année. Cette unité est dotée de 5 chambres d'hôpital du jour, des salles de soins, d'une salle réservée aux examens médicaux, d'un laboratoire avec plusieurs salles destinées à la réalisation des analyses biologiques et

moléculaires. Elle permettra également d'accueillir 15 patients en hôpital du jour et de traiter environ une centaine de personnes par jour.

L'objectif général de ces deux centres est de contribuer à la lutte contre la drépanocytose au Sénégal, principalement par la recherche-action, accessoirement par la recherche fondamentale. Les objectifs spécifiques immédiats sont relatifs à l'amélioration du circuit de soins, une rapidité de prise en charge, une limitation des transferts interservices et la mise en place du dépistage néonatal. Ce dépistage néonatal consiste à rechercher systématiquement la drépanocytose chez les nouveau-nés dans les maternités des deux villes (Dakar et Saint-Louis), à prendre en charge les enfants dépistés, les malades comme les porteurs du trait, Les nouveau-nés dépistés sont au besoin, référés au service de pédiatrie du Centre hospitalier universitaire de Saint-Louis ou à l'hôpital d'enfants Albert Royer. Ces activités englobent aussi l'analyse des données épidémiologiques, cliniques et socio-anthropologiques recueillies en collaboration avec d'autres équipes de recherche humaines, la suggestion d'un modèle de dépistage néonatal et de prise en charge précoce de la maladie drépanocytaire adapté au système de santé publique.

1.10.4 Recherche

La drépanocytose est à l'origine d'une intense activité de recherche au Sénégal. Cette recherche était initialement axée sur les aspects épidémiologiques et cliniques dont les résultats ont permis aux équipes d'apporter leur contribution à une meilleure connaissance de la maladie. Plusieurs études ont été réalisées selon ce contexte, parmi lesquelles celles consacrées à la prise en charge des patients (187), aux aspects épidémiologiques et évolutifs (186, 188), ou encore celles relatives aux complications (189-191)

Hormis la recherche clinique, divers travaux portant sur l'effet de certaines plantes ont été menés. C'est ainsi que des plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle, telles que *Leptadenia hastata* (extraits de racines) et *Maytenus senegalensis* (poudre de racines) ont fait l'objet d'études in vitro en vue d'apprécier leur effet anti-falcémiant sur les globules rouges drépanocytaires (192, 193). Ces plantes de la pharmacopée traditionnelle sont utilisées par les tradi-praticiens dans le traitement de la drépanocytose.

Les activités de recherche se sont également poursuivies au plan biologique et certaines d'entre elles étaient orientées vers les aspects biochimiques de la maladie. Des études visant à évaluer la fréquence de la carence en fer au cours de la drépanocytose (l'association drépanocytose carence martiale étant relativement fréquente en zone

tropicale) ont ainsi été réalisées (194). Des équipes se sont intéressées aux anomalies cytolitiques biomembranaires liées à la lipidoperoxydation, l'accumulation de la lysophosphatidyl-choline, prédisposant les globules rouges drépanocytaires aux phénomènes d'hémolyse (195). La prévalence des anticorps anti-phospholipides a aussi été déterminée chez les patients drépanocytaires, eu égard à l'implication de ces immunoglobulines dans la pathogénie de la maladie (196), de même que le polymorphisme du phénotype de l'haptoglobine a été analysé comme facteur prédictif de survenue d'anémie sévère au cours de la drépanocytose (197).

Les travaux ont, en outre, porté sur la détermination du profil lipidique classique (198) et celle des LDL-oxydées de sujets drépanocytaires (199), dans le but de mesurer le risque athérogène associé à l'affection, risque longtemps considéré comme faible du fait de la diminution de la cholestérolémie totale notée en période de crise.

Des travaux de recherche initiés en collaboration avec des équipes européennes (françaises en particulier) ont également contribué à une meilleure connaissance de la drépanocytose (200-202).

Malgré les nombreux travaux sur la maladie drépanocytaire au Sénégal, le volet génétique reste encore un terrain vierge.

Chapitre 2 : Les modulateurs génétiques de la drépanocytose

2.1 Gènes modificateurs de la drépanocytose déjà validés

2.1.1. Les 'Quantitative Trait Loci' (QTLs) de l'HbF

2.1.1.1 L'HbF dans la drépanocytose

Le rôle bénéfique de l'HbF a été initialement observé chez les nouveaux-nés et les nourrissons atteints de drépanocytose. Physiologiquement le taux d'HbF subit une décroissance progressive pour se stabiliser définitivement à l'âge de 5 ans au plus tard. Chez l'adulte sain, le taux d'HbF définitif est normalement inférieur à 1% mais il peut être beaucoup plus important en cas de persistance héréditaire de l'HbF (PHHF) d'origine délétionnelle ou mutationnelle. On a observé que les patients drépanocytaires ayant une PHHF délétionnelle (génotype de type S/PHHF) sont indemnes de toute manifestation

clinique et hématologique de la maladie avec un taux d'HbF pouvant aller jusqu'à 40% (203, 204).

Le taux d'HbF est l'un des facteurs les plus importants pour le pronostic de la drépanocytose. Dès qu'il dépasse 10%, il suffit à bloquer l'élongation de la polymérisation de l'HbS en s'intercalant entre les fibres de polymères en formation. En effet, la chaîne γ (comme la chaîne β normale) porte en position 7 un acide glutamique dont la chaîne latérale chargée négativement est hydrophile : l'HbF ne participe donc pas à la formation du polymère. Mieux, les hétéro-tétramères ($\alpha_2\beta^S\gamma$) formés entre HbS et HbF peuvent s'intercaler dans le polymère et en interrompre la croissance (Figure 26).

Des faisceaux d'arguments montrent qu'un taux d'HbF même légèrement élevé exerce un effet atténuateur sur la sévérité de la drépanocytose. Les sujets drépanocytaires de certaines ethnies (Arabie Saoudite, Inde) ayant un taux relativement élevé d'HbF ont des maladies moins sévères (205). L'apparition de complications spécifiques telles que le syndrome pied-main, le STA ou les CVO est contemporaine de la cinétique de décroissance du taux d'HbF dans les premiers mois de vie. Chez l'enfant, il existe des relations très significatives entre un taux bas d'HbF et la survenue des épisodes vaso-occlusifs (158). A l'inverse, l'augmentation du taux d'HbF diminue la morbidité et la mortalité des patients drépanocytaires (206).

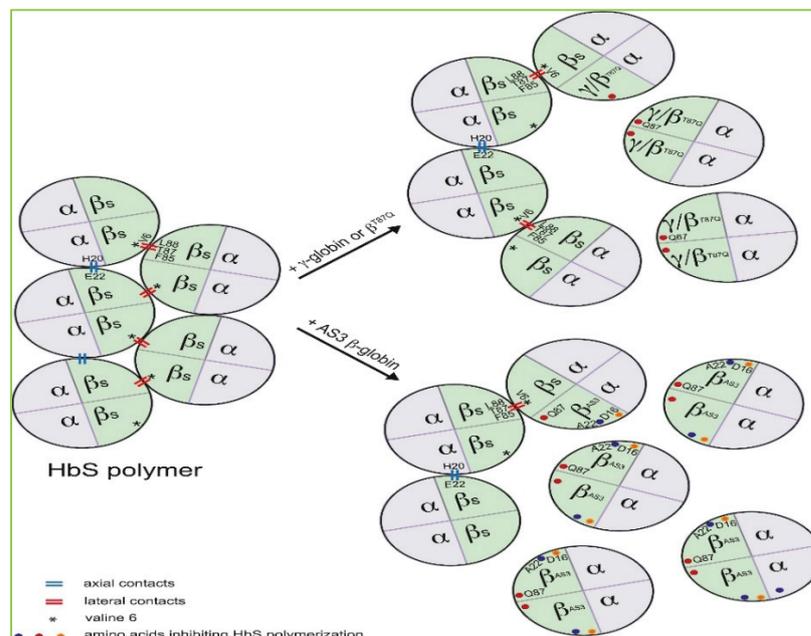


Figure 26. Processus d'interruption de la polymérisation de l'HbS par l'HbF.

Tiré de (207).

Les résultats des GWAS (genome wide association studies) menées depuis les années 2000, montrent qu'une fraction significative (20 à 50%) de la variation du taux d'HbF chez le patient drépanocytaire est due à seulement trois loci (208):

- le promoteur du gène de la bêta-globine ;
- l'espace inter-génique entre les gènes *HBS1L* et *MYB*, baptisé HMIP ;
- intron 2 du gène *BCL11A*.

Le mécanisme d'action des SNP impliqués sur ces loci, situés dans des régions non codantes du génome, n'est pas encore totalement explicité. Combinés entre eux, ils se révèlent plus fortement corrélés à l'HbF que séparément. D'autres SNP semblent également associés, de façon plus rare, aux variations de l'HbF (209) : par exemple au niveau des gènes *TOX* ou *OR* (récepteurs olfactifs), ou du promoteur du gène *SAR1*.

2.1.1.2 Polymorphisme γ -*XmnI* et haplotypes β -globine

Il a été remarqué depuis longtemps que les différents haplotypes β^S sont des facteurs pronostiques de la maladie. Ils sont en relation avec l'expression phénotypique et la sévérité de la drépanocytose, selon le taux d'HbF résiduel des patients. Le taux d'HbF chez les patients porteurs des haplotypes les plus communs varie dans ce sens : Bantou < Bénin < Sénégal < Arabo-Indien (138). Cependant, au sein de chaque groupe d'haplotypes, la gamme des niveaux d'HbF est très large, sans parler des combinaisons d'haplotypes pour les patients qui ne sont pas homozygotes pour le même haplotype β^S . Ces résultats sont corroborés par ceux de Nagel et collaborateurs (210, 211). En effet, ces auteurs ont rapporté que les patients homozygote SS avec l'haplotype Sénégal ou Arabo-Indien ont les taux d'HbF les plus élevés et les phénotypes les moins sévères, tandis que les patients de l'haplotype Bantu présentent les taux d'HbF les plus faibles et l'évolution clinique la plus sévère. Ces résultats ont récemment été confirmés par Bernaudin et collaborateurs (212). En effet, ces auteurs ont rapporté que le taux d'HbF était plus faible chez les patients avec l'haplotype Bantou/République centrafricaine (CAR) et positivement avec les haplotypes Bénin et Sénégal.

L'explication moléculaire de ces différences de taux d'HbF se situe au niveau du polymorphisme *XmnI* ou rs7482144. Les haplotypes Arabo-Indien et Sénégal contiennent le SNP dit *Xmn1* et sont associés à des complications moins sévères, à la différence de l'haplotype Bantou ou Benin. Le polymorphisme *Xmn1* ou rs7482144 est dû à une substitution dans le promoteur proximal du gène de la gamma-globine *HBB2* (11p15) où une thymine remplace une cytosine en position -158 (Figure 27). Il doit son nom à l'endonucléase

de restriction *Xmn1* qui reconnaît la mutation dans la séquence -157 à -166 du promoteur et qui a été utilisée lors de sa découverte (213). *Xmn1* est probablement un facteur cis-régulateur mais son mécanisme d'action direct n'est pas clairement établi. Il pourrait ainsi être seulement en déséquilibre de liaison avec la 'vraie' mutation causale (214). Les patients drépanocytaires porteurs de ce SNP voient leur taux d'HbF multiplié par 3 à 11 (215). *Xmn1* est également associé à des taux de réticulocytes et d'hémoglobine totale plus élevés et il a été clairement associé au taux d'HbF dans des cohortes américaines (nord et sud), africaines, asiatiques et européennes de patients non drépanocytaires (216).

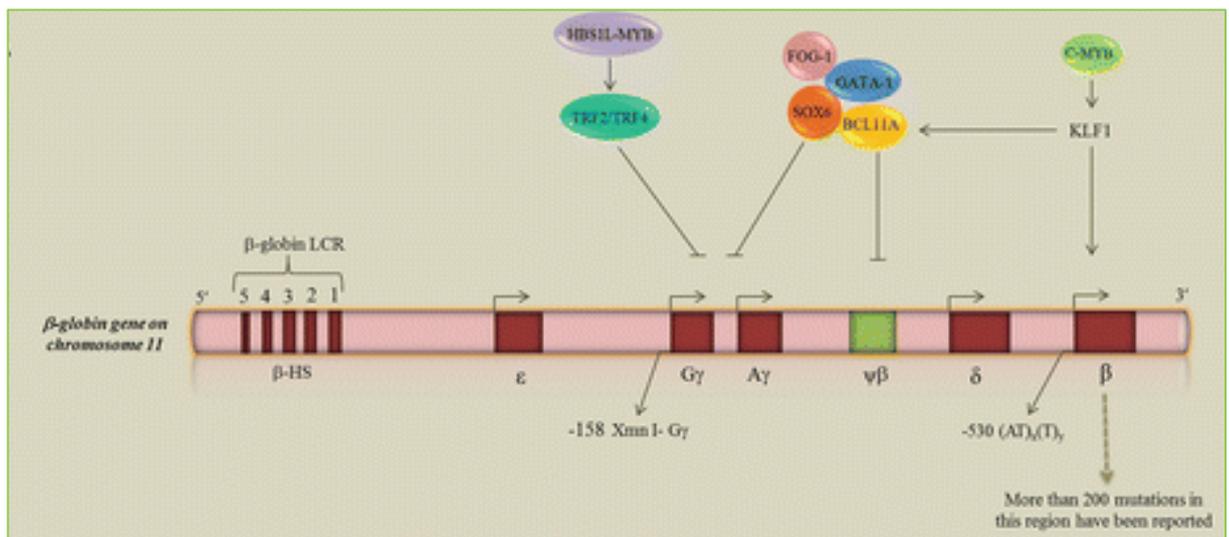


Figure 27. Localisation chromosomique Polymorphisme $\epsilon\gamma$ -*Xmn1*, rs7482144.

Tiré de (217).

2.1.1.3 Gène *BCL11A*

Le gène *BCL11A*, situé en position 2p16, code une protéine qui est un répresseur transcriptionnel en forme de doigt de zinc impliqué dans l'érythropoïèse. Il contient des SNP influant sur le taux d'HbF dans une séquence de 14 Kilobases (Kb) située dans son second intron (163) (Figure 28). Dans les GWAS, le marqueur le plus déterminant du taux d'HbF est le SNP rs4671393. Les polymorphismes rs10189857 et rs11886868 sont également associés de façon indépendante et forte à l'HbF dans certaines études (218, 219).

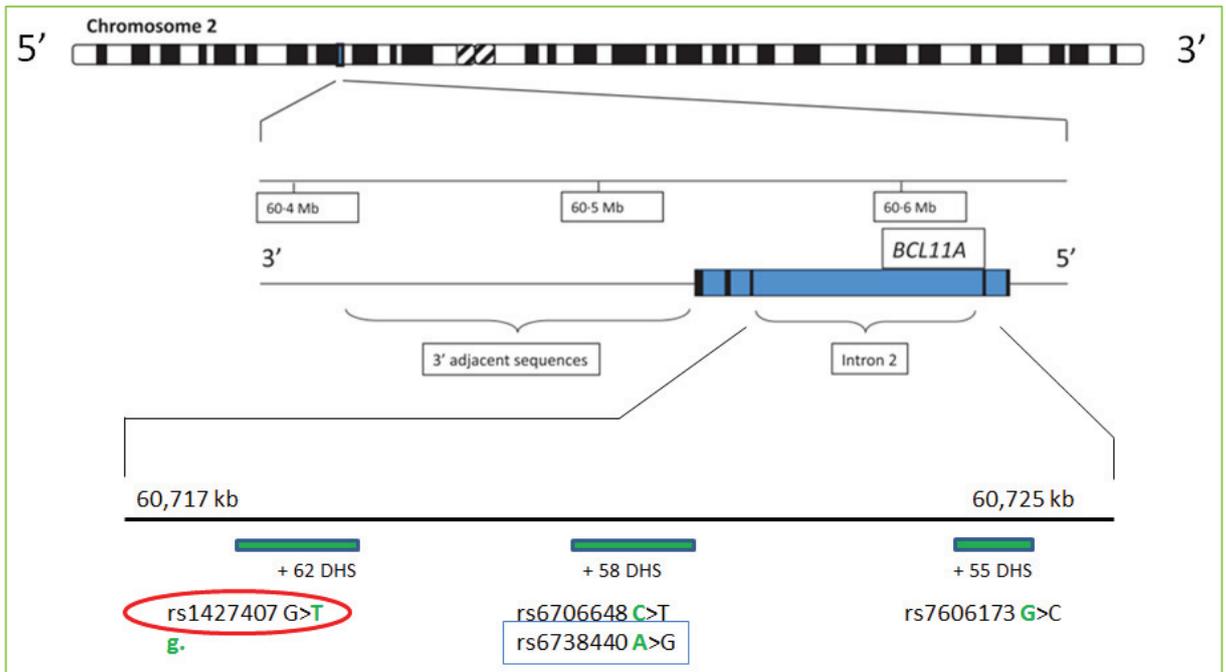


Figure 28. Localisation chromosomique du gène *BCL11A*. (220)

La protéine BCL11A, à l'aide de différents partenaires, participe à l'inhibition progressive de l'expression des gènes γ -globines via un complexe de répression qui se lie sur plusieurs sites sur le cluster β -globine : HS3 dans le LCR (locus control region), la région entre les gènes gamma et delta, et le promoteur du gène *HBG* (Figure 29). BCL11A interagit avec le complexe de remodelage NuRD, les facteurs de transcription érythroïdes GATA-1 et FOG-1. Via ces interactions, la protéine BCL11A est impliquée dans la commutation gamma vers beta globine (221).

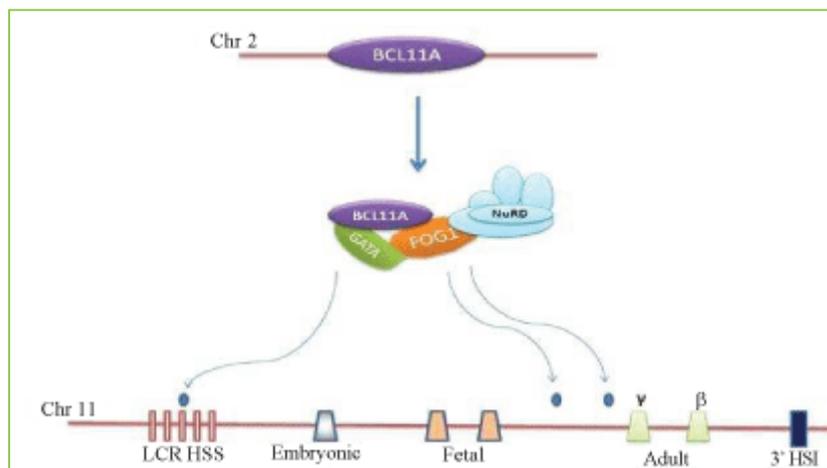


Figure 29. Rôle de BCL11A dans l'expression séquentielle des gènes de globine.

Tiré de (222).

Les SNPs cités plus haut, qui sont pour la plupart en fort déséquilibre de liaison entre eux, entraînent une diminution d'expression de la protéine BCL11A, ce qui a pour conséquence une répression moindre de l'expression des gènes gamma-globine. Ils semblent être responsables pour 15 à 18% de la variation du taux d'HbF (223). Ils ont également été associés à une augmentation de l'hémoglobine et des leucocytes et à une diminution des plaquettes (224). Cette association est retrouvée dans des populations asiatiques, africaines, afro-américaines et européennes (224, 225).

2.1.1.4 Espace inter-génique *HBS1L-MYB* (HMIP)

La région inter-génique *HBS1L-MYB* est située sur le chromosome 6q23 et s'étale sur 126 Kb (226). Les polymorphismes responsables des variations de l'HbF sont répartis en trois blocs dans cette zone inter-génique non codante : HMIP 1, 2 et 3 Figure 30. Le bloc 2, long de 24 kb, contient les SNPs les plus fortement associés aux variations de l'HbF dont le principal représentant est rs9399137 (216).

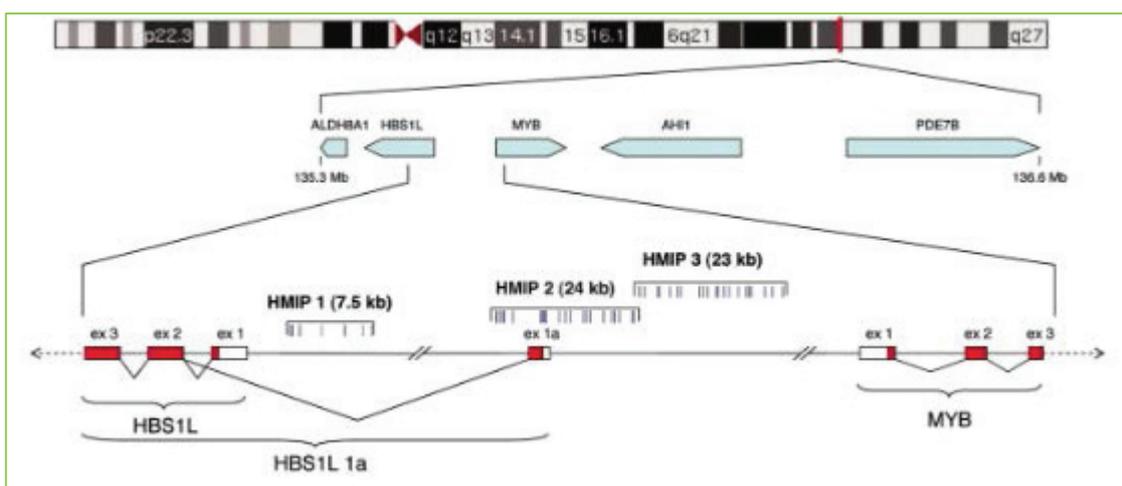


Figure 30. Organisation de la région inter-génique *HBS1L-MYB*

Tiré de (226). Les blocs contenant les SNP associés au niveau d'HbF sont HMIP 1, 2 et 3.

Le gène *HBS1L* appartient à la famille des « GTP binding protein » qui s'expriment principalement dans le cœur et dans les muscles squelettiques, mais aussi dans les progéniteurs érythroïdes (227). Le gène *MYB* est un oncogène de la famille des facteurs de transcription myéloblastiques. Il agit également sur l'érythropoïèse, en contrôlant la balance différenciation / prolifération. Pour cela, la protéine MYB fonctionne comme un régulateur de transcription : surexprimée, elle inhibe l'expression des gènes gamma-globines (*HBG1* et *HBG2*) tandis qu'en faible quantité, elle est associée à une diminution de la prolifération et à une accélération de la différenciation érythroïde. (227). La protéine MYB semble également

activer l'expression de gènes réprimant l'expression des gènes gamma-globines (comme *BCL11A*) (227).

L'intervalle *HBS1L-MYB* contient des éléments où peuvent se lier des facteurs de transcription érythroïdes qui interviennent dans la régulation de l'expression du gène *MYB*. Une délétion de 3 bases (rs66650371) située dans HMIP2 affecte la liaison de quatre de ces facteurs de transcription (GATA1, LDB1, TAL1 et KFL1) réduisant de fait l'activation du promoteur du gène *MYB*. Sa présence entraîne donc une accélération de la différenciation des érythrocytes et au final une augmentation du taux d'HbF. Cette micro-délétion est en très fort déséquilibre de liaison avec le SNP rs9399137 et elle représente a priori le facteur causal de l'augmentation associée d'HbF (228, 229).

Ces trois QTLs (*Xmnl*, HMIP et *BCL11A*) permettent d'expliquer 10 à 50% de la variation des taux d'HbF aussi bien chez l'adulte sain que chez le patient atteint de drépanocytose ou de β -thalassémie (229, 230). La variation restante est probablement due à de nombreux loci avec des effets relativement faibles et / ou à des variants rares ayant des effets quantitatifs significatifs sur l'expression du gène de la γ -globine qui sont généralement absents des études de population GWAS (231).

2.1.1.5 Corrélation QTLs HbF et clinique de la drépanocytose

Bien que plusieurs études d'association à l'échelle du génome aient démontré l'influence des loci *Xmnl*, *BCL11A* et HMIP sur les taux d'HbF (216, 232, 233), seules trois études ont porté sur leurs effets directs sur la sévérité clinique de la maladie. En effet, Muszlak *et al.* ont montré que le SNP *BCL11A* rs4671393 était associé à un taux d'hospitalisation plus faible dans une cohorte de 82 enfants atteints d'anémie falciforme de Mayotte (234). Au Brésil (205 patients drépanocytaires âgés de 12 à 68 ans), Leonardo a démontré que les patients sans allèle mineur HMIP ou *BCL11A* avaient une évolution clinique plus sévère (priapisme, vitesse de régurgitation tricuspидienne élevée, ulcères de jambe, ostéonécrose et accident vasculaire cérébral manifeste)(230). Enfin, Wonkam *et al.* ont rapporté que deux SNPS sur *BCL11A* (rs11886868 et rs4671393) et deux autres sur HMIP (rs28384513 et rs9494142) étaient associées à un taux d'hospitalisation plus faible pour les événements douloureux dans une cohorte camerounaise (235). En ce qui concerne les paramètres biologiques, les QTLs de l'HbF favorisaient une diminution des taux de CRP et du nombre de leucocytes dans la drépanocytose (233, 236). Dans toutes ces études, ces associations n'ont pas été testées en fonction du génotype alpha-globine et l'effet

supplémentaire du polymorphisme XmnI n'a pu être pris en compte puisque presque tous les patients avaient des haplotypes β^S de type Bénin, Bantu ou Cameroun. De plus, l'effet confondant de HU ne pouvait être exclu dans ces études.

2.1.2 Génotype alpha-globine

De nombreux travaux ont montré que les patients drépanocytaires porteurs d'une alpha-thalassémie avaient un meilleur pronostic clinique de façon générale. En effet, le défaut de synthèse d'alpha-globine diminue la concentration d'hémoglobine S intra-érythrocytaire et donc la polymérisation de l'HbS, la falciformation érythrocytaire et l'hémolyse (131, 237, 238). Chez les patients drépanocytaires alpha-thalassémiques, la concentration sanguine en hémoglobine est plus élevée, les érythrocytes sont moins denses et plus déformables et les taux de réticulocytes sont abaissés (212, 239). Cliniquement, ces patients sont moins sujets aux complications vasculaires (131, 240) telles que les vasculopathies cérébrales (241-243), la cholélithiase (244, 245) ainsi que les ulcères de jambe, le syndrome thoracique aigu (SCA) et la néphropathie chronique (246-248). En revanche, d'autres études montrent que la majoration de la viscosité sanguine induite par l'alpha-thalassémie favoriserait la survenue de complications vaso-occlusives et d'ostéonécrose (131, 235, 249, 250) (Tableau 1).

Tableau 1. Effet d'une alpha-thalassémie sur certaines complications cliniques de la drépanocytose.

Tiré de (251).

Phenotype	Effect of α -thalassaemia	Reference
Survival	Probably little effect	Higgs <i>et al</i> (1982); Mears <i>et al</i> (1983); Schroeder <i>et al</i> (1989); Keclard <i>et al</i> (1996); Martinez <i>et al</i> (1996); Keclard <i>et al</i> (1997); Thomas <i>et al</i> (1997); Miller <i>et al</i> (2000); Mouele <i>et al</i> (2000)
Painful episodes	Protective in HbSC* Permissive† or little effect in HbSS	Platt <i>et al</i> (1991); Billett <i>et al</i> (1995); Mukherjee <i>et al</i> (1998); Powars <i>et al</i> (2002)
Stroke	Protective	Miller <i>et al</i> (1988); Balkaran <i>et al</i> (1992); Adams <i>et al</i> (1994); Ohene-Frempong <i>et al</i> (1998); Neonato <i>et al</i> (2000); Sarnaik and Ballas (2001); Hsu <i>et al</i> (2003)
Osteonecrosis	Permissive in HbSS‡ protective in HbSC	Steinberg <i>et al</i> (1984); Ballas <i>et al</i> (1989); Milner <i>et al</i> (1991); Milner <i>et al</i> (1993); Powars <i>et al</i> (2002)
Acute chest syndrome	Unrelated or protective	Higgs <i>et al</i> (1982); Steinberg <i>et al</i> (1984); Castro <i>et al</i> (1994); Mukherjee <i>et al</i> (1998)
Proliferative retinopathy	Unrelated or mild protection	Condon <i>et al</i> (1983); Fox <i>et al</i> (1993)
Heart	Cardioprotective	Braden <i>et al</i> (1996)
Cholelithiasis	Protective	Adekile and Haider (1996); Haider <i>et al</i> (1998); Powars <i>et al</i> (2002)
Leg ulcer	Protective	Higgs <i>et al</i> (1982); Koshy <i>et al</i> (1989)
Splenic function	Protective	Adekile <i>et al</i> (1996); Wali <i>et al</i> (2002)
Growth and development	Unrelated	Singhal <i>et al</i> (1996)
Menarche	Unrelated	Serjeant <i>et al</i> (2001)
Priapism	Mild protection	Nolan <i>et al</i> (2004)
Splenic sequestration	Permissive	De Ceulaer and Serjeant (1991)
HbF	Probably little effect	Embury <i>et al</i> (1984)
Albuminuria	Protective	Guasch <i>et al</i> (1999)

The effects of α -thalassaemia may differ in sickle cell anaemia and HbSC disease and data on other genotypes of sickle cell disease are very few. Heterogeneity among populations of patients with sickle cell anaemia, in the ages of the patients studied and in the numbers of patients in each study sometimes make firm conclusions difficult.

*Protective denotes a reduction in the incidence or prevalence of a phenotype with α -thalassaemia.

†Permissive denotes an increased incidence or prevalence of a phenotype when α -thalassaemia is present.

‡HbSS-homozygosity for the HbS gene.

Au final, l'alpha-thalassémie agirait comme un facteur modulateur plutôt que protecteur réel de la drépanocytose puisque qu'elle orienterait davantage vers le sous-phénotype vaso-occlusif au détriment du sous-phénotype hémolytique (Figure 31).

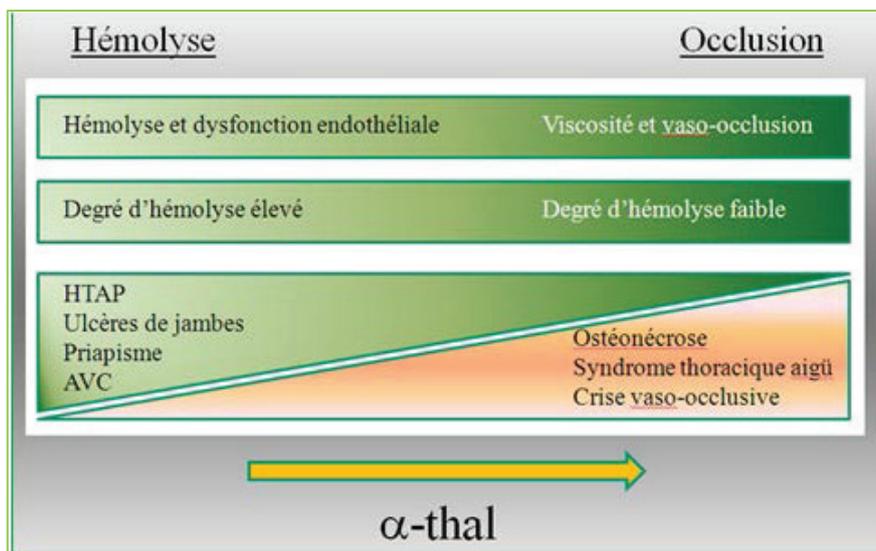


Figure 31. Influence de l'alpha-thalassémie dans les sous-phénotypes de drépanocytose.

Adapté de (131).

2.1.3 Le déficit en G6PD

2.1.3.1 Une association longtemps controversée avec la vasculopathie cérébrale

Le déficit en Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase (G6PD), comme la drépanocytose, est une anomalie génétique du globule rouge responsable d'anémie hémolytique. Elle est portée par un chromosome différent et donc transmise de façon indépendante. Cependant, ces deux pathologies peuvent se trouver associées. On observe une plus grande prévalence du déficit en G6PD chez les patients drépanocytaires par rapport à la population générale, notamment dans les régions de forte endémie palustre (252). L'impact de la déficience en G6PD sur l'expression clinique et biologique de la maladie a été longtemps controversé depuis la publication princeps de Bernaudin *et al.* associant déficit en G6PD et vasculopathie cérébrale (253). En effet, d'autres études réalisées dans la foulée ont confirmé cette association (243, 254, 255) tandis que d'autres équipes ne la retrouvaient pas (256, 257). Ces différences s'expliquent probablement par des aspects méthodologiques puisque les résultats des études d'association phénotype-génotype dépendent des critères cliniques étudiés et des seuils retenus, le plus souvent variables d'une étude à l'autre. Parallèlement, Benkerrou *et al.* ont mis en évidence une anémie chez les nouveau-nés déficitaires en G6PD, anémie qui s'estompe ensuite probablement parce que le déclin de l'HbF entraîne une majoration de l'hémolyse et donc du nombre de jeunes érythrocytes avec une activité de la G6PD efficace (258).

2.1.3.2 Quel mécanisme physiopathologique ?

La G6PD, première enzyme de la voie des pentoses phosphates, est la principale source intracellulaire de NADPH et a longtemps été considérée comme une enzyme anti-oxydante dans les érythrocytes (259). La G6PD a un rôle similaire sur les cellules vasculaires qui sont caractérisées par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (EROS) (260). Le NADPH est en effet utilisé comme cofacteur de la NO synthase endothéliale (eNOS) pour générer du NO (261). L'activité G6PD neuronale s'est également révélée être protectrice dans des modèles murins de maladie de Parkinson (262) et de lésion ischémique aiguë (263), tous deux médiés au moins en partie par la génération de radicaux oxygène. Le déficit en G6PD pourrait enfin contribuer aux maladies cardio-vasculaires et diabétiques qui présentent des similitudes histo-pathologiques avec la vasculopathie cérébrale du

drépanocytaire (260). Inversement, le déficit en G6PD peut atténuer la maladie vasculaire proliférative en diminuant la réponse vasculaire à l'angiotensine (255).

Etant donné que la drépanocytose est également associée à une augmentation de la production de ROS et à un dysmétabolisme du NO (264, 265), il serait logique de supposer que les complications de la maladie d'origine vasculaire (telles que la vasculopathie cérébrale) pourraient être aggravées par un déficit en G6PD (Figure 32).

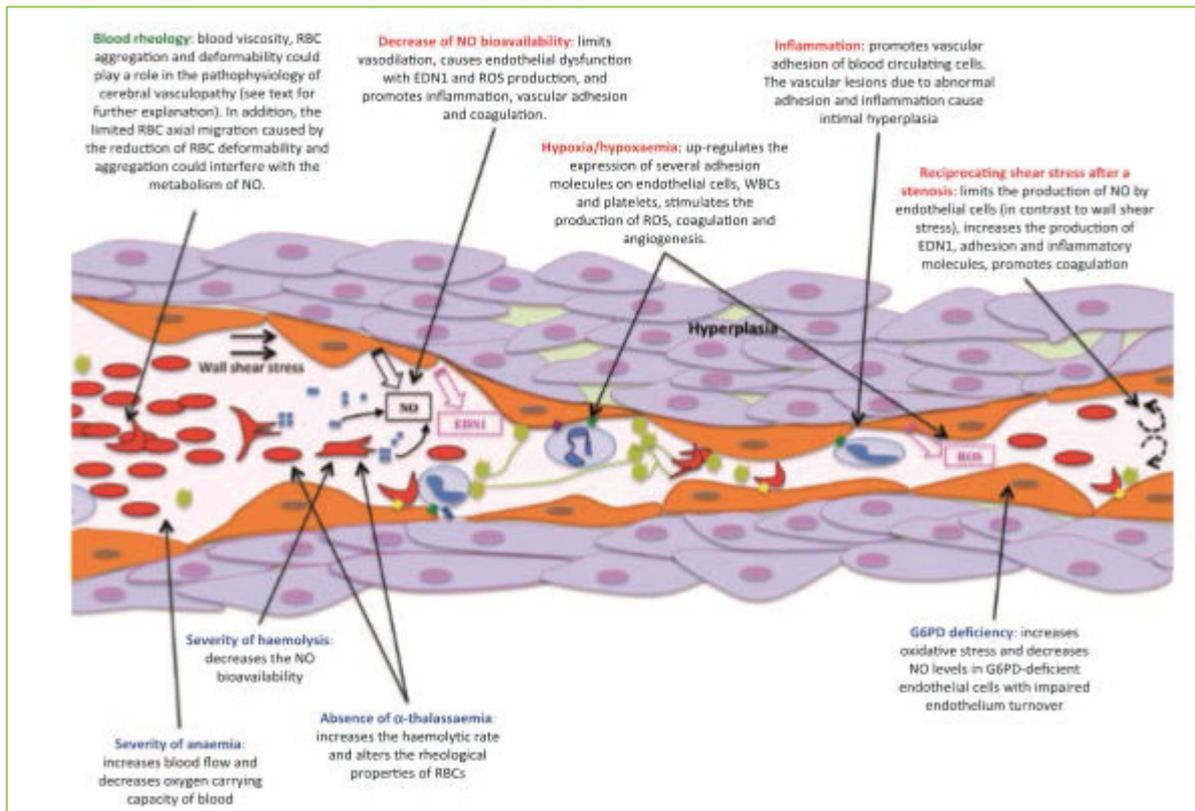


Figure 32. Mécanismes physiopathologiques de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire.

Tiré de (266).

Mais ceci reste une hypothèse car, autant le déficit en G6PD a été associé à une augmentation du SO systémique dans la population générale, autant le corollaire n'a encore jamais été démontré chez les patients drépanocytaires.

2.1.4 Le gène *UGT1A1*

La bilirubine, qui résulte de l'hémolyse physiologique chez tout individu, passe du sang vers le foie où elle est conjuguée à des acides glucuroniques en bilirubine conjuguée (ou directe) grâce à l'action de l'enzyme *UGT1A1* (Uridine diphosphate-glucuronosyl transférase 1A1) exprimée par les hépatocytes. Cette réaction de conjugaison permet à la bilirubine libre, hydrophobe, d'acquérir un caractère hydrophile indispensable à son élimination via la bile dans les voies intestinales (267).

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'hémolyse chronique est une des caractéristiques principales de la maladie drépanocytaire. L'excès de bilirubine libre induit une surcharge du système de conjugaison hépatique. Ainsi, une partie de la bilirubine non conjuguée passe dans les voies biliaires où elle précipite. Cette bilirubine précipitée est à

l'origine des calculs vésiculaires. L'autre partie de la bilirubine non conjuguée repasse dans le sang, générant une hyperbilirubinémie indirecte chez les malades.

Une proportion importante de patients atteints de drépanocytose est donc prédisposée à la lithiase biliaire (268). Il a été démontré que plusieurs facteurs génétiques et hématologiques modulaient l'apparition de la lithiase biliaire chez les patients drépanocytaires. Le plus important est le polymorphisme de répétition du dinucléotide (TA)₅₋₈ dans la boîte TATA du promoteur du gène *UGT1A1*. De nombreuses études ont démontré que les génotypes (TA)₇/(TA)₇, (TA)₇/(TA)₈ et (TA)₈/(TA)₈ augmentaient le risque de lithiase chez les enfants et adultes drépanocytaires (244, 269-273). Récemment, notre équipe a montré que la présence d'une alpha-thalassémie associée (surtout à l'état homozygote) diminuait le risque de lithiase biliaire chez le patient drépanocytair, indépendamment du génotype *UGT1A1* (245).

2.1.5 Autres gènes modificateurs

De nombreuses études, plus ou moins bien conduites et non systématiquement validées sur des cohortes de confirmation indépendantes, ont analysé l'effet de variants de différents gènes candidats sur le risque de survenue de certaines complications chez les drépanocytaires. Ces études concernaient entre autres les gènes codants pour les protéines impliquées dans la régulation de la pression artérielle, la réponse immunitaire, les mécanismes pro-adhésifs, les mécanismes pro-inflammatoires et le métabolisme lipidique.

Ainsi, des auteurs ont rapporté que le polymorphisme APOL1 G1, facteur de risque identifié pour l'insuffisance rénale non diabétique, était associé à une albuminurie. Grâce au séquençage d'exomes entiers, ces auteurs ont permis de découvrir également, plusieurs nouveaux variants conservant leur importance dans les cohortes de validation, notamment les polymorphismes de ZFH4 affectant les numérations leucocytaire et neutrophile, ainsi que les variants AGGF1, CYP4B1, CUBN, TOR2A, PKD1L2 et CD163 affectant le débit de filtration glomérulaire dans la drépanocytose (274, 275). Certains polymorphismes des gènes de IL-1 β (-511C> T et + 3954C> T) et IL-6 (-597G> A et -174G> C) ont montré leur influence sur certains paramètres cliniques et biologiques de la maladie. En effet, IL-1 β + 3954C> T SNP serait associé à un risque accru d'ostéonécrose, à une pression artérielle pulmonaire élevée et à un nombre de réticulocytes absolu plus bas, tandis que IL-6-597G> A serait associé à un risque plus élevé de rétinopathie et d'ulcère de jambe (276). Sebastiani et al. ont mené en 2010 une GWAS sur 1265 patients drépanocytaires en prenant comme critère global de

sévérité le risque de mortalité à 5 ans calculé à l'aide de leur modèle présenté plus haut (277). Trois gènes principaux ont été identifiés comme des modificateurs potentiels de la sévérité globale de la drépanocytose : KCNK6 qui code une protéine d'un canal potassique, TNKS qui code l'enzyme tankyrase 1 (régulateur potentiel de la longueur des télomères) et HK2 qui code une enzyme du métabolisme du glucose.

Chapitre 3 : Le stress oxydant, acteur majeur de la drépanocytose

3.1 Généralités sur le stress oxydant

3.1.1. Définition du stress oxydant et des espèces réactives de l'oxygène

Après la découverte des radicaux libres dans les systèmes biologiques il y a un peu plus de 60 ans (278), Harman *et al.* évoquent pour la première fois en 1956 l'hypothèse selon laquelle l'accumulation des dommages moléculaires et cellulaires causés par des radicaux libres centrés sur l'oxygène serait responsable des phénomènes du vieillissement (279). Ces radicaux libres sont par définition des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique, ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Ils ont été longtemps considérés comme nuisibles, responsables de potentiels dommages à l'ADN, aux protéines et aux lipides. Cependant, la description de la production d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) par les cellules phagocytaires dans la lutte contre les pathogènes, celle du rôle biologique du NO ainsi que la découverte des enzymes productrices qui leur sont associées soulignent également le rôle physiologique de ces ROS. Néanmoins, le stress oxydant résulte du déséquilibre entre oxydants et anti-oxydants, est toujours délétère.

Le paradoxe des ROS est en effet qu'elles constituent des produits potentiellement toxiques du métabolisme mais sont en même temps des molécules essentielles à l'homéostasie cellulaire. Cette double potentialité peut être expliquée, au moins en partie, par le fait que les réponses cellulaires varient de manière très sensible et très différente en fonction de la nature chimique du ROS, de son niveau de production (effet dose-dépendant) ou encore du site producteur. Une production modérée et contrôlée des ROS peut entraîner une oxydation réversible des molécules environnantes : les ROS agissent alors en véritables seconds messagers. À l'inverse, une surproduction de ROS ou un déficit des systèmes de défense entraîne l'apparition d'un stress qui provoque l'oxydation non spécifique et irréversible de molécules biologiques, conduisant à une perte de leur fonction (280). De nombreuses molécules sont susceptibles d'être attaquées ou modifiées par les ROS. Les acides aminés et les protéines sont les premières cibles. On a estimé que 50% à 70% des ROS produites par une cellule peuvent être piégées par les protéines (281). Les acides gras polyinsaturés, comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique, présents notamment dans les membranes plasmiques, sont également une cible majeure de l'attaque radicalaire. Leur

oxydation par les ROS, appelée peroxydation lipidique, conduit à la formation de très nombreux produits primaires (les hydroperoxydes) et secondaires (les aldéhydes) dont les activités biologiques sont multiples (282).

Le stress oxydant (SO) est un état résultant d'un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les capacités anti-oxydantes de l'organisme (enzymes antioxydantes et systèmes antioxydants non enzymatiques) (283, 284) (Figure 33). Cet état est observé physiologiquement au cours du vieillissement et il accompagne également de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète, maladies neurodégénératives, drépanocytose...). Il se traduit par l'accumulation de produits d'oxydation des biomolécules (lipides, protéines, acides nucléiques) au niveau plasmatique et au niveau cellulaire, ce qui permet de l'évaluer de façon indirecte via la quantification de ces produits d'oxydation.

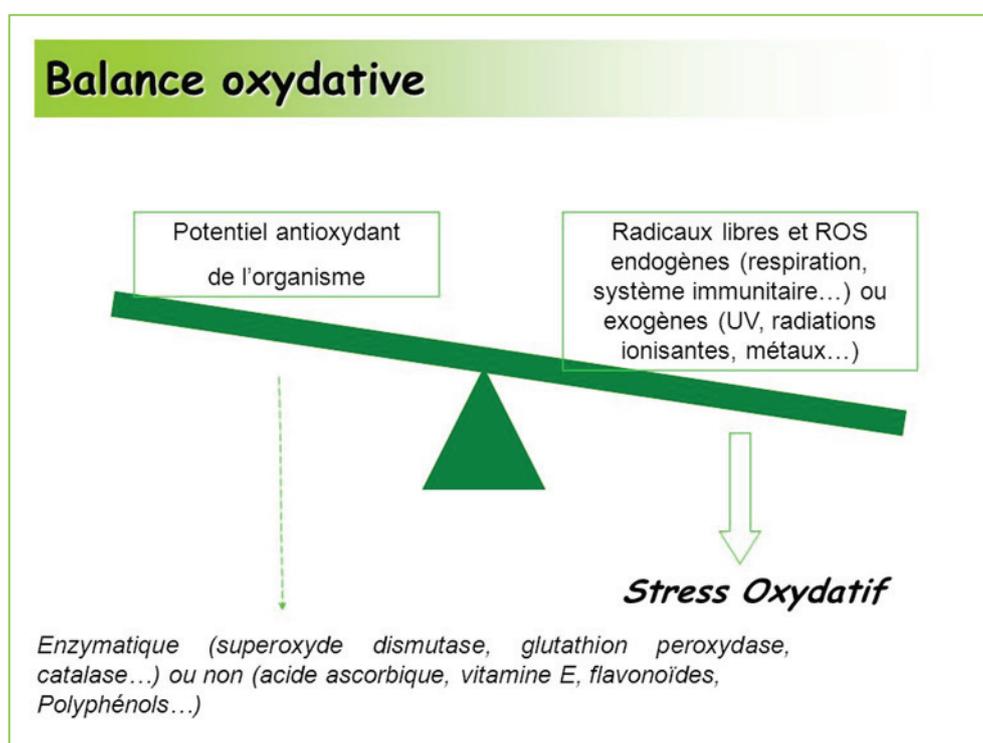


Figure 33. Représentation schématisée de la théorie du stress oxydant.

Comme leur nom l'indique, les ROS proviennent de l'oxygène qui existe naturellement comme une molécule de dioxygène stable où tous les électrons sont appariés 2 à 2 sur la couche périphérique. L'ajout d'un électron non apparié rend la molécule d'oxygène instable et conduit à la formation de l'anion superoxyde (principale forme radicalaire de ROS), avec le radical hydroxyle OH^{\bullet} (qui dérive de l'anion hydroxyle OH^-). Ces espèces radicalaires proviennent surtout de la chaîne respiratoire mais pas uniquement. Il

peut y avoir des ROS non radicalaires, mais tous les radicaux libres sont des ROS et ces espèces sont plus réactives et oxydantes que l'oxygène moléculaire (285). Selon le même principe, il existe aussi des espèces réactives de l'azote (Figure 34).

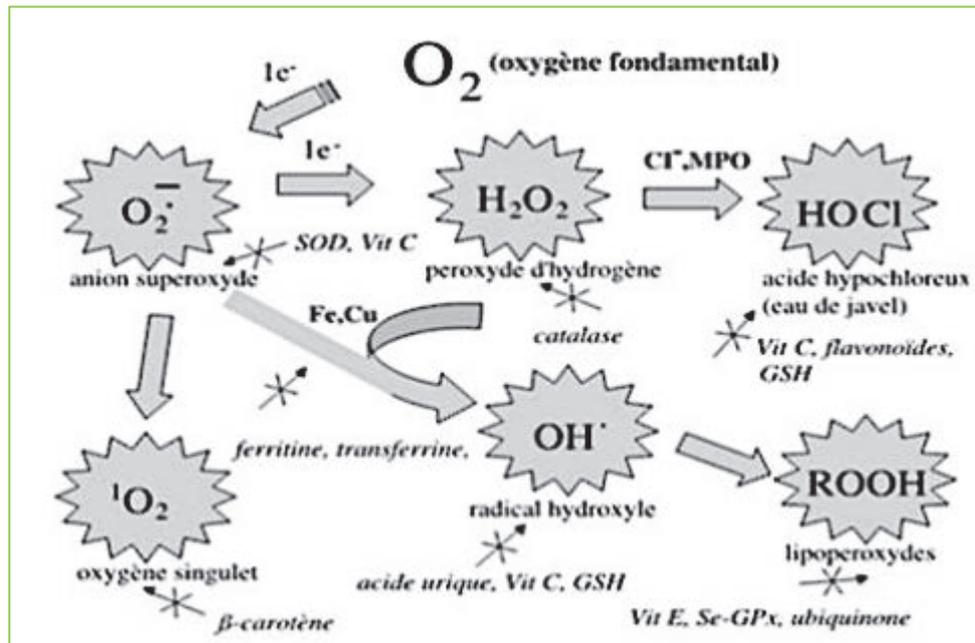


Figure 34. **Les Espèces Réactives de l'Oxygène**

Ces espèces sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux peroxydes (OH^{\bullet}). Les enzymes anti-oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion-peroxydase (GPx) permettent de réguler les ROS.

3.1.2 Mécanismes de formation des ROS

Lors des phénomènes d'hypoxie-reperfusion, l'arrêt du flux sanguin vers les tissus provoque un environnement ischémique ou hypoxique. Les ROS peuvent être générés pendant l'hypoxie dans les mitochondries et dans les tissus, ainsi que pendant la phase de reperfusion qui suit. Cette phase peut provoquer une lésion de reperfusion, se référant aux dommages causés au vaisseau et au tissu lorsque l'oxygène est réintroduit dans les tissus, conduisant à une augmentation de la concentration des espèces radicalaires (286). Dans des conditions physiologiques, la production de ROS est faible et les systèmes antioxydants endogènes suffisent pour maintenir l'équilibre entre la production et l'élimination d' $O_2^{\bullet-}$, empêchant ainsi la dégradation de NO. Dans les états pathologiques dans lesquels la production de ROS est augmentée ou la capacité antioxydante du vaisseau est diminuée, NO est transformé en ONOO⁻, entraînant une inhibition de la relaxation dépendante de l'endothélium (287) (Figure 35).

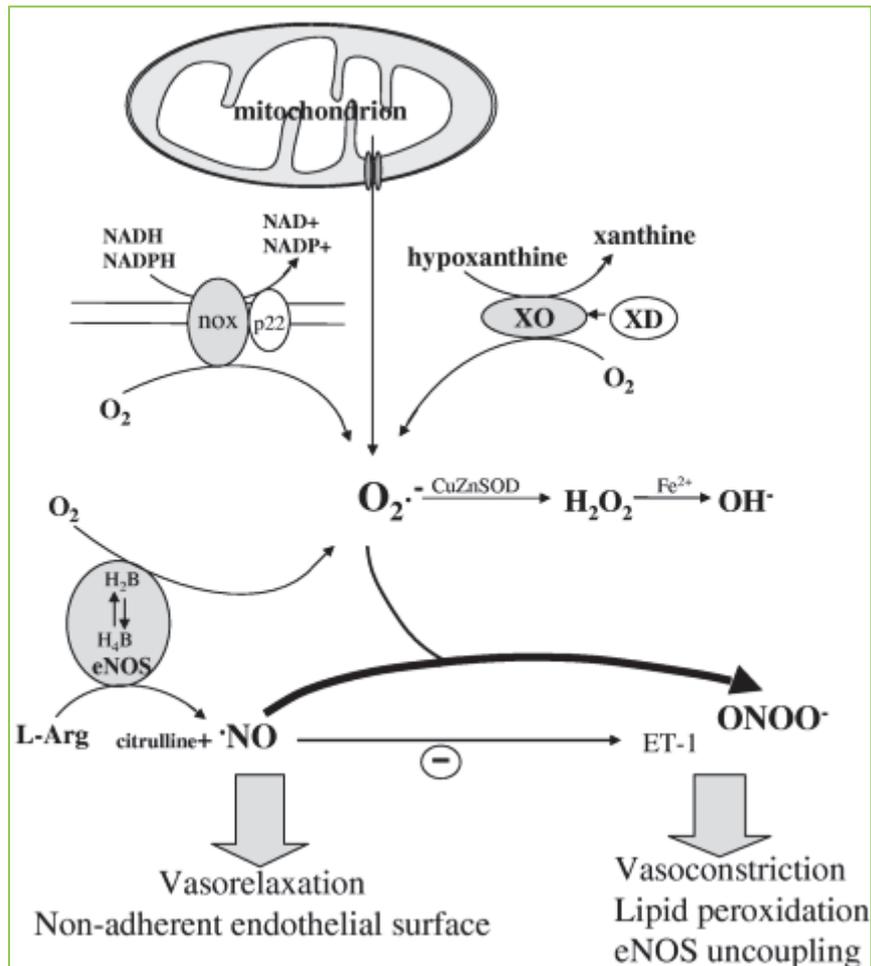


Figure 35. La production de ROS et ses conséquences lors de l'hypoxie/ reperfusion.

Tiré de (286). Dans les conditions physiologiques, eNOS forme du NO et de la citrulline à partir de la L-arginine. NO directement ou en inhibant la libération d'ET-1, favorise la vasorelaxation. Dans les épisodes d'hypoxie/reperfusion, il existe un déséquilibre entre NO et la formation d'O₂•⁻. Les enzymes contribuant à l'augmentation de la production de O₂•⁻ comprennent la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase (XO) et l'eNOS. L'excès d'O₂•⁻ se traduit par une inactivation de NO et par la formation de peroxynitrite (ONOO⁻) et, par conséquent, une diminution de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium et éventuellement une vasoconstriction. ONOO⁻ est également un puissant oxydant, il intervient dans la peroxydation des lipides et le découplage de l'eNOS. L'O₂•⁻ peut être décomposé en H₂O₂ (spontanément ou par CuZnSOD). En présence d'ions métalliques, H₂O₂ peut être métabolisé en radical hydroxyle. L-Arg, L-arginine ; H₂B, dihydrobioptérine ; H₄B, tétrahydrobioptérine ; XD, xanthine déshydrogénase ; SOD, superoxyde dismutase.

La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire de ROS : dans les cellules non phagocytaires, 49 à 80 % des anions superoxydes proviennent du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ces ROS mitochondriales, dont la production est dépendante du fonctionnement de la chaîne respiratoire, sont spécifiquement considérées comme des senseurs de l'environnement, permettant aux cellules de s'adapter à ses fluctuations. La production de ROS mitochondriales est intrinsèque au fonctionnement de la chaîne respiratoire. En effet, les voies métaboliques associées aux différents nutriments convergent vers l'acétylCoA, dont la prise en charge par le cycle de Krebs libère de l'énergie sous forme d'équivalents réduits, NADH, H⁺ et FADH₂, donneurs d'électrons à la chaîne

respiratoire. Les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H₂O. L'énergie ainsi libérée (sous forme d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne) est alors utilisée par l'ATP synthétase pour synthétiser l'ATP : ce sont les oxydations phosphorylantes (288).

Dans ces conditions, le fonctionnement de l'ATP synthétase est couplé à celui de la chaîne respiratoire. Une proportion significative de l'oxygène (2 % à 6 %) échappe à la réduction complète en H₂O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (289), pour donner naissance à l'ion superoxyde (O₂^{•-}) : cette production est absolument indissociable du processus respiratoire. Plusieurs systèmes anti-oxydants mitochondriaux, localisés en différents sites, prennent en charge O₂^{•-} et ses dérivés (Figure 36). Lorsque le fonctionnement de la chaîne respiratoire est normal et que le potentiel de membrane est faible, la production d'O₂^{•-} par les complexes I et III s'effectue au cours du transfert des électrons du complexe I au cycle des quinones (forward electron transfer). Au niveau du complexe III, c'est le coenzyme Q, sous sa forme ubisemiquinone QH., qui est responsable de la production d'O₂^{•-}. Lorsque le potentiel de membrane est élevé (en l'absence d'ADP) et lorsque du FADH₂ est utilisé par le complexe II, il y a production d'O₂^{•-} au sein du complexe I via le flux inverse (reverse electron transfer) (290).

Le radical hydroxyle peut également oxyder les protéines ou l'ADN (mitochondrial et nucléaire), et induire la peroxydation lipidique (elle-même limitée par des piègeurs de radicaux libres, de nature lipophile, tels que la vitamine E ou le coenzyme Q). Il est important de souligner ici la dualité d'action du coenzyme Q : piègeur de radicaux libres, sous forme réduite, dans les membranes biologiques, il est la source essentielle d'O₂^{•-} dans la chaîne respiratoire

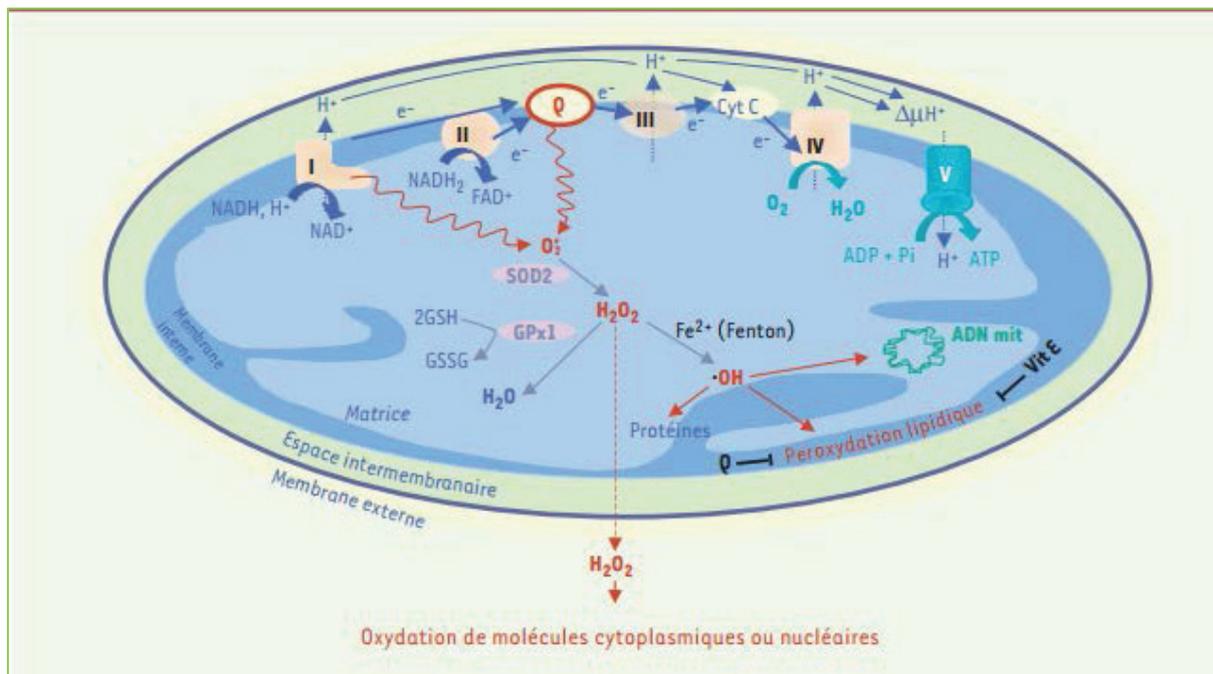


Figure 36. Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde

Au cours du transfert des électrons dans des conditions physiologiques, il peut y avoir des fuites d'électrons et production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par le complexe I et le coenzyme Q. $O_2^{\bullet-}$ est métabolisé par la superoxyde dismutase (SOD2,) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci peut être décomposé en H_2O par le glutathion peroxydase (GPx1), en présence de glutathion réduit (GSH), se transformer en radical hydroxyle ($\cdot OH$) par la réaction de Fenton, en présence de Fe^{2+} , ou encore diffuser dans le cytoplasme et modifier l'activité des protéines cytoplasmiques ou nucléaires en les oxydant. (280).

Les cellules phagocytaires sont une autre source importante de ROS. Elles libèrent des produits toxiques, qui incluent le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). (291). Il en est de même pour l'apoptose qui est un processus de mort cellulaire programmée. Le système microsomal mono-oxygénase cytochrome P450-dépendant (MMO) est l'une des principales sources de ROS dans le réticulum endoplasmique, notamment de H_2O_2 (292, 293).

La plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes $O_2^{\bullet-}$ via une activité des enzymes spécifiques de type cellulaire. Il s'agit entre autres, de la NADPH oxydase membranaire (NOX), la myéloperoxydase (MPO) et la NO synthase (NOS). La NOX et la NOS des phagocytes, ont un rôle majeur dans l'inflammation et dans l'immunité innée. La MPO des neutrophiles a un rôle majeur dans les défenses et l'inflammation. Ces ROS produites par ces enzymes sont donc détruites par un système antioxydant qui comprend des enzymes telles que la catalase, la glutathion peroxydase (GPx) ou la superoxyde dismutase (SOD) (Figure 37).

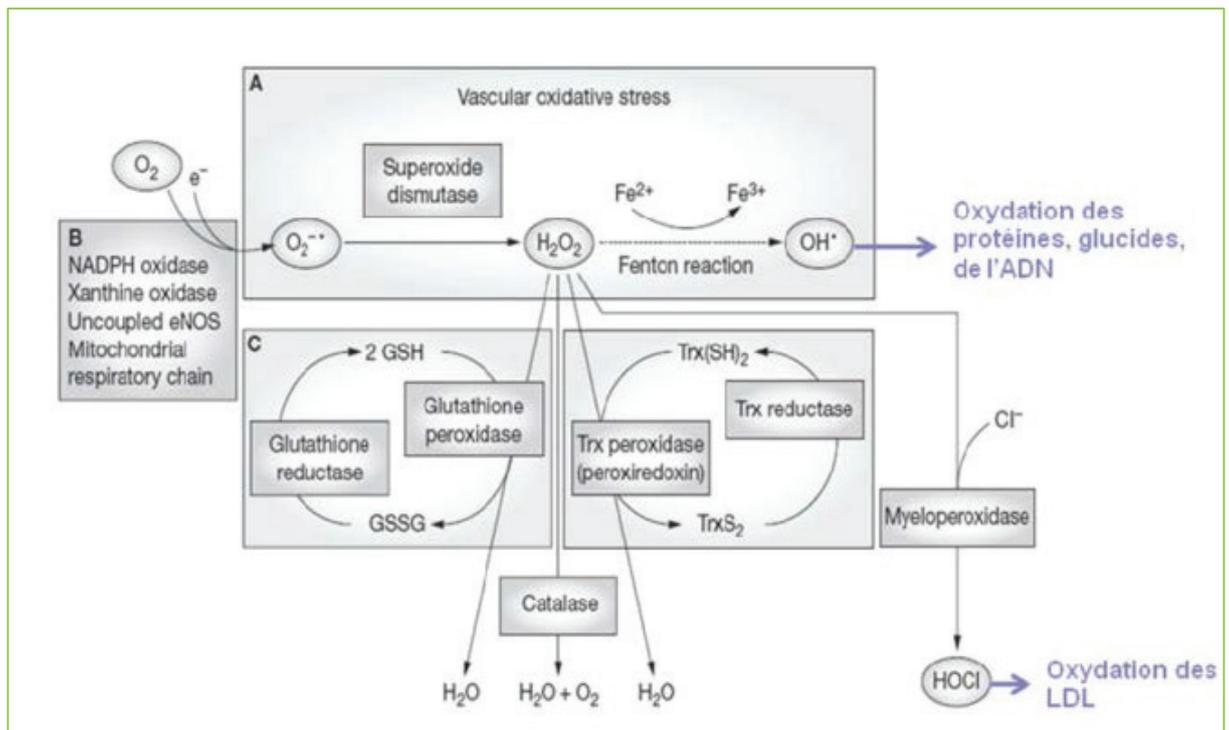


Figure 37. **Enzymes impliquées dans la génération et l'inactivation des ROS**

(294).**A**) La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène entraîne un stress oxydatif. **(B)** O_2 réagit avec un électron altéré pour former un superoxyde. De nombreuses études impliquent des NADPH oxydases, de la xanthine oxydase, des eNOS non couplés et la « fuite » d'oxygène activé des mitochondries au cours de la respiration oxydative en tant que sources importantes d'anion superoxyde superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). L'anion superoxyde peut être converti en peroxyde d'hydrogène par l'enzyme la superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène peut subir une conversion spontanée en hydroxyle radical (l'état de réduction de trois électrons de l'oxygène moléculaire) par la réaction de Fenton. Les radicaux hydroxyles sont extrêmement réactifs et attaquent la plupart des composants cellulaires. **(C)** Le peroxyde d'hydrogène peut également être détecté par le glutathion peroxydase, la catalase ou la thiorédoxine peroxydase en eau et en oxygène. L'enzyme myéloperoxydase peut utiliser le peroxyde d'hydrogène pour oxyder le chlorure (Cl^-) en acide hypochloreux ($HOCl$), un agent fortement oxydant, qui peut chlorer et, de ce fait, inactiver diverses biomolécules, notamment les lipoprotéines et le substrat du eNOS, L-arginine. La myéloperoxydase peut aussi oxyder l'oxyde nitrique en nitrite dans le système vasculaire. Cl^- , chlorure ; e^- , électron non apparié ; eNOS, oxyde nitrique synthase endothéliale ; Fe^{2+} , ion ferreux ; Fe^{3+} , ion ferrique ; GSH, glutathion monomère ; GSSG, le disulfure de glutathion ; $HOCl$, acide hypochloreux ; H_2O , eau ; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène ; O_2 , oxygène moléculaire ; $O_2^{\cdot-}$, anion superoxyde ; $OH\cdot$, radical hydroxyle ; Trx, thiorédoxine.

3.1.2.1 Système Xanthine oxydo-réductase

L'enzyme cytosolique xanthine oxydo-réductase est interconvertible en xanthine oxydase (XO) ou xanthine déshydrogénase (XDH) (295). Cette enzyme intervient dans le métabolisme de l'acide urique à partir de l'hypoxanthine et de la xanthine. Suivant les conditions d'oxygénation, l'une ou l'autre des formes métabolisera la réaction. Ainsi, en conditions ischémiques, l'ATP est catabolisée en ADP, AMP puis hypoxanthine, qui est alors pris en charge par la XDH utilisant le $NADP^+$ comme cofacteur pour former du NADPH et de la xanthine. Cette dernière est ensuite transformée en acide urique par la XDH + $NADP^+$. Dès lors que l'oxygénation redevient suffisante (= reperfusion), c'est la XO qui métabolise

l'hypoxanthine et la xanthine en utilisant comme cofacteur l'O₂ pour former de l'acide urique et de l'O₂⁻ (Figure 38) (285). La XO constitue alors un fournisseur non négligeable de ROS lors de la phase de reperfusion (296).

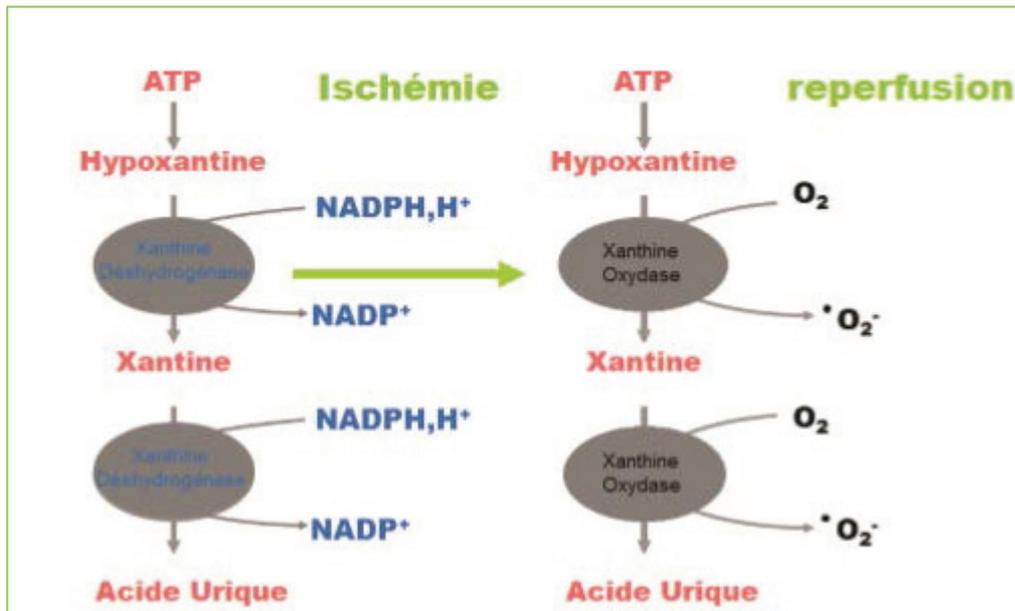


Figure 38. Effet de l'ischémie-reperfusion sur le système xanthine oxydoréductase

Dans un environnement pauvre en oxygène, l'hypoxanthine est transformée en acide urique grâce à la xanthine déshydrogénase et le cofacteur NADPH. Au moment de la reperfusion, c'est la xanthine oxydase qui, en consommant de l'O₂, forme de l'acide urique et de l'anion superoxyde O₂⁻ à partir d'hypoxanthine.

Dans des conditions hypoxiques, comme on les voit dans la drépanocytose, l'adénosine triphosphate (ATP) est consommée en adénosine diphosphate et en adénosine monophosphate. Si l'apport d'oxygène continue de diminuer, l'adénosine monophosphate est catabolisée, entraînant l'accumulation d'hypoxanthine et de xanthine dans le tissu (286, 297, 298).

3.1.2.2 Systèmes NADPH oxydase

En parallèle de la production de ROS par le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire, la plupart des cellules sont capables de produire des radicaux superoxydes O₂⁻ via une activité NAD(P) H oxydase membranaire (NOX). Les NOX sont des enzymes qui catalysent la réduction mono-électronique de l'O₂ en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons (299) avec génération de radicaux superoxydes.



Les NOX sont classées en trois groupes qui se distinguent par la présence de domaines additionnels, en plus de la sous-unité catalytique NADPH oxydase. Le premier

groupe comprend les NOX1 à 4 qui possèdent uniquement la sous-unité catalytique (300). La NOX5 possède un domaine calmodulin-like additionnel (301). Le troisième groupe comprend les Dual oxydases ou DUOX, nommées ainsi car en plus de la sous-unité NADPH oxydase, d'un domaine calmodulin-like, il existe un domaine homologue aux peroxydases à hème comme les myéloperoxydases et les lactoperoxydases.

Les NOX ont été initialement étudiées dans les cellules phagocytaires où elles jouent un rôle primordial dans la défense contre les pathogènes, mais elles existent également dans toutes les autres cellules non phagocytaires où elles participent à la signalisation cellulaire. Le NADPH est alors utilisé comme donneur d'électrons pour réduire l'O₂ en O₂^{•-} qui sera ensuite rapidement dismuté en H₂O₂. Mais ce dernier, faiblement microbicide, sera à son tour transformé en anions hypochlorite (ClO⁻), composé halogéné extrêmement toxique pour les agents microbiens, par l'enzyme myéloperoxydase (MPO) (302). Ainsi, dans des conditions pro-inflammatoires, la quantité de phagocytes activés augmente et la production de ROS médiée par la NADPH oxydase est exacerbée (303).

D'autres sources ou modes de génération exogène des ROS existent de par les interactions avec leur milieu environnant. Par exemple, l'ingestion ou l'inhalation de toxiques, de produits oxydés ou oxydants (304, 305), ou encore les radiations (306, 307) sont autant de situations pouvant produire un stress oxydant.

3.1.2.3 Myéloperoxydase

La MPO est une peroxydase héminique qui catalyse la réaction suivante :



L'acide hypochloreux (HOCl) produit par la MPO à partir du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un oxydant fort, bactéricide et pouvant agir sur de nombreuses molécules (308). L'enzyme est présente en concentrations importantes dans les granules primaires des cellules polynucléaires neutrophiles (PNNs) (309). Elle est largement utilisée comme un marqueur biochimique pour l'infiltration des neutrophiles dans la muqueuse gastrique blessée (310).

Une élévation de la myéloperoxydase (MPO) est le reflet d'une intense activation leucocytaire et par conséquent la preuve indirecte que des ROS ont été produits dans des situations pathologiques. La MPO est un facteur prédictif de risque cardio-vasculaire, elle reflète l'activation très précoce des neutrophiles au niveau de la plaque d'athérosclérose.

Elle est aussi un marqueur de l'inflammation et son dosage est à mettre en parallèle avec la CRP ultra-sensible. En effet, des études ont montré que la MPO serait un marqueur potentiel de l'athérosclérose. Les individus déficitaires en MPO présenteraient moins de maladies cardiovasculaires alors qu'une élévation des taux de MPO serait associée avec un risque plus élevé de maladie coronarienne. Une MPO > 350 µg/ L permettrait d'identifier les personnes à risque d'infarctus du myocarde dans une période de 1 à 6 mois avant l'attaque (311).

Les ROS causent de sévères dommages à l'ensemble de la cellule en affectant l'ADN, les lipides avec la formation de malonyldialdéhyde (MDA) et les protéines avec la formation de produits avancés d'oxydation des protéines, AOPP (Advanced Oxidation Protein Products).

✓ **Produits d'oxydation avancée des protéines (AOPP ou Advanced Oxidation Protein end Products)**

Les produits finaux d'oxydation avancée des protéines (AOPP) sont des marqueurs de l'oxydation des protéines et des dommages oxydatifs. Les protéines peuvent subir une oxydation de leurs acides aminés les plus sensibles à l'oxydation, comme la cystéine, le tryptophane, la valine, la phénylalanine et la méthionine. Les protéines subissent aussi une glycosylation non covalente par une attaque radicalaire du glucose ou de l'ascorbate en présence de métaux de transition (312). Ces sous-produits sont plus stables que les lipides peroxydés mais restent de bons indicateurs du statut oxydant général (313). L'acide hypochloreux produit par les phagocytes peut également réagir avec les résidus tyrosine des protéines pour former au final des AOPP. Des concentrations d'AOPP plasmatiques élevées sont associées à un grand nombre de désordres pathologiques (314-317).

✓ **Malonyldialdéhyde (MDA)**

Les acides gras polyinsaturés sont les plus susceptibles d'être peroxydés. En présence d' OH^\bullet , l'atome d'hydrogène se détache facilement des doubles liaisons dont sont riches les acides gras polyinsaturés qui deviennent alors des radicaux peroxydes (ROO^\bullet) (318). Une fois formés, ces ROO^\bullet peuvent être réarrangés, après une réaction de cyclisation, en endoperoxydes dont les produits finaux particulièrement toxiques sont le malonyldialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). Le MDA peut altérer la stabilité de l'HbA et présente des effets mutagènes et carcinogènes tandis que le 4-HNE est hautement cytotoxique et joue le rôle de second messenger des ROS dans la signalisation cellulaire (319).

De par leur pertinence dans l'évaluation de l'état oxydant, ils sont tous deux fréquemment utilisés comme biomarqueurs par la communauté de recherche biomédicale.

✓ **Domage de l'ADN**

Il existe au sein de la cellule, deux « types » d'ADN : l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS du fait de son potentiel de séparation plus faible que celui de l'ADN nucléaire et de sa proximité directe de l'une des principales sources cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale.

En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire (320). Les mécanismes explicatifs proposés sont : 1°) l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial, 2°) sa localisation proche de la membrane interne, 3°) des mécanismes de réparations frustrés, 4°) une structure circulaire sans introns augmentant statistiquement le risque de mutations pathogènes (321, 322).

Selon Granjean (323), les altérations de l'ADN sont essentiellement causées par le radical hydroxyle HO° et sont de différents types :

- modification de base azotée, en particulier la guanine qui peut être transformée en 8-hydroxy-2'-deoxyguanine ou encore la thymine en thymine glycol. Cela entraîne un non appariement, ou encore un blocage de la réplication de l'ADN,
- destruction de la liaison entre la base et le désoxyribose, à l'origine d'un site dépourvu de base qui s'avère être non fonctionnel,
- destruction du désoxyribose, responsable d'une cassure de brin létale pour la cellule,
- formation de pontages avec les protéines ou avec des dérivés d'oxydation lipidique (tel que le MDA).

3.1.3 Les principaux systèmes anti-oxydants

En condition physiologique, le pouvoir oxydant des ROS est contrebalancé par de nombreux antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Cet état d'équilibre permet à l'organisme d'assurer une défense anti-infectieuse efficace (324) et de contribuer à la transduction de signaux intracellulaires (325). Les défenses antioxydantes permettent de prévenir la génération de ROS, d'inactiver ceux-ci ou encore de limiter leurs effets délétères (326).

Comme nous l'avions mentionné plus haut, le maintien de l'intégrité et de l'efficacité de la chaîne de transferts des électrons dans la mitochondrie permet de limiter au maximum les fuites électroniques conduisant à la formation de ROS. De plus, de nombreuses molécules, à savoir la ferritine, la transferrine, la céruloplasmine, l'albumine, la lactoferrine et bien d'autres, permettent de chélater les métaux de transition impliqués dans la formation de radicaux hydroxyles lors des réactions de HaberWeis et Fenton (327). Elles sont réparties dans l'organisme et permettent de diminuer la production de ROS (328).

Plusieurs enzymes sont également impliquées dans la défense antioxydante. Les trois enzymes antioxydantes majeures sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Aussi bien l'activité que l'expression des gènes codants pour ces enzymes peuvent être augmentées lors d'un stress oxydant (329) (Figure 39).

L'expression des gènes antioxydants est assurée par des facteurs de transcription comme le « nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 » (Nrf2). Le facteur de transcription Nrf2 est exprimé dans plusieurs types tissulaires et cellulaires.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'activation, par le stress oxydant, de la voie Nrf2- Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1) ayant pour résultat la suractivation des gènes antioxydants via la séquence ERA « élément de réponse antioxydante », une région qui contrôle l'expression basale et inductible des gènes antioxydants (330-332) (Figure 40). Le pouvoir antioxydant du Nrf2 provient de sa capacité à induire l'expression de gènes antioxydants lorsqu'il se lie sur la séquence ERA. Parmi ces gènes, il y a NQO1 (NAD(P)H : quinone oxydoréductase 1), GST Ya (Glutathion S transférase Ya) et HO-1 (Hème oxygénase) (330).

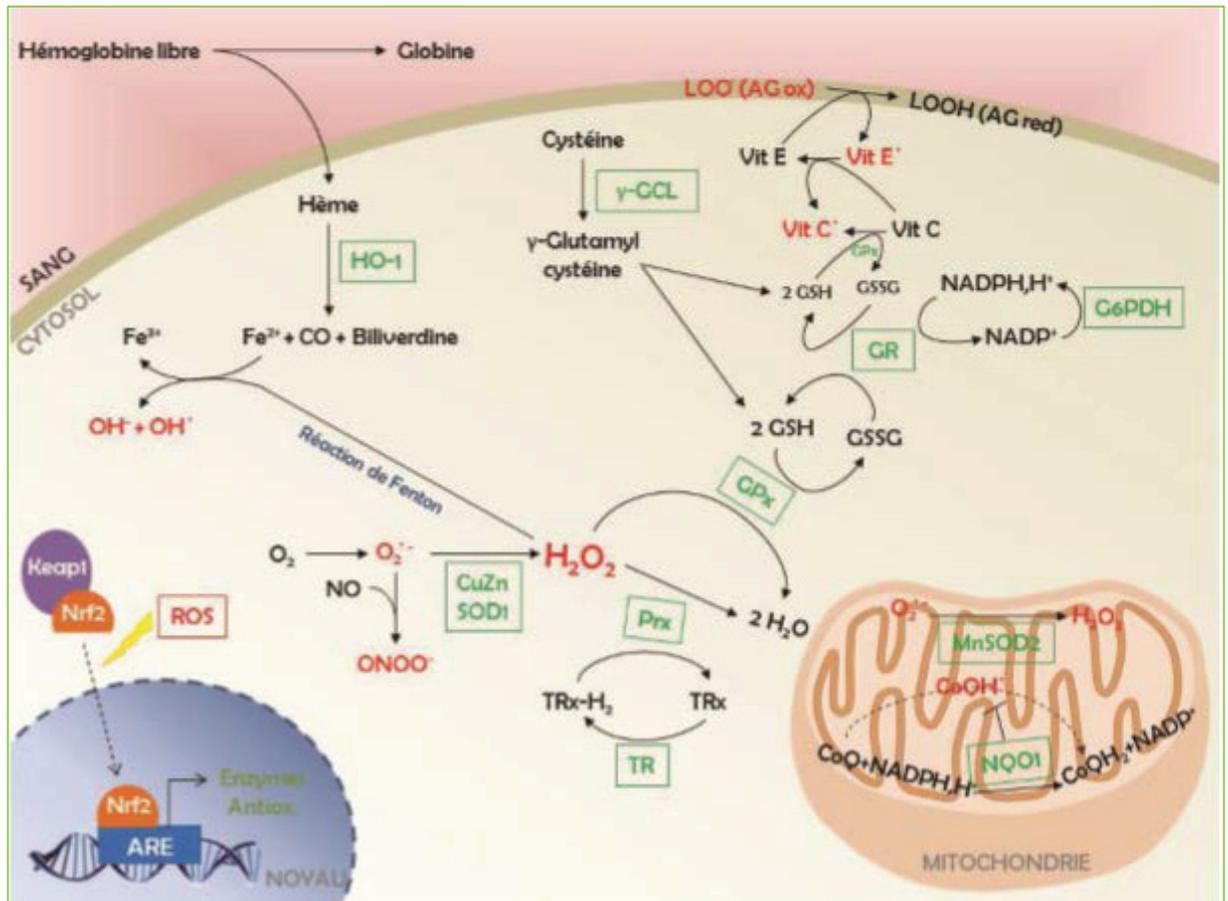


Figure 39. **Systèmes antioxydants dans une cellule endothéliale**

En rouge, les agents pro-oxydants. En vert, les enzymes antioxydantes. Lors de l'hémolyse, l'hémoglobine se dissocie et libère ses noyaux hèmes qui s'intercalent dans la membrane plasmique. L'hème est hautement réactif et génère un stress oxydant qui est détecté par Keap1, protéine redox-sensible séquestrant Nrf2 à l'état basal. La protéine Keap1 change alors de conformation, le complexe Keap1-Nrf2 n'est plus reconnu par le protéasome. Les protéines Keap1 sont saturées en Nrf2 et les Nrf2 néosynthésés se retrouvent libres dans le cytosol, puis transloquent dans le noyau où ils se fixent au niveau des ARE situés dans la région promotrice des gènes de la plupart des enzymes antioxydantes. Ces enzymes fonctionnent de façon synergique et complémentaire pour lutter efficacement contre l'excès d'agents pro-oxydants et limiter ainsi les dommages cellulaires. Fe³⁺ : ion ferrique ; Fe²⁺ : ion ferreux ; CO : Monoxyde de carbone ; HO-1 : Hème oxygénase-1 ; γ-GCL : γ-glutamyl cystéine ligase ; LOO• : Acide gras (AG) peroxydé ; LOOH : AG réduit ; Vit E : Vitamine E réactive ; Vit C : Vitamine C réactive ; GPx : Glutathion peroxydase ; GSH : Glutathion réduit ; GSSG : Glutathion oxydé ; G6PD : Glucose 6-phosphate déshydrogénase ; GSR : Glutathion réductase ; Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein-1 ; Nrf2 : Nuclear factor erythroid-related factor-2 ; ARE : Antioxidant response element ; O₂^{•-} : anion superoxyde ; ONOO⁻ : peroxy-nitrite ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; Prx : Peroxyredoxine ; TRx-H₂ : Thioredoxine réduite ; TRx : Thioredoxine oxydée ; TR : Thioredoxine réductase ; CoQ : Coenzyme Q ; CoQH• : radical Coenzyme Q réduite ; CoQH₂ : Coenzyme Q réduite.(333).

Parmi les cibles du Nrf2, certaines sont impliquées dans le métabolisme du glutathion (GSH). La synthèse du GSH dépend des niveaux de cystéine disponibles et de l'activité de l'enzyme responsable de sa synthèse c'est-à-dire la glutamate-cystéine ligase. Un échangeur permet l'entrée de cystéine dans la cellule, en échange de la sortie d'un glutamate. Il s'agit du système x(-) (c), dont l'expression génique est régulée par l'activation de Nrf2 (334). De plus, l'expression génique des deux sous-unités de l'enzyme glutamate-cystéine ligase est modulée par le Nrf2 (335). L'enzyme glutathion synthétase contient également des sites ERA

au niveau de son promoteur, ce qui indique que son expression pourrait être modulée par le Nrf2 (336). L'enzyme glutathion peroxydase (GPx) est aussi une cible de Nrf2 puisque dans les cellules Caco-2, l'expression génique de la GPx est induite par la surexpression de Nrf2 et renversée par la surexpression de son inhibiteur Keap-1 (337). Dans des cellules épithéliales pulmonaires, l'invalidation de Keap-1 augmente l'expression génique de la GPx, alors qu'elle est diminuée par l'invalidation du Nrf2 (338). L'enzyme glutathion réductase (GR) est également modulée par le Nrf2. En effet, les cellules pulmonaires de souris Nrf2^{-/-}, exposées à de la fumée de cigarette, ont une expression réduite de la GR (339).

Nrf2 pourrait aussi être impliqué dans la régulation de l'expression des SODs et de la catalase (340). En effet, une étude clinique a démontré que l'administration de Prostandim, un activateur du Nrf2, induit une augmentation de 30% de la SOD et 54% de la catalase (341).

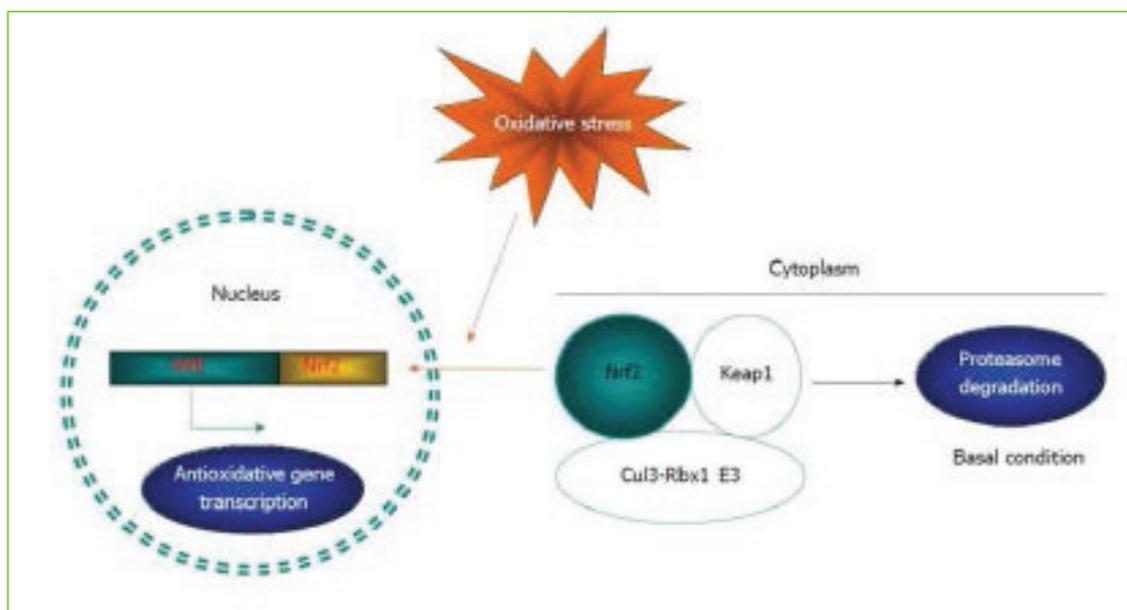


Figure 40. **Activation des gènes antioxydants par le stress oxydant activant Nrf2**

Le stress oxydant favorise l'expression des gènes antioxydants en activant le Nrf2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like 2). À l'état basal, le niveau de Nrf2 libre est très faible car il forme un complexe avec Keap1 et la ligase E3 CUL3-Rbx-1 conduisant à sa dégradation par le protéasome. En situation de stress oxydant, le niveau de Nrf2 libre augmente car il est dissocié de Keap1. Les molécules Nrf2 entreront ensuite dans le noyau, liront l'élément cis du ARE et stimuleront l'expression des gènes cibles du Nrf2. ARE : élément de réponse antioxydant; CUL3 : Cullin 3; E3: ubiquitine ligase; Keap1 : Kelch-like ECH-associated protein 1; Rbx-1 : RING box protein 1.

3.1.3.1 Superoxyde dismutase

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Figure 41). Le

peroxyde d'hydrogène formé (H_2O_2) est pris en charge par les catalases (présentes en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques) et les glutathion peroxydases à sélénium. Chez l'homme, 3 isoenzymes sont décrites : la Cu/Zn-SOD1 cytosolique, la Mn-SOD2 mitochondriale et la Cu/Zn-SOD3, qui diffèrent par la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire. La SOD3 est sécrétée par les cellules musculaires lisses et constitue le système antioxydant majeur de la paroi artérielle, son expression et sa sécrétion sont augmentées par les facteurs vasoactifs (histamine, endothéline 1, angiotensine II) et diminuées par l'homocystéine (342). SOD1 et SOD3 sont des dimères, l'une est une enzyme cytosolique et l'autre est une enzyme extracellulaire. Ces deux formes sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes que chez les bactéries. L'ion cuivre est essentiel dans la réaction de dismutation tandis que l'ion zinc est nécessaire au maintien de la structure protéique (343).

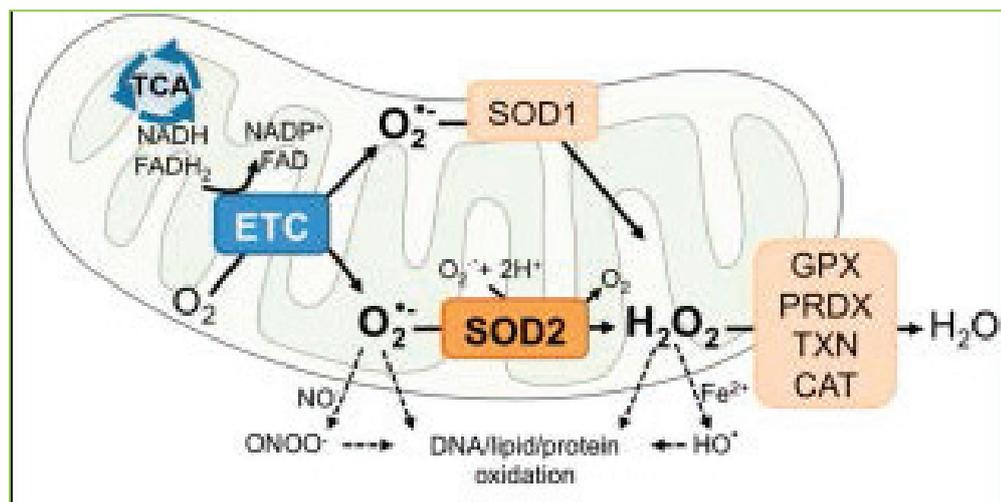
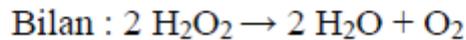
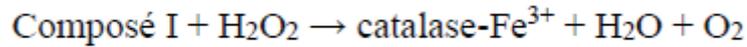
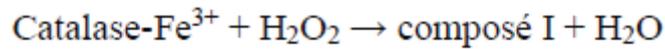


Figure 41. **Fonction de la SOD2 mitochondriale**

Tiré de (344). SOD2 est localisée dans la matrice mitochondriale pour catalyser la dismutation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . H_2O_2 est encore métabolisé par la catalase (CAT) dans les peroxysomes ou par le système glutathion peroxydase (GPX), peroxyredoxin (PRDX) / thiorédoxine (TXN), dont les isoformes se trouvent dans les mitochondries et le cytosol. $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 peuvent réagir pour former d'autres oxydants, tels que le peroxydinitrite ($ONOO^-$) ou le radical hydroxyle (HO^{\bullet}). En fonction de la réactivité ou de la quantité d'oxydant, l'oxydation subséquente des macromolécules peut conduire à des degrés variables de résultats cellulaires, y compris des changements dans la signalisation redox (par exemple oxydation et inactivation de la phosphatase) ou irréversibles (dommages à l'ADN).

3.1.3.2 Catalase

La catalase ou CAT est une enzyme tétramérique contenant un groupe hème qui catalyse la décomposition du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Son action a été découverte au début du 19ème siècle par un français (345). La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène :



La catalase est composée de 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement héminique avec Fe^{3+} lié au site actif. Chaque molécule a habituellement une molécule de NADPH, H^+ qui lui est liée, la protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de l'activité catalase (346).

Elle est ubiquitaire, présente en faible concentration dans de nombreux organes tels que le cerveau, cœur et muscle squelettique mais fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. Dans toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, l'activité de la catalase est localisée presque exclusivement dans les peroxysomes (riches en oxydases) (347). Chez l'homme, des individus atteints d'acatalasémie, une affection bénigne héréditaire se caractérisant par une déficience en catalase, semblent être asymptomatiques (348). Des études sur des modèles animaux ont montré que la catalase pouvait être induite par diverses cytokines en condition d'hyperoxie et par certains oxydants in vitro (349-351). Mais des résultats contradictoires ont été rapportés (352). De plus, il a été montré que la catalase pouvait prévenir les dommages à l'ADN produit par l'ozone (353). Une surexpression de la catalase a montré des effets protecteurs dans le système cardiovasculaire en inhibant l'hypertrophie aortique induite par l'AngII (354) et en retardant le développement de l'athérosclérose (355).

De hauts niveaux de H_2O_2 intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la catalase tandis que de plus faibles niveaux seraient préférentiellement pris en charge par la GPX. Ces mécanismes redondants deviennent ainsi complémentaires (356).

3.1.3.3 Les Gluathion peroxydases (GPx)

Les GPx font partie d'un système complet qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 . Ce système prend aussi en charge des lipides peroxydés. La GPx est l'enzyme clef du système et nécessite la présence de glutathion réduit (GSH) comme donneur d'électron. Le glutathion disulfite (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron. Le rapport

GSH/GSSG est un index de l'état d'oxydation dans la cellule (346, 357). La GPx est capable de détoxifier d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases) (357).

D'autres enzymes comme la glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases et l'hème oxydase présentent également une activité anti-oxydante relativement importante.

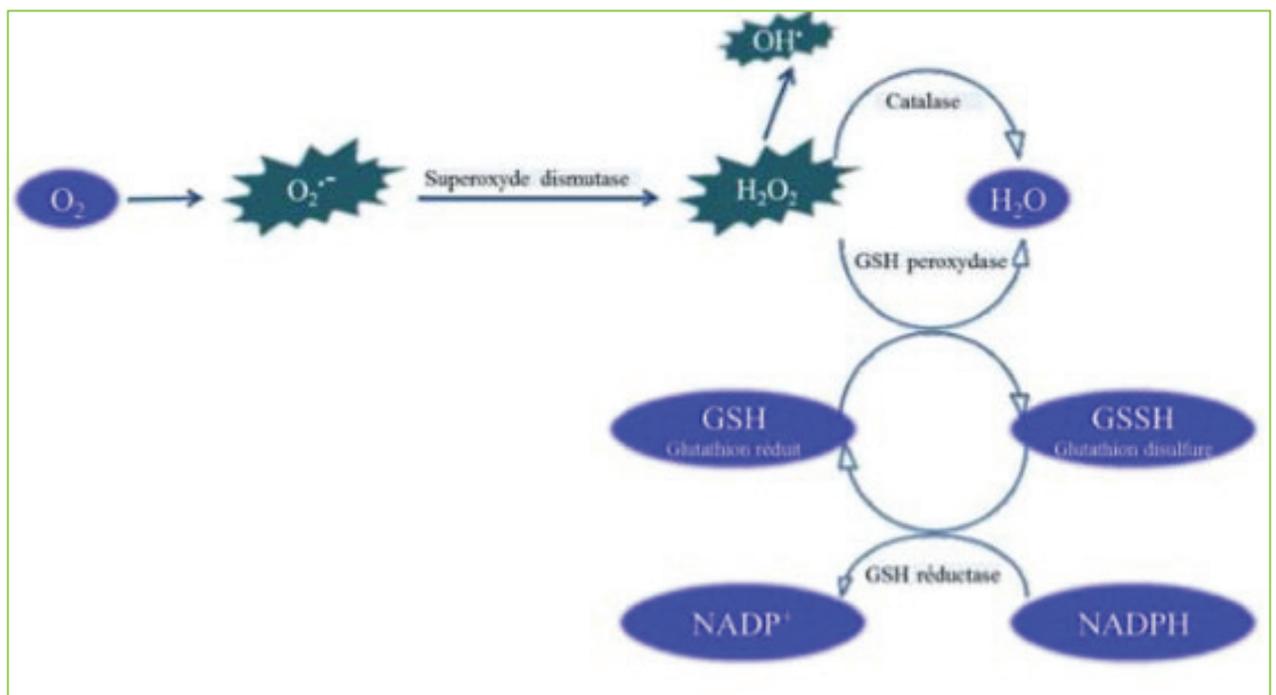


Figure 42. Mécanismes de défense anti-oxydant

Il existe plusieurs isoformes de GPx contenant du sélénium (358, 359), la GPx cytosolique et mitochondriale, présente dans la plupart des tissus ; ii) la GPx phospholipide-hydroperoxyde (HPGPx) se trouve dans le cytosol et peut directement réduire les phospholipides hydroperoxydes, et les hydroperoxydes de cholestérol ; iii) et enfin la GPx extracellulaire. A la différence de la GPx qui n'est capable de réduire les peroxydes membranaires qu'après action de la phospholipase A2, et qui n'agit que sur les acides gras hydroperoxydés, la HPGPx réduit directement les hydroperoxydes du cholestérol, des cholestéryl-esters, et des phospholipides présents dans des membranes oxydées ou des lipoprotéines oxydées.

3.1.3.4 Systèmes anti-oxydants non enzymatiques

Bien qu'une grande variété d'anti-oxydants non-enzymatiques existe, la quantité produite de façon endogène n'est pas suffisante pour protéger les cellules des attaques oxydantes et nécessite d'être complétée par l'alimentation (318). Dans cette catégorie d'anti-oxydants nous retrouvons des oligoéléments, le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

✓ Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro-oxydante (réaction de Fenton, d'Haber-Weiss).

✓ Glutathion

Le glutathion réduit (GSH) participe à la dismutation du peroxyde d'hydrogène et/ou des peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (318, 360, 361). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car, plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (362).

✓ Ubiquinones, cytochrome c

Les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouent un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (360). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxyde. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (361).

Le cytochrome c présent dans l'espace inter-membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre du radical superoxyde produit au niveau de la chaîne respiratoire.

Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l'H₂O (363).

✓ Vitamine E et vitamine C

Les vitamines E (α -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importants dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (318, 361, 364).

La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l'O₂^{•-} et l'OH[•]. Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (361, 364).

Des métaux jouent également des rôles non négligeables dans la défense antioxydante. Ainsi, le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et dans certains micro-organismes le nickel (Ni), jouent un rôle important en tant que catalyseur de la SOD (365). De la même façon, le sélénium (Se) est l'élément catalyseur de la GPx. Un déséquilibre entre oligo-éléments, par exemple un excès de cuivre par rapport au zinc, peut également favoriser l'apparition d'un stress oxydant (366, 367). Étant donné que les oligo-éléments interviennent également dans la régulation du système immunitaire, leur rôle a été investigué en médecine humaine (368, 369)

Plusieurs autres groupes de molécules hydrophiles et lipophiles participent à la défense antioxydante, ce sont les antioxydants hydrophiles et lipophiles. Les tocophérols, les rétinoïdes, les flavonoïdes, l'ubiquinol, la bilirubine ainsi que la mélatonine font partie des antioxydants lipophiles, spécialisés dans la protection des lipides et dans l'interruption des réactions en chaîne lors de la peroxydation lipidique. À côté du glutathion, l'acide urique, la vitamine C, les dérivés thiol, les protéoglycanes et l'acide hyaluronique font quant à eux partie des antioxydants hydrophiles, capables de protéger de l'oxydation tant les lipides, les protéides, que l'ADN.

3.2 Stress oxydant et drépanocytose

3.2.1 Rôle du stress oxydant dans le cercle vicieux drépanocytaire

Le cercle vicieux drépanocytaire inclut des complications pathologiques « néfastes » telles que la falciformation, l'hémolyse, l'inflammation, les CVO et les épisodes d'hypoxie/reperfusion à l'origine d'une altération de la balance pro oxydants / antioxydants

via une augmentation de la production de ROS ou une diminution des défenses antioxydantes (370) (Figure 43).

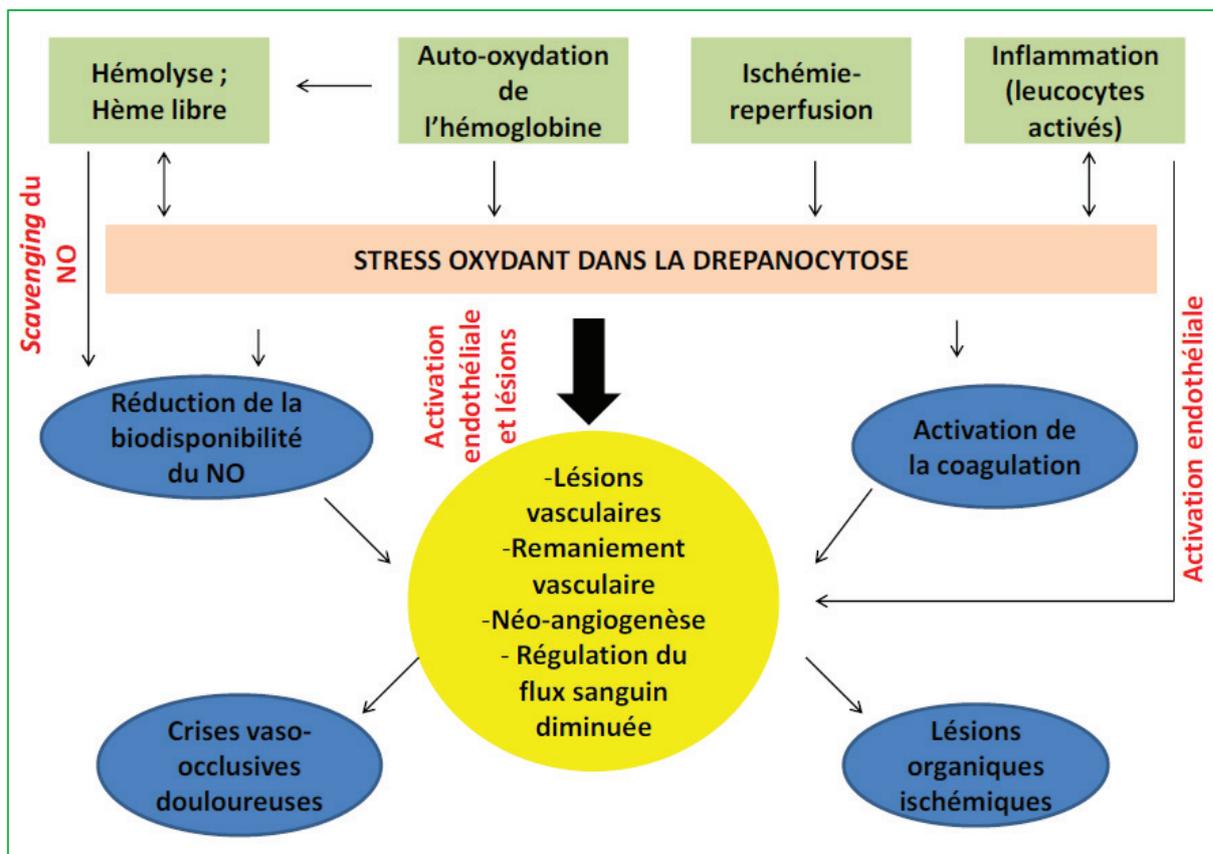


Figure 43. Sources et rôle physiopathologique du stress oxydant dans la drépanocytose (371).

La production de stress oxydant dans la drépanocytose est multifactorielle et peut s'expliquer par :

- l'hémolyse accrue conduisant à une augmentation de l'hème libre fortement impliquée dans la production de ROS ;
- l'auto-oxydation de l'hémoglobine S qui engendre une production de ROS 1,7 fois supérieure à celle de l'Hb A ;
- l'augmentation de l'ischémie-reperfusion, exacerbée par l'adhésion cellulaire à l'endothélium, qui va stimuler la production de ROS via notamment la xanthine oxydase ;
- le contexte inflammatoire bien caractérisé dans la maladie drépanocytaire. Il est encore aujourd'hui difficile de dire si l'état pro-inflammatoire chronique retrouvé dans la drépanocytose contribue à l'exacerbation du stress oxydant dans la pathologie ou inversement. De plus en plus d'études démontrent une relation plutôt bidirectionnelle entre inflammation et stress oxydant.

Les espèces réactives produites au cours du stress oxydant sont impliquées dans la falciformation des globules rouges, l'adhérence cellulaire à l'endothélium, la modulation du tonus vasculaire et l'inflammation, à l'origine des crises vaso-occlusives douloureuses et des lésions organiques.

Plusieurs études ont rapporté au repos chez les patients drépanocytaires une augmentation de la peroxydation lipidique (372-378) et de l'oxydation des protéines (375, 379, 380) aux niveaux plasmatiques, érythrocytaires et sériques. Parallèlement, bien que les résultats concernant l'état des défenses antioxydantes divergent selon les études (375, 381, 382), ces patients présentent dans certains cas une capacité antioxydante significativement plus faible qui serait à l'origine d'un stress oxydant amplifié (373, 381, 383-386). Des études ont montré une diminution significative du niveau de base de NO sérique chez les sujets homozygotes (HbSS) par rapport aux témoins (387, 388) indiquant que les patients drépanocytaires ont des niveaux plus faibles de NO et une capacité anti-oxydante totale (CAT) plus faible par rapport aux contrôles sains normaux.

Cette augmentation du stress oxydant perpétuerait en retour le cercle vicieux de la drépanocytose. Des études ont montré des relations entre les marqueurs du stress oxydatif et certaines complications de la drépanocytose. En effet, Morris et collaborateurs (385), ont rapporté une diminution des taux de glutathion et de glutamine chez des patients atteints de drépanocytose et présentant une hypertension artérielle pulmonaire. De plus, Klings et collaborateurs (389) ont rapporté que les ROS pouvaient jouer un rôle important dans la dysfonction vasculaire observée au cours du syndrome thoracique aigu et des CVO.

Des études ont montré une corrélation positive entre des marqueurs hémolytiques tels que la bilirubine et des concentrations plasmatiques d'AOPP chez des patients atteints de drépanocytose (390). Ceci, suggérerait que le stress oxydatif élevé est probablement en partie lié à une augmentation de l'hémolyse. De plus, une corrélation entre les concentrations d'AOPP et nitrotyrosine suggère un rôle du stress oxydant dans la diminution de la biodisponibilité du NO chez les enfants drépanocytaires homozygotes (391). Dans l'étude de Renoux et *al.* (250), une diminution des concentrations d'AOPP était retrouvée chez des patients alpha-thalassémiques. L'alpha-thalassémie diminue légèrement la concentration de l'HbS intra-érythrocytaire (47,48) réduisant les événements d'ischémie/reperfusion qui augmentent la production de ROS (16, 17,43).

Des concentrations plasmatiques de MDA significativement élevées ont été retrouvées dans plusieurs études portant sur des populations drépanocytaires (381, 392, 393). L'accumulation de MDA perturbe l'organisation des phospholipides dans la bicouche membranaire des érythrocytes humains. L'oxydation des phospholipides dans les membranes de plasma et d'organelles internes (par exemple les mitochondries) endommage leur fonction (390). Les dommages membranaires sont considérés comme un facteur important contribuant à la falciformation irréversible (394, 395).

3.2.2 Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose

3.2.2.1 L'auto-oxydation de l'HbS

Bien que ce phénomène soit retrouvé à la fois pour l'HbA et l'HbS, des études ont montré que cette dernière avait la capacité de s'auto-oxyder 1,7 fois plus vite que l'HbA (396). En effet, à l'inverse de l'HbA, l'Hb S se retrouve rapidement submergée par la production continue de $O_2^{\bullet-}$ puis par sa dismutation en H_2O_2 qui peut aboutir à la production de radical hydroxyle. Par ailleurs, la méthémoglobine, en l'absence de réduction du fer par la méthémoglobine réductase, va se dénaturer en hémichromes. Ces hémichromes, retrouvés dans la membrane érythrocytaire des GR drépanocytaires (397), vont favoriser l'oxydation des constituants membranaires des globules rouges (Figure 44).

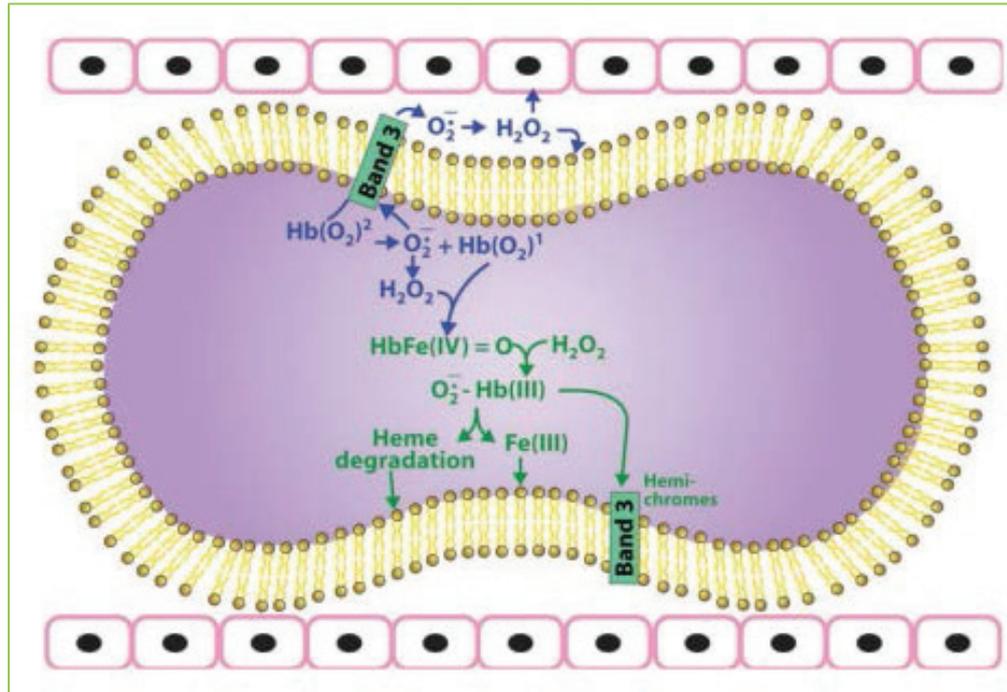


Figure 44. Réactions associées à l'auto-oxydation de la désoxy-hémoglobine.

Tiré de (398).

A cause de l'hémolyse intravasculaire constante, des concentrations élevées d'hémoglobine libre (399) et d'hème plasmatique sont retrouvées observées chez les patients drépanocytaires à l'état de base (400). En inactivant le NO, l'hémoglobine libre réduit sa biodisponibilité, limitant ainsi son action vasodilatatrice, anti-thrombotique et anti-inflammatoire (400, 401). L'hème hydrophobe libéré dans le plasma s'intercale rapidement dans la membrane plasmique des cellules endothéliales. A ce stade, l'hème libère son fer (402) qui va induire l'activation des cellules endothéliales et des dommages liés à la libération non enzymatique de ROS (403).

3.2.2.2 Système Xanthine oxydo-réductase

Une diminution de l'activité XO chez des patients atteints de drépanocytose a été rapportée (404). Cette diminution est due au fait que XO catalyse la génération du radical superoxyde à partir de l'hypoxanthine [6] et peut ainsi entraîner une légère réduction de l'activité de XO chez les sujets HbSS entraînant ainsi une légère réduction de H₂O₂. De plus, la diminution observée de l'activité sérique de XO chez ces patients atteints de drépanocytose, a été confirmée par la mesure des taux sériques de purine par HPLC. Les résultats suggèrent que la concentration d'hypoxanthine est élevée alors que celles de

xanthine et d'acide urique sont significativement diminuées dans le milieu extracellulaire par rapport au groupe témoin (404).

Une étude d'Osarogiagbon *et al.* (297) sur des souris drépanocytaires ayant subi une lésion par ischémie-reperfusion ont montré que celles soumises à des conditions hypoxiques présentaient une activité XO plus élevée par rapport aux souris témoins dans les conditions ambiantes. Selon ces auteurs, cette augmentation de XO générée par l'hypoxie peut conduire à la production d'O₂[•], capables de générer des radicaux libres, tels qu'observés par l'augmentation de l'excrétion d'éthane et de OH, deux marqueurs du stress oxydatif.

3.2.2.3 Système NADPH oxydase

Une étude a montré qu'une partie significative de la production de ROS dans les cellules drépanocytaires était médiée enzymatiquement par la NADPH oxydase. Celle-ci est contrôlée par la protéine kinase C et la signalisation intracellulaire Ca²⁺ dépendante dans les GR drépanocytaires (405). D'autres études ont suggéré que les superoxydes dérivés de la NADPH-oxydase des cellules endothéliales et du fer catalytiquement actif contribuent aux réponses pro-inflammatoires et pro-thrombogènes associées à la drépanocytose (406, 407).

3.2.2.4 Myéloperoxydase (MPO)

Des activités circulantes plus élevées de MPO ont été rapportées chez des patients atteints de drépanocytose comparés aux témoins (404). Les polynucléaires neutrophiles sont bien connus pour jouer un rôle important dans l'inflammation de l'anémie falciforme (383, 404). Les leucocytes activés libèrent de la MPO, qui pénètre ensuite dans la paroi vasculaire, augmente l'inflammation et génère des oxydants (383). Une étude sur l'effet du N-acétyl-lysyltyrosylcystéine-amide a montré que celui-ci était un inhibiteur non toxique efficace de l'activité MPO (408) qui diminue le stress oxydatif dépendant de la MPO en ce qui concerne la peroxydation des lipides plasmatiques et l'oxydation des tissus vasculaires, améliore la fonction vasculaire et diminue les lésions oxydatives chez les patients atteints de drépanocytose. Par conséquent, ces auteurs ont suggéré que cet inhibiteur pourrait être un nouvel outil qui peut être utile non seulement pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels la MPO augmente le stress oxydatif et altère la fonction vasculaire dans la drépanocytose, mais aussi comme traitement possible pour prévenir les inflammations et les lésions dépendantes de la MPO (408).

3.2.2.5 Autres sources

L'homocystéine, un acide aminé soufré qui est produit pendant le métabolisme de la méthionine, peut produire des espèces réactives de l'oxygène par auto-oxydation au cours de la drépanocytose (383). Bien qu'aucun lien clair avec la drépanocytose n'ait été démontré, l'hyperhomocystéinémie est associée à un risque accru de maladie cérébrovasculaire chez les patients atteints de drépanocytose (409), suggérant une propension accrue aux maladies vasculaires. De plus, les concentrations sériques de cofacteurs clés dans le métabolisme de l'homocystéine (c.-à-d. le folate et les vitamines B12 et B6) sont diminués chez les patients atteints d'anémie falciforme, ce qui suggère qu'ils sont plus sujets à l'hyperhomocystéinémie (389). L'hyperhomocystéinémie pourrait également augmenter la production de ROS via un mécanisme impliquant la production de diméthyl-arginine asymétrique qui entre en compétition avec la L-arginine, substrat de l'oxyde nitrique synthase (NOS). En absence de L-arginine, précurseur du NO, la NOS endothéliale (eNOS) se met à produire des ROS au détriment de la production de NO (406).

3.3 Les systèmes de défense anti-oxydants dans la drépanocytose

3.3.1 Systèmes anti-oxydants enzymatiques

3.3.1.1 Généralités

Comme dans beaucoup de pathologies, la protéine Nrf2 jouerait un rôle dans la physiopathologie de la drépanocytose. En effet, l'expression de Nrf2 serait réduite chez les patients drépanocytaires via une augmentation du taux de miR-144 érythrocytaire, un microARN inhibiteur de Nrf2 notamment en présence de stress oxydant (410). Ainsi, un dérèglement de l'axe régulateur miR-144 – Nrf2 pourrait ainsi conduire à une tolérance au stress oxydant plus faible chez des patients drépanocytaires. D'autre part, Ferreira et al. (411) ont montré que l'HbS induisait l'expression de HO-1 dans les cellules hématopoïétiques via un mécanisme qui implique la dégradation de KEAP1 suivie de l'activation consécutive du facteur de transcription Nrf2. D'ailleurs, le traitement de souris drépanocytaires avec de l'hème augmente l'expression de HO-1, inhibe la stase vasculaire, les interactions leucocytes-endothélium et l'expression de NF- κ b, VCAM-1 et ICAM-1 en réponse à un stress d'ischémie/reperfusion(412).

Ainsi, il semble que durant des épisodes hémolytiques aigus, les patients drépanocytaires augmentent l'HO-1 pour faire face au stress lié à la libération de l'hème et

au stress oxydant (413). Cette adaptation permet le catabolisme de l'hème toxique par HO-1 et la formation de CO (un vasodilatateur anti inflammatoire), de biliverdine (un antioxydant) et de ferritine (un agent chélateur de fer) (412, 414). De manière similaire, Gosh et al (415) ont mis en évidence *in vivo* et *in vitro* que HO-1 et NQO1 était induites dans le rein, les poumons et le foie de modèles murins drépanocytaires sévères et dans des cellules endothéliales pulmonaires de patients drépanocytaires traités avec de l'hème. Néanmoins, ces auteurs ne se sont pas intéressés au facteur de transcription Nrf2 dans cette étude (Figure 45).

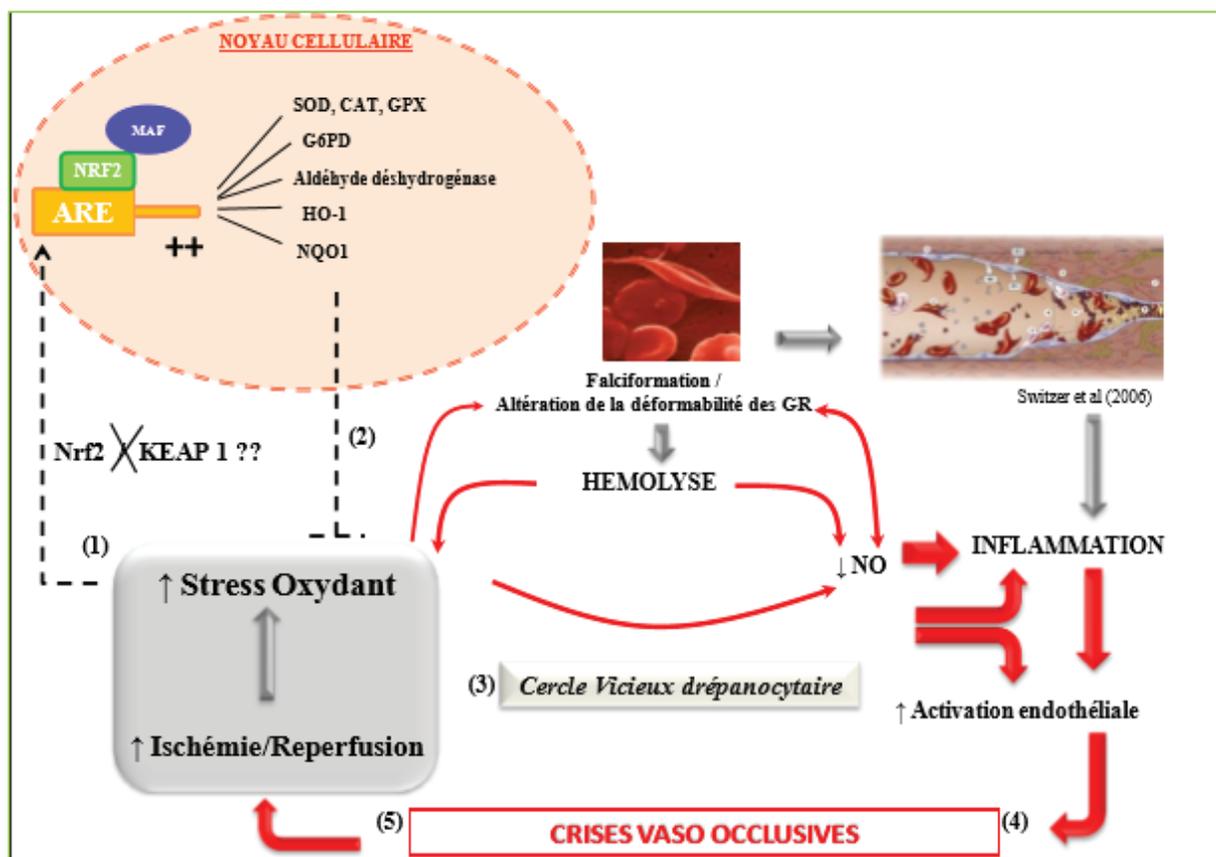


Figure 45. Rôle supposé de Nrf2 suite à un stress d'ischémie/reperfusion drépanocytaire

Tiré de (416). (1) L'augmentation des phénomènes d'ischémie/reperfusion à l'origine d'une élévation du stress oxydant pourrait conduire à la dissociation du complexe Nrf2/Keap1 et la translocation nucléaire de Nrf2 chez les patients drépanocytaires. Une fois dans le noyau, Nrf2 hétérodimérise avec une protéine Maf, le rendant ainsi actif, puis se lie à un site de reconnaissance ARE (élément de réponse antioxydant) situé sur des régions promotrices de gènes clés impliqués dans la réponse au stress oxydant. Coordonnant ainsi l'expression d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GPX), glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PD), aldéhyde déshydrogénase, hème oxygénase (HO-1), NADPH-quinone oxydoréductase 1. (2) Ces enzymes antioxydantes et détoxifiantes pourraient ainsi réguler la balance pro oxydant /antioxydant et diminuer le stress oxydant, paramètre clé du cercle vicieux drépanocytaire. Ce qui soulève la question suivante : Est-ce que la régulation du statut redox médié par Nrf2 pourrait réduire l'hémolyse, les altérations hémorhéologiques, l'altération de la biodisponibilité du NO, l'inflammation, l'activation endothéliale et ainsi constituer une voie thérapeutique potentielle dans la limitation des crises vaso occlusives (4) et des phénomènes d'ischémie/reperfusion associés (5) chez les patients drépanocytaires.

L'implication de Nrf2 dans l'induction de la synthèse d'HbF a été récemment proposée comme voie thérapeutique potentielle dans la drépanocytose (417, 418). Par ailleurs, dans le cytoplasme, Nrf2 est lié à KEAP1 qui prévient sa translocation nucléaire en favorisant sa dégradation par un protéasome. Aussi, *in vitro*, le traitement de cellules BFU-E1, générées à partir de cellules mononucléaires sanguines périphériques de patients drépanocytaires, avec un inhibiteur protéasomal de Nrf2 conduit à une augmentation de l'activité de Nrf2 avec une augmentation concomitante de l'expression des gènes de réponse antioxydante tel que NQO1 et du statut antioxydant cellulaire (418). Plus précisément, ces auteurs montrent que c'est l'induction de ROS issues de l'inhibition protéasomale et non cette inhibition directement qui est à l'origine de l'activation de Nrf2 (418).

3.3.1.2 Les superoxyde dismutases (SOD)

Certaines études antérieures ont démontré que les activités de la SOD, de la capacité totale antioxydante et de la peroxydase étaient réduites (419-421), tandis que d'autres indiquaient que les activités de la SOD et de la peroxydase étaient augmentées (374, 375, 392, 405) dans les érythrocytes de patients atteints de drépanocytose.

En effet, beaucoup d'équipes ont travaillé sur l'activité enzymatique de la SOD dans la drépanocytose. Gizi *et al.* (374) ont décrit une augmentation de l'activité de la SOD dans les érythrocytes de patients atteints de drépanocytose par rapport à des sujets sains (1628.8 ± 384.5 U/gHb pour les témoins vs 1821.8 ± 435.4 U/gHb pour les patients ; $p = 0.05$) et ils ont émis l'hypothèse que cette augmentation reflétait la tentative de défense des GR drépanocytaires contre le stress oxydant. Ces résultats sont en accord avec les observations historiques de Das et Nair (381). En effet, ces auteurs ayant travaillé sur des érythrocytes normaux et falciformes, ont également rapporté une activité SOD plus élevée dans les cellules drépanocytaires ($5,000+93.9$ unités/g d'Hb) que dans les cellules normales ($2950+144$ unités /g d'Hb), corroborant ainsi l'hypothèse de Gizi *et al.* (374). Une étude de Schacter *et al.* a également démontré que les patients drépanocytaires cliniquement les plus sévères présentaient une réduction de l'activité SOD par rapport aux patients moins sévères, bien que la quantité de protéine soit comparables dans les deux groupes (420).

En revanche, d'autres études ont rapporté des résultats contradictoires concernant l'activité de cette enzyme antioxydante dans les érythrocytes de patients atteints de drépanocytose. En effet, Alsultan *et al.* (372) ont observé une activité SOD significativement diminuée chez des sujets homozygotes SS par rapport à des sujets sains. Al-Naama *et*

collaborateurs abondent également dans le même sens en observant une baisse de l'activité SOD dans les érythrocytes de patients SS par rapport à des témoins (422). Cette baisse d'activité pourrait être attribuée à la production élevée de ROS chez ces patients surtout lors de la falciformation.

De plus, des niveaux réduits de l'activité de la SOD sérique ont été observés chez les patients drépanocytaires transfusés par rapport aux patients drépanocytaires non transfusés (423) ; un des mécanismes suggérés est que la surcharge en fer engendrée par la transfusion pourrait conduire à une augmentation de l'activité des ROS sur les composants membranaires, contribuant aux complications hémolytiques et vaso-occlusives (424, 425). L'excès de fer transfusionnel provoquerait l'accumulation de fer plasmatique labile, la forme pathologique du fer non lié à la transferrine. Ce fer plasmatique labile est rapidement absorbé par les cellules, ce qui conduirait à une augmentation du pool de fer labile et à la génération de ROS.

3.3.1.3 Catalase

Les travaux de Lamia et *al* montrent une activité réduite de la catalase dans les érythrocytes de patients atteints de drépanocytose comparés à des témoins (218 ± 30.3 k/g Hb pour les patients vs 275 ± 37.7 k/g Hb pour les témoins ; $p < 0.001$) (422). Ces résultats sont corroborés par ceux de Vicky et *al.* (426) qui ont également travaillé sur les érythrocytes de patients drépanocytaires et de sujets AA. A ces travaux, s'ajoutent ceux de Möckesch et *al.* (391) et Biswal S et *al.* (427) qui ont travaillé respectivement sur les érythrocytes et le plasma de patients atteints de drépanocytose comparés à des témoins. Leurs résultats étaient superposables aux deux autres précédemment cités. La diminution de la catalase pourrait s'expliquer par son utilisation pour lutter contre cette surproduction de ROS chez les patients atteints de drépanocytaires.

En revanche, Castilhos et *al.* (404) ont obtenu des résultats contradictoires. Ces auteurs ont effectivement observé une augmentation significative (2,3 fois supérieure) de l'activité de la catalase dans du sang total de patients atteints de drépanocytose en phase stationnaire comparés à des témoins sains. Hermann et *al.* ont (428) aussi observé une augmentation de l'activité de la catalase dans les érythrocytes de patients homozygotes SS comparés à des témoins mais sans que cette augmentation ne soit significative. Selon ces auteurs, l'augmentation de la catalase pourrait être un signal de défense pour capter le maximum d' H_2O_2 .

3.3.1.4 Les glutathions peroxydase (GPx)

Les travaux de Gizi et *al.* démontrent une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase dans les érythrocytes de patients atteints de drépanocytose (44.1 ± 11.3 U/gHb) comparés aux sujets contrôles AA (30.0 ± 4.9 U/gHb ; $p = 0.001$) tandis qu'aucune différence relative au taux de glutathion réductase n'était pas observée entre les deux groupes (374). Ces résultats sont discordants de ceux obtenus par Cho et *al.* qui démontrent une diminution d'activité de 33% de la glutathion peroxydase 1 chez les patients drépanocytaires comparés à des sujets contrôles, corrélée à l'hémolyse observée chez ces patients. Cependant, ils observent chez les patients bénéficiant d'un traitement à l'hydroxyurée une augmentation de 90% de l'activité de la glutathion peroxydase 1 comparée à celle des patients ne recevant pas d'hydroxyurée (429). De plus, Alsultan et *al.* (372) ont observé une activité de GPx érythrocytaire significativement inférieure chez les patients drépanocytaires (48.50 ± 6.2 U/g d'Hb) comparés à des témoins AA (176.30 ± 12.71 U/g d'Hb). La baisse d'activité de cette enzyme peut être attribuée à la production élevée de ROS chez ces patients qui peut détruire les enzymes antioxydantes.

3.3.2 Systèmes anti-oxydants non enzymatiques

Dans une étude récente, les concentrations plasmatiques en manganèse, et en cuivre ne différaient pas entre les enfants atteints de drépanocytose à l'état stationnaire et des enfants de AA (430), alors que les concentrations en fer, en sélénium et en zinc étaient significativement inférieures chez les enfants atteints de drépanocytose comparés à des témoins (431). Le zinc a une action antioxydante par inhibition de la peroxydation lipidique dans les globules rouges et sa carence a été associée au risque d'augmenter la crise vaso-occlusive grave chez l'enfant SS (432). Le sélénium joue un rôle important dans la prévention de la modification oxydative des lipides, la réduction de l'inflammation et la prévention de l'agrégation plaquettaire (433).

3.3.2.1 Glutathion

Gizi et *al.* observent une diminution du glutathion total ainsi qu'une réduction du glutathion réduit chez des patients atteints de drépanocytose comparés à des sujets sains (374). Cette diminution du glutathion est en accord avec l'étude d'Amer et *al.*, qui soulignent également la présence d'un stress oxydant exacerbé chez les patients drépanocytaires

pouvant être régulé par l'administration de vitamines A, C et E (434) Castilhos et *al.* (404) confirment ces résultats en trouvant également une réduction du glutathion réduit dans les érythrocytes des patients atteints de drépanocytose. Le glutathion réduit réagit avec les ROS et contribue à l'homéostasie redox de la cellule.

3.3.2.2 Ubiquinones, cytochrome c

Niklowitz et *al.* (435) ont rapporté des concentrations normales ou réduites d'ubiquinone plasmatique chez des patients atteints de drépanocytose avec un net décalage de l'état redox en faveur de la partie oxydée de l'ubiquinone plasmatique. Le changement en faveur de la partie oxydée d'ubiquinone peut être considéré comme un signal pour un stress oxydatif accru.

3.3.2.3 Vitamine E et vitamine C

Gizi et *al.* ont observé une diminution de la concentration plasmatique des vitamines C et E chez les patients drépanocytaires comparés aux sujets contrôles (374). Il convient aussi de noter que les patients atteints de drépanocytose présentent une réduction d'environ 40% des taux plasmatiques de carotène et une réduction de 30% des taux de vitamine E (436, 437). En outre, il existe une corrélation inverse entre les taux de vitamine E et le pourcentage de globules rouges irréversibles (Ndombi IO 1990). Bien qu'il semble que la déplétion en vitamine E puisse jouer un rôle dans le développement de la vaso-occlusion, l'effet de la supplémentation en vitamine E n'est pas clair. Dans deux petites études prospectives évaluant l'effet de la supplémentation en vitamine E chez des patients souffrant d'anémie falciforme (438), il y avait une diminution du nombre de cellules falciformées irréversibles, mais cela n'était pas corrélé à une réduction du nombre de CVO. La mesure des niveaux d'acide ascorbique dans la drépanocytose a produit des résultats contradictoires : plusieurs études (389, 439-441) ont démontré des concentrations réduites dans le plasma et les globules blancs chez les patients atteints de drépanocytose, mais d'autres n'ont trouvé aucune différence significative. Cette disparité peut refléter des différences dans les populations étudiées, mais rend moins probable que la vitamine C représente un antioxydant important dans cette population.

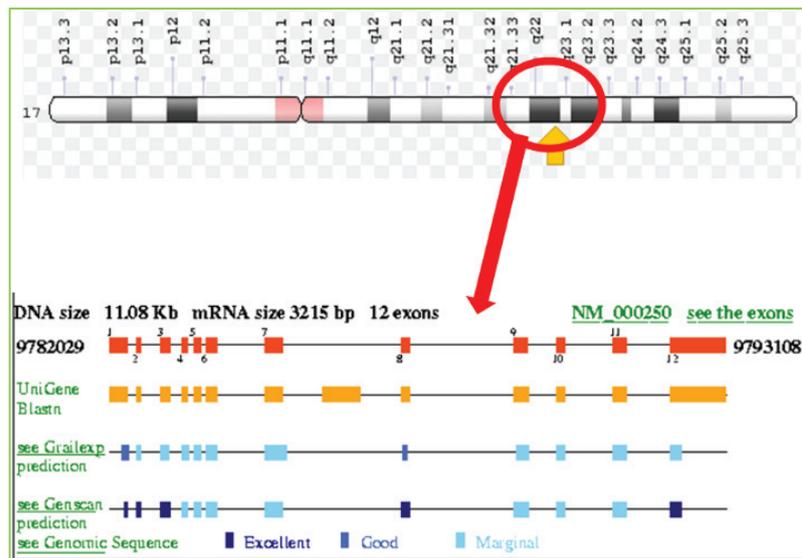
3.4 Les gènes impliqués dans le stress oxydant

Les polymorphismes des gènes impliqués dans le stress oxydant pourraient partiellement expliquer la grande variété clinique inter-individuelle de beaucoup de maladies telles que la drépanocytose. Dans notre étude, nous avons ciblé 4 gènes codant des enzymes du SO dont certains polymorphismes pourraient être corrélés à la clinique de la drépanocytose. Il s'agit de *SOD* (rs4880), *MPO* (rs2333227), *XO* (rs207454) et *NFE2L2* (rs35652124).

3.4.1 Gène de la myéloperoxydase

3.4.1.1 Description du gène et de la protéine

Le gène *MPO* se trouve au niveau du bras long du chromosome 17 en position 22 (17q22). Il comprend 12 exons pour une taille totale de 11,08 Kb (Figure 46).



L'ARNm de 3215 pb permet la traduction de la protéine MPO qui comprend 745 acides aminés. Cette expression se fait au niveau de plusieurs organes tels que le pharynx, le cerveau mais aussi dans de nombreux autres tissus et cellules (Tableau 2).

Tableau 2. Expression de la MPO au sein de différents organes, tissus et cellules

Tiré de <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>.

expressed in (based on citations)										
organ(s)	System	Organ level 1	Organ level 2	Organ level 3	Organ level 4	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol
	Digestive	pharynx								
	Nervous	brain								
	Reproductive	male system	prostate				PubMed	Homo sapiens		
	Visual	eye								
tissue	System	Tissue	Tissue level 1	Tissue level 2	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol	
	Blood / Hematopoietic	bone marrow								
cells	System		Cell			Pubmed	Species	Stage	Rna symbol	
	Blood/Hematopoietic		erythrocyte			PubMed	Homo sapiens			
	Blood/Hematopoietic		monocyte							
	Blood/Hematopoietic		neutrophil			PubMed	Homo sapiens			
	Lymphoid/Immune		macrophage							
	Reproductive		epithelial cell			PubMed	Homo sapiens			

L'enzyme mature humaine est un homodimère symétrique de 745 acides aminés, formé de 2 héli-enzymes, chacune à 2 sous-unités reliées par un pont disulfure (une chaîne légère de 15 kDa et une chaîne lourde de 59 à 64 kDa produite par excision de 6 acides aminés à partir du précurseur commun)(442) . La protéine est glyquée, ce qui explique les variations de son poids moléculaire (120 à 150 kDa). Elle possède un pic d'absorption caractéristique à 430 nm dû à sa structure hémique (pic de Soret). Son site actif est localisé à la base d'une poche hydrophobe, étroite et profonde, qui ne permet l'accès qu'aux substrats de faible poids moléculaire (443).

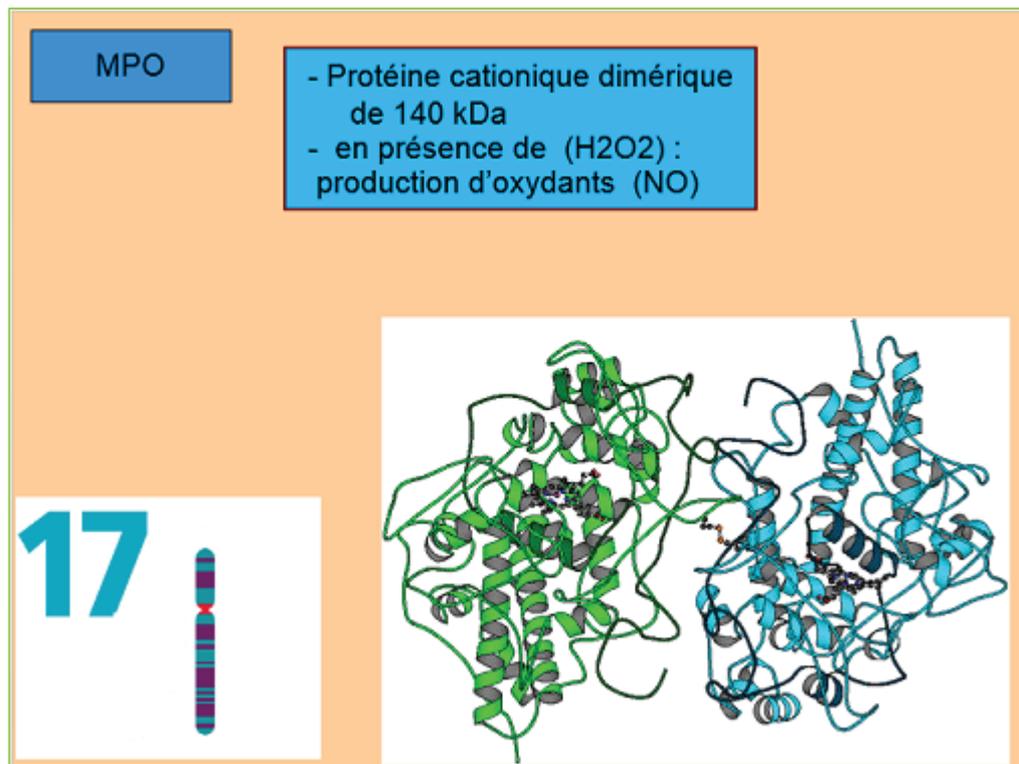


Figure 47. Structure biochimique de la protéine MPO

3.4.1.2 Polymorphismes génétiques

Plusieurs études ont rapporté que certains polymorphismes du gène *MPO* seraient impliqués dans beaucoup de pathologies et syndromes tels que les cancers, l'athérosclérose (444) l'inflammation, le diabète, etc. Toutes ces pathologies ont comme point commun le stress oxydant où la protéine MPO joue un rôle majeur. En effet, le gène *MPO* peut entraîner un déséquilibre oxydant / antioxydant, et contribuer de manière significative au développement et à la progression des complications vasculaires liées au diabète (445).

Le polymorphisme du gène *MPO* le plus étudié et qui serait impliqué dans plusieurs pathologies est le polymorphisme *rs2333227* qui correspond à une mutation d'une Guanine (G) par une Adénine (A) en position 463 de la région promotrice du gène ($-463G>A$). Ce SNP a été associé à une réduction drastique (25 fois) de la transcription de la protéine dans des cellules de leucémie myéloïde aiguë (446, 447). Ce polymorphisme a également été associé à une susceptibilité accrue au développement de divers cancers : cancer du poumon (448, 449), cancer de la prostate (dans une population américaine) (450, 451) et cancer colorectal (452). Par contre il serait protecteur contre d'autres cancers tels que celui du col de l'utérus (453, 454) et il ne contribuerait pas à la survenue du carcinome naso-pharyngien dans une population chinoise Han du sud de la Chine (455). En dehors des cancers, le polymorphisme *rs2333227* du gène *MPO* pourrait être considéré comme un marqueur de stratification du

risque d'événements cardiovasculaires indésirables chez les patients souffrant de maladie artérielle périphérique, sans en être pour autant un facteur de risque indépendant (456). Il a été aussi rapporté un effet protecteur de ce polymorphisme de l'hypertension artérielle (457). En revanche, ce polymorphisme semble être un facteur favorisant de la maladie d'Alzheimer dans une population chinoise (458). Il serait aussi un facteur de risque du planus de Lichen, une maladie inflammatoire touchant la peau, la muqueuse de la bouche et plus rarement, l'œsophage et les conjonctives (459).

Des études récentes ont porté sur un autre polymorphisme de MPO qui est le SNP rs2107545. Ce polymorphisme contribuerait à une sensibilité accrue à la formation de la plaque carotidienne chez les patients atteints de diabète de type 2 (445). De plus, le SNP rs2107545 du gène MPO peut être utilisé comme biomarqueur pour la susceptibilité et le pronostic des patients ayant subi un AVC ischémique (445).

3.4.2 Gènes des superoxydes dismutases

3.4.2.1 Description du gène et de la protéine

Dans la classification internationale, les SOD appartiennent au groupe des oxydoréductases (EC1.15.1.1). Elles sont présentes dans toutes les cellules de mammifères. On en distingue 3 : la SOD Cu/Zn intracellulaire, la SOD Cu/Zn extracellulaire et la MnSOD, cette dernière étant la plus importante pour le stress-oxydant.

L'activité de la SOD Cu/Zn intracellulaire (gène *SOD1*) représente 80% de l'activité SOD totale d'une cellule. C'est une protéine dimérique d'environ 32 kDa dont chaque unité possède un site catalytique actif contenant un atome de cuivre et un atome de zinc (460). Seul le cuivre sous forme Cu^{2+} participe à l'activité catalytique de l'enzyme, le zinc assurant sa stabilité (461). L'expression de la SOD Cu/Zn intracellulaire est plutôt constitutive dans les cellules humaines. Elle est codée chez l'homme par un gène situé sur le chromosome 21 (région 21q22) qui possède dans sa région promotrice des boîtes TATA et CCAAT ainsi que des éléments de réponse de différents facteurs de transcription (462). Ce gène peut être inductible par divers facteurs ; notamment par Nrf2 (463-466).

La SOD Cu/Zn extracellulaire (gène *SOD3*) est glycosylée et sécrétée dans l'espace extracellulaire (467). Cette enzyme tétramérique (135 kDa) possède des sous-unités liées de façon non covalente et possédant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc. Le gène

SOD3 est situé sur le chromosome 4 (4p-q21) chez l'homme ; sa région promotrice possède des séquences régulatrices dont celles correspondant à la réponse antioxydante ou ARE pour « Antioxidant Response Element » (462, 466).

L'activité de la MnSOD (gène *SOD2*) représente 20% de l'activité totale cellulaire et peut être inhibée par H₂O₂ et par les peroxy-nitrites (468). A l'inverse de la MnSOD des procaryotes qui est dimérique, celle des mammifères est homo-tétramérique avec une masse moléculaire de 80 KDa et 222 acides aminés (469). Chaque sous-unité d'environ 21 à 23 KDa, contient dans son site catalytique un atome de Mn sous la forme Mn³⁺. La MnSOD est localisée strictement dans la mitochondrie. La structure primaire de chaque sous-unité possède une séquence d'adressage du côté NH₂ terminal, qui assure le transport de la protéine nouvellement synthétisée dans la matrice mitochondriale. Une fois transportée dans la mitochondrie, le peptide signal est finalement clivé par une peptidase de la matrice mitochondriale et les 4 sous-unités s'associent alors pour donner naissance à l'enzyme active (470) (Figure 48).

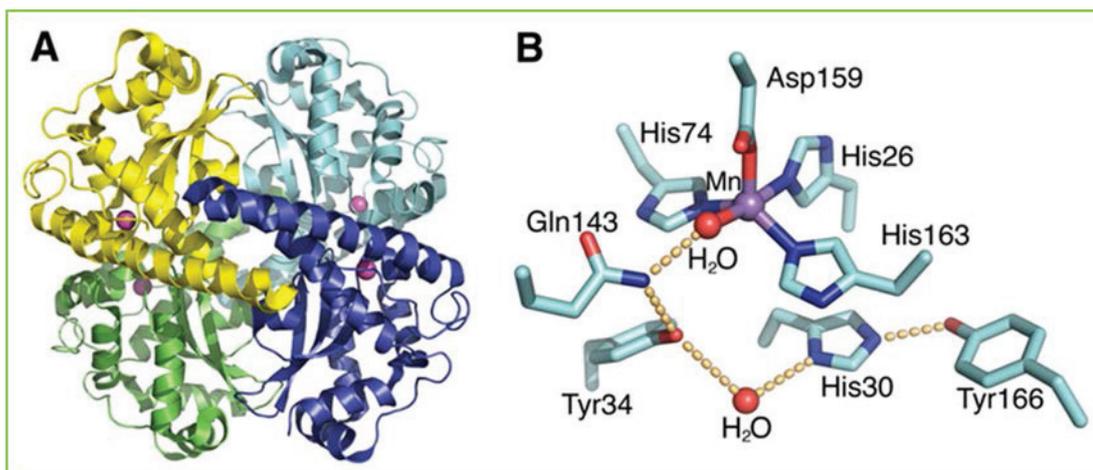


Figure 48. Structure cristalline humaine de MnSOD

Tiré de (471). (A) La structure MnSOD homotétramère, contenant deux faisceaux symétriques à quatre hélices et quatre domaines α / β C-terminaux, est représentée avec les quatre chaînes polypeptidiques distinctes colorées en cyan, bleu, vert et jaune et les ions de manganèse du site actif décrits comme des sphères magenta. (B) site actif MnSOD et schéma de liaison hydrogène. Les chaînes latérales des résidus de sites actifs His26, His74, His163 et Asp159 lient l'ion Mn, conjointement avec une molécule de solvant. Un réseau de liaison à l'hydrogène, représenté dans des sphères orange, est observé dans le site actif de MnSOD, s'étendant à partir du solvant lié au métal. Le solvant forme une liaison hydrogène avec Gln143 et le réseau se poursuit avec une liaison hydrogène à Tyr34. Une molécule d'eau conservée assure ensuite la médiation de la liaison hydrogène entre Tyr34 et His30, et His30 forme également une liaison hydrogène avec Tyr166 provenant d'une sous-unité adjacente.

La MnSOD mitochondriale est codée par le gène *SOD2* sur le bras court du chromosome 6 (6q25) (472). Il présente une taille de 14.21 Kb et est constitué de 5 exons (Figure 49). La région proximale du promoteur de ce gène possède une région riche en

éléments GC (de -189 à -86 pb du site d'initiation de la transcription), mais pas de boîtes TATA ou CAAT (473). En dehors de cette région proximale, le promoteur comporte des éléments de réponse pour différents facteurs de transcription, dont certains sont caractérisés et d'autres restent potentiels (473). L'ARNm permet la traduction de la protéine SOD2 qui comprend 222 acides aminés. Ce gène est exprimé dans plusieurs organes tels que la bouche et l'os. (Tableau 3).

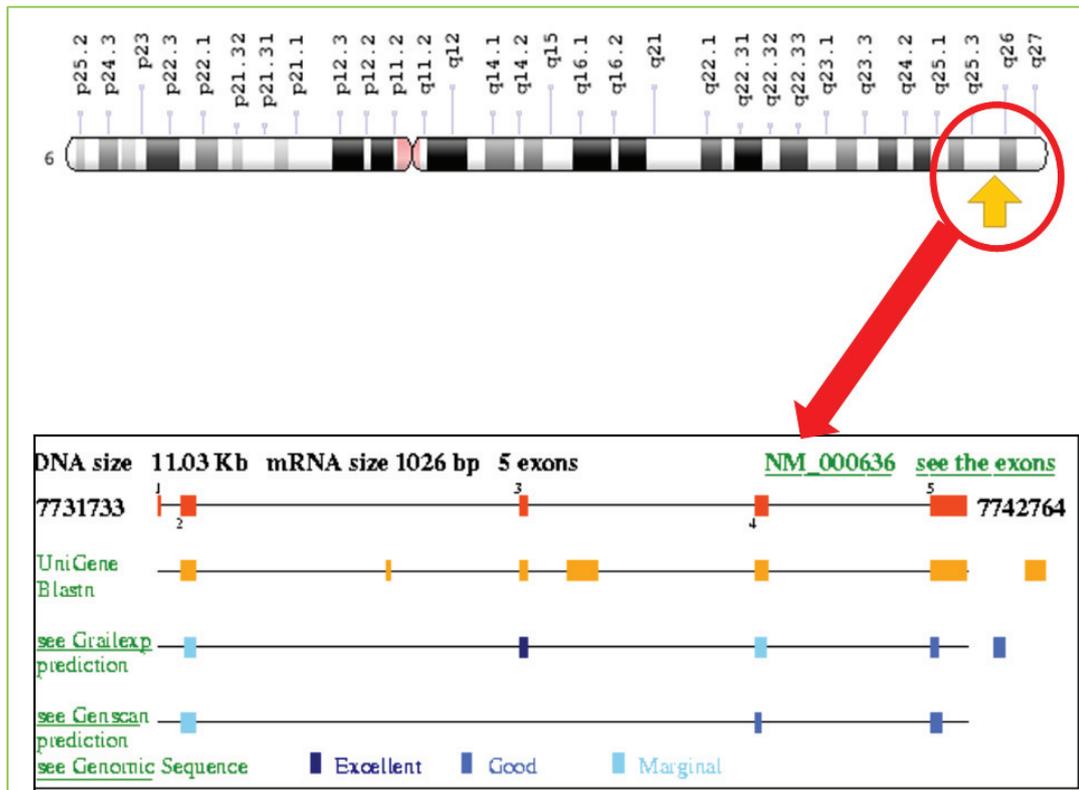


Figure 49. Caractéristiques moléculaires du gène *SOD2*

Tiré de (<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>)

Tableau 3. Expression du gène SOD2 au sein de différents organes, tissus et cellules

Tiré de <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>.

Type	ubiquitous									
expressed in	(based on citations)									
organ(s)	System	Organ level 1	Organ level 2	Organ level 3	Organ level 4	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol
	Digestive	mouth				highly				
	Nervous	brain								
	Reproductive	male system	prostate							
	Respiratory	respiratory tract	trachea			highly				
tissue	System	Tissue	Tissue level 1	Tissue level 2	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol	
	Connective	bone			predominantly					

3.4.2.2 Polymorphismes génétiques

Certains polymorphismes du gène *SOD* (surtout 2 et 3) seraient impliqués en partie dans certaines maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique (474-480), la maladie d'Alzheimer (481-483), de Parkinson (484-486) ou même dans le diabète (487) ou le cancer (488).

Plusieurs SNPs ont ainsi été impliqués dans le développement de différents cancers, mais le plus fréquemment étudié chez l'homme reste le polymorphisme rs4880 (Ala16Val) du gène *SOD2* qui a fait l'objet de plus de 80 études (489). En effet, le génotype muté serait associé à un risque accru de cancer du sein avec un potentiel métastatique élevé (490, 491). Ce polymorphisme, lorsqu'il est associé à certains autres du gène *GSTT1* codant la glutathion S-transférase thêta 1, semble aussi jouer un rôle important dans la modulation du risque du cancer de la vessie chez les fumeurs d'après une étude réalisée en Colombie-Britannique (492). Les autres cancers où le polymorphisme rs4880 de *SOD2* pourrait être impliqués sont :

- le carcinome hépatocellulaire dans une étude réalisée en Chine (493) et dans une autre en France en association avec le polymorphisme rs2333227 (-G463A) de MPO (494) ;
- le cancer de la prostate (495, 496) ;
- le cancer du poumon (497) en Turquie et aux Etats-Unis (498) ;
- le cancer du pancréas en association avec le polymorphisme rs2333227 (-G463A) de MPO (499) ;

- certains syndromes myéloprolifératifs (polycythémia vera, thrombocytémie essentielle et myélofibrose primaire) (500).

Cependant, d'autres auteurs ont observé des résultats différents de ceux rapportés ci-dessus. En effet, le rôle de rs4880 dans le cancer de la prostate relaté dans le paragraphe précédent ne corrobore pas l'étude de Liwei *et al.* qui n'ont trouvé aucune association significative entre les polymorphismes Ala9Val et Ala16Val de MnSOD et la susceptibilité au cancer de la prostate (501). De même, l'étude de Zejnilovic *et al.* (497), ainsi que celle de Choi JY *et al.* ne retrouvent pas le risque de cancer du poumon induit par ce SNP dans une population d'hommes fumeurs ou exposés à l'amiante (502). Par ailleurs, l'étude de Mohelnikova-Duchonova *et al.* n'a pas rapporté une association significative entre rs4880 et le cancer du pancréas (503). Enfin, d'autres auteurs n'ont pas retrouvé un lien entre le polymorphisme Ala16Val et la leucémie myéloïde aiguë (504) ou chronique (505).

D'autres polymorphismes du gène *SOD2* ont fait l'objet de publications, mais pas autant que le SNP rs4880. Parmi ces polymorphismes, nous avons les SNPs rs278339 et rs5746136 qui seraient associés au risque du cancer gastrique (506) mais aussi d'une dépendance élevée à l'héroïne sans augmentation du niveau d'expression de *SOD2* chez des personnes consommant de l'héroïne (507).

3.4.3 Gène de la xanthine oxydo-réductase

3.4.3.1 Description du gène et de la protéine

La xanthine oxydase (XO) est une molybdoflavoenzyme qui a été identifiée par Schardinger en 1902 (508) et qui est membre de la famille des molybdoenzymes qui comprend également l'aldéhyde oxydase (AO) et la sulfite oxydase (SO). La xanthine oxydase (XO) (EC 1.1.3.22) et la xanthine déshydrogénase (XDH) (EC 1.1.1.204) sont les formes interconvertibles de la xanthine oxydoréductase (XOR).

La XOR est une enzyme homodimère composée de deux sous-unités identiques, chacune est de poids moléculaire d'environ 145 kDa (509-511). Chaque sous unité est organisée en trois domaines, chacun étant associé à un cofacteur spécifique : le domaine N-terminal de 20 kDa (510-513) (Figure 50).

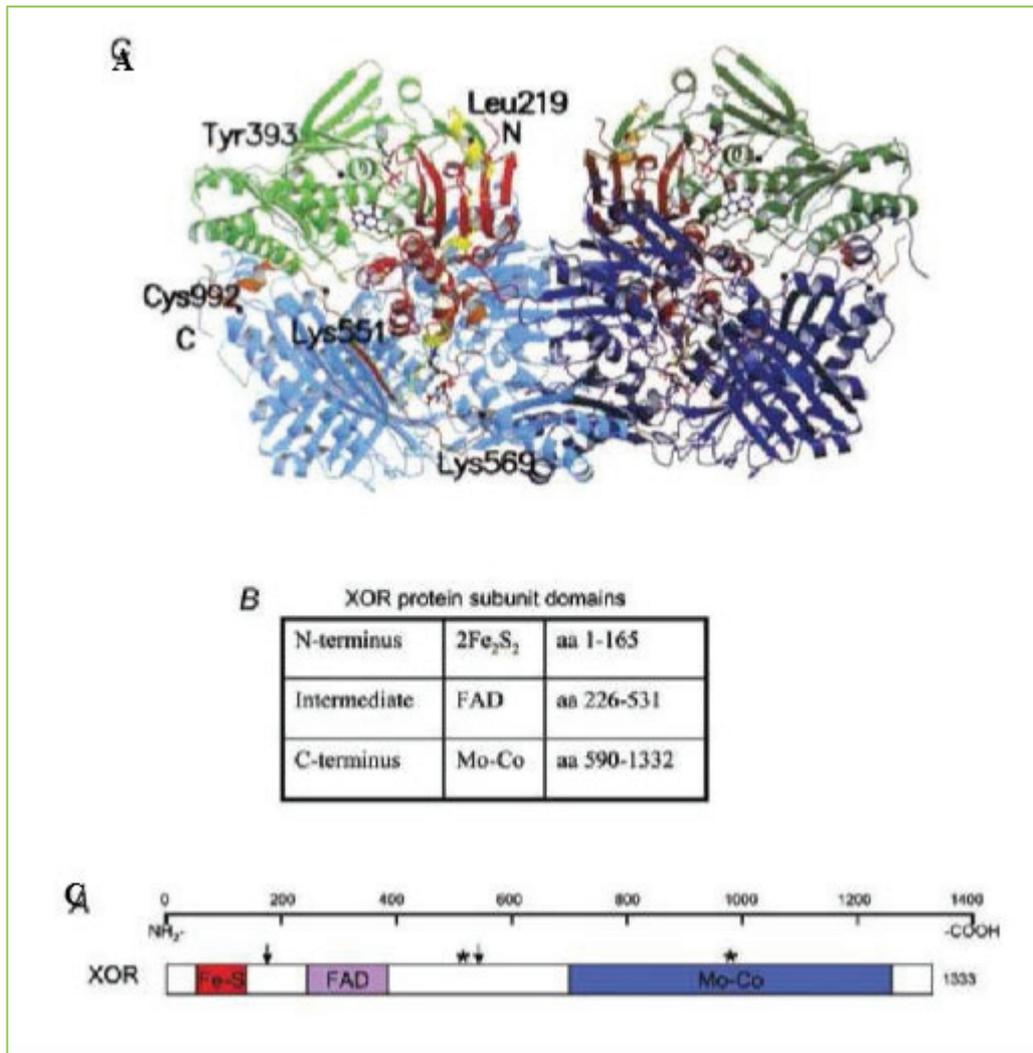


Figure 50. **Structure de l'enzyme xanthine oxydoréductase**

Tiré de (514) A: Structure cristalline de l'homodimère de la XOR bovine; les domaines identiques des deux sous unités sont représentés par les mêmes couleurs (claire pour le monomère à gauche, et plus foncées pour celui à droite): en rouge le domaine du Fe₂ / S₂, en vert le domaine du FAD et en bleu le domaine Mo (515) B: Les trois domaines des sous unités de la XOR, leurs tailles et leurs cofacteurs associés (515). C: Structure secondaire de la XOR, les flèches indiquent les sites de protéolyse par la trypsine(516) et les étoiles indiquent les résidus cystéines modifiés lors de la conversion réversible de la XOR (Cys 535, Cys 992) (517).

Le gène *XDH* codant pour la XOR humaine est long de plus de 60 kb, comprend 36 exons (518) et se trouve sur le bras court du chromosome 2 (2p22) (518, 519). Le transcrit d'ARNm contient un cadre de lecture ouvert de 3999 pb codant pour 1333 acides aminés (518, 519) (Figure 51).

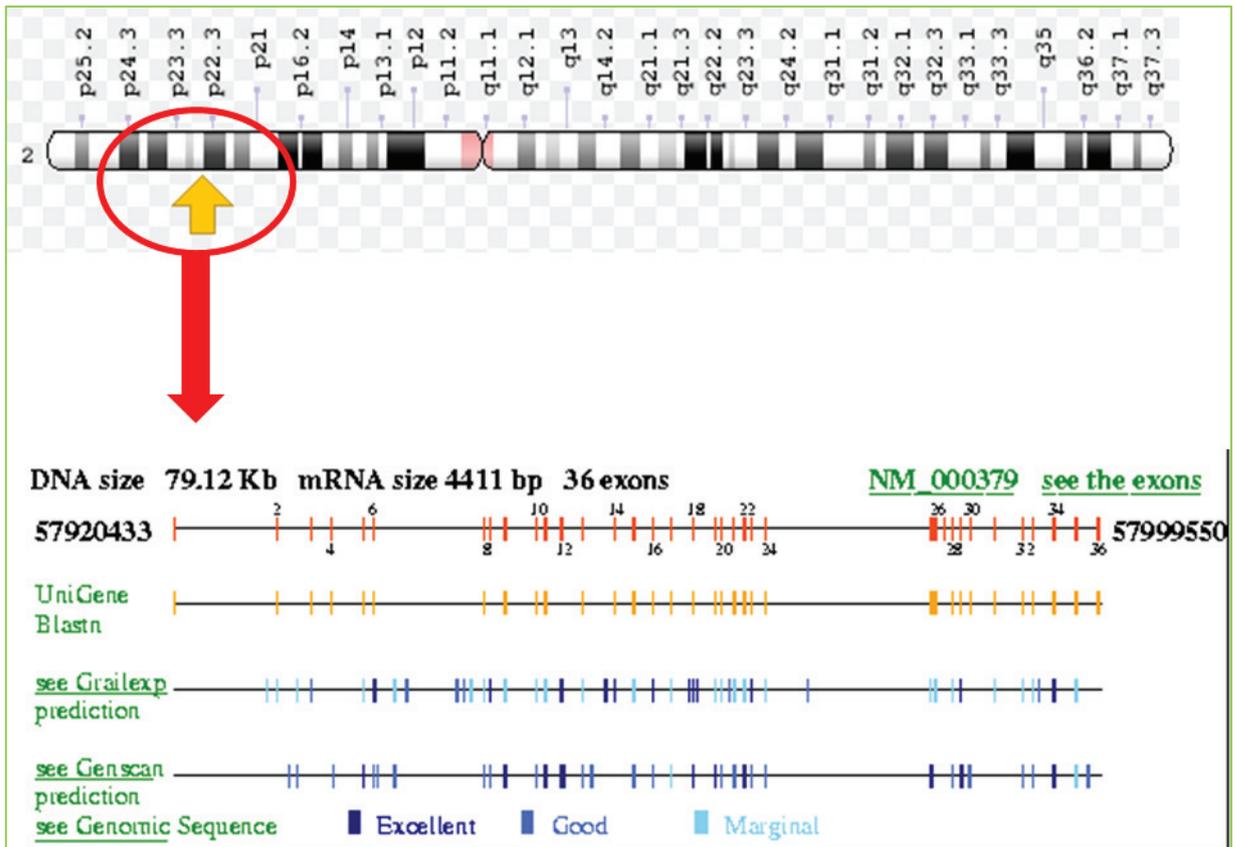


Figure 51. Caractéristiques moléculaires du gène XDH

Tiré de (<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>)

L'organisation intron-exon est presque identique entre les gènes XOR et AO (520) et leurs séquences d'acides aminés sont homologues à 50% (521). Leur similitude dans la structure primaire s'étend à leur structure tertiaire, car elles partagent les mêmes cofacteurs ainsi que plusieurs des mêmes substrats (520). Les gènes codant pour AO et XOR sont étroitement espacés sur le chromosome 2 (520), suggérant qu'ils proviennent d'un gène ancestral via la duplication en tandem. Le rôle fonctionnel de l'AO demeure inconnu, mais il est susceptible d'être différent de celui du XOR car il ne possède pas d'activité de déshydrogénase (522).

La distribution cellulaire de XO a été mise en évidence en 1981 par Jarasch et coll. (523) chez les bovins pour lesquels ils ont montré la présence de cette enzyme, en particulier dans l'endothélium capillaire des cellules mammaires (523). Parallèlement, chez l'homme, cette enzyme a été retrouvée dans les cellules du tractus digestif et dans le foie (524) mais aussi des glandes mammaires (525). Des études microscopiques des cellules endothéliales humaines ont confirmé non seulement la présence de XO dans le cytoplasme sous forme de vésicules (526) mais également dans la surface des cellules membranaires de manière asymétrique (527) (Tableau 4).

Tableau 4. Expression du gène XDH au sein de différents organes, tissus et cellules.

Tiré <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>.

Type	restricted									
expressed in	(based on citations)									
organ(s)	System	Organ level 1	Organ level 2	Organ level 3	Organ level 4	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol
	Digestive	intestine	large intestine	colon						
		intestine	small intestine							
		liver								
	Endocrine	neuroendocrine	pituitary							
	Respiratory	respiratory tract	larynx							
cells	System	Cell		Pubmed	Species	Stage	Rna symbol			
	Digestive	hepatocyte								

3.4.3.2 Polymorphismes génétiques

La xanthine oxydase est une des principales sources de radicaux libres (528). Elle est impliquée dans plusieurs pathologies telles que le diabète (529, 530), les problèmes cardiovasculaires, l'ischémie-reperfusion (531), la goutte (532) et l'athérosclérose (533). L'inhibition de cette enzyme est une approche thérapeutique très utilisée dans le traitement ou la prévention de plusieurs de ces maladies. Presque tous les auteurs qui ont montré une implication de la xanthine-oxydase dans ces différentes pathologies ont travaillé sur la protéine (via son activité enzymatique) et non sur les polymorphismes génétiques du gène *XDH*.

Néanmoins, une étude faite au sein d'une population espagnole a rapporté que différents polymorphismes dans les gènes de la voie oxydante (dont rs207454 sur le gène *XDH*) pouvaient affecter la susceptibilité au cancer du sein (534). A l'inverse, d'autres études ont observé une association entre ce polymorphisme *XDH* et la survie chez les femmes atteintes de cancer du sein (535) mais aussi chez des patients atteints de cancer gastrique (536). D'autres auteurs ont associé certains polymorphismes de *XDH* (rs1042039, rs1054889 et rs2073316) à l'hypertension artérielle dans la population rurale chinoise de Han (537). De plus, une étude japonaise a suggéré que des variations génétiques de *XDH*, à savoir trois mutations faux-sens (G172R, A932T, N1109T) et huit SNP communs (11488C> G, 37387A> G, 44408A> G, 46774G> A, 47686C> T, 49245A> T, 66292C> G et 69901A> C) contribuaient en partie à l'hypertension artérielle et à ses complications, y compris l'athérosclérose et

l'insuffisance rénale chronique (538). L'association entre l'exposition au plomb, le polymorphisme rs7574920 de XDH et le risque de tumeurs cérébrales adultes a également été observée par Bhatti P *et al.* (539).

3.4.4. Gène NFE2L2

3.4.4.1 Description du gène et de la protéine

En 1994, Moï *et al.* ont découvert la protéine Nrf2 (ou Nuclear Factor Erythroid 2 Related Factor 2) en recherchant des séquences polypeptidiques présentant une affinité avec la séquence NFE2/API1 située dans le promoteur du gène de la β -globine (540). Elle est composée de 605 acides aminés chez l'Homme, possède une région basique leucine zipper (bZIP) dans son domaine C-terminal est divisé en six domaines fonctionnels appelés Neh (Nrf2 ECH homology) (Figure 52) (541).

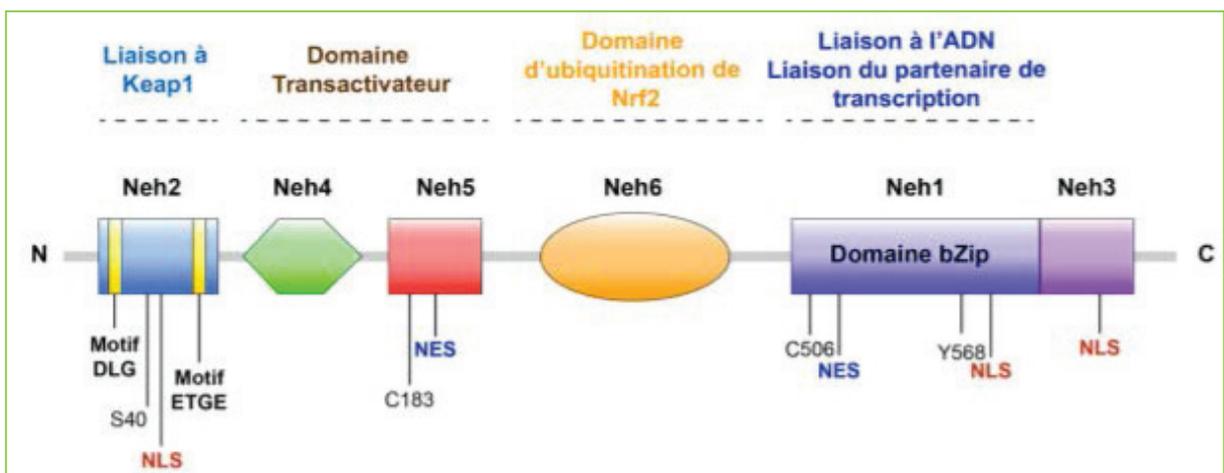


Figure 52. **Structure et domaines fonctionnels de la protéine Nrf2**

bZIP: domaine leucine zipper basique; Neh: Nrf2-ECH homology; NLS: nuclear localization signal; NES: nuclear export signal (541).

La protéine Nrf2 est exprimée de façon ubiquitaire : elle est présente dans de nombreux organes détoxifiants comme le foie et les reins ainsi que dans la peau, les poumons, le tube digestif et les muscles (Tableau 5)

Tableau 5. Expression du gène *NFE2L2* au sein de différents organes, tissus et cellules.

Tiré de <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>.

organ(s)	System	Organ level 1	Organ level 2	Organ level 3	Organ level 4	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol
	Digestive	liver				highly				
	Respiratory	lung	alveoli			highly		Homo sapiens		
	Urinary	kidney				highly				

tissue	System	Tissue	Tissue level 1	Tissue level 2	Level	Pubmed	Species	Stage	Rna symbol
	Muscular	striatum	skeletal						

cells	System		Cell		Pubmed	Species	Stage	Rna symbol
	Blood/Hematopoietic		neutrophil			Homo sapiens		
	Lymphoid/Immune		macrophage			Homo sapiens		
	Respiratory		alveolar macrophage			Homo sapiens		

Environ 250 gènes voient leur synthèse régulée par le facteur Nrf2 (542). Ils sont directement et indirectement impliqués dans une gamme de fonctions biologiques allant de la cyto-protection dans des conditions de stress à des voies métaboliques entraînant la production de NADPH et d'ATP (543, 544).

En-dehors de la drépanocytose, la réponse au SO utilisant la voie de signalisation Nrf2 est impliquée dans la protection contre le vieillissement, la neuro-dégénérescence, la carcinogénèse, l'hépatotoxicité, les maladies cardiovasculaires et les maladies respiratoires comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et l'emphysème, l'asthme, la fibrose et les agressions pulmonaires aiguës (545). Nrf2 aurait également un rôle cytoprotecteur dans le système de défense cellulaire (546, 547) avec de nombreux effets bénéfiques, du moins en théorie, dans le cancer.

En effet, il n'est pas clair que Nrf2 est un suppresseur de tumeur ou a un caractère oncogénique (543, 548). L'activation de Nrf2 entraîne une régulation à la hausse des gènes impliqués dans le métabolisme des médicaments et déclenche par conséquent une

résistance aux chimiothérapies. Une suractivation induit également une reprogrammation métabolique vers des voies anabolisantes parallèles à la glycolyse favorisant la croissance tumorale (549).

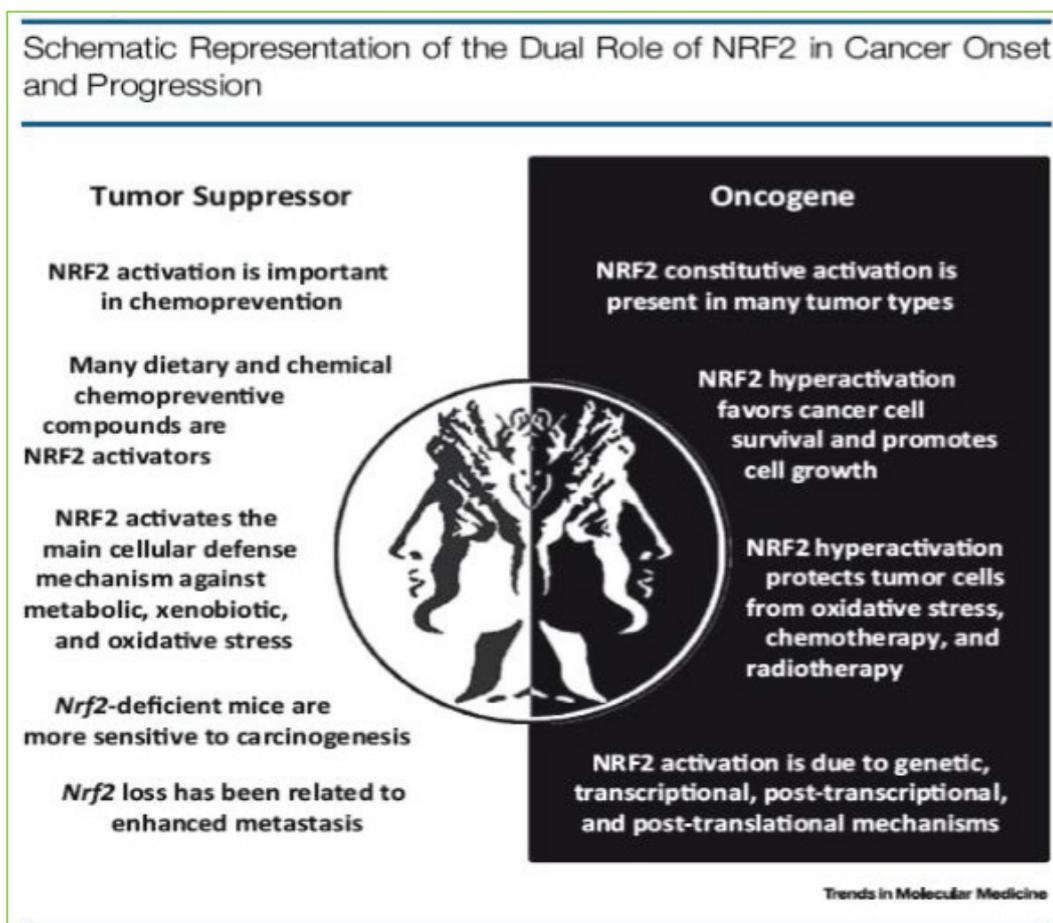


Figure 53. Rôle de NRF2 dans le cancer

Tiré de (550). Le côté gauche de la figure énumère certaines des preuves principales soutenant le rôle suppresseur de tumeur de NRF2; le côté droit de la figure résume les preuves à l'appui du rôle oncogène de NRF2. La figure bi-frontale représente Janus, le dieu romain à deux visages.

Le gène codant la protéine Nrf2 s'appelle *NFE2L2*. Il est localisé au niveau du bras court du chromosome 2 (2q31.2) et a une taille d'environ 34,8 kb avec 5 exons et 4 introns (Figure 54). Sa région promotrice contient deux séquences ARE/EpRE (élément antioxydant ou élément de réponse électrophile) à -492 pb et -754 pb à travers lesquelles elle est induite par Nrf2 (auto-induction). Sa région régulatrice contient trois séquences XRE (élément de réponse xénobiotique) à -712 pb, +755 pb et +850 pb. Les séquences ARE et XRE sont impliquées dans la régulation positive inductible de la transcription des gènes. Une région kB2 pour la liaison de NF-KB a été détectée à +270 pb, des stimuli pro-inflammatoires pouvant induire la transcription via cet élément. Enfin, cinq séquences CpG dans la région

promotrice permettent l'hyperméthylation et la répression de l'expression génique (543, 551).

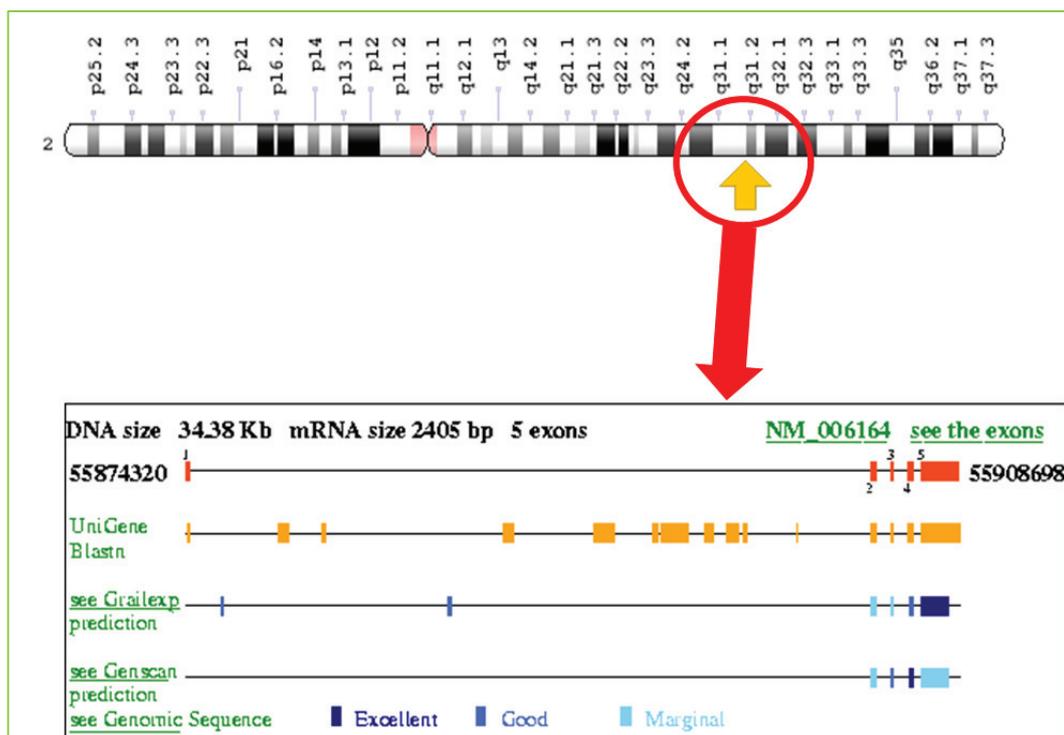


Figure 54. Localisation chromosomique du gène *NFE2L2*

Tiré de (<http://qenatlas.medecine.univ-paris5.fr/>.)

3.4.4.2 Polymorphismes génétiques

Sur le plan génotypique, certains polymorphismes du gène *NFE2L2* confirment le rôle de Nrf2 dans les cancers tels que les tumeurs de la tête et du cou, de la vessie, du colorectum et du poumon (552-554). En effet, un polymorphisme du gène serait significativement associé à la mortalité globale chez des femmes ménopausées atteintes de cancer du sein (555). Une association significative a été notée entre le SNP rs6721961 dans le promoteur *NFE2L2* et les effets tardifs de la radiothérapie chez les Afro-Américains, mais pas chez les caucasiens (556). Ce SNP se traduit par une expression réduite de Nrf2. Par contre, une autre étude n'a pas retrouvé de corrélation entre certains SNP du gène *NFE2L2* et la toxicité de la radiothérapie chez des femmes atteintes de cancer du sein (557). En outre ce SNP serait associé au syndrome myélodysplasique et la leucémie myéloïde aiguë qui ont comme caractéristiques communes un stress oxydatif élevé avec déficit de réparation et méthylation aberrante de l'ADN (558).

Une étude portant sur 11 SNPs du gène *NFE2L2* dont trois (rs35652124, rs6706649, rs6721961) dans la région promotrice a révélé qu'un haplotype constitué par les SNPs de la

région promotrice était associé à une efficacité accrue dans la réponse de Keap1-Nrf2-ARE au stress oxydatif dans un contexte de maladie de Parkinson (559). Le génotypage de six SNPs du gène *NFE2L2* (rs2364723, rs13001694, rs10497511, rs1806649, rs1962142 et rs6726395) a montré que ces polymorphismes n'étaient pas associés au risque de diabète de type 1, mais étaient significativement associés à ses complications (560). De plus, seul le SNP rs2364723 réduisait de manière significative les taux sériques de HMOX1 chez les patients atteints de diabète de type 1 portant l'allèle muté à l'état homozygote (GG), par rapport aux patients hétérozygotes (CG) et sauvages (CC) (560).

PARTIE 2 : ASPECTS METHODOLOGIQUES

**CHAPITRE 1 : CONCEPTS METHODOLOGIQUES DES ETUDES DE
CORRELATION PHENOTYPE-GENOTYPE**

**CHAPITRE 2 : STRATEGIE ET TECHNIQUES DE GENOTYPAGE
UTILISEES**

CHAPITRE 3 : LES METHODES DE DOSAGE DU STRESS OXYDANT

Chapitre 1 : Concepts méthodologiques des études de corrélation phénotype-génotype

1.1 Stratégie 'gènes-candidats' et études pangénomiques

La recherche et la caractérisation des déterminants génétiques impliqués dans les maladies génétiques "complexes" ont été initiées dans la décennie 1990 par des travaux qui ont concerné, entre autres, le diabète de type 2. Compte tenu de la multiplicité des loci potentiellement impliqués, les méthodes employées dans les maladies monogéniques ont dû être adaptées à l'étude de l'hérédité polygénique. On retiendra de cette époque deux méthodes majeures : la stratégie gène candidat et l'étude d'association pangénomique, GWAS (genome-wide association study).

1.1.1 Principe et avantages / inconvénients de chaque stratégie

1.1.1.1 Stratégie 'gènes-candidats'

Cette stratégie consiste à rechercher et à analyser les variants génétiques dans des gènes dont la fonction pourrait jouer un rôle dans la pathologie en question. Elle repose sur une bonne connaissance de la physiologie et de la fonction du gène mis en examen et de ses interactions avec les autres partenaires impliqués dans la même voie métabolique qui pourrait être incriminée dans la pathologie. Le gène peut être candidat parce qu'il est situé sur une région particulière d'un chromosome impliqué dans la maladie, ou parce que son produit protéique est suspecté d'être la cause de la maladie.

Puisque dans une maladie complexe chaque variant génétique ne possède qu'un effet minime sur la variation du trait phénotypique et donc sur la survenue ou non de la maladie, cette stratégie nécessite une approche épidémio-génétique sur des groupes importants de patients atteints et de sujets témoins indemnes de la maladie (études cas-témoins).

La question posée étant « le variant génétique est-il plus fréquent chez les sujets présentant la maladie que chez les témoins ? », la réponse ne peut être objectivée que par un test statistique de comparaison de fréquences au risque 5%, typiquement un test du chi². Si la réponse est oui, on est en droit de conclure (au risque de 5% de se tromper) que le variant en question est l'un des déterminants génétiques de la maladie, ou bien qu'il est en déséquilibre de liaison génétique avec l'un des déterminants génétiques de la maladie.

N'ayant aucune information objective et biologique quant au retentissement du variant génétique sur la fonction du gène et sur la maladie, nous ne pouvons à ce stade que constater qu'il existe une association significative au sens statistique entre la présence du variant génétique et la présence de la maladie. C'est pourquoi ces analyses sont appelées des analyses d'association.

Ces approches gène candidat, qui ont mis en évidence de nombreux variants génétiques impliqués dans des maladies génétiques complexes, présentent le défaut de ne pouvoir cibler et analyser que les gènes connus dont la fonction est évidemment connue et qui présentent un rapport a priori évident avec la pathologie.

1.1.1.2 Approche GWAS "Genome Wide Association Study"

Le développement des technologies de séquençage et de génotypage à haut débit à partir des années 2000, basées sur les "puces à ADN" (DNA chips) a ouvert la voie à l'obtention rapide d'un très grand nombre de génotypes. Il est alors devenu envisageable de génotyper un grand nombre de marqueurs génétiques chez un grand nombre de sujets.

Cette opportunité technologique a ouvert la voie aux GWAS qui se résument à l'étude d'association à très grande échelle : autant d'analyses d'association cas-témoin que de variants génétiques analysés. En effet la méthode consiste à génotyper un maximum de marqueurs génétiques (de 300 000 à 1 000 000 selon le type de puce à ADN) chez un grand nombre de sujets atteints de la maladie génétique complexe et un grand nombre de sujets témoins.

La méthode GWAS consiste en des études d'association entre un allèle donné d'un SNP et le phénotype "malade" ou "non malade." La méthode GWAS repose donc sur le déséquilibre de liaison génétique qui existe au sein du génome humain entre un allèle d'un marqueur génétique (SNP) et, à moins que le marqueur testé ne soit directement causal, un variant génétique potentiellement impliqué dans la maladie. Le variant étudié constitue une partie du déterminisme génétique de la maladie complexe.

Un des points forts de la méthode est qu'elle permet de cribler le génome avec une haute densité de marqueurs : en effet, pour une puce ADN 550K (qui génotype 550 000 SNPs), la densité moyenne est de 1 marqueur SNP toutes les 60 kb.

La méthode GWAS pourrait sembler "la" méthode définitive susceptible de repérer tous les déterminants génétiques d'une maladie, compte tenu de sa haute densité de

couverture du génome. Néanmoins la méthode souffre d'un certain nombre de limites. Comme elle se résume à une succession d'études d'association cas-témoin, l'association d'un SNP avec la maladie est testée comme habituellement, au risque statistique 5% (0,05). Une association sera réputée significative quand il n'y a que 5% de chance que cette affirmation soit fausse (ce qui somme toute laisse 95% de chance d'avoir raison), c'est le risque d'erreur de type I. En d'autres termes il y a 5% de chance que l'association soit trouvée positive par hasard. Ce qui implique que si le génotypage de quelques gènes se fait en gène-candidat, la probabilité de trouver une association 'par hasard' est faible. En revanche, le génotypage en GWS de 10000 gènes, va impliquer fatalement qu'on retrouve quelques associations statistiques uniquement par le fait du hasard. En d'autres termes, des études de réplication sont encore plus indispensables en GWAS.

Concernant les études réalisées durant cette thèse, nous avons privilégié la stratégie gènes-candidats.

1.1.2 Notion de déséquilibre de liaison

Les études d'association sont fondées sur le principe du déséquilibre de liaison (DL). On définit le déséquilibre de liaison comme une association non aléatoire entre les allèles de deux loci localisés sur le même chromosome. Plus deux loci sont proches l'un de l'autre, moins leurs allèles ont de chance d'être transmis de façon indépendante. Alors, on dit d'eux qu'ils sont en déséquilibre de liaison. Le concept de déséquilibre de liaison est très utile pour la recherche en génétique. Ceci s'explique par le fait que, si on trouve une association entre un marqueur et une maladie, cela suggère qu'il existe un déséquilibre de liaison entre eux, en d'autres mots que le locus marqueur et le locus de la maladie sont liés. On devine alors que le marqueur est situé à proximité du locus de la maladie, ce qui facilite alors l'identification du gène. L'un des avantages de connaître le déséquilibre de liaison des SNP dans une région donnée, réside dans le fait qu'il permet de sélectionner un groupe de SNP pour capturer la variabilité génétique de la région ciblée réduisant ainsi le nombre de SNP à génotyper (561). Cette méthode de sélection est appelée en anglais «tagging».

Les SNP ainsi sélectionnés sont appelés des SNP marqueurs ou «tagSNPs». Le «tagging» permet d'éviter la redondance et limite ainsi les coûts du génotypage. Ainsi dans les études d'association, les SNPs étudiés sont des 'tag SNP' c'est-à-dire qu'ils ne sont pas responsables directement de la variabilité génétique mais qu'ils seraient en fort déséquilibre de liaison avec le SNP responsable.

1.2 Démarches théoriques dans le choix des SNPs à tester en gène-candidat

1.2.1 Fréquence allélique dans la population considérée

L'évaluation de la fréquence d'un polymorphisme dans une population est importante pour évaluer son pouvoir pathogène potentiel et surtout la puissance statistique de notre étude. Sans rentrer dans le détail des calculs statistiques, on comprend bien qu'un SNP très rare nécessitera d'avoir une cohorte de taille extrêmement importante pour avoir un minimum de 'cas', c'est-à-dire des patients porteurs à la fois du SNP et du caractère phénotypique étudié. Pour une cohorte de 300 patients, une fréquence allélique (FA) d'au moins 20% est souhaitable afin d'avoir environ au moins une soixantaine de patients hétérozygotes pour la mutation considérée.

Cette évaluation *a priori* de la FA du SNP considéré dans une population est possible grâce aux bases de données issues du séquençage à haut débit (SHD), dont l'accessibilité a permis le séquençage de plus en plus d'individus de populations très diverses ces dernières années. On citera principalement : le projet «1000 Genomes», la base ESP (Exome Sequencing Project) qui comprend actuellement les exomes de 6502 individus., la base ExAC (Exome Aggregation Consortium) regroupant les exomes de 60 706 individus issus de 14 cohortes de patients de 6 groupes de populations. La base gnomAD (Genome Aggregation Database), qui correspond à une évolution d'ExAC, compile actuellement 123.136 exomes et 15.946 génomes. Elle regroupe les données d'ExAC et d'autres projets de séquençage tels que 1000 Genomes et HapMap. La base dbSNP est à l'origine une base de polymorphismes de type SNP mais aujourd'hui elle référence également les variations selon leur degré de pathogénicité. Ces différentes bases de données sont regroupées dans le Tableau 6 selon qu'il s'agit d'une base de données des populations, spécifique d'une maladie ou bien une base de séquences

Tableau 6. Bases de données de populations, de maladies et séquences

Tiré de (562).

Population databases	
Exome Aggregation Consortium http://exac.broadinstitute.org/	Database of variants found during exome sequencing of 61,486 unrelated individuals sequenced as part of various disease-specific and population genetic studies. Pediatric disease subjects as well as related individuals were excluded.
Exome Variant Server http://evs.gs.washington.edu/EVS	Database of variants found during exome sequencing of several large cohorts of individuals of European and African American ancestry. Includes coverage data to inform the absence of variation.
1000 Genomes Project http://browser.1000genomes.org	Database of variants found during low-coverage and high-coverage genomic and targeted sequencing from 26 populations. Provides more diversity compared to the Exome Variant Server but also contains lower-quality data, and some cohorts contain related individuals.
dbSNP http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp	Database of short genetic variations (typically ≤ 50 bp) submitted from many sources. May lack details of the originating study and may contain pathogenic variants.
dbVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar	Database of structural variation (typically > 50 bp) submitted from many sources.
Disease databases	
ClinVar http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar	Database of assertions about the clinical significance and phenotype relationship of human variations.
OMIM http://www.omim.org	Database of human genes and genetic conditions that also contains a representative sampling of disease-associated genetic variants.
Human Gene Mutation Database http://www.hgmd.org	Database of variant annotations published in the literature. Requires fee-based subscription to access much of the content.
Locus/disease/ethnic/other-specific databases	
Human Genome Variation Society http://www.hgvs.org/dblist/dblist.html	The Human Genome Variation Society site developed a list of thousands of databases that provide variant annotations on specific subsets of human variation. A large percentage of databases are built in the Leiden Open Variation Database system.
Leiden Open Variation Database http://www.lovd.nl	
DECIPHER http://decipher.sanger.ac.uk	A molecular cytogenetic database for clinicians and researchers linking genomic microarray data with phenotype using the Ensembl genome browser.
Sequence databases	
NCBI Genome http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome	Source of full human genome reference sequences.
RefSeqGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg	Medically relevant gene reference sequence resource.
Locus Reference Genomic (LRG) http://www.lrg-sequence.org	
MitoMap http://www.mitomap.org/MITOMAP/ HumanMitoSeq	Revised Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA.

Ces différentes bases de données vont permettre de filtrer les variants selon leur fréquence dans la population générale. On considère qu'un variant est un polymorphisme lorsque sa fréquence dans la population générale est supérieure à 1%. Cependant les informations issues de ces bases de données doivent être utilisées avec prudence. Ces bases ne contiennent pas que des variants bénins et les cohortes peuvent contenir des individus présentant diverses pathologies de l'adulte, seuls les phénotypes pédiatriques sévères étant éliminés. Les filtres utilisés avec ces bases de données ne sont donc pas parfaits et peuvent éliminer des variants pathogènes qu'ils considèrent comme bénins (faux négatifs).

1.2.2 Evaluation du pouvoir pathogène présomptif

1.2.2.1 Principe général

L'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) rappelle dans ses recommandations de 2015 de ne plus utiliser les termes « mutation » ou « polymorphisme » mais seulement le terme « variant » qui sera interprété selon le niveau de pathogénicité (562). Un variant est donc une modification par rapport à la séquence de référence et les variants sont répartis en cinq classes différentes, allant de « pathogène » à « bénin ».

Dans l'étude d'une maladie génétique selon la stratégie « gène-candidat », nous pouvons avoir plusieurs variants de FA comparable localisés sur le gène considéré et la logique est évidemment de choisir de préférence celui ou ceux situés dans les exons et entraînant un changement d'acide-aminé. Ce sont ces derniers qui ont le plus de chance d'entraîner une perte de fonction ou une diminution de synthèse partielle de la protéine. Les SNPs introniques ne peuvent en théorie jouer que sur le degré de synthèse de la protéine, soit par une diminution de la fixation des facteurs de transcription au niveau du promoteur, soit par des anomalies d'épissage.

1.2.3.2 Variants affectant l'épissage

Une majorité des mutations d'épissage causant des maladies chez l'homme touche les deux dinucléotides conservés GT et AG localisés respectivement dans les sites donneurs et accepteurs (563). Ces deux dinucléotides sont essentiels dans la définition de l'exon par le splicéosome mais des mutations affectant d'autres positions des sites d'épissage 5' et 3', introniques ou exoniques, peuvent également causer un épissage aberrant conduisant à un saut d'exon, une activation d'un site cryptique d'épissage ou une rétention d'intron. En dehors de ces sites, des mutations peuvent également affecter le point de branchement, ou créer/activer des sites cryptiques d'épissage aboutissant à un épissage partiel de l'exon. Dans ce cas l'exon sera plus court ou plus long, selon que le site cryptique activé par la mutation est exonique ou intronique (Figure 55).

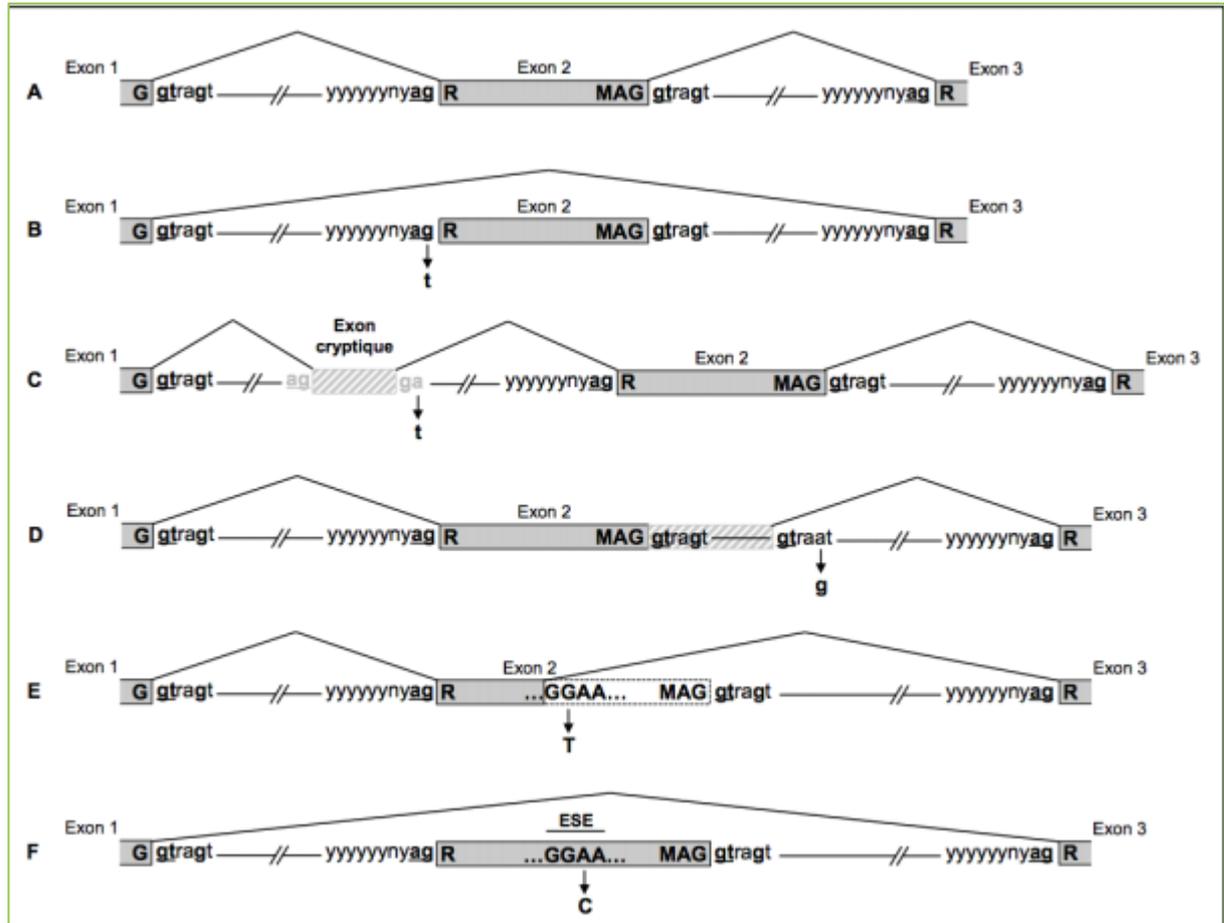


Figure 55. Mutations affectant l'épissage

(A) Épissage normal. (B) Mutation d'un site consensus d'épissage, un saut d'exon est observé la plupart du temps. (C) Mutation intronique entraînant l'activation d'un site cryptique d'épissage. Un exon cryptique est alors retenu lors de l'épissage. (D) Mutation intronique créant un nouveau site consensus d'épissage conduisant à la rétention d'une séquence intronique. (E) Mutation exonique créant un nouveau site consensus d'épissage à l'excision d'une partie de l'exon. (F) Mutation exonique affectant un ESE (*exonic splicing enhancers*), un saut d'exon est observé la plupart du temps Tiré de (564).

1.2.3.3 Variations faux-sens

Les mutations faux-sens sont responsables d'un changement d'acide aminé. Elles peuvent affecter la stabilité, l'adressage intracellulaire, la maturation de la protéine, son assemblage dans une structure multimérique, les sites importants pour l'activité enzymatique, les interactions fonctionnelles avec des ligands et d'autres protéines. Lorsqu'un changement faux-sens est survenu, il est souvent difficile de distinguer une mutation pathogène d'une simple variation nucléotidique, sans effet fonctionnel, mais qui serait rare dans la population étudiée. L'absence de changement d'acide aminé laisserait supposer une absence de conséquence fonctionnelle. Cependant, pour une minorité de mutations synonymes, un effet délétère a pu être montré avec une altération de l'épissage dans la majorité des cas (Cf. paragraphe précédent) (565).

1.2.3.4 Variations affectant la régulation de la transcription

Une mutation délétère localisée dans le promoteur d'un gène peut, par plusieurs mécanismes, affecter l'expression de ce gène. Tout type de mutations peut être rencontré et de nombreux exemples sont décrits en pathologie humaine (566). En dehors des régions promotrices, les mutations peuvent altérer d'autres éléments pouvant se trouver à des centaines voire des milliers de paires de bases du gène. Ces séquences régulatrices de courtes tailles peuvent fixer des facteurs de transcription entraînant l'activation (enhancers) ou l'inhibition (silencers) de la transcription (567).

L'expression d'un gène peut également être altérée par le changement de son environnement chromatinien habituel. Cet effet de position peut être la conséquence de remaniements tels que des translocations, délétions, insertions ou inversions (568) ou de la délétion du LCR (pour Locus Control Region) (569). Enfin, des variations de gènes codant des facteurs de transcription peuvent également être la cause d'anomalies de la transcription (570).

1.3 Application aux SNPs de notre étude

1.3.1 Gène *MPO* – rs2333227

Très peu d'études ont porté sur les polymorphismes du gène *MPO* chez des patients drépanocytaires. La principale a suggéré que le polymorphisme rs2333227 (G-463A) du gène *MPO* pouvait être un modulateur génétique important de la susceptibilité aux infections des patients drépanocytaires (571). Neuf ans plus tard, Barbosa *et al.* ont montré que l'homozygotie AA pour ce SNP serait corrélée positivement au nombre d'hospitalisations et à la splénectomie (572). Enfin, tout récemment, une étude a rapporté que les génotypes GA ou AA de ce SNP seraient associés à un faible taux de cholestérol total et de LDL-Cholestérol chez les patients drépanocytaires sous HU (573). Ces mêmes auteurs ont également observé que les patients GA ou AA sous HU avaient des taux d'acide urique plus bas que ceux qui n'en prenaient pas.

Pour l'étude des polymorphismes du gène *MPO*, nous avons donc choisi le polymorphisme rs2333227 cité plus haut. Cette mutation dont la nomenclature HGVS est NM_000250.1(*MPO*) : c.-643G>A est située dans la région promotrice du gène. Il s'agit d'une mutation où une cytosine ou guanine est remplacée par une thymine ou adénine, selon que

l'on se situe sur le brin sens ou anti-sens (Figure 56) et qui entrainerait d'après la littérature une diminution de l'activité enzymatique de la protéine (446).



Figure 56. Gène MPO avec la mutation NM_000250.1(MPO):c.-643G>A (rs2333227)

Un élément très important qui a aussi motivé le choix de ce polymorphisme a été sa fréquence allélique au sein de la population africaine qui est de 0.36 (Figure 57).

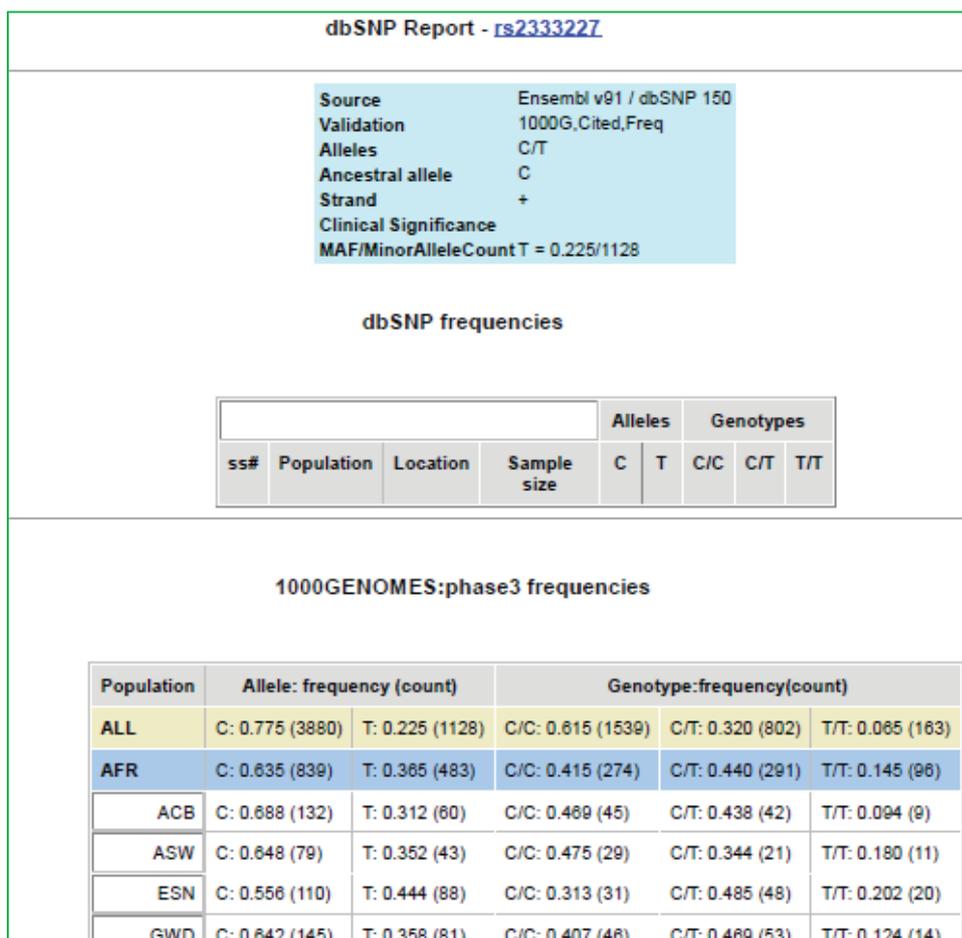


Figure 57. Fréquence allélique du polymorphisme rs2333227 dans la population africaine.

1.3.2 Gène SOD2 – rs4880

Malgré les nombreux travaux portant sur l'enzyme SOD2 dans la drépanocytose, seul un article portant sur l'étude du gène *SOD2* dans la drépanocytose aurait été publié à ce jour. Dans cette étude, Farias et collaborateurs (574) ont examiné l'association du polymorphisme rs4880 (Val16Ala) de *SOD2* et de l'activité superoxyde dismutase (SOD) avec la crise vaso-occlusive et la séquestration splénique aiguë chez des enfants atteints de drépanocytose. Les résultats obtenus ont suggéré que le polymorphisme rs4880 de *SOD2* (associé à une faible activité de la SOD) pourrait être un facteur de susceptibilité à la survenue de ces deux complications cliniques de la drépanocytose.

Notre recherche bibliographique n'ayant *a priori* retrouvé que ce polymorphisme de *SOD2* étudié dans la drépanocytose, nous l'avons choisi pour notre population d'étude. Il s'agit d'une mutation située dans l'exon 2 et dont la nomenclature HGVS est NM_001024465.2(*SOD2*) : c.47T>C. Ce polymorphisme correspond à une mutation d'une thymine ou une adénine par une cytosine ou une guanine selon que l'on se trouve sur le brin sens ou anti-sens (Figure 58).

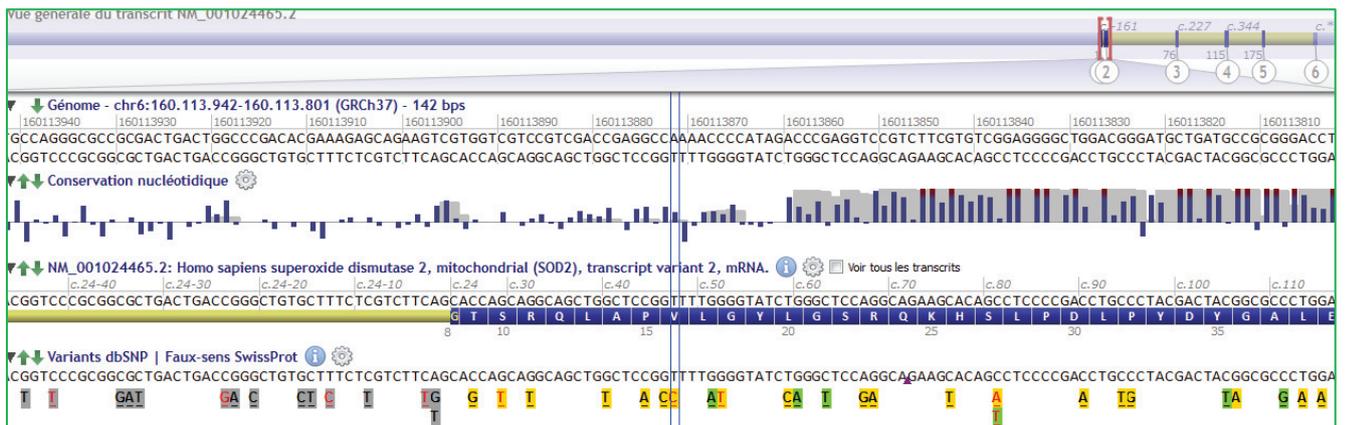


Figure 58. Gène SOD2 avec la mutation NM_001024465.2(*SOD2*):c.47T>C (rs4880)

Cette mutation n'affecte pas l'épissage et présente une fréquence allélique de 0.42 au sein de la population africaine (Figure 59).

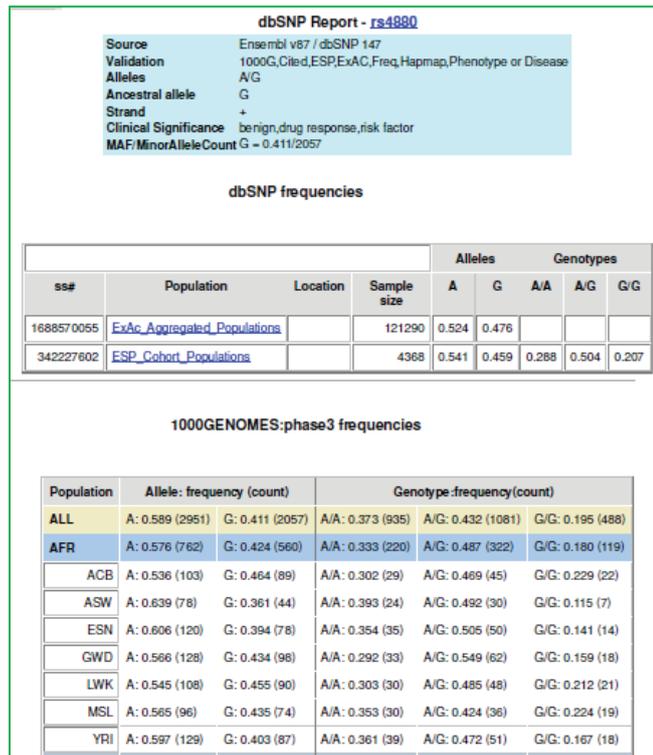


Figure 59. Fréquence allélique polymorphisme rs4880 dans la population africaine.

1.3.3 Gène XDH – rs207454

Plusieurs études ont porté sur le gène XDH dans des pathologies autres que la drépanocytose (cf chapitre 'Effets du gène-contexte hors drépanocytose du gène XOR'). A notre connaissance, il n'existe pas encore de travaux sur l'étude du gène ou de ses variants dans la drépanocytose. La majorité des travaux portant sur le gène XOR, ont étudié le variant rs207454 et il a été démontré que ce variant a des effets significatifs dans plusieurs pathologies donc susceptibles d'avoir un impact dans la drépanocytose. Par conséquent, nous l'avons choisi pour l'étudier dans notre travail.

Cette variation de séquence, dont la nomenclature HGVS est NM_000379.3(XDH):c.3352-30A>C, est une mutation intronique d'une adénine par une cytosine (Figure 60).



Figure 60. Gène XDH avec la mutation NM_000379.3(XDH):c.3352-30A>C (rs207454) Sa fréquence allélique au sein de la population africaine est assez élevée (0.37). Elle entraînerait une diminution du niveau d'expression de l'ARNm (536) (Figure 61).

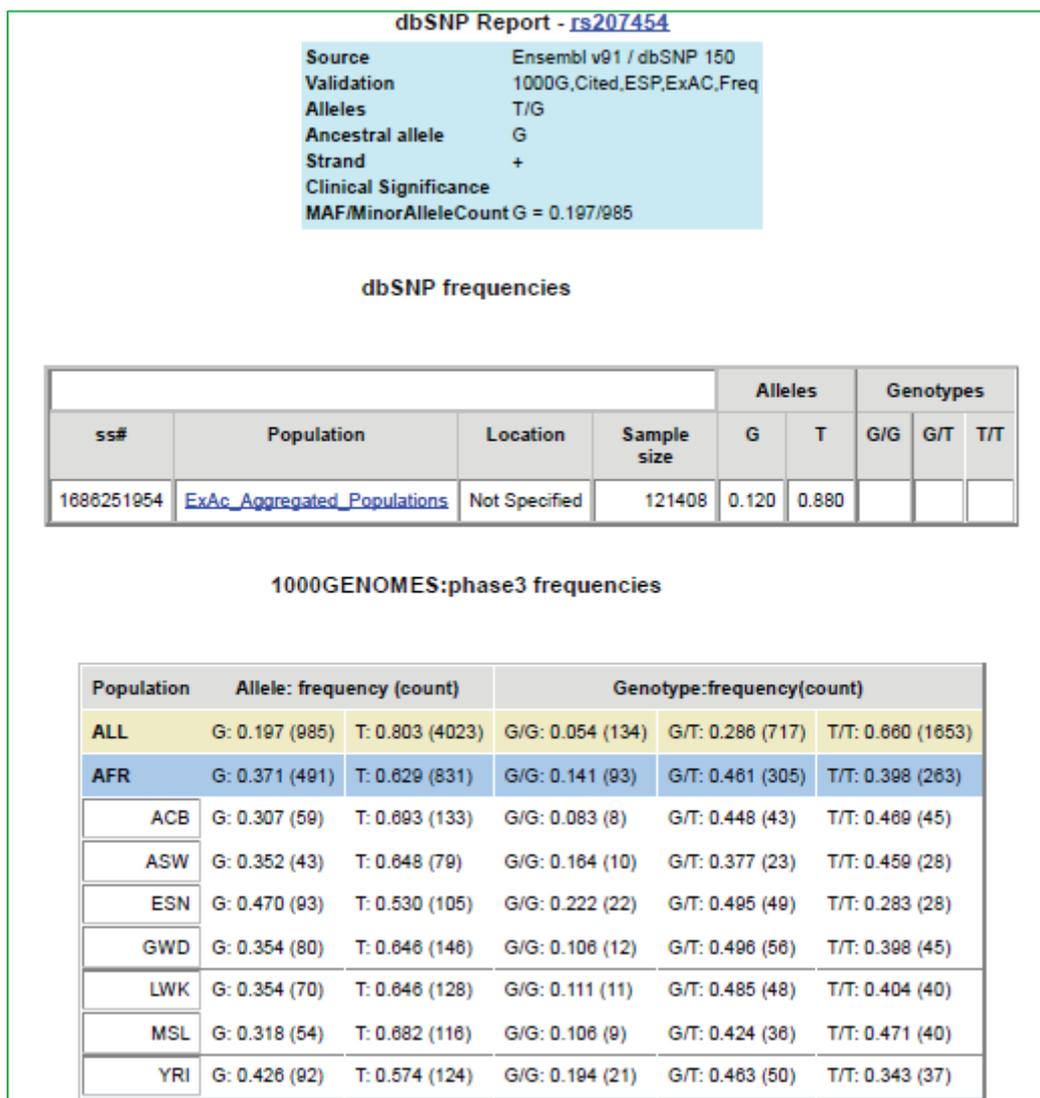


Figure 61. Fréquence allélique du polymorphisme rs207454 dans la population africaine

1.3.4 Gène *NFE2L2* – rs35652124

Comme pour le gène *XDH*, plusieurs polymorphismes du gène *NFE2L2* ont fait l'objet d'études mais aucune ne portait sur la drépanocytose (cf chapitre 'Effets du gène-contexte hors drépanocytose du gène *NFE2L2*').

Dans notre travail, nous avons choisi d'étudier le polymorphisme rs35652124 dans la drépanocytose car elle semble diminuer l'activité du promoteur *Nrf2* (575). Ce polymorphisme situé dans la région promotrice correspond au remplacement d'une adénine par une guanine (Figure 62) et sa nomenclature HGVS est NM_006164.4(*NFE2L2*):c.-769A>G.

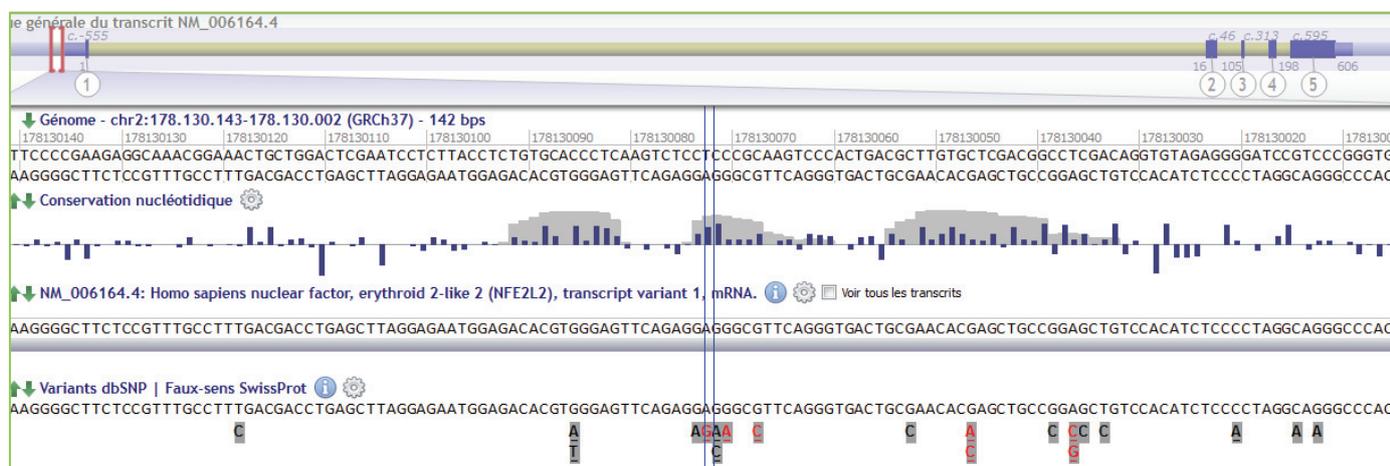


Figure 62. Gène *NFE2L2* avec la mutation NM_006164.4(*NFE2L2*):c.-769A>G (rs35652124)

Il a une fréquence allélique de 0.14 au sein de la population africaine (Figure 63).

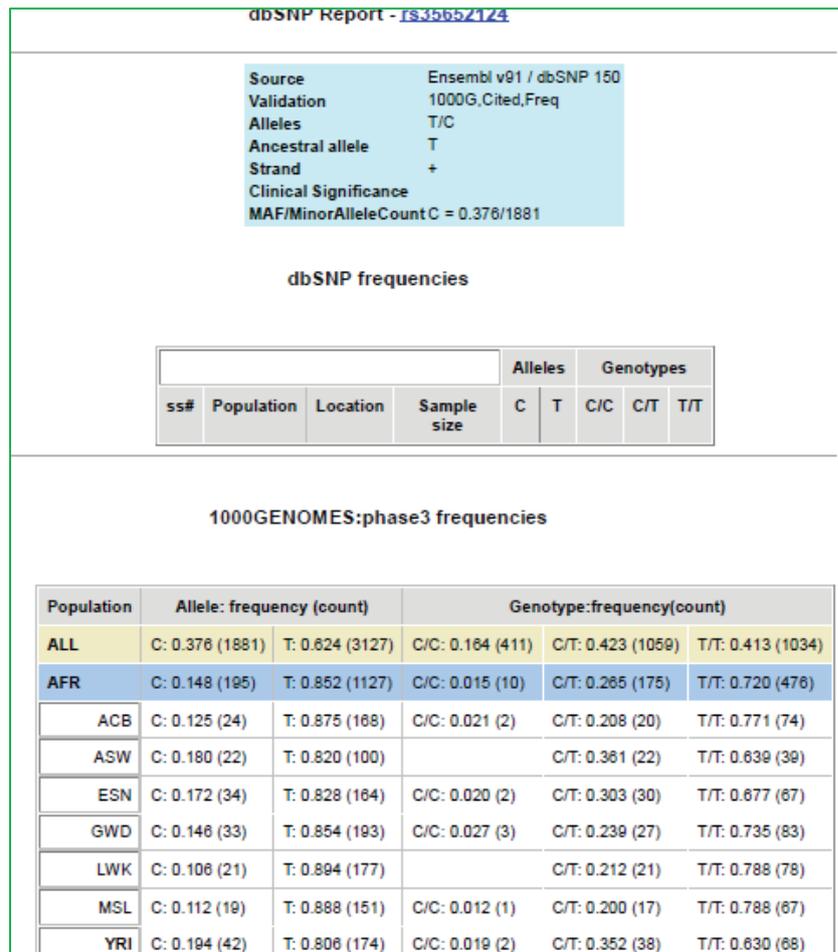


Figure 63. Fréquence allélique du polymorphisme rs35652124 dans la population africaine.

1.4 Analyse critique et exploitation des résultats de génotypage obtenus

1.4.1 Equilibre de Hardy-Weinberg

1.4.1.1 Principe

Le test de Hardy-Weinberg consiste à s'assurer de la répartition homogène d'un variant génétique dans une population avec une fréquence restant en théorie constante d'une génération à une autre (576). Une question centrale est de savoir si la loi de Hardy-Weinberg établie pour une population théorique idéale s'applique également aux populations naturelles ou observées. Cette loi, qui s'appuie en effet sur un raisonnement probabiliste, ne s'applique en théorie qu'à des populations d'effectif infini, et supposées remplir toute une série de conditions qui ne sont jamais respectées dans la nature (absence de mutation, migration, sélection).

Le principe du test est simple et peut être résumé en 3 étapes :

1/ Echantillonnage d'une population, dénombrement des effectifs génotypiques réels (possible grâce à la codominance) et calcul des fréquences alléliques réelles parmi les N

individus échantillonnés, soit $p = f(A)$ et $q = f(a)$.

2/ Calcul des effectifs génotypiques attendus (c'est-à-dire le nombre d'homozygotes sauvages, d'hétérozygotes et d'homozygotes mutés) dans une population théorique idéale qui aurait le même effectif et les mêmes fréquences alléliques que la population étudiée. Les formules de calcul sont les suivantes : nbre (AA) = $p^2 \times N$; Nbre (Aa) = $2pq \times N$ et nbre (aa) = $q^2 \times N$.

3/ Comparaison des effectifs observés et des effectifs attendus (comparaison des deux distributions) par un test statistique du Chi Deux. Le test du Chi Deux nécessite le calcul de la distance X^2 permettant de tester l'hypothèse d'égalité entre la distribution observée et la distribution théorique (Hypothèse nulle H_0).

$$X^2 = \sum \frac{(\text{effectifs observés} - \text{effectifs théoriques})^2}{\text{effectifs théoriques}}$$

La somme est effectuée sur tous les génotypes et la valeur X^2 est comparée à une valeur seuil, lue dans une table χ^2 , en fonction de 2 paramètres : un risque α choisi par l'utilisateur qui est en général 5% et un nombre de degrés de liberté (ddl) égal à la différence entre le nombre de génotypes et le nombre d'allèles du système génétique étudié (Tableau 7).

Tableau 7. Loi du khi-deux avec le nombre de degrés de liberté

α	0,05	0,01	0,001
ddl			
1	3,84	6,63	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,81	11,34	16,27
4	9,49	13,28	18,47
5	11,07	15,09	20,52
6	12,59	16,81	22,46
7	14,07	18,48	24,32
8	15,51	20,09	26,12
9	16,92	21,67	27,88
10	18,31	23,21	29,59
11	19,68	24,72	31,26
12	21,03	26,22	32,91
13	22,36	27,69	34,53
14	23,68	29,14	36,12
15	25,00	30,58	37,70
16	26,30	32,00	39,25
17	27,59	33,41	40,79
18	28,87	34,81	42,31
19	30,14	36,19	43,82
20	31,41	37,57	45,31
21	32,67	38,93	46,80
22	33,92	40,29	48,27
23	35,17	41,64	49,73
24	36,42	42,98	51,18
25	37,65	44,31	52,62
26	38,89	45,64	54,05
27	40,11	46,96	55,48
28	41,34	48,28	56,89
29	42,56	49,59	58,30
30	43,77	50,89	59,70

L'interprétation se fait alors comme suit :

- si χ^2 calculé est inférieur à χ^2 seuil, H0 est acceptée et on conclut que la population suit la loi de Hardy-Weinberg ;
- si χ^2 calculé est supérieur à χ^2 seuil, H0 est rejetée et on conclut que la population ne suit pas la loi de Hardy-Weinberg avec un risque $\alpha = 5\%$ de se tromper.

1.4.1.2 Exemple

Prenons comme exemple la répartition de la délétion alpha-thalassémique de -3.7 Kb au sein de la population de 300 enfants drépanocytaires (600 allèles) utilisée pour notre étude dont les génotypes se distribuent comme suit : 238 sauvages, 56 hétérozygotes et 6 homozygotes.

Calculs de p et q :

$$p = ((2 \times 238) + 56) / 600 = 0.89 ; q = ((2 \times 6) + 56) / 600 = 0.11$$

Fréquences théoriques des 3 génotypes et effectifs attendus :

- Sauvages : $p^2 = 0,792$ soit un effectif théorique de $0.792 \times 300 = 237,6$ soit 238 patients ;
- Hétérozygotes : $2pq = 0,196$ soit un effectif théorique de $0,196 \times 300 = 58,8$ soit 59 patients ;
- Homozygotes : $q^2 = 0,012$ soit un effectif théorique de $0,012 \times 300 = 3,6$ soit 3 patients.

Test du Chi-Deux :

Tableau III. Répartition homogène de la délétion -3,7 kb au sein de notre population d'étude

	Sauvages	Hétérozygotes	Homozygotes	p
Effectifs observés	238	56	6	0.72
Effectifs théoriques	238	59	3	

Calcul du nombre degrés de liberté

Puisque dans notre exemple, nous avons 3 génotypes et 2 allèles, le ddl=3-2 = 1, donc le χ^2 seuil est égal 3.84 (cf tableau 8).

Calcul de χ^2

Si nous appliquons la formule, nous aurons, $\chi^2 = 3.15$.

Par conséquent, χ^2 (3.15) calculé est inférieur à χ^2 seuil (3.84 pour 1 ddl) et donc H_0 est acceptée et on en conclut que la population suit la loi de Hardy-Weinberg. En d'autres termes, le test de Chi-Deux n'étant pas statistiquement significatif, l'hypothèse H_0 est retenue : la délétion alpha-thalassémique -3,7 kb est répartie de façon homogène au sein de notre population d'étude.

1.4.2 Analyse statistique : modèle dominant, récessif ou additif

Une fois les résultats de génotypage 'validés' par le test de Hardy-Weinberg, l'étape suivante est de mettre en relation la présence du SNP (à l'état hétérozygote ou homozygote) au caractère phénotypique étudié. Si l'on considère « a » l'allèle majeur, c'est-à-dire le plus fréquent dans une population donnée, et « A » le SNP considéré, les génotypes possibles sont donc « aa », « aA » ou « AA ». Considérons R_α le risque de base d'avoir la maladie ($R_\alpha > 1$) et R_β le sur-risque lié à la présence du SNP ($R_\beta > R_\alpha$). R_α correspond donc au génotype « aa ». On ne sait pas a priori si l'augmentation du risque de la maladie existe dès la première copie du SNP ou s'il en faut 2.

On doit donc utiliser 3 modèles différents pour évaluer ce risque : le modèle récessif, le modèle dominant et le modèle additif (Figure 64) (577) :

- le modèle dominant considère que R_β est atteint à partir du moment où au moins un allèle A est présent, c'est-à-dire pour les génotypes « aA » et « AA » ;
- le modèle récessif considère que 2 copies de l'allèle A sont nécessaires pour atteindre R_β (génotype « AA »). Le génotype « aA » n'entraîne donc pas de modification de R_α ;
- le modèle additif considère que R_α est augmenté en présence d'une seule copie du SNP (génotype « aA ») mais sans toutefois atteindre R_β . R_β est atteint lorsque le sujet est porteur de deux copies de A (génotype « AA »).

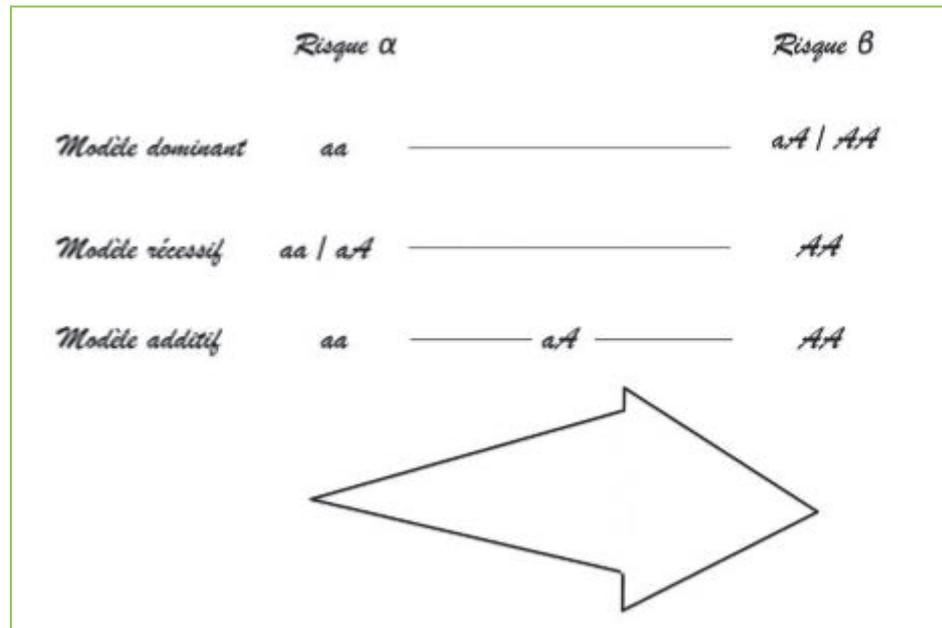


Figure 64. **Risque de maladie en fonction du génotype et du modèle statistique considéré.**

Tiré de (577) a allèle majeur (le plus fréquent dans une population donnée, non associé à la maladie), A : SNP considéré. Risque α : risque de maladie à l'état basal ; risque β : risque de maladie conféré par la présence de l'allèle A ; avec risque $\beta >$ risque $\alpha >$ 1.

En pratique, pour l'exploitation des résultats dans le modèle récessif, les patients seront classés en 2 catégories : les aa et aA d'un côté et les AA de l'autre. Dans le modèle dominant, on distinguera aussi 2 catégories : aa versus (aA + AA). En revanche, dans le modèle additif, chaque génotype sera comptabilisé à part.

1.4.3. Notion de cohorte de confirmation

Pour être acceptée scientifiquement, toute association statistique entre un SNP et un critère phénotypique doit impérativement être validée sur une cohorte de confirmation, idéalement totalement indépendante de la première. Comme cela n'est pas toujours possible, certains auteurs scindent en deux leur propre cohorte et se servent de la seconde 'semi-cohorte' pour confirmer les associations trouvées sur la première (578).

Chapitre 2 : Stratégie et techniques de génotypage utilisées

2.1 Contexte et stratégie globale

Nous avons mis au point pour le génotypage de tous les polymorphismes qui ont fait l'objet de cette étude des techniques facilement réalisables et reproductibles au Sénégal. Ces techniques sont :

- une technique de gap-PCR multiplex pour le diagnostic des principales délétions alpha-thalassémiques ;
- une technique FRET pour le génotypage du marqueur *Xmnl* ;
- des techniques HRM pour la recherche des variants fréquents de la G6PD et pour le génotypage des SNPs de BCL11A, de HMIP ainsi que des 4 SNPs du stress-oxydant décrits plus haut ;
- et bien sûr les réactions de séquençage Sanger correspondantes afin d'obtenir des témoins ou de vérifier certains résultats douteux.

2.2 Définition et validation d'un couple d'amorces de PCR

Prenons pour cela l'exemple du couple d'amorces que nous avons défini pour le séquençage Sanger du rs207454 (gène *XDH*).

2.2.1 Recherche de la carte d'identité d'un SNP

DbSNP de Pubmed est une des bases de données des mutations de maladies génétiques. Elle renferme des polymorphismes mono-nucléotidiques (SNP) et de multiples variations à petite échelle comprenant des insertions / délétions, des microsatellites et des variantes non polymorphes. Ceci nous permet d'avoir toutes les informations relatives à la séquence de référence, la localisation de la mutation, les fréquences alléliques au sein de différentes populations, etc. (Figure 65).

5/10/2016 Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs207454

NCBI dbSNP Short Genetic Variations

Search small variations in dbSNP or large structural variations in dbVar

Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs207454

RefSNP
 Organism: human (*Homo sapiens*)
 Molecule Type: Genomic
 Created/Updated in build: 79/147
 Map to Genome Build: 107/Weight 1
 Validation Status: [View](#) [Download](#)
 Citation: [PubMed](#)

Alele
 Variation Class: SNV: single nucleotide variation
 RefSNP Alleles: A/C (REV)
 Allele Origin:
 Ancestral Allele: C
 Variation Viewer: [View](#)
 Clinical Significance: NA
 G=0,1226/14421 (ExAC)
 G=0,1967/985 (1000 Genomes)
 G=0,1696/2206 (GO-ESP)

HGV Names

- NC_000002.11:g.31567632T
- NC_000002.12:g.31344766T
- NG_008871.1:g.74980A>C
- NM_000379.3:c.3352-30A>C
- XM_011533095.1:c.3349-30

SNP Details are organized in the following sections:
[GeneView](#) [Map](#) [Submission](#) [Fasta](#) [Resource](#) [Diversity](#) [Validation](#)

Integrated Maps (Hint: click on 'Chr Pos' to see variant in the new NCBI variation viewer)

Assembly	Annotation Release	Chr	Chr Pos	Contig	Contig Pos	SNP to Chr	Contig to Allele	Contig to Chr	Str
GRCh38.p2	107	2	31344766	NT_022184.16	15198647	Rev	T	Fwd	
GRCh37.p13	105	2	31567632	NT_022184.15	10389519	Rev	T	Fwd	

GeneView
 GeneView via analysis of contig annotation: [XDH](#) xanthine dehydrogenase
 View more variation on this gene (click to hide).
 Clinical Source: in gene region cSNP has frequency double hit [Go](#)

Primary Assembly Mappings	Assembly	SNP to Chr	Chr	Chr position	Contig	Contig position
	GRCh38.p2	Rev	2	31344766	NT_022184.16	15198647

Figure 65. Carte d'identité du SNP rs207254 du gène *XDH* sur dbSNP

La séquence de référence obtenue avec dbSNP va nous permettre de faire le design de nos amorces avec le logiciel Primer 3.0.

2.2.2 Définition d'un couple d'amorces sur primer 3.0

Le logiciel Primer 3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) est un logiciel de bio-informatique, disponible en ligne sur Internet, qui permet la définition rapide d'un couple d'amorces de PCR dans une région nucléotidique donnée. Le logiciel choisit les deux amorces de manière à éviter au maximum les problèmes d'auto-hybridation, tout en faisant en sorte que leurs Tm soient les plus proches possibles. De plus, sur l'écran de paramétrage, il faut aussi définir entre autres, la taille approximative des amorces que l'on souhaite. Ceci est capital car, en Sanger, il faut chercher des amplicons de 500 à 600 pb alors que pour l'HRM, il faudra des amplicons de 100 pb ou moins. Ceci garantit *a priori* la réussite de la réaction PCR. Le logiciel présente alors tous les couples répondant aux critères assignés, en les classant par ordre décroissant de 'probabilité de réussite'. En pratique, sauf cas particulier, on choisira le premier couple donné par le logiciel. Dans cet exemple, la taille de l'amplicon obtenu est de 569 pb. (Figure 66).

Primer3 Output

```
No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Unrecognized base in input sequence

OLIGO      start len   tm   gc%  any th  3' th  hairpin  seq
LEFT PRIMER  373  22  60.81  50.00  0.00  0.00  0.00  GGTGCCAGTGACAATGTAAGGT
RIGHT PRIMER  941  22  61.09  54.55  0.00  0.00  0.00  CAGGAGAACACTGAGGGAGGAA
SEQUENCE SIZE: 1001
INCLUDED REGION SIZE: 1001

PRODUCT SIZE: 569, PAIR ANY_TH COMPL: 1.05, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00
TARGETS (start len
```

Figure 66. Exemple de couple d'amorces défini dans Primer 3

2.2.3 Vérification de la spécificité du couple d'amorces à l'aide du logiciel Primer Blast

Afin d'éviter l'obtention d'amplicons parasites, il faut ensuite s'assurer que le couple d'amorces choisi n'a pas la possibilité de se fixer sur le génome ailleurs qu'au niveau de la zone étudiée. Ce point est vérifié à l'aide du logiciel Primer Blast, disponible lui aussi en ligne sur Internet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Schématiquement, le logiciel recherche alors tous les amplicons 'possibles' avec leur taille théorique en utilisant les amorces sélectionnées. Idéalement, il faut que notre amplicon cible (et seulement celui-là) soit retrouvé. Si un ou plusieurs amplicons surnuméraires sont détectés, on s'expose à obtenir des amplifications non spécifiques en mettant en œuvre la PCR. Cependant, il n'y a pas trop de risque si les amplicons 'théoriques' obtenus ont une taille supérieure à 1500 pb puisqu'il s'agit à peu près de la limite supérieure pour une PCR faite dans les conditions classiques. Par exemple, avec les amorces choisies ci-dessus, le logiciel donne l'amplicon attendu et seulement celui-là (Figure 67) :

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGTGCCAGTGACAATGTAAGGT	22	60.81	50.00	5.00	1.00
Reverse primer	CAGGAGAACACTGAGGGAGGAA	22	61.09	54.55	3.00	0.00
Products on intended target						
Products on allowed transcript variants						
Products on potentially unintended templates						
Products on target templates						
> NC_000002.12 Homo sapiens chromosome 2, GRCh38.p7 Primary Assembly						
product length = 569						
Features associated with this product:						
xanthine dehydrogenase/oxidase isoform X1						
xanthine dehydrogenase/oxidase						

Figure 67. Vérification de la spécificité du couple d'amorces XDH sur Primer Blast

2.2.4 Vérification de l'absence de SNP parasite au niveau des amorces

Pour qu'une amplification PCR soit correcte, il est capital que les amorces puissent se fixer sans aucun mésappariement sur le génome. Ceci inclut de vérifier : (i) leur complémentarité parfaite avec la séquence sauvage et (ii) l'absence, autant que possible, du moindre SNP sur leur séquence afin d'éviter une amplification spécifique d'allèle. Ce dernier point est vérifié à l'aide du logiciel SNP check lui aussi disponible sur Internet (<https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm>) (Figure 68). Les SNPs qui peuvent être vraiment gênants, sont ceux situés dans la région 3' des amorces avec une fréquence allélique significative.

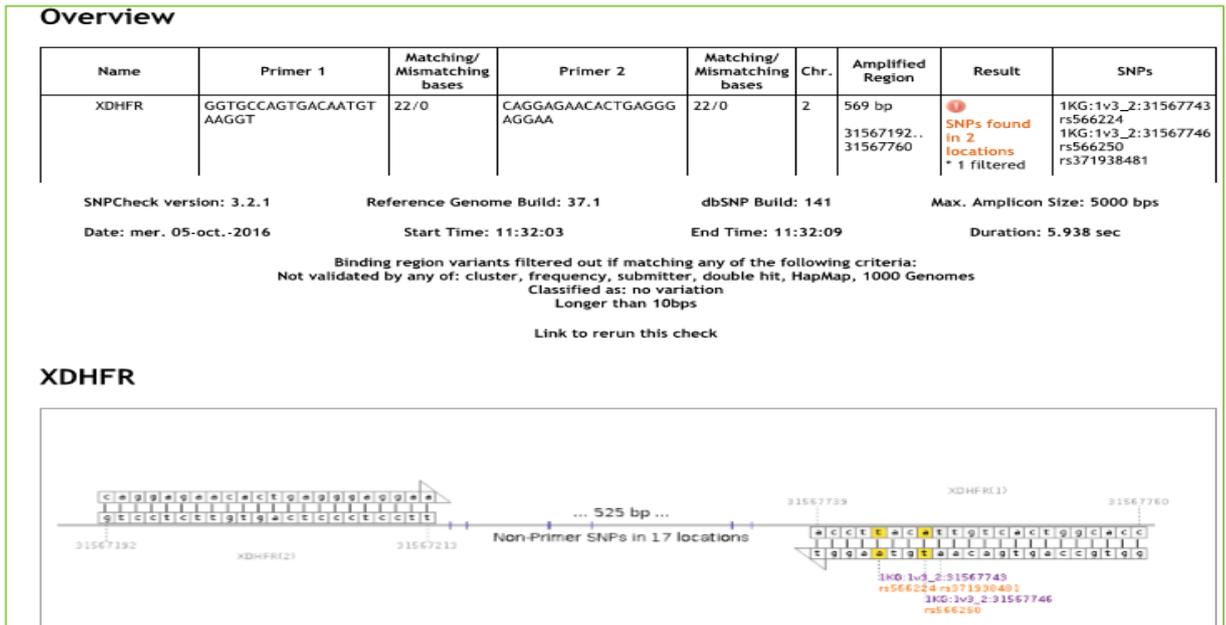


Figure 68. Recherche de SNP sur les amorces grâce au logiciel SNP check.

2.3 Description de la gap-PCR 'Multiplex alpha'

2.3.1 Principe de la gap-PCR multiplex

La PCR multiplexe (ou multiplex PCR) est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, par l'utilisation d'au moins trois amorces PCR par réaction. La PCR multiplexe peut se faire en point final (les produits de PCR étant usuellement différenciés par leur taille ou la présence d'un site de restriction) ou en temps réel (chaque produit étant mesuré par une sonde spécifique couplée à un fluorochrome dont le spectre d'émission est différent des autres).

Une gap-PCR est spécialement conçue pour mettre en évidence une délétion plus ou moins longue d'un brin d'ADN de façon spécifique. Les amorces sont construites de façon à encadrer au plus près les points de cassure caractéristiques de la délétion : si l'allèle est non délété, l'intervalle entre les deux amorces sera trop grand et l'amplification n'aura pas lieu ; en revanche, si l'allèle est délété, les deux amorces seront artificiellement rapprochées et l'amplification aura lieu (Figure 69). Une gap-PCR est quasiment automatiquement multiplexe puisqu'on rajoutera toujours au moins une amorce supplémentaire permettant l'amplification de l'allèle sauvage non délété qui se différenciera de l'allèle délété par une taille d'amplicon différente.

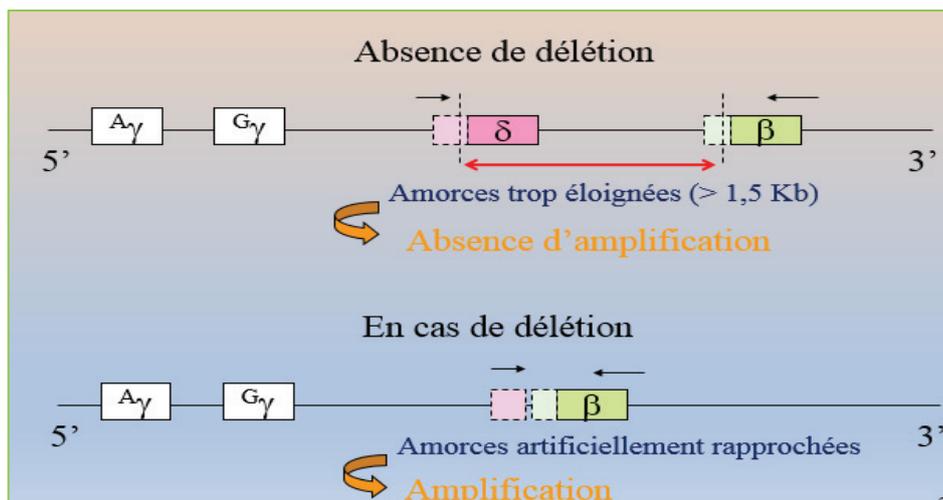


Figure 69. Technique de Gap-PCR

2.3.2 Application à la recherche des principales délétions alpha-thalassémiques

2.3.2.1 Introduction – Amorces utilisées

Notre technique de Gap-PCR Multiplex est utilisée pour rechercher les 5 délétions alpha-thalassémiques les plus communes, à savoir deux délétions α^+ -thalassémiques (-3.7 kb, -4.2 Kb) et trois délétions α^0 -thalassémiques (MED, SEA, -20.5kb) (579). En utilisant différentes amorces spécifiques à ces 5 délétions (Tableau 8) dans une réaction d'amplification multiplex, on peut ainsi les rechercher dans une seule expérience, ce qui en fait une méthode efficace, peu coûteuse et rapide. Cette méthode nécessite l'utilisation de contrôles positifs pour chacune des délétions testées, outre l'ADN de type 'wild' et un blanc.

Tableau 8. Amorces utilisées en multiplex alpha et amplicons générés

Séquences d'amorces (5'----->3'sequence)	Tailles des fragments (pb)	Génotypes
$\alpha 2/3.7$-F : CCCCTCGCCAAGTCCACCC 3.7/20.5-R : AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG $\alpha 2$-R : AGACCAGGAAGGGCCGGTG	2022/2029 pb (délétion - 3,7)	α + -thalassémie: - $\alpha 3.7$
4.2-R : CCCGTTGGATCTTCTCATTTC 4.2-F : GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	1800pb (amplimère $\alpha 2\alpha 2$)	Gène sauvage (Normal)
4.2-R : CCCGTTGGATCTTCTCATTTC 4.2-F : GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	1628 pb	α + -thalassémie: - $\alpha 4.2$
-(α) : GCCCAACATTCCGGAGTACATG 20.5-F : -(α) : AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG 20.5-R :	1175 pb	α^0 -thalassémie:-(α) 20.5
MED-F : TACCCTTTGCAAGCACACGTAC MED-R : TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	875 pb	α + -thalassémie: --MED
SEA-F : CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC SEA-R : AGCCACGTTGTGTTTCATGGC	1349 pb	α + -thalassémie: --SEA

2.3.2.2 Matériels et réactifs

Les réactifs nécessaires sont les suivants :

- **Quantité d'ADN** : 50 ng ;

- **GoTaq® Green Master Mix** : C'est une solution prête à l'emploi (contenant déjà les dNTPs MgCl₂ et les tampons de réaction) contenant de la Taq polymérase d'origine bactérienne. Elle contient deux colorants (bleu et jaune) qui permettent de suivre la migration pendant l'électrophorèse. Les réactions assemblées avec le GoTaq® Green Master Mix ont une densité suffisante pour le chargement direct sur des gels d'agarose. GoTaq® Green Master Mix est intéressante pour toute réaction d'amplification qui sera visualisée par électrophorèse sur gel d'agarose et colorée au bromure d'éthidium;

- **Bétaïne** : c'est l'additif de PCR le plus couramment utilisé pour améliorer l'amplification des séquences riches en GC en raison de sa capacité à dissoudre la structure secondaire qui bloque l'action de la polymérase ;

- **Amorces** : à une concentration de 0,01 nmol pour chacune des amorces ;

Agarose et Tampon TBE (Tris-borate –EDTA) 1X pour la préparation du gel à 1.5% ;

- Marqueur de base (colorant bleu) de 500 paires de bases

- **Bromure d'éthidium BET**. Le BET est un agent intercalant qui va présenter une

fluorescence orangée sous lumière ultraviolette (U.V. de longueur d'onde 312 nm). A manier avec précaution car cancérogène.

Les matériels nécessaires sont les suivants :

- **Cuve d'électrophorèse** ;
- **Transilluminateur UV** et caméra Polaroid, ou système de caméra électronique UV. Nous avons utilisé l'appareil Gel Doc™ de Biorad. (Figure 70).

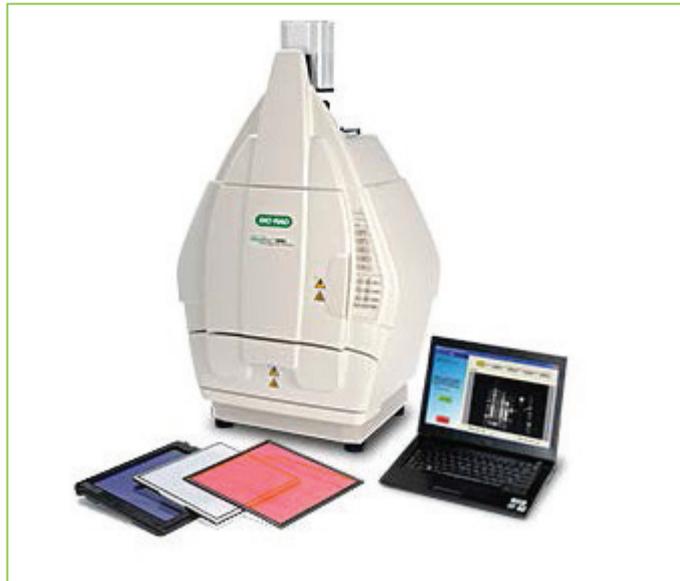


Figure 70. **Appareil Gel Doc™ de Biorad pour la révélation des produits PCR**

2.3.2.3 Mode opératoire - Révélation du gel

Un exemple de protocole expérimental est disponible en annexe 0.

Après la PCR, retirer les tubes du thermocycleur et passer directement à la migration, parce que, avec la Go Taq green, nous n'avons pas besoin d'un agent alourdissant comme l'orange green. En effet, l'orange green (encore appelé tampon de charge), présente l'avantage d'alourdir l'échantillon afin qu'il sédimente au fond des puits de dépôt creusés dans le gel.

Pour la migration électrophorétique, charger un marqueur de base 500 sur un gel d'agarose 1.5 % et passer à 100 V pendant 15 à 20 min dans un tampon Tris-borate-EDTA (TBE) 0.5X. Après migration, colorer le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 7 à 10 min. Après lavage du gel dans de l'eau stérile, visualiser les bandes avec l'appareil Gel Doc (Figure 71).

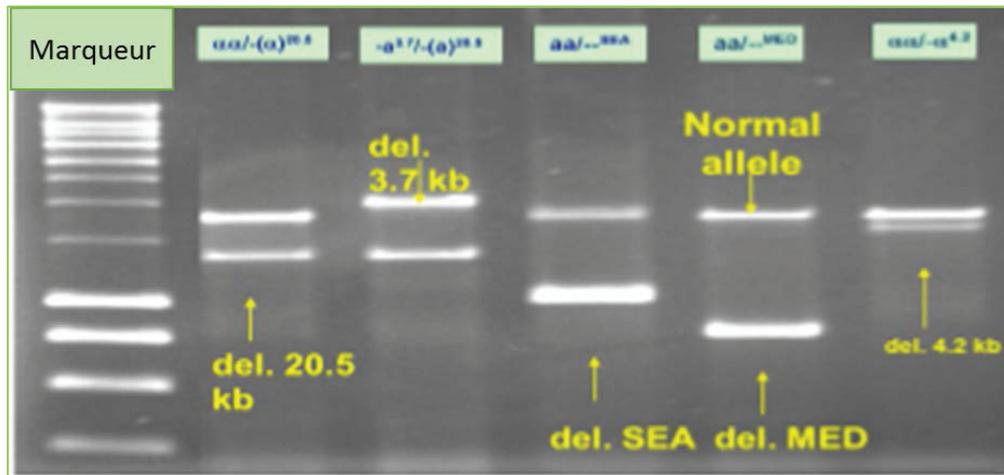


Figure 71. Révélation d'un gel de référence en multiplex alpha

2.4 Description de la technique FRET sur Light Cycler 480

2.4.1 Principe théorique

Cette technique repose sur l'analyse, par automate de PCR en temps réel, des courbes de dénaturation d'un ADN simple brin sur lequel est fixé un couple de sondes oligonucléotidiques de type FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) spécifiques de la région où se trouve le SNP à étudier.

Les sondes utilisées sont des sondes FRET en tandem (sonde Light Cycler™). Le système utilise un couple de sondes d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore. La particularité de ce système réside dans le fait que le processus de transfert d'énergie par FRET, s'effectue entre deux fluorophores séparés par moins de 5 nucléotides, le fluorophore donneur ayant un spectre d'émission se chevauchant avec le spectre d'excitation du fluorophore accepteur. Le transfert d'énergie est alors direct et hautement efficace : une fois les deux sondes appariées à leur séquence cible, l'énergie libérée par le fluorophore donneur de haute énergie est directement captée par le fluorophore accepteur de moindre énergie qui ainsi excité, émet à son tour un signal fluorescent mesurable (Figure 72).

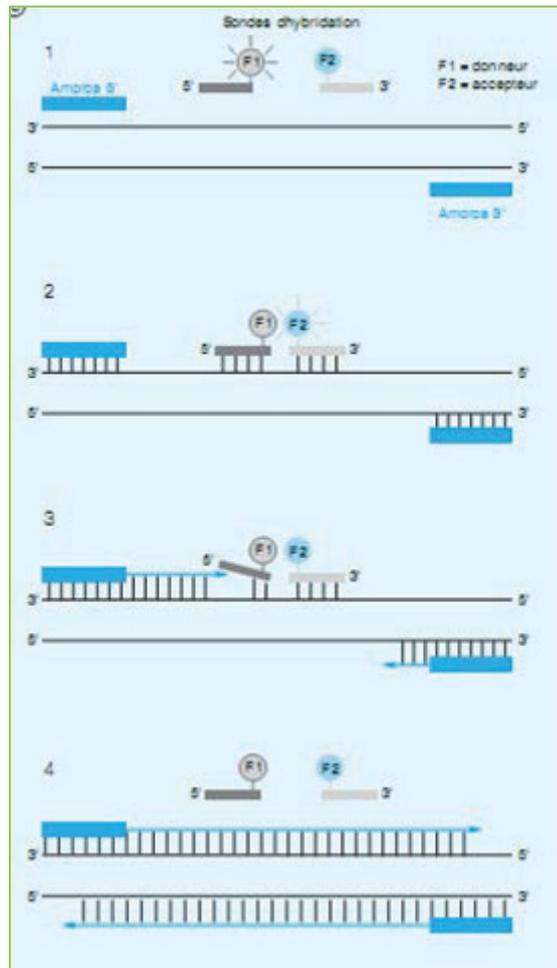


Figure 72. Principe des sondes FRET en tandem

1 : dénaturation de l'ADN cible : le fluorophore donneur F1, est excité par la lumière incidente et émet une faible fluorescence ; 2 : hybridation des amorces et des deux sondes : les deux sondes sont très proches l'une de l'autre (entre 1 et 5 base les séparent), de même que les deux fluorophores. Il se produit un transfert d'énergie (FRET) entre les fluorophores qui entrent en résonance. L'énergie émise par le fluorophore F1 excite la fluorophore F2 qui émet alors une fluorescence mesurable ; 3 : élancement des amorces par l'ADN polymérase : les sondes sont déplacées, d'où suppression du FRET et la perte du signal fluorescent émis par F2 ; 4 : fin de la synthèse du nouveau brin complémentaire.

Quand on utilise des sondes FRET à des fins de génotypage, il faut impérativement que le SNP à étudier soit sur la séquence d'une des sondes qui est alors dite 'sensor'. Cette sonde peut être complémentaire soit de la séquence sauvage, soit de la séquence mutée : cela est indifférent mais il faut bien se souvenir quelle option on a choisi pour l'interprétation ultérieure des résultats. L'autre sonde, baptisée 'anchor', est quant à elle parfaitement complémentaire de la région où elle se fixe et elle est définie de telle sorte que sa température de déshybridation (dite T_m) soit toujours supérieure à celle de la sonde 'sensor'. Les marquages peuvent se faire indifféremment sur les sondes 'sensor' et 'anchor'. Au total : (i) ces sondes n'émettent de la fluorescence que lorsqu'elles sont toutes les deux fixées sur l'ADN (le phénomène de transfert d'énergie est possible) ; (ii) comme la sonde

'anchor' se déshybride par définition en dernier, l'émission de la fluorescence ne dépend que de la fixation ou non de la sonde 'sensor'.

2.4.2. Application au génotypage *XmnI*

2.4.2.1 Définition des amorces et des sondes

Nous n'avons pas eu besoin de faire un design d'amorces et de sondes pour le génotypage *XmnI* par FRET, puisque les données existaient déjà et que cette technique avait été reprise avec succès par Joly *et al.* (580). Les séquences détaillées des amorces PCR et des sondes sont données ci-dessous (Tableau 9).

Tableau 9. Amorces et sondes utilisées pour le génotypage *XmnI* par FRET

Amorces		Sondes
- Amorces directes 5' > 3' CTGAAACTGTTGCTTTA	Taille (pb) 560	-Sonde de détection (Fluorescéine à l'extrémité 3') (5' > 3') CTGAAACGGTCCCTGGCTAAAC
-Amorce inverse 5' > 3' GCCTCACTGGATACTCTAA GA		-Sonde d'ancrage (LC640 ou 705 à l'extrémité 5', phosphate à l'extrémité 3') (5' > 3') CACCCATGGGTTGGCCAGCCTTGC

2.4.2.2 Matériels et réactifs

Les réactifs nécessaires sont les suivants :

- **Quantité d'ADN** : 50 ng
- **Go Taq G2 colorless mix 2x® (2X)** : C'est une solution prête à l'emploi contenant de la Taq polymérase d'origine bactérienne, des dNTPs (400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP), MgCl₂ et des tampons de réaction à des concentrations optimales pour une amplification efficace des matrices d'ADN par PCR. Contrairement à la Go Taq Green, ce mélange ne contient pas de colorant. En effet, nous utilisons une technique avec révélation par fluorescence pour laquelle les colorants jaunes et bleus (contenus dans le tampon de réaction de la Go Taq Green) pourraient interférer puisqu'ils absorbent à des longueurs d'onde comprises entre 225 et 300 nm. Ces colorants ont des pics d'excitation à 488 nm et dans la plage de 600 à 700 nm qui correspondent aux longueurs d'onde d'excitation couramment utilisées dans les instruments de détection de fluorescence ;
- **Amorces PCR** à une quantité de 100 ng chacune ;
- **sondes FRET** : Ces deux sondes à savoir la sonde de détection dénommée LC-FITC-*XmnI* et la sonde d'ancrage dénommée LC-Red640-*XmnI* à une concentration de 1,25 mM ;
- **Eau stérile** ;

- **Agarose et Tampon TBE** (Tris-borate –EDTA) 1X pour la préparation du gel à 1.5% ;
- **Marqueur de base** (colorant bleu) de 500 paires de bases.

Les matériels nécessaires sont :

- **Cuve d'électrophorèse** ;
- **Transilluminateur UV Gel Doc™ de Biorad** ;
- **Appareil LightCycler 480 de Roche** (Figure 73.)

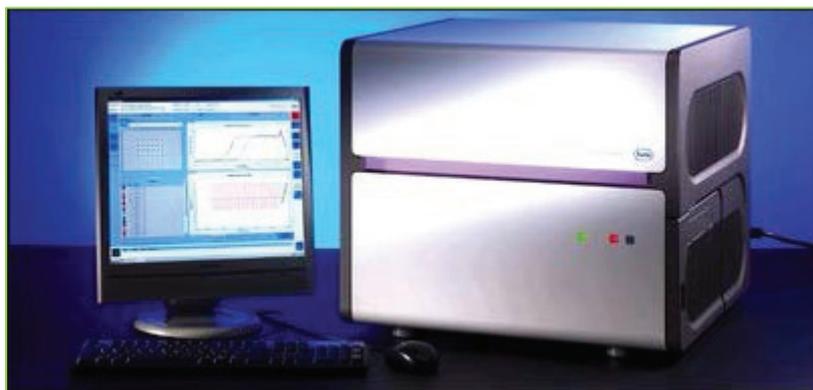


Figure 73. **Appareil LightCycler 480 de Roche**

2.4.2.3 Mode opératoire et révélation des résultats

Ce mode opératoire comprend deux étapes : une première étape de PCR permettant d'avoir des amplicons portant le SNP à étudier et une seconde étape correspondant à la réalisation de la courbe de fusion sur Light Cycler 480. Cette seconde étape est bien sûr précédée de l'addition des sondes fluorescentes dans le milieu réactionnel. Un exemple de protocole expérimental est disponible en annex 0.

Le principe général de la technique repose sur le fait que la T_m de déshybridation de la sonde 'sensor' sera plus élevée en l'absence de mismatch que s'il existe un mésappariement au niveau du SNP étudié. Cette T_m est déterminée graphiquement sur le Light Cycler. Un exemple de résultat de génotypage par FRET est détaillé dans la Figure 74.

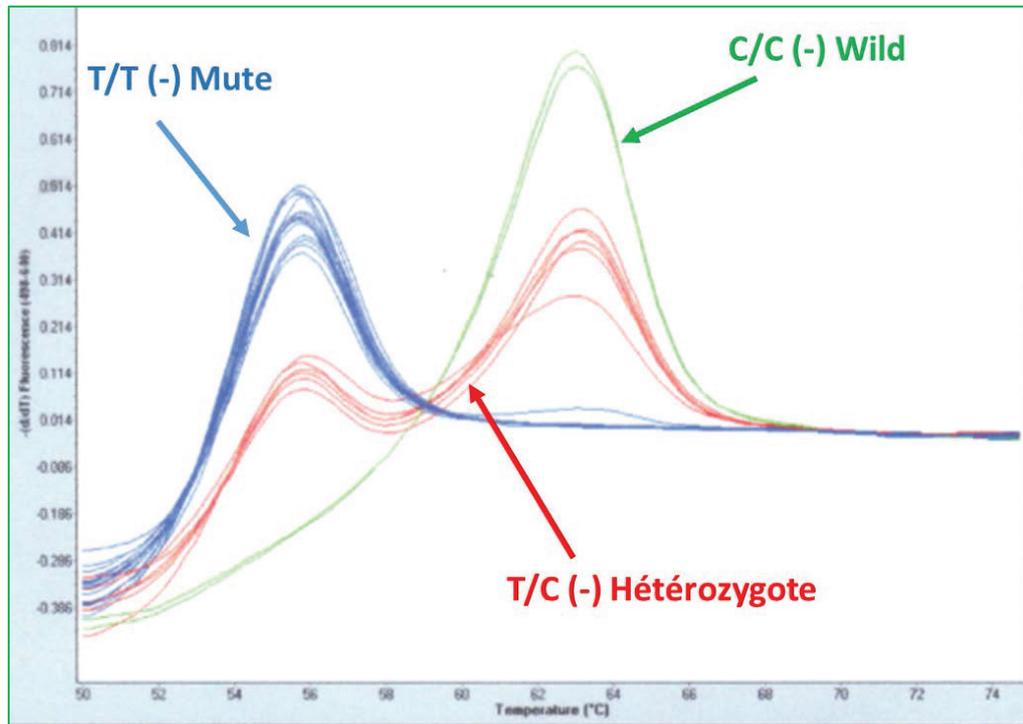


Figure 74. Exemple de résultat de génotypage de "XmnI" en technique FRET sur Light Cycler 480®

Ce graphique (tiré du Light Cycler) représente l'opposé de la dérivée de l'intensité de fluorescence par rapport au temps ($-dF/dT$) en fonction de la température. Pour un allèle donné, chaque fois que son T_m est atteint, on observe la déshybridation de la sonde de détection, ce qui se traduit par une chute brutale de fluorescence et donc par une brusque augmentation (pic) de $-dF/dT$. Un patient homozygote pour le SNP (**T/T(-) mute**) considéré ou homozygote sauvage (**C/C (-) wild**) aura un unique pic de T_m (toutes les sondes 'sensor' se détachent en même temps). A l'inverse, un patient hétérozygote (**T/C (-) hétérozygote**) en aura deux : les 50% de sondes 'sensor' fixées avec un mismatch se détachent à une première T_m et les 50% restants de sondes 'sensor' parfaitement appariées se détachent à une seconde T_m . C'est à ce niveau qu'il faut savoir si la sonde 'sensor' est complémentaire de la séquence sauvage ou du SNP afin de savoir à quel allèle correspond chaque T_m . Dans cet exemple, la sonde sensor est complémentaire à l'allèle sauvage.

2.5 Description de la technique HRM (High Resolution Melting)

2.5.1 Principe général

L'analyse des courbes de fusion à haute résolution, ou High Resolution Melt (HRM) est une technique de biologie moléculaire permettant la détection de mutations, de polymorphisme génétique et de différences épigénétiques dans des échantillons d'ADN. La région de l'ADN potentiellement porteuse de la mutation est d'abord amplifiée par PCR. Puis l'amplicon est chauffé très progressivement et précisément d'environ 50°C à 95°C. À un certain point, les deux brins d'ADN se séparent : c'est ce processus que l'on appelle fusion de l'ADN. Le principe de la technique HRM est d'observer cette fusion en temps réel. Cela est possible grâce à des composés particuliers, appelés fluorochromes intercalants, qui ont la propriété de devenir plus fluorescents lorsqu'ils sont fixés à de l'ADN double brin. En l'absence de double brin, ils ne peuvent pas se fixer donc leur niveau de fluorescence baisse. Au début de l'analyse HRM, à la plus basse température, l'intensité de fluorescence est très

importante, car l'ensemble de l'amplicon est présent sous forme double brin. Mais, au fur et à mesure que la température augmente et que les brins se séparent, la fluorescence diminue. L'enregistrement de l'intensité de fluorescence en fonction de la température est appelée courbe de fusion (Figure 75).

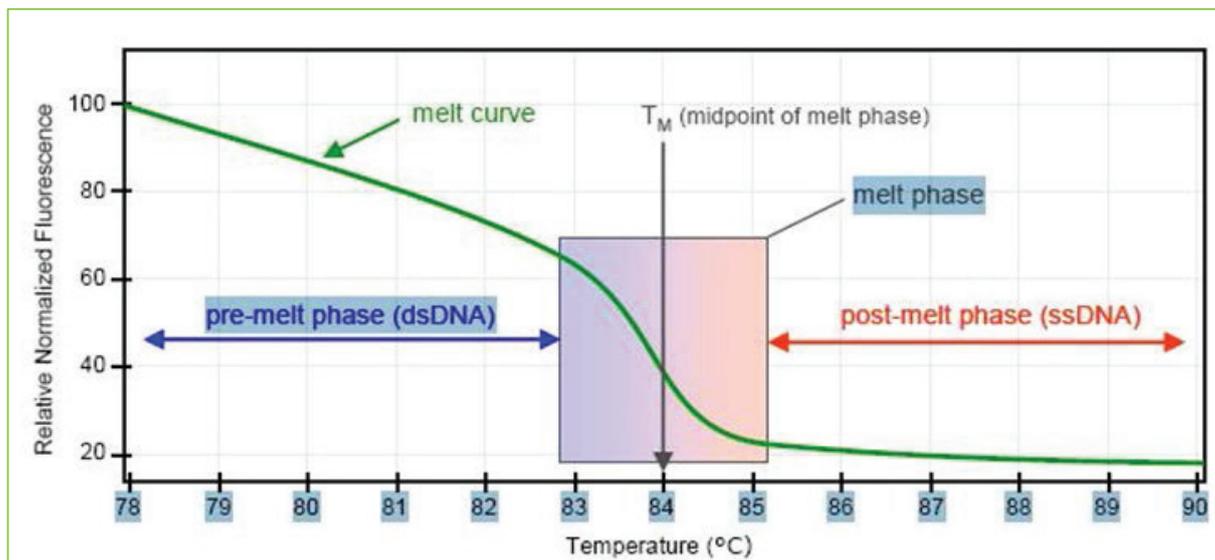


Figure 75. **Réprésentation graphique d'une HRM**

La courbe de fusion (verte) représente la transition de l'amplicon étudié de l'état double brin (émission maximale de fluorescence) à l'état simple brin (émission basale de fluorescence de l'intercalant). On appelle 'phase de fusion' ou 'melt phase' l'intervalle de températures pour lequel la dissociation double brin > simple brin est la plus importante. Le T_m est la température correspondant au milieu de cette phase de fusion

Si cette séquence comporte des variants, des mutants, ou des délétions, tout changement, même mineur, dans la séquence de l'ADN conduit à une variation de la cinétique de fusion, qui peut être détectée grâce à la haute résolution utilisée (Figure 76).

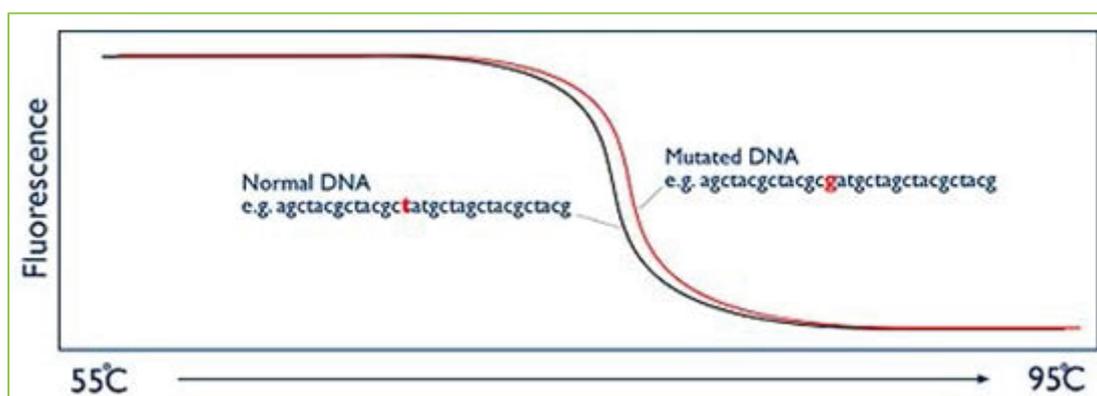


Figure 76. **Variation de la cinétique de fusion due à un variant, un mutant ou une délétion.**

2.5.2 Application à notre travail

2.5.2.1 Définition des amorces

Pour ces quatre génotypages (G6PD Betica, BCL11A, HMIP et gènes du stress oxydant), nous avons utilisé la technique HRM, les étapes seront les mêmes, ce sont les conditions PCR et les températures de fusion qui vont différer. Pour le génotypage de G6PD Betica et des gènes du stress oxydant, un design d'amorces était nécessaire ainsi qu'un séquençage pour avoir des témoins, puisque ce sont des génotypages qui n'ont jamais été effectués dans le laboratoire. Les amorces utilisées pour ces différents génotypages sont disponibles en annexe 0.

2.5.2.2 Matériels et réactifs

Les réactifs nécessaires sont les suivants :

- Green GoTaq® (2X) ;
- Amorces (cf amorces 5) ;
- Syto9 : le SYTO9® est un fluorophore qui, après excitation à 470nm, émet une fluorescence de couleur verte (540nm). Ce marqueur possède la capacité d'émettre de la fluorescence une fois lié à l'ADN ;
- Eau stérile ;
- Agarose pour la préparation du gel à 1.5% ;
- Tampon TBE (Tris-borate –EDTA) 1X pour le gel ;
- Marqueur de base (colorant bleu) de 500 paires de bases ;

Les matériels nécessaires sont :

- Cuve d'électrophorèse ;
- Transilluminateur UV Gel Doc™ de Biorad ;
- Appareil LightCycler 480 de Roche.

2.5.2.3 Mode opératoire et révélation des résultats

Ce mode opératoire comprend deux étapes : une première étape de PCR permettant d'avoir des amplicons portant le SNP à étudier. Le fragment d'intérêt ne doit pas dépasser 150 à 200 pb car la présence d'un variant sur un fragment court modifiera de façon plus significative la courbe de fusion que sur un fragment long. Une seconde étape correspondant à la réalisation de la courbe de fusion sur Light Cycler 480. Cette seconde étape est bien sûr précédée de l'addition du SYTO9® dans le milieu réactionnel. Des

exemples de protocoles expérimentaux sont disponibles en annexe **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

➤ Interprétation des données

Comme un sujet possède deux copies de chaque gène, il y a trois possibilités :

1. Aucun allèle ne contient la mutation (Type sauvage ou normal)
2. L'un ou l'autre des deux allèles contient la mutation (Hétérozygote)
3. Les deux allèles contiennent la mutation (Homozygote)

Les deux allèles étant amplifiés simultanément, la courbe de fluorescence que l'on observe correspond à la somme des courbes de fluorescences des deux allèles. Comme le T_m de dissociation est différent pour chaque duplex, il en résultera des profils HRM distincts pour les 3 génotypes possibles que l'on pourra interpréter en les associant à des témoins normaux, hétérozygotes et homozygotes (Figure 77).

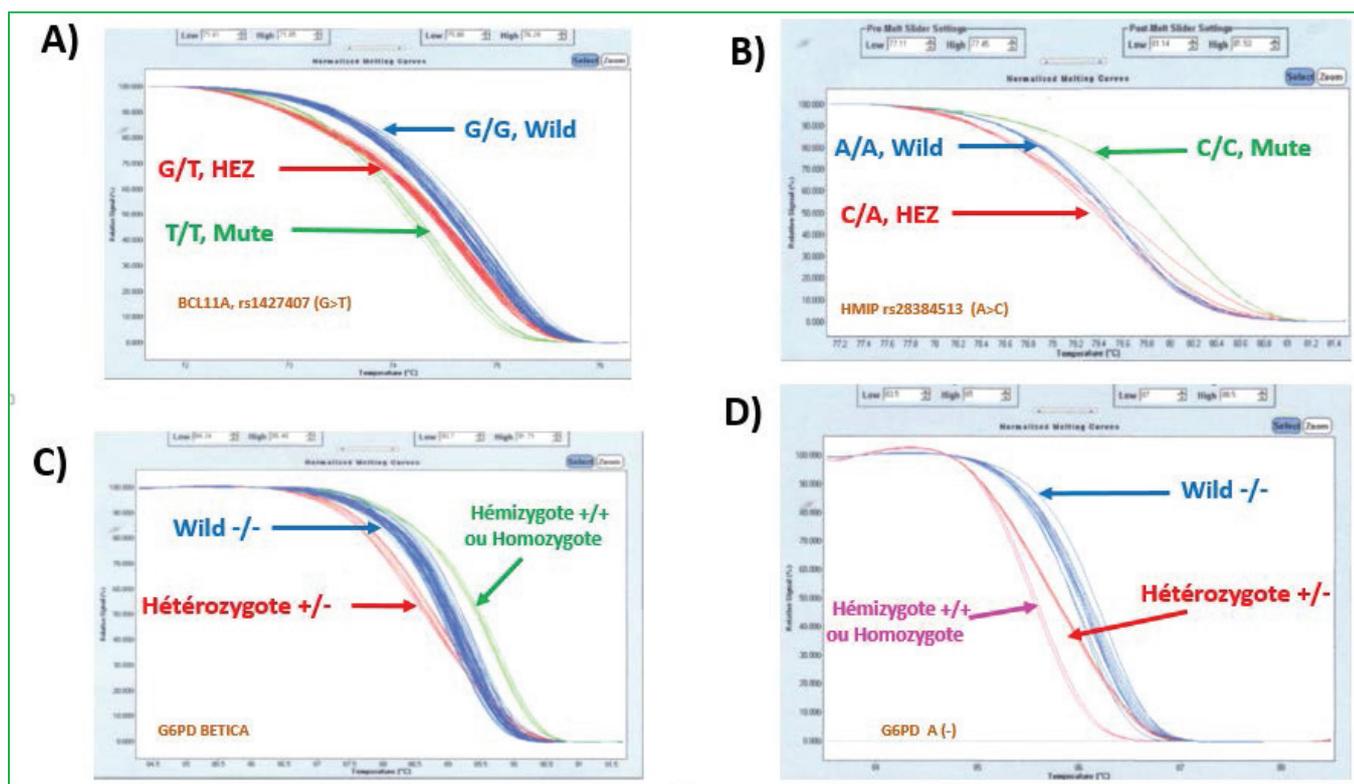


Figure 77. Exemples de courbes obtenues par HRM

A) HRM BCL11A, rs1427407; B) HRM HMIP, rs28384513; C) HRM G6PD BETICA; D) HRM G6PD A (-). Nous observons une bonne séparation de l'ensemble des tracés. En bleu, les courbes correspondant à des homozygotes sauvages. En vert ou rose, les courbes correspondant à des homozygotes mutés ; et en rouge les courbes correspondant aux patients hétérozygotes.

Chapitre 3 : Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant

3.1 Produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP)

L'oxydation avancée des protéines est révélée par la formation de liaisons covalentes entre les résidus tyrosine aboutissant à la formation de dityrosine et à des produits d'agrégation de haut poids moléculaire (Advanced Oxidation Protein Products, AOPP). La méthode de Witko-Sarsat (581) a été utilisée. En présence d'iodure de potassium (KI) et en condition acide, l'absorbance de ces AOPP peut être mesurée par spectrophotométrie à 340 nm. Les échantillons plasmatiques (200 µL) dilués avec du PBS 1/5, ont ensuite été traités avec 10 µl KI (1.16M) et 20µl d'acide acétique pur. Après vortexage, l'absorbance a été mesurée à 340nm. La chloramineT a été utilisée en tant que gamme standard pour la mesure et les résultats ont été exprimés en µmol/ml (Figure 78).

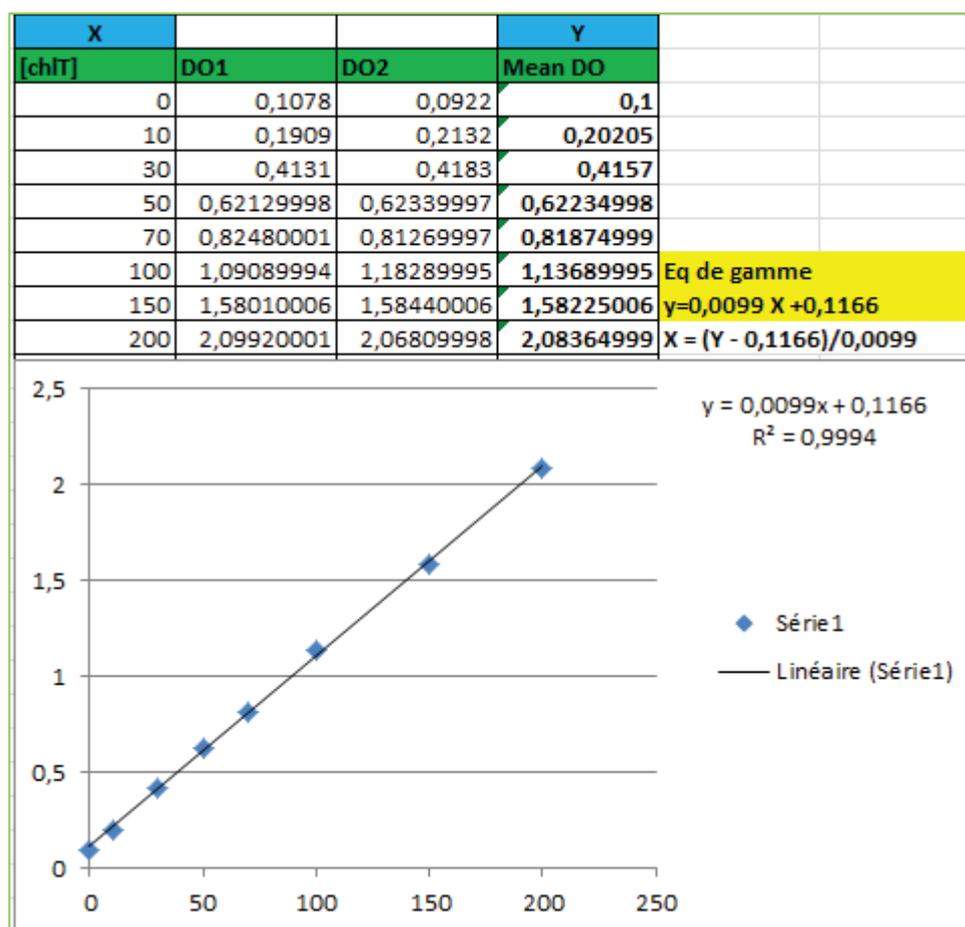


Figure 78. Gamme standard de chloramine T utilisée pour le dosage des AOPP

3.2 Malondialdéhyde (MDA)

Le dosage du MDA est réalisé par une méthode spectrophotométrique : la méthode d'Ohkawa (582); cette méthode utilise l'acide thiobarbiturique (TBA). En effet, une molécule de MDA en milieu acide et à chaud est condensée avec deux molécules de TBA pour former un complexe coloré en rose (Figure 79) susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde $\lambda = 532 \text{ nm}$ (583).

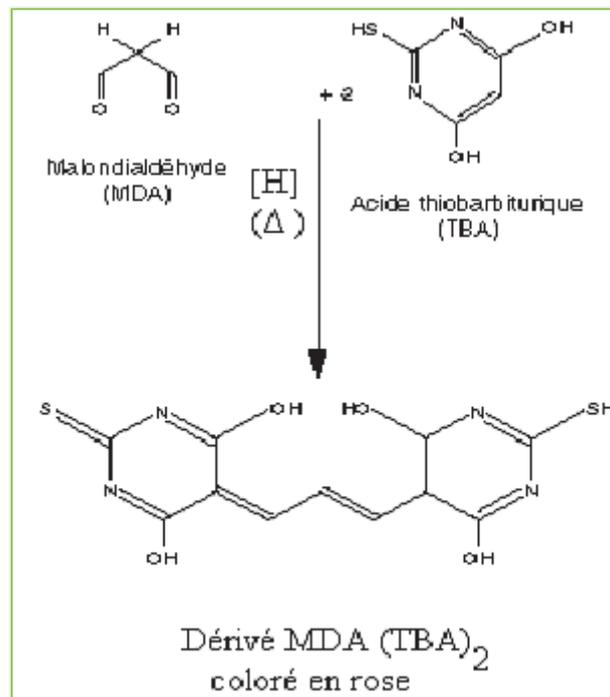


Figure 79. Complexe rose dérivé du MDA

Cette technique présente d'excellentes qualités sur le plan de la sensibilité, sauf qu'elle manque de spécificité à cause des interférences potentielles avec des molécules ne relevant pas du stress oxydant mais réagissant avec le TBA. Elle reste malgré tout le test le plus classique permettant l'évaluation de la peroxydation lipidique (584). Les concentrations de MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon réalisée avec le 1,1,3,3-tétrathoxypropane (MDA) comme standard (585), établie dans les mêmes conditions que pour les dosages des échantillons (Figure 80). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/ml}$.

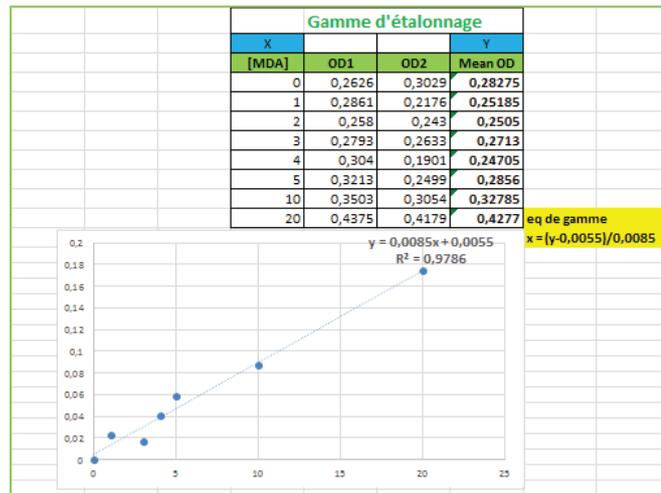


Figure 80. Gamme standard de MDA utilisée pour le dosage de MDA de nos échantillons

3.3 Catalase

Deux types de méthodes peuvent être utilisés pour mesurer l'activité de la catalase, soit la diminution de la concentration du peroxyde d'hydrogène, soit la formation d'oxygène. Ces méthodes sont très sensibles mais nécessitent des conditions expérimentales strictes comme par exemple l'absence d'oxygène. L'enzyme oxyde dans un premier temps un donneur d'hydrogène (en excès par rapport à la concentration de peroxyde d'hydrogène dans le milieu) comme le méthanol en formaldéhyde, puis ce dernier réagit avec le 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald®) pour donner un composé qui absorbe à 550 nm (586) (Figure 81). Une solution de formaldéhyde connue est utilisée comme standard et les résultats sont exprimés en UI.

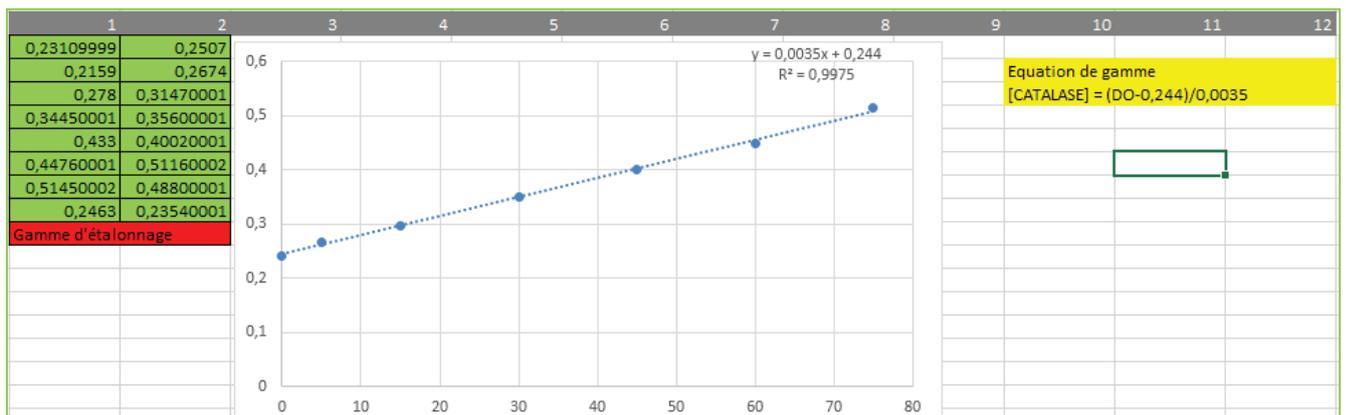


Figure 81. Droite d'étalonnage pour la détermination de l'activité catalase

3.4 Glutathion Peroxydase (GPx)

Toutes les techniques décrites reposent sur le même principe : en présence de glutathion réduit (GSH), la glutathion peroxydase réduit un hydroperoxyde (ROOH), tandis que le GSH est oxydé en glutathion disulfure (GSSG). Les premières méthodes mesuraient à des temps fixes le glutathion non consommé. Mais nous avons eu recours à une technique indirecte qui est actuellement la technique la plus utilisée. Cette méthode est basée sur la cinétique de l'oxydation du NADPH, H⁺ en NADP⁺ à 340 nm (Figure 82). Elle consiste à ajouter au milieu biologique (plasma, érythrocytes traités au préalable par un agent réducteur pour réduire la GPx et le réactif de Drabkin's contenant du cyanure pour inhiber l'effet peroxydase de l'hémoglobine) un substrat (peroxyde d'hydrogène, cumène hydroxyperoxyde, t-butyl hydroxyperoxyde), un agent réducteur (glutathion), de la glutathion réductase et du NADPH, H⁺ (587).

Selon le substrat utilisé, on pourra également mesurer l'activité des GPx non sélénodépendantes encore appelées glutathionS-transférases. Par exemple si on utilise le peroxyde d'hydrogène ou le t-butyl hydroxyperoxyde comme substrats, seules les GPx sélénodépendantes (GPx1, 2, 3 et 4) seront actives alors que le cumène hydroxyperoxyde est réduit par les deux formes de GPx, sélénodépendantes et non sélénodépendantes (Glutathion S-transférases). Cette remarque peut être importante selon le milieu biologique à analyser. En effet, les érythrocytes ne contiennent que de la GPx sélénodépendante alors que le plasma contient 80 % de forme sélénodépendante et 20 % de forme non sélénodépendante. Pour nos dosages, nous avons travaillé sur le plasma avec comme substrat le peroxyde d'hydrogène.

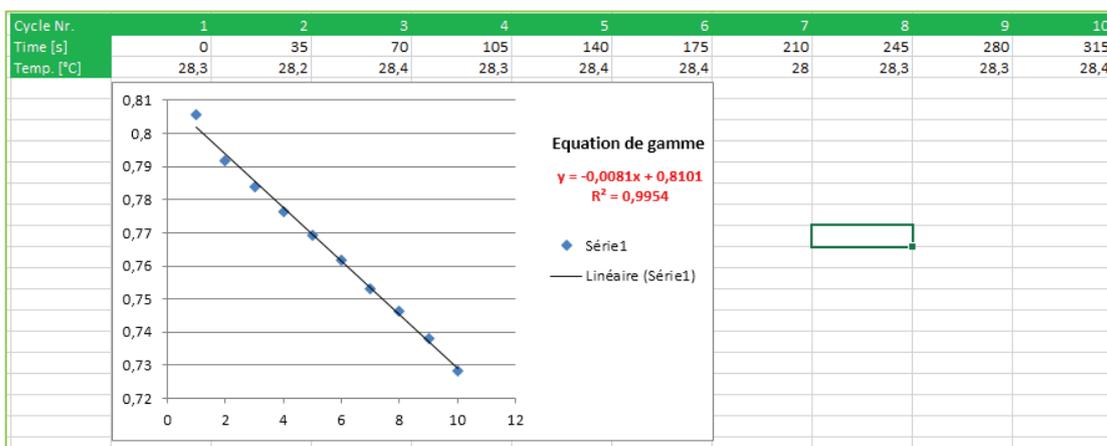


Figure 82. Pente de mesure de l'activité GPx

3.5 Superoxyde Dismutase (SOD)

Le substrat (O_2^-) de la SOD est très instable et a une durée de vie très courte. Les méthodes de dosage sont donc indirectes. Le protocole de mesure a été mis au point d'après la méthode de Beauchamp et Fridovich ((588), modifiée par Oberley (589). Il évalue la SOD par sa capacité à inhiber un flux d'anion superoxyde (O_2^-) généré par le système Xanthine-Xanthine Oxydase. Les radicaux superoxydes produits par ce système réduisent le nitrobleu de tétrazolium (NBT) en bleu de formazan stable à 560 nm. C'est une méthode cinétique qui permet de suivre l'activité SOD dans le temps, et une pente d'inhibition est obtenue pour chaque échantillon (Figure 83).

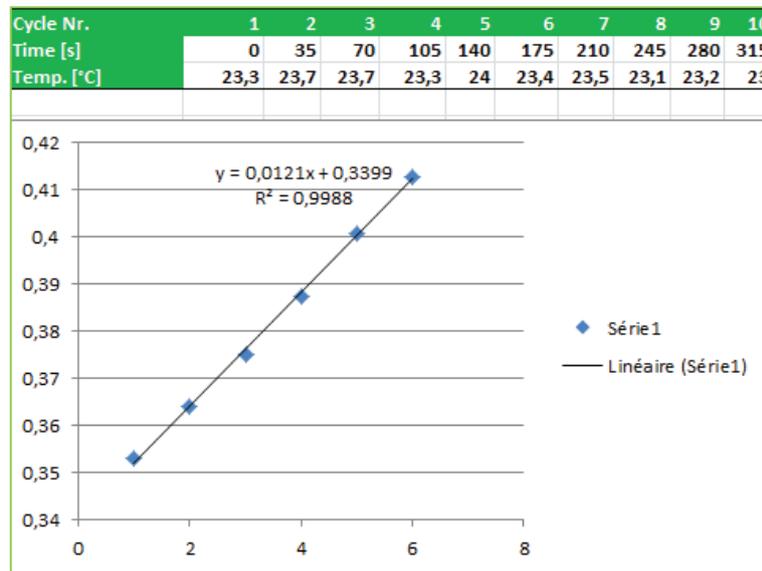


Figure 83. Pente d'inhibition de l'activité SOD

3.6 Xanthine oxydase (XO)

La mesure de l'activité de la xanthine oxydase fait partie d'une série de tests « déshydrogénases » récemment mis au point (590). L'oxydation de la xanthine en acide urique en présence de nitrobleu tétrazolium (NBT) entraîne une réduction irréversible de ce dernier en formazan coloré en violet. L'absorbance est lue en 560 nm et comme pour SOD, c'est une méthode cinétique qui permet de suivre l'activité XO dans le temps, et une pente est obtenue pour chaque échantillon (Figure 84).

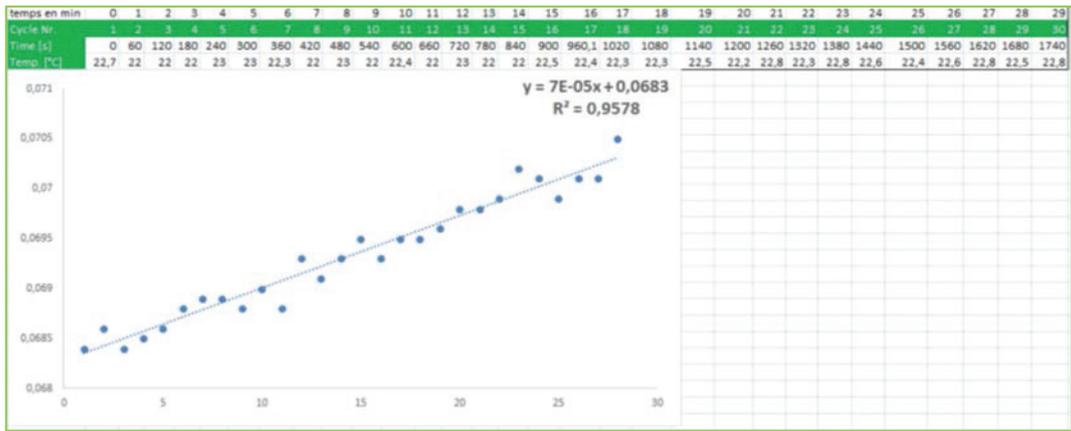


Figure 84. Pente de mesure de l'activité XO

3.7 Myéloperoxydase (MPO)

Ce test est un immunodosage enzymatique indirect semi-quantitatif. Des anticorps anti-MPO humains stabilisés ont été déposés à la surface des micropuits pour servir de substrats dans ce système. Les plasmas de patients sont placés dans les micropuits et mis à incuber, ce qui permet aux anticorps anti-MPO humains de fixer de manière spécifique la MPO contenue dans le plasma. Après des lavages successifs visant à éliminer les autres peroxydases non liées et d'autres protéines sériques, le complexe est détecté par ajout d'une solution 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) et de H₂O₂ servant de substrat chromogène. Le TMB est d'abord oxydé en un radical libre bleu, ayant un maximum d'absorption à 653 nm ($\epsilon = 3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). On mesure dans ce dosage l'apparition du TMB peroxydé (Figure 85).

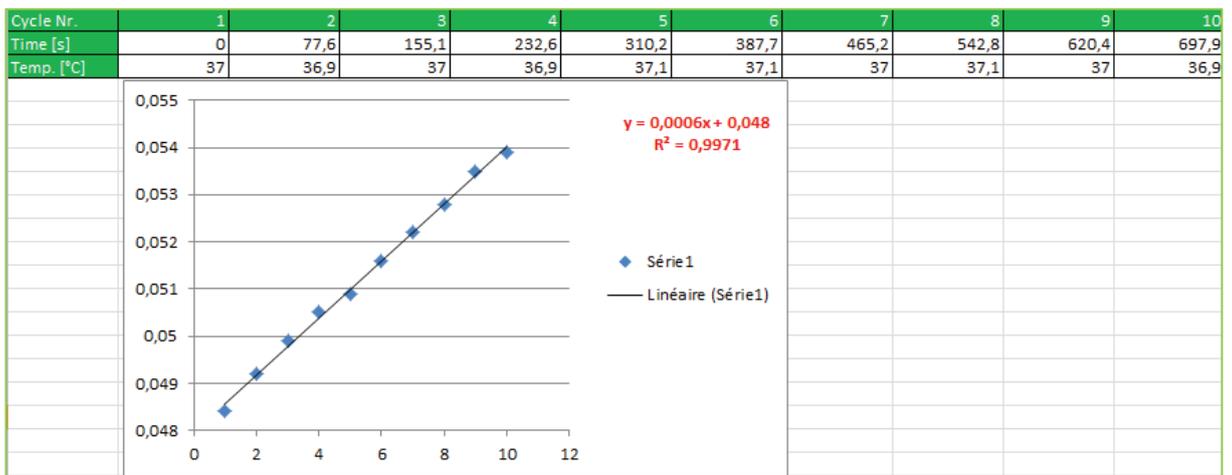


Figure 85. Pente de mesure de l'activité MPO

PARTIE 3: CONTRIBUTION PERSONNELLE

ARTICLE 1: GENETIC BACKGROUND OF THE SICKLE CELL DISEASE PEDIATRIC POPULATION OF DAKAR, SENEGAL, AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL FRAMESHIFT B-THALASSEMIA MUTATION [HBB: c.265_266DEL; P.LEU89GLUFS*2]. – PUBLIÉ DANS HEMOGLOBIN 2017 MAR; 41(2):89 - 95.

ARTICLE 2: COMBINED EFFECTS OF ALPHA-THALASSEMIA AND HbF QUANTITATIVE TRAIT LOCI IN A COHORT OF SENEGALESE CHILDREN WITH SICKLE CELL ANEMIA – SOUMIS DANS BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY (BJH).

ETUDE 3 : EVALUATION DES INTER-RELATIONS ENTRE LE STRESS OXYDANT SYSTEMIQUE, LES PRINCIPAUX GENES MODIFICATEURS DE LA DREPANOCYTOSE ET LA SEVERITE CLINIQUE DE LA MALADIE.

ETUDE 4: EVALUAUTION DES EFFETS DE CERTAINS POLYMORPHISMES DE GENES IMPLIQUES DANS LE STRESS OXYDANT SUR L'EXPRESSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DE LA DREPANOCYTOSE

Article 1 : Profil génétique de la population drépanocytaire sénégalaise et caractérisation d'une nouvelle mutation β^0 -thalassémique.

1.1 Contexte scientifique de l'étude – Présentation de l'article

Comme expliqué plus haut, la drépanocytose est une maladie monogénique dont les manifestations cliniques varient considérablement d'un patient à l'autre en raison de facteurs environnementaux et génétiques (591). Parmi ces facteurs génétiques, nous pouvons notamment citer le statut alpha-globine, les haplotypes β^S (ou du moins le polymorphisme *XmnI* rs7482144) et le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). L'alpha-thalassémie a été associée à une fréquence plus élevée d'événements vaso-occlusifs (592), alors qu'elle protège partiellement contre la survenue d'une vasculopathie cérébrale (241, 242) et d'une cholélithiase (244). Bien que ce point ait longtemps été débattu (255, 256), le déficit en G6PD est maintenant reconnu comme un facteur de risque indépendant de la vasculopathie cérébrale chez les enfants atteints d'anémie falciforme (253, 593, 594). Le polymorphisme *XmnI* quant à lui a été associé à des taux résiduels d'HbF plus élevés et à moins de complications cliniques.

Ces gènes sont désormais systématiquement génotypés dans les pays développés pour le suivi médical des patients. En revanche, très peu de données sur ces modificateurs génétiques sont actuellement disponibles dans de nombreux pays d'Afrique subsaharienne, en particulier au Sénégal, où la drépanocytose est un problème de santé publique majeur. La population sénégalaise est caractérisée par une importante diversité ethnique (Wolofs, Peulhs, Sereres, Diolas, etc.) mais la consanguinité est très courante dans certains groupes ethniques et elle représente l'un des principaux facteurs de transmission de l'allèle β^S d'une génération à l'autre. Jusqu'à présent, le diagnostic biologique de la maladie était réalisé par électrophorèse sur acétate de cellulose après la première hospitalisation pour une complication typique de la maladie (principalement dactylite à 2 ou 3 ans) mais le diagnostic différentiel génétique entre β^S/β^S et β^S/β -thal n'est jamais établi, ainsi que le génotypage des gènes modificateurs communs. De plus, l'activité biochimique du G6PD n'est pas déterminée systématiquement chez les patients atteints de drépanocytose. Pour pallier à ce manque de données épidémiologiques, nous avons réalisé dans cette étude le

génotypage systématique de ces modificateurs génétiques de base auprès de 295 enfants drépanocytaires sénégalais suivis à l'hôpital pédiatrique de Dakar.

Deux cent quatre vingt quinze enfants atteints de drépanocytose (167 garçons et 128 filles) provenant de la cohorte pédiatrique de l'hôpital d'enfants Albert Royer de Dakar (qui comptait environ 2 700 enfants) ont participé à cette étude entre janvier et décembre 2015. Ils ont été inclus lors d'une visite de suivi de routine pour la plupart d'entre eux (environ 70%) ou lors d'une hospitalisation pour une complication liée à la maladie. Le diagnostic différentiel entre les génotypes S/S, S/C, S / β -thal ou S/X a été réalisé avec une technique dédiée d'ARMS-PCR (Amplification-refractory mutation system). Pour les patients suspectés d'être S/X ou S/ β -thal lors de l'ARMS-PCR, un séquençage direct de Sanger du gène *HBB* a été réalisé afin de confirmer le diagnostic et d'identifier la mutation β -thal ou le variant de l'hémoglobine au niveau moléculaire. Les 5 délétions alpha-thalassémiques les plus fréquentes (c'est-à-dire les délétions de -3,7 Kb, -4,2 Kb, -20,5 Kb, SEA, MED ont été recherchées par GAP-PCR Multiplex. Les 2 principaux variants déficitaires en G6PD les plus fréquents en Afrique (à savoir A(-) et Betica), ont été recherchés par une technique HRM.

Pour chaque gène modificateur, la fréquence allélique globale a été calculée et la répartition équilibrée des trois génotypes (homozygote de type sauvage, hétérozygote et homozygote muté) a été vérifiée par l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) en utilisant un test de χ^2 . Le gène G6PD étant situé sur le chromosome X, l'équilibre de Hardy pour les variants A(-) et Betica a été vérifié séparément pour les hommes et les femmes. Des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, États-Unis) et un niveau de $p < 0,05$ a été considéré comme significatif.

Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift β -Thalassemia Mutation [*HBB*: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]

Fatou Gueye Tall^{a,c,e}, Cyril Martin^{c,d}, El hadji Malick Ndour^{a,e}, Indou Déme Ly^{e,f}, Céline Renoux^{b,c}, Louis Chillotti^b, Nicolas Veyrenche^b, Philippe Connes^{c,d,h}, Papa Madiaye Gueye^a, Rokhaya Ndiaye Diallo^a, Philippe Lacan^b, Ibrahima Diagne^g, Pape Amadou Diop^a, Aynina Cissé^a, Philomène Sall Lopez^{a,e} and Philippe Joly^{b,c,d}

^aLaboratoire de Biochimie Pharmaceutique-FMPO, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal; ^bUF Pathologie Moléculaire du Globule Rouge, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire Grand-Est, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France; ^cLaboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Equipe 'Biologie Vasculaire et du Globule Rouge', Université Claude Bernard Lyon 1, COMUE Lyon, France; ^dLaboratoire d'Excellence sur le Globule Rouge (Labex GR-Ex), Paris, France; ^eCentre Hospitalier National d'Enfants Albert-Royer, Dakar, Sénégal; ^fService Universitaire de Pédiatrie-FMPO, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal; ^gUFR des Sciences de la Santé, Université Gaston Berger, Saint-Louis, Sénégal; ^hInstitut Universitaire de France, Paris, France

ABSTRACT

Sickle cell disease is a genetic disorder with a large variability in the pattern and severity of clinical manifestations. Different genetic modulators have been identified but very few epidemiologic data are available on these modifier genes in Senegal. This study aimed to determine their prevalence in a Senegalese sickle cell disease pediatric population. The following genetic parameters were genotyped in 295 sickle cell disease children of the Dakar pediatric hospital: sickle cell disease genotype [β^S/β^S (*HBB*: c.20A>T), β^S/β^C (*HBB*: c.19G>A), β^S/β^0 -thalassemia (β^0 -thal)], *XmnI* polymorphism, the five most common α -thalassemia (α -thal) deletions and the A(-) and Betica glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PD) deficient variants. Despite very few β^S/β^C and β^S/β^0 -thal children (1.0% each), a novel frameshift β^0 -thal mutation was characterized: *HBB*: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2. The $-\alpha^{3,7}$ (rightward) deletion was the only α -thal deletion identified in this cohort (12.0% allelic frequency). Most of β^S/β^S patients (61.9%) were homozygous for the *XmnI* polymorphism and assumed to carry a Senegal/Senegal β^S haplotype. The remaining haplotypes were predominantly of the Benin type. While the Betica G6PD variant was quite frequent (13.0%), a low frequency of the A(-) variant was detected (1.0–2.0%). The systematic genotyping of the $-\alpha^{3,7}$ deletion and of the G6PD Betica variant in sickle cell disease patients from Senegal could be useful to identify patients at risk for several complications, such as cerebral vasculopathy, where it has been demonstrated that a normal α -globin genotype and G6PD deficiency are predisposing factors. These patients should be eligible for a transcranial Doppler examination that is not routinely offered in Senegal.

ARTICLE HISTORY

Received 31 January 2017
Revised 9 May 2017
Accepted 11 May 2017

KEYWORDS

α -Thalassemia (α -thal);
glucose-6-phosphate
dehydrogenase (G6PD)
Betica; novel β -thalassemia
(β -thal) mutation; sickle cell
disease; *XmnI*
polymorphism

Introduction

Homozygous sickle cell anemia (β^S/β^S genotype) is one of the most common recessive genetic disorders worldwide, with about 300,000 affected children being born every year, mostly in sub-Saharan Africa where it constitutes a major public health problem [1]. At the molecular level, the mutated β^S allele results from a single base substitution on the codon 6 of the β -globin gene (*HBB*: c.20A>T; p.Glu7Val). The β^S allelic frequency in sub-Saharan Africa varies from 10.0 to 40.0% and is estimated to be around 10.0% in Senegal [2]. Compound heterozygosity for the β^S allele and a β -thalassemia (β -thal) mutation or some particular β -globin variants [Hb C (*HBB*: c.19G>A), Hb D-Punjab (*HBB*: c.364G>C), Hb O-Arab (*HBB*: c.364G>A), Hb E (*HBB*: c.79G>A) or any of the Hb Lepore mutations] lead to a sickle cell disease syndrome with very similar clinical

manifestations as homozygous Hb S patients but with a lower occurrence and/or severity for some of them.

Although sickle cell anemia is a monogenic disorder, its clinical manifestations vary greatly from one patient to another because of environmental and genetic factors [3]. An increasing number of modifier genes have been identified since the 1990s and some of them are now routinely genotyped in developed countries for the medical follow-up of patients, namely the α -globin status, the β^S haplotypes (or at least the so-called *XmnI* G_γ polymorphism rs7482144) and the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency status. The $-\alpha^{3,7}$ (rightward) α -thalassemia (α -thal) deletion (at least in the homozygous state), has been associated with a higher frequency of vaso-occlusive events [4], while it partially protects against the occurrence of cerebral vasculopathy [5,6] and cholelithiasis [7]. Although debated [8,9], G6PD deficiency is now recognized as an independent risk factor

CONTACT Philippe Joly  philippe.joly@chu-lyon.fr  Laboratoire de Biochimie Moléculaire Grand Est, Groupement Hospitalier Est, 59 Boulevard Pinel, 6590 BRON, France

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

for cerebral vasculopathy in sickle cell anemia children [10–12]. Among the five common β^S haplotypes (Senegal, Bantu, Arab-Indian, Cameroon and Benin) described in the 1980s [13], those (*i.e.* Senegal and Arab-Indian) bearing the C>T single nucleotide polymorphism (SNP) at position -158 of the α^2 -globin gene (*HBG2*: g.-158C>T), identified by Labie *et al.* in 1985 [14], were shown to be associated with higher residual Hb F levels and lower clinical complications. In contrast, individuals with the Bantu or Benin haplotypes tend to have a more severe disease [15,16].

Unfortunately, very few genetic data about these genetic modifiers are currently available in many sub-Saharan countries, especially in Senegal where sickle cell disease is a major public health issue with about 1700 affected newborn per year [17]. The Senegalese population is characterized by an important ethnic diversity (Wolofs, Peulhs, Sereres, Diolas, *etc.*) but consanguinity is very common in some ethnic groups and represents one of the major factors that promote transmission of the β^S allele from one generation to another in the homozygous state. Up to now, the biological diagnosis of the disease was performed by cellulose acetate electrophoresis after the first hospitalization for a typical sickle cell disease complication (mainly dactylitis at 2- or 3-years old) but the genetic differential diagnosis between β^S/β^S and Hb S/ β -thal is never made, as well as the genotyping of the common modifier genes. Moreover, G6PD biochemical activity is not determined routinely for sickle cell disease patients. To overcome this lack of epidemiological data, we performed a systematic screening of these basic genetic modifiers for 295 Senegalese sickle cell disease children followed at the Dakar pediatric hospital.

Materials and methods

Two hundred and ninety five children (167 males and 128 females) from the pediatric sickle cell disease cohort of the Albert-Royer Children's Hospital, Dakar, Senegal (which comprised about 2500 individuals) were consecutively enrolled between January and December 2015. The enrollment was done either during a routine follow-up visit (about 70.0% of patients) or during hospitalization for sickle cell disease-related complication. Ages ranged between 2 and 18 years [mean 9.3; standard deviation (SD) 4.0] and Hb F levels between 1.1 and 26.2% (mean 9.3; SD 5.1). According to the Helsinki declaration, the legal caregivers gave their written and/or oral consent for the genetic diagnosis of sickle cell disease (including the modifier genes) and the study was approved by the Ethics Committee of the Albert-Royer Hospital.

DNA was extracted from peripheral blood stained with EDTA using the QIAmp® DSP DNA Blood Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) in Dakar. Genotypic analyses were performed in Lyon (France). Differential diagnosis between β^S/β^S , β^S/β^C (*HBB*: c.19G>A), β^S/β -thal or β^S/β^X genotypes was performed with a dedicated amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR), method [18]. For patients suspected to carry β^S/β^X or β^S/β -thal by ARMS-PCR, a direct Sanger sequencing of the *HBB* gene was performed on the ABI

PRISM® 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) apparatus in order to confirm the diagnosis and to identify the β -thal mutation or the hemoglobin (Hb) variant at the molecular level. The five most frequent α -thal deletions [*i.e.* the $-\alpha^{3.7}$, $-\alpha^{4.2}$ (leftward), $-(\alpha)^{20.5}$, Southeast Asian ($-\alpha^{SEA}$) and Mediterranean ($-\alpha^{MED}$)] were screened with a multiplex gap-PCR protocol [19].

Two specific high resolution melting (HRM) protocols focusing on the A(-) (G6PD: rs1050828, c.376A>G; rs105029, c.202G>A) and Betica (G6PD: c.376A>G; c.968T>C) G6PD deficient variants were employed on the Light Cycler 480® device (Roche Diagnostics, Meylan, France). The primers have already been described for the A(-) variant [20]. For the Betica c.968T>C mutation, new primers were designed with the primer 3 software to obtain a PCR product of 76bp length: (i) forward: 5'-GGC GAG GCC ACC AAA GGG TA-3'; (ii) reverse: 5'-GAG GAC GAC GGC TGC AAA AGT-3'. For the PCR reaction, each tube contained, in a final volume of 20 μ L, 90 ng DNA template, 40 ng of each primer, 10 μ L of GoTaq Green Master Mix (Promega, Charbonnières-les-bains, France) and 7.6 μ L sterile water. The PCR conditions were as follows: 10 min. denaturation at 95 °C; 35 cycles with denaturation for 30 seconds at 95 °C, hybridization for 30 seconds at 60 °C for Betica, and 58 °C for A(-), elongation for 1 min. at 72 °C and final elongation for 5 min. at 72 °C. The HRM protocol was performed with 15 μ L of PCR product in which 1 μ L of Syto®9 dye (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) was added: 10 min. at 94 °C, 1 min. at 40 °C (to facilitate the formation of heteroduplexes) and a shift from 70 to 97 °C (0.1 °C/second) with a continuous fluorescence acquisition. An example of the resulting HRM melting curves can be visualized on Figure 1.

The β^S haplotypes were determined in sickle cell anemia (β^S/β^S) patients only. Among the six commonly genotyped SNPs (*i.e.* *Hind*II ϵ , *Xmn*I, *Hind*III α^2 , *Hind*III α^1 , *Hind*II ψ and *Hinc*II δ), we focused first on the *Xmn*I polymorphism with a dedicated fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay on Light Cycler 480® (Roche Diagnostics) [21]. For data interpretation, considering our Senegalese population, we assumed that all β^S *Xmn*I [-] alleles were of the Senegal (Sen) type and patients were thus categorized as Sen/Sen, Sen/X or X/X where X is a Benin (Ben), Cameroon (Cam), Bantu (Ban) or atypical (Aty) haplotype. Thereafter, in order to identify the X haplotypes in a subset of 42 patients (11 Sen/X and 31 X/X), we performed a direct Sanger sequencing for the determination of the *Hind*III α^2 and *Hind*III α^1 polymorphisms. In combination with the *Xmn*I polymorphism, we could deduce the complete β^S haplotype for those patients.

Statistical analyses

For each genetic variant, the overall allelic frequency was calculated and the balanced distribution of the three possible genotypes in the population (wild-type homozygous, heterozygous and mutant homozygous) was verified by the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) using a χ^2 test. Since the *G6PD* gene is located on the X chromosome, the HWE for

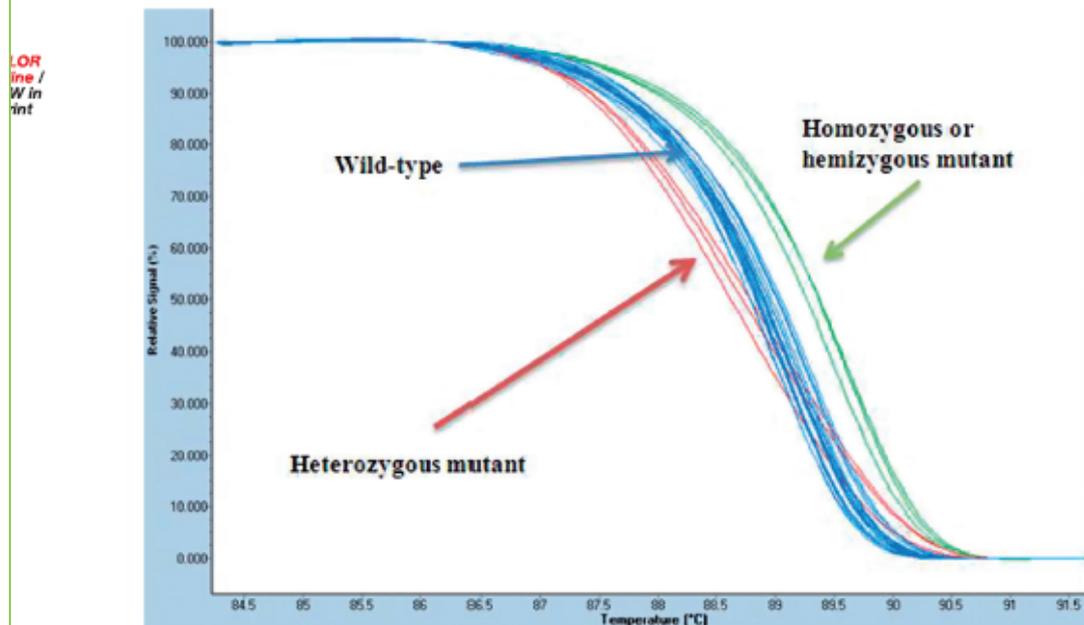


Figure 1. The novel β -globin mutation [*HBB*: c.265_266 del; p.Leu89Glufs*2].

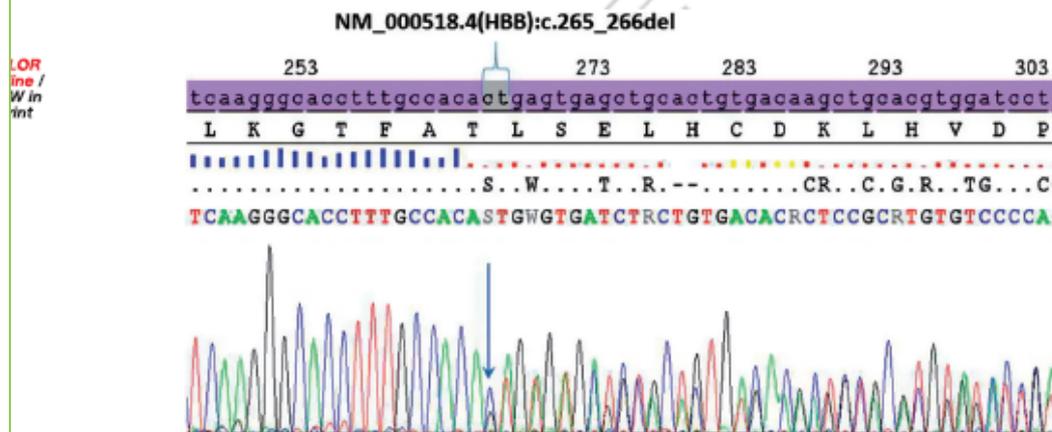


Figure 2. Distribution of modifiers genes in Africa from previously reported data. The $-\alpha^{3,7}$ deletion increases from west to east

the A(-) and Betica variants was verified for men and women, separately. Statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 22 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and a p level of <0.05 was considered to be significant.

Results

Among our 295 sickle cell disease children, we detected 98.0% β^S/β^S ($n=289$), 1.0% β^S/β^C ($n=3$) and 1.0% β^S/β -thal ($n=3$). The three corresponding β -thal mutations were *HBB*: c.92+5G>T, *HBB*: c.-79A>G and a novel β^0 -thal mutation that generates a stop codon two amino acids

further: *HBB*: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2 (Figure 2). This novel allele was detected in an 8-year-old boy with no α -thal deletion or a G6PD deficiency. This patient exhibited a strong regenerative microcytic and hypochromic anemia: white blood cell (WBC) count $11.9 (10^9/L)$, Hb 7.3 g/dL, packed cell volume (PCV) 0.22 L/L, mean corpuscular volume (MCV) 55.0 fL, mean corpuscular Hb (MCH) 18.9 pg, mean corpuscular Hb concentration (MCHC) 31.2 g/dL, platelet count $675.0 (10^9/L)$ and reticulocytes 19.3%.

Prevalence and allelic frequencies of the $-\alpha^{3,7}$ deletion (no other α -thal deletion was detected) and *XmnI* polymorphism are described in Table 1. Allelic frequencies of 0.12 and 0.75 were detected for these two gene modifiers,

Table 1. Prevalence of genetic modifiers ($-\alpha^{3,7}$ deletion and *XmnI* polymorphism) in our sickle cell disease pediatric cohort ($n=295$).

Genetic modifiers	Number of children	Prevalence (%)	Allelic frequency	p Value*
$-\alpha^{3,7}$ deletion				
wild-type	234	79.3	0.12	>0.1
heterozygous	55	18.6		
homozygous	6	2.1		
<i>XmnI</i> polymorphism ^b				
wild-type	32	11.1	0.75	>0.1
heterozygous	78	27.0		
homozygous	179	61.9		

*The HWE was checked by the χ^2 test^bSickle cell anemia (β^S/β^S) patients only ($n=289$).**Table 2.** Prevalence of the two deleterious mutations causing G6PD deficiency in our sickle cell disease pediatric cohort.

G6PD genotypes	Number of children	Prevalence (%)	Allelic frequency	p Value*
Males ($n=167$)				
A(-) wild-type	166	99.4	<0.01	>0.1
A(-) hemizygous	1	0.6		
Betica wild-type	145	86.8	0.13	>0.1
Betica hemizygous	22	13.2		
Females ($n=128$)				
A(-) wild-type	122	95.3	0.02	>0.1
A(-) heterozygous	6	4.7		
A(-) homozygous	0	0.0		
Betica wild-type	103	80.5	0.13	>0.1
Betica heterozygous	17	13.3		
Betica homozygous	8	6.2		

*The HWE was checked by the χ^2 test

respectively, and no deviation from HWE was observed. Considering our hypothesis that all *XmnI* (+) β^S alleles are of Senegal type, the β^S haplotypes repartition in our sickle cell disease population was as followed: Sen/Sen (61.9%; $n=179$), Sen/X (27.0%; $n=78$) and X/X (11.1%; $n=32$). Among the 42 patients (31 X/X and 11 Sen/X patients) in whom a complete β^S haplotyping was performed, we found the following combinations: 26 Ben/Ben, eight Sen/Ben, two Sen/Cam, two Ban/Ben, one Ban/Ban, one Ban/Cam, one Sen/Cam and one Ben/Aty.

The allelic frequencies of the G6PD^{202A-376G} A(-) and Betica variants are given in Table 2 and were comparable between males and females; <0.02 for A(-) and 0.13 for Betica. Once again, no deviation from HWE was observed.

Discussion

The β^S/β^S genotype was the most frequent sickle cell disease genotype found in our pediatric cohort, while β^S/β^C and β^S/β -thal genotypes were rarer (about 1.0% each). These data, which are very similar to those of Diagne *et al* [22] (95.0% of β^S/β^S vs. 4.0% of β^S/β^C and 1.0% of β^S/β -thal, respectively), confirm the very low frequency of β -thal genes in the Senegalese population. According to Kasili [23], these mutations usually occur as a few sporadic cases spread out over the countries of East Africa with a 'patchy' distribution. In West Africa, allelic frequency of β -thal varies from 0.8% (Nigeria) to 1.3–1.7% (Ghana) but may rise to 9.0% in some tribes in Liberia [24]. The new β -thal mutation characterized in one of our three β^S/β -thal patients perfectly illustrates the 'patchy' distribution of the β -thal alleles among

African populations. The β^C mutation also has a low prevalence compared to the β^S mutation, except for a few countries where it can be as high as 50.0%: the Ivory Coast (1.0–50.0%), Ghana (8.0–40.0%), Togo (7.0–17.0%), Benin (7.0–27.0%), Burkina Faso (15.0–40.0%) and Nigeria (1.0–9.0%) [25]. According to the study of Diagne *et al* [22], a prevalence of 1.0% only was found in our sickle cell disease cohort. Since symptomatic sickle cell disease patients are diagnosed in Senegal only when they come to the hospital for their first vaso-occlusive crisis, a recruitment bias could have been introduced, hence underestimating the frequency of β^S/β^C in our pediatric cohort. Only a systematic neonatal screening of sickle cell disease could give more accurate information.

Our study is the first to report the α -thal frequency in Senegalese sickle cell disease children with a prevalence of 20.6% for the $-\alpha^{3,7}$ deletion. A similar result (20.8%) was observed in the neighboring West African country of Guinea Conakry [26] but, interestingly, the prevalence of the $-\alpha^{3,7}$ deletion increases when moving from west to east Africa (Figure 3): 32.0% in Nigeria [27], 37.3% in Cameroon, 67.2% in Congo [28], 77.5% in Uganda [29], 58.0% in Tanzania [30] and 49.0% in Kenya [31]. This observation may reflect some differences in the survival advantage given by α -thal in sickle cell disease regarding altitude, mean age of individuals and local endemicity of malaria [32].

The β^S haplotypes distribution in Senegal was estimated to be 100.0% of Sen/Sen homozygous patients [33] but this estimation was obtained on a quite limited number of β^S/β^S patients ($n=47$), all of them belonging to the particular Niokholo Mandenka population located in the Niokholo Hills (30 km northwest of Kedougou, East Senegal). Since this ethnic group (which comprises about 3000 individuals from a dozen villages) was shown to constitute an endogamous group with few inter-breeding with surrounding populations (~5.0% immigration per generation) [34], these data obviously do not reflect the overall Senegalese population. Moreover, because of its high economic potential and healthcare performances compared to other African countries, Senegal has recently faced important immigration fluxes towards its economic capital, *i.e.* Dakar. As a consequence, it was not surprising to detect other β^S haplotypes than the Senegal one in our sickle cell disease cohort: these haplotypes were predominantly (about 86.0%) of the Benin type since the 'Benin area' (which comprises Benin, Nigeria, Niger, *etc.*) is very close to Senegal. A few Bantu, Cameroon and atypical β^S alleles were also found in about 14.0% of the β^S haplotypes (10/73 in our subset). Interestingly, all 42 children for which this complete β^S haplotyping was performed were born in Senegal. A few of them have not a 'Senegalese-like' birth name, suggesting that their parents probably originated from neighboring countries such as Guinea. It would mean that the β^S haplotypes other than 'Senegal' are partly due to recent immigration but are also present in the genetic background of the Senegalese population for at least two or three generations.

In sub-Saharan Africa, the G6PD A(-) variants (c.376A>G; c.202G>A) are the predominant cause of G6PD deficiency [35]. The c.376A>G substitution is a polymorphic

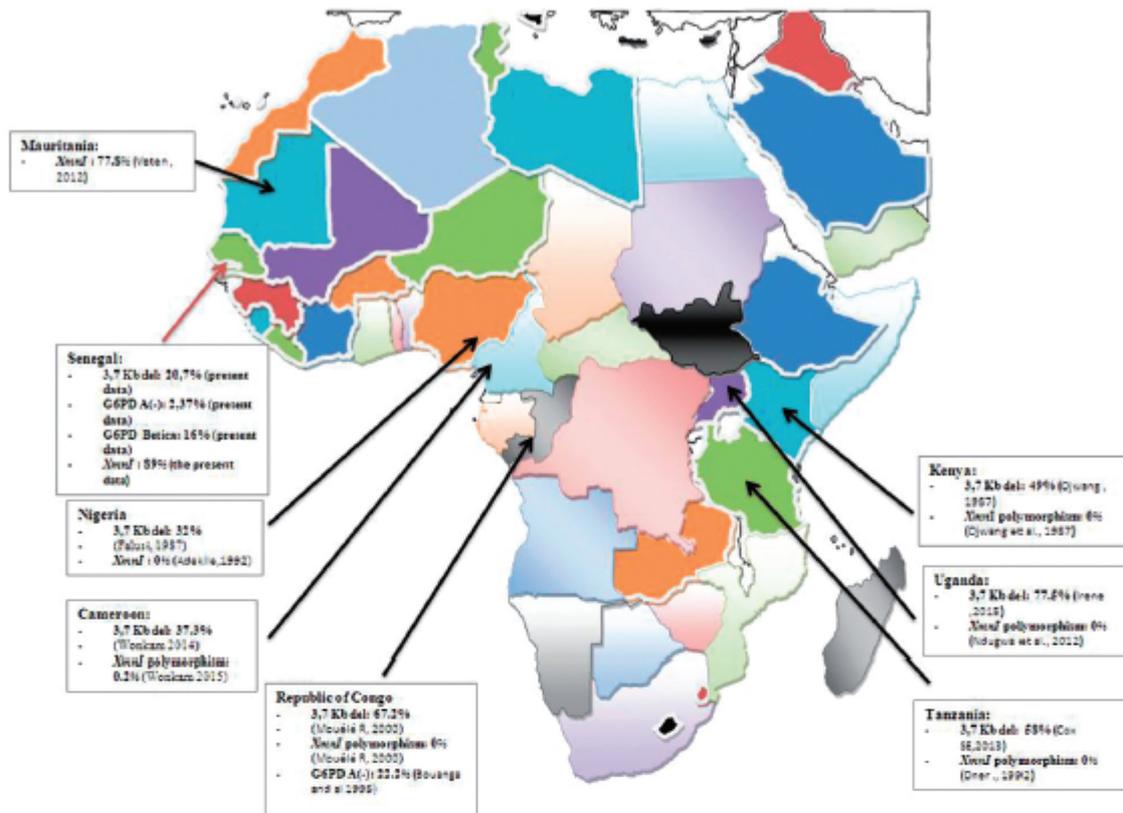


Figure 3. Normalized HRM curves of three possible genotypes for the G6PD Betica. At 84 °C, the denaturation of the 76 bp amplicon has not yet begun (100.0% fluorescence). At 91 °C, the denaturation is complete (0% fluorescence).

mutation very frequent in Africa that gives rise to the so-called 'allele A' of the *G6PD* gene, while the c.202G>A mutation is responsible for the enzyme deficiency per se. Other G6PD mutations with a genetic background of allele A have also been described in African individuals: G6PD A(-)⁶⁸⁰ (c.376A>G; c.680G>T), G6PD Betica (c.376A>G; c.968T>C) and G6PD Santamaria (c.376A>G; c.542A>T) [36]. In Senegal, G6PD deficiency was reported in 8.0 to 10.0% of the general population and reached 21.0% in β^S/β^S patients [37]. However, this screening was made by biochemistry (*i.e.* measurement of enzyme activity) that usually fails to detect heterozygous females and which can easily give falsely normal results if G6PD activity is not normalized with another enzyme activity (such as hexokinase or pyruvate kinase) to take into account the mean red blood cell (RBC) age [38]. A genetic study focusing on the G6PD^{202A}_{376G} and Betica variants was conducted 10 years ago in Senegal on a specific subgroup of population (*i.e.* the Serer population) and allelic frequencies of 1.0 and 10.0%, respectively, were found [39]. Another study in Gambia, whose borders are totally included in the Senegalese territory, also showed a higher prevalence for the G6PD Betica variant compared to the A(-) variant, while a study in Mali (another neighboring state of Senegal) reported a relatively high frequency of G6PD Betica (6.1%) in the Fulani ethnic group (6.1%) [40]. These results contrast with other reports from

tropical sub-Saharan countries in which the A(-) G6PD deficient variant was the only one identified [41]. Outside of Africa, the G6PD Betica variant has only rarely been described in Spain [42], Costa Rica [43] and the Canary Islands [36]. Altogether, these data strongly suggest a founder genetic effect for the G6PD Betica mutation (c.968T>C) in West Africa. Our results confirmed the high frequency of G6PD Betica in sickle cell disease Senegalese patients with 13.2% of hemizygous females and 6.2% of homozygous females. Interestingly, the sum of these two frequencies is very close to the frequency of biochemical G6PD deficiency in β^S/β^S patients as determined by Diop *et al.* [37]. Comparatively, the G6PD^{202A}_{376G} variant is anecdotic with only one hemizygous male and six heterozygous females in our entire cohort.

Conclusions

Our study is the first one to determine all the common genetic modifiers of sickle cell disease in a large and representative Senegalese pediatric cohort. It thus provides clear and robust epidemiological data that could be of great interest for the future development of sickle cell disease genotyping in Senegal. Given their quite high frequencies, the specific search for the $-\alpha^{3,7}$ deletion and for the G6PD Betica variant should be priorities compared to the differential diagnosis of

β^S/β^S and β^S/β^0 -thal, for example. Our dedicated HRM method for the G6PD Betica variant could also be much easier to perform routinely than the biochemical dosage, which is very time-consuming and fails to detect heterozygous females. The other α -thal deletions [$-\alpha^{4.2}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $-\alpha^{SEA}$ and $-\alpha^{MED}$] do not need to be screened since none of them were found in the present study.

The systematic genotyping of the $-\alpha^{3.7}$ deletion and the G6PD Betica variant in sickle cell disease patients from Senegal could be useful to identify patients at risk for several complications, such as cerebral vasculopathy, where it has been demonstrated that the normal α -globin genotype and G6PD deficiency are predisposing factors. Those patients should be eligible for a transcranial Doppler examination, which is not routinely offered in Senegal for economic reasons.

Acknowledgments

FGT was the principal investigator who coordinated the research, wrote the paper and takes primary responsibility for it. PJ supervised the genotyping analyses in France and reviewed the paper. PSL, EMD, PMG, RND, PAD and AC supervised the recruitment in Senegal and/or helped. PL and CR helped with the genetic data collection and/or HRM methodology. PC and CM reviewed the paper. IDL and ID are the pediatric hematologists who currently perform the clinical follow-up of the sickle cell disease patients in Dakar. The authors thank Marc Romana (Université des Antilles/Inserm UMR 1134 Biologie Intégrée du Globule Rouge CHU, Hôpital Ricou, Pointe-à-Pitre Guadeloupe, France) for editing the manuscript.

Disclosure statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

References

- Piel FB, Patil AP, Howes RE, *et al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*. 2013; 3819(9861):142–151.
- Lopez-Sall P, Diop PA, Digne I, *et al.* [Transferrin soluble receptors' contribution to the assessment of iron status in homozygous drepanocytic anaemia]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2004;62(4):415–421.
- Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, *et al.* A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood*. 2007;110(7):2727–2735.
- Renoux C, Connes P, Nader E, *et al.* α -Thalassaemia promotes frequent vaso-occlusive crises in children with sickle cell anaemia through haemorrhological changes. *Pediatr Blood Cancer*. 2017. doi: 10.1002/pbc.26455. [Epub ahead of print].
- Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, *et al.* Coinheritance of α -thalassaemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anaemia. *Hemoglobin*. 2010;34(6):516–529.
- Hsu LL, Müller ST, Wright E, *et al.* α -Thalassaemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anaemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003;25(8):622–628.
- Vasavda N, Menzel S, Kondaveeti S, *et al.* The linear effects of α -thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2007;138(2):263–270.
- Müller ST, Milton J, Steinberg MH. G6PD deficiency and stroke in the CSSCD. *Am J Hematol*. 2011;86(3):331. doi: 10.1002/ajh.21958.
- Rees DC, Lambert C, Cooper E, *et al.* Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anaemia. *Blood*. 2009;114(3):742–743; author reply: 743–744.
- Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, *et al.* G6PD deficiency, absence of α -thalassaemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anaemia. *Blood*. 2008;112(10):4314–4317.
- Hellani A, Al-Akoum S, Abu-Amro KK. G6PD Mediterranean S188F codon mutation is common among Saudi sickle cell patients and increases the risk of stroke. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2009;13(4):449–452.
- Joly P, Garnier N, Kebaili K, *et al.* G6PD deficiency and absence of α -thalassaemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anaemia. *Eur J Haematol*. 2015; 96(4):404–408.
- Labie D, Nagel RL. Genetic heterogeneity of sickle mutations. *Acta Haematol*. 1987;78(2-3):184–185.
- Labie D, Dunda-Belkhdja O, Rouabhi F, *et al.* The -158 site 5' to the α^L gene and α^L expression. *Blood*. 1985;66(6):1463–1465.
- Nagel RL, Rao SK, Dunda-Belkhdja O, *et al.* The hematologic characteristics of sickle cell anaemia bearing the Bantu haplotype; the relationship between G gamma and HbF level. *Blood*. 1987;69(4):1026–1030.
- Powars DR, Meiselman HJ, Fisher TC, *et al.* β^S Gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anaemia. Use in predicting clinical severity. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1994;16(1):55–61.
- Digne I, Digne-Gueye ND, Signate-Sy H, *et al.* [Management of children with sickle cell disease in Africa: experience in a cohort of children at the Royal Albert Hospital in Dakar]. *Med Trop*. 2003;63(4-5):513–520.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989;17(7):2503–2516.
- Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassaemia. *Blood*. 2000;95(1):360–362.
- Joly P, Lacan P, Garcia C, *et al.* Rapid genotyping of two common G6PD variants, African (A-) and Mediterranean, by high-resolution melting analysis. *Clin Biochem*. 2009;43(1-2):193–197.
- Joly P, Lacan P, Garcia C, *et al.* Rapid and reliable β -globin gene cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. *Clin Chim Acta*. 2011;412(13-14):1257–1261.
- Digne I, Ndiaye O, Moreira C, *et al.* [Sickle cell disease in children in Dakar, Senegal]. *Arch Pediatr*. 2000;7(1):16–24.
- Kasli EG. The geographical distribution of some abnormal hemoglobins in Eastern Africa. In: Winter W, Editor. *Hemoglobin Variants in Human Populations*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 1987:30–43.
- Weatherall DJ, Clegg JB. *The Thalassaemia Syndromes*, 4th ed. Oxford, Oxfordshire, UK: Blackwell Science, 2001.
- Bain BJ, Wild BJ, Stephens AD, Phelan LA. *Variant Hemoglobins: A Guide to Identification*. Hoboken, NJ, USA: Blackwell Publishing Ltd, 2010.
- Millimono TS, Loua KM, Rath SL, *et al.* High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the Republic of Guinea (West Africa). *Hemoglobin*. 2012;36(1):25–37.
- Falusi AG, Esan GJ, Ayyub H, Higgs DR. α -Thalassaemia in Nigeria: its interaction with sickle-cell disease. *Eur J Haematol*. 1987;38(4):370–375.
- Mouele R, Pambou O, Feingold J, Galacteros F. α -Thalassaemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anaemia. *Hum Hered*. 2000;50(2):118–125.

- [29] Lubega I, Nduwaga CM, Mworosi EA, Tumwine JK. α Thalassemia among sickle cell anaemia patients in Kampala, Uganda. *Afr Health Sci*. 2015;15(2):682–689.
- [30] Cox SE, Makani J, Newton CR, *et al*. Hematological and genetic predictors of daytime hemoglobin saturation in Tanzanian children with and without sickle cell anaemia. *ISRN Hematol*. 2013;2013:472909. doi: 10.1155/2013/472909.
- [31] Ojwang PJ, Ogada T, Beris P, *et al*. Haplotypes and α globin gene analyses in sickle cell anaemia patients from Kenya. *Br J Haematol*. 1987;65(2):211–215.
- [32] Enevold A, Alifrangis M, Sanchez JJ, *et al*. Associations between α^+ -thalassaemia and Plasmodium falciparum malarial infection in northeastern Tanzania. *J Infect Dis*. 2007;196(3):451–459.
- [33] Currat M, Trabuchet G, Rees D, *et al*. Molecular analysis of the β -globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the β^S Senegal mutation. *Am J Hum Genet*. 2002;70(1):207–223.
- [34] Langaney A, Gomila J. Bedik and Niokholonko intra and inter-ethnic migration. *Hum Biol*. 1973;45(2):137–150.
- [35] Vulliamy TJ, Othman A, Town M, *et al*. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A(-). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(19):8568–8571.
- [36] Xu W, Westwood B, Bartsocas CS, *et al*. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood*. 1995;85(1):257–263.
- [37] Diop S, Sene A, Cisse M, *et al*. [Prevalence and morbidity of G6PD deficiency in sickle cell disease in the homozygote]. *Dakar Med*. 2005;50(2):56–60.
- [38] Miao JK, Chen QX, Bao LM, *et al*. Determination of optimal cutoff value to accurately identify glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient heterozygous female neonates. *Clin Chim Acta*. 2013;424:131–135.
- [39] De Araujo C, Migot-Nabias F, Guitard J, *et al*. The role of the G6PD A₁Eth376G/068C allele in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the seerer population of Senegal. *Haematologica*. 2006;91(2):262–263.
- [40] Maiga B, Dolo A, Campino S, *et al*. Glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and susceptibility to mild malaria in Dogon and Fulani, Mali. *Malar J*. 2014;13:270. doi: 10.1186/1475-2875-13-270.
- [41] Ouattara AK, Yameogo P, Diarra B, *et al*. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Burkina Faso: G-6-PD Betica Selma and Santamaria in people with symptomatic malaria in Ouagadougou. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016029. doi: 10.4084/MJHID.2016.029.
- [42] Rovira A, Vives Corrons JL, Estrada M, *et al*. [Identification of molecular variants of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase by the polymerase chain reaction technique]. *Med Clin (Barc)*. 1994;102(8):281–284.
- [43] Beutler E, Kuhl W, Saenz GF, Rodriguez W. Mutation analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Costa Rica. *Hum Genet*. 1991;87(4):462–464.

1.3 Principaux résultats obtenus - Conclusion

Outre le présent article, cette étude a fait également l'objet de communications lors d'un congrès national et international au Sénégal (Annexe.0).

Malgré le très petit nombre d'enfants β^S/β^C et β^S/β^0 -thal (1,0% chacun), une nouvelle mutation β^0 -thal a été caractérisée : HBB: c.265_266del; p.Leu89Glufs* 2. La délétion $-\alpha^3$,⁷ était la seule délétion alpha-thalassémique identifiée dans cette cohorte avec une fréquence allélique de 12,0%. Plus de la moitié des patients β^S/β^S (61,9%) étaient homozygotes pour le polymorphisme *XmnI* et donc très vraisemblablement homozygotes pour l'haplotype Sénégal. Les haplotypes restants étaient principalement du type béninois. Alors que la variante Betica G6PD était assez fréquente (13,0%), une faible fréquence de la variante A (-) a été détectée (1,0–2,0%).

Le génotypage systématique de la délétion $-\alpha^{3.7}$ et de la variante G6PD Betica chez les patients atteints de drépanocytose du Sénégal pourrait être utile pour identifier les patients à risque de plusieurs complications, telles que la vasculopathie cérébrale. En effet, il a été démontré que l'absence d'alpha-thalassémie associée et le déficit en G6PD étaient des facteurs prédisposants. Ces patients « à risque » devraient être éligibles prioritairement pour le doppler transcrânien qui n'est pas systématiquement proposé au Sénégal.

Ainsi, cette étude pourrait contribuer à une meilleure prise en charge des patients. En effet, connaissant le profil génotypique d'un patient, la prise en charge pourra être orientée soit vers la prévention des complications du sous-phénotype vaso-occlusif ou soit celles du sous-phénotype hémolytique. De plus, le doppler transcrânien n'étant pas accessible à tous les enfants, le génotypage de ces gènes modificateurs, pourrait améliorer la prise en charge et surtout la prévention de la vasculopathie cérébrale

Cet article a permis d'évaluer pour la première fois les fréquences de ces gènes modificateurs au sein de la population drépanocytaire sénégalaise. Il serait à présent pertinent d'évaluer leur effet sur l'expression clinique 'naturelle' de la maladie, d'où l'objet de notre seconde étude.

Article 2 : Effets combinés des QTLs de l'HbF et de l'alpha-thalassémie sur la sévérité clinique de la drépanocytose dans une population pédiatrique sénégalaise – Soumis dans British Journal of Haematology (bjh)-2018

2.1 Contexte scientifique de l'étude - Présentation de l'article

Après avoir établi les prévalences des modulateurs génétiques au sein de notre population (article 1), nous avons voulu déterminer les effets cliniques et biologiques de ces gènes modificateurs (l'alpha-thalassémie, le déficit en G6PD et les QTLs de l'HbF) pour un meilleur suivi de nos patients. Plusieurs travaux ont précédemment étudié l'influence de ces trois modificateurs génétiques sur l'hétérogénéité clinique et biologique de la drépanocytose, essentiellement aux Etats Unis d'Amérique ou en Europe (216, 232, 595). En revanche, en Afrique et particulièrement au Sénégal, il y a très peu d'études sur ces gènes (135). Cette étude trouve tout son intérêt d'y être réalisée, puisque qu'elle participera à mieux développer le volet génétique de la drépanocytose au Sénégal. Ainsi, l'étude de ces gènes permettra leur recherche systématique au Sénégal pour une meilleure prise en charge des patients. Plusieurs travaux ont tenté de corrélés les QTLs de l'HbF avec l'état clinique des patients atteints de drépanocytose (216, 234, 235, 596). Cependant, la plupart de ces études ont travaillé sur des populations de patients drépanocytaires caractérisées par des haplotypes plus sévères et traitées à l'hydroxyurée. Au Sénégal, il n'existe pas encore de dépistage néonatal systématique (le diagnostic de la maladie est généralement posé lors de la première complication hospitalisée) et la grande majorité des patients ne sont pas sous hydroxyurée, quelle que soit leur évolution clinique. L'hydroxyurée n'a donc pas d'impact sur les potentiels effets de ces gènes sur la clinique au sein de cette cohorte caractérisée par une évolution naturelle de la maladie.

C'est dans ce contexte que le premier objectif était d'étudier les effets cliniques et biologiques des trois gènes modificateurs au sein d'une population sénégalaise pédiatrique non traitée à l'hydroxyurée et n'ayant pas bénéficié de dépistage néonatal. Le deuxième objectif était d'étudier les effets combinés de l'alpha-thalassémie et des QTLs de l'HbF sur la survenue d'une crise vaso-occlusive (CVO) et sur les paramètres biologiques. Avec ce deuxième objectif, nous tenterons de déterminer si la co-présence des QTLs de l'HbF et de l'alpha-thalassémie chez l'enfant atteint de drépanocytose module les risques de survenue des crises vaso-occlusives et les paramètres biologiques.

Nous avons effectué cette étude sur 301 enfants drépanocytaires sénégalais dont l'âge médian était de 9 ans. Ces enfants ont été recrutés à l'hôpital pédiatrique de Dakar. Les principales délétions alpha-thalassémiques (-3.7 Kb, MED, SEA, -20.5 Kb et -4.2 Kb) et les principaux variants déficitaires de la G6PD (A-, MED et Betica) ont été recherchés respectivement par la technique gap-PCR multiplex et la technique HRM. Trois QTLs de l'HbF ont été étudiés soit par HRM, soit par technique FRET: rs7482144 (dit XmnI) sur le promoteur HBG2, rs4671393 (BCL11A) et rs28384513 (espace inter-génique HBS1L-MYB). Les allèles mutés ont ensuite été additionnés pour constituer un score de 0 à 6 et les patients ont été classés en 3 groupes selon le nombre de QTLs : [0-1], [2-3] et [4 à 6]. Ces facteurs génétiques ont été corrélés avec les principaux paramètres biologiques mesurés à l'état de base, et trois marqueurs de sévérité clinique : l'âge de la première complication, le nombre de crises vaso-occlusives (CVO) et le nombre d'hospitalisations sur les 2 années précédant l'inclusion. L'effet des QTLs de l'HbF a ensuite été étudié en fonction du génotype alpha : sauvage (population non porteuse de la délétion 3.7 Kb), n=235 ou muté (population présentant la délétion), n=66. De même, l'influence du génotype alpha-thalassémique a été étudiée après subdivision de la cohorte en deux selon le nombre de QTLs : [0 à 2], n=158 et [3 à 6], n=143.

2.2 Article

British Journal of Haematology

Combined effects of alpha-thalassemia and HbF quantitative trait loci in a cohort of Senegalese children with sickle cell anemia

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Ordinary Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Tall, Fatou Gueye; Universite Cheikh Anta Diop, Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique Martin, Cyril; University Claude Bernard Lyon 1, CRIS EA 647 Ndour, El hadji ; Universite Cheikh Anta Diop, Biochimie Pharmaceutique Renoux, Céline; Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Unité de Pathologie Moléculaire du Globule Rouge, Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire Ly, Indou Deme; Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer, pediatrics Connes, Philippe; University Claude Bernard Lyon 1, CRIS EA 647 GUEYE, Papa; Universite Cheikh Anta Diop, Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique Diallo, Rokhaya Ndiaye; Universite Cheikh Anta Diop, Laboratoire de Biochimie Pharamaceutique Diagne, Ibrahima; Universite Gastion Berger Saint Louis UFR de Sciences de la Sante, Pediatrie Diop, Papa; Universite Cheikh Anta Diop, Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique Cisse, Aynina; Universite Cheikh Anta Diop, Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique Salla, Philomène Lopez; Universite Cheikh Anta Diop, Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique JOLY, Philippe; Hôpital Edouard-Herriot, Biochimie (Bât.5)
Key Words:	SICKLE CELL ANAEMIA, alpha-thalassemia, HbF QTL, Senegal haplotype, G6PD deficiency, genetic modifiers

SCHOLARONE™
Manuscripts

Combined effects of alpha-thalassemia and HbF quantitative trait loci in a cohort of Senegalese children with sickle cell anemia

Fatou Gueye Tall^{1,3,5}, Cyril Martin^{3,4}, El Hadji Malick Ndour^{1,5}, Céline Renoux^{2,3}, Indou Déme Ly^{5,6}, Philippe Connes^{3,4,8}, Papa Madiaye Gueye¹, Rokhaya Ndiaye Diallo¹, Ibrahima Diagne^{6,7}, Pape Amadou Diop¹, Aynina Cissé¹, Philomène Sall Lopez^{1,5} and Philippe Joly^{2,3,4}

¹ Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique-FMPO, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

² UF « Biochimie des pathologies érythrocytaires », Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire Grand-Est, Groupement hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

³ Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (LIBM) EA7424, Equipe "Biologie vasculaire et du globule rouge", Université Claude Bernard Lyon 1, COMUE Lyon, France.

⁴ Laboratoire d'Excellence sur le globule rouge (Labex GR-Ex), Paris, France.

⁵ Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer- Dakar, Sénégal.

⁶ Service universitaire de Pédiatrie-FMPO, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal.

⁷ UFR des sciences de la santé – Université Gaston Berger, Saint-Louis, Sénégal.

⁸ Institut Universitaire de France, Paris, France.

Key words: sickle cell anaemia, alpha-thalassemia; HbF QTL; Senegal haplotype; G6PD deficiency; genetic modifiers

Running title: Combination of modifier genes in sickle cell disease

Text without references: 3417 words

Corresponding author

Dr. Philippe JOLY – philippe.joly@chu-lyon.fr

Abbreviations:

SCA	Sickle cell anemia	LDH	Lactate dehydrogenase
ROS	Reactive oxygen species	BIL	Bilirubin
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase	ASAT	Aspartate amino-transferase
SNP	Single nucleotide polymorphism	CRP	C-reactive protein
Hb	Hemoglobin	HPLC	High performance liquid chromatography
QTL	Quantitative trait loci	SPSS	Statistical package for social sciences
HMIP	HBS1L-MYB intergenic region	SD	Standard deviation
ACS	Acute chest syndrome		
VOC	Vaso-occlusive crisis		
RBCs	Red blood cells		
HU	Hydroxyurea		
WBC	White blood cell		
PLT	Platelet		
RET	Reticulocyte		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

BACKGROUND: Our objective was to investigate the combined effects of alpha-thalassaemia and HbF QTL on clinical and biological parameters in a pediatric Senegalese sickle cell anaemia population not treated with hydroxyurea. The G6PD genotype was also investigated.

MATERIALS AND METHODS: Steady-state biological parameters and VOC requiring emergency admissions were recorded over a 2-year period in 301 children with SCA. Age of first hospitalized complication was also recorded. These data were correlated with genetic modulators. The HbF QTL were studied through the genotyping of 3 SNPs located on three different loci: *XmnI*, *BCL11A* and *HBSIL-MTB* region.

RESULTS: G6PD genotype had no impact on VOC occurrence and on biological parameters. Combination of alpha-thalassaemia and at least 2 HbF QTL was shown to significantly delay the age of the first complication. However, combination of homozygous alpha-thalassaemia and 3 to 6 HbF QTL was associated with higher VOC occurrence during infancy. The positive impact of HbF QTL on HbF levels and VOC rate was observed only in patients without alpha-thalassaemia.

CONCLUSION: Alpha-globin and HbF QTL genotypes have inter-related modifier effects in the clinical severity of SCA. Heterozygous alpha-thalassaemia with at least 2 HbF QTL would be the most suitable genotype to reduce VOC occurrence.

Peer Review

INTRODUCTION

Although sickle cell anemia (SCA) is a monogenic disease caused by a single point mutation, clinical manifestations show a striking phenotypic heterogeneity. SCA has been recognized as an inflammatory disease triggered by erythrocyte sickling and hemolysis (Conran and Belcher 2018). An increasing number of SCA modifiers genes have been identified since the 1990s (Steinberg and Adewoye 2006). The major ones (i.e. alpha-globin status, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency) are frequently determined in developed countries, as well as some single nucleotide polymorphisms (SNPs) implied in the residual hemoglobin F (HbF) level. These HbF quantitative trait loci (QTL) mainly comprise the *XmnI-HBG2* polymorphism on chromosome 11p15 (rs7482144 C>T); the *HBSIL-MYB* (HMIP) intergenic region on chromosome 6q23 and the *BCL11A* gene on chromosome 2p16. These three loci account for approximately 20–50% of HbF variation in patients with SCA (Creary, *et al* 2009, Lettre, *et al* 2008).

Several works have previously studied the influence of these three genetic modifiers on the clinical and biological heterogeneity of SCA. Co-inheritance of alpha-thalassemia is protective against cerebral vasculopathy (Belisario, *et al* 2010, Hsu, *et al* 2003, Joly, *et al* 2016a), cholelithiasis (Joly, *et al* 2016b, Vasavda, *et al* 2007) as well as leg ulcers, acute chest syndrome (ACS) and chronic kidney disease (Gearđ, *et al* 2017, Guasch, *et al* 1999, Higgs, *et al* 1982). In contrast, alpha-thalassemia would increase the risks for osteonecrosis (Lemonne, *et al* 2013) and frequent vaso-occlusive crises (VOC) (Renoux, *et al* 2018, Wonkam, *et al* 2017). Although debated (Miller, *et al* 2011, Rees, *et al* 2009), G6PD deficiency is now recognized as an independent risk factor for cerebral vasculopathy in children with SCA (Bernaudin, *et al* 2008, Hellani, *et al* 2009, Joly, *et al* 2016a). Finally, increased HbF level has been associated with a better clinical course in SCA (Platt, *et al* 1994) and with a reduction in oxidative stress (Dasgupta, *et al* 2010, Silla 1999).

Several works tried to correlate the HbF QTL with the clinical status of patients with SCA (Friedrich, *et al* 2016, Leonardo, *et al* 2016, Lettre, *et al* 2008, Muszłak, *et al* 2015, Wonkam, *et al* 2017). However, all these studies had some drawbacks that limited their interpretation: (i) except in the latter study (Wonkam, *et al* 2017), the most severe patients received hydroxyurea (HU), a well-

1
2
3 known HbF inducer that may have blunted the effects of the genetic modifiers; (ii) most patients
4 presented two Bantu or Benin β^S haplotypes that are negative for *XmnI*, the major HbF QTL; (iii) no
5 study focused on the mixed effects of alpha-thalassemia and HbF QTL on the clinical severity of the
6 disease. Senegal is a sub-Saharan African country where the frequency of the β^S mutation ranges from
7 8 to 10% with a high predominance of the Senegal haplotype, which is positive for the *XmnI*
8 polymorphism (rs7482144). Because of economic concerns, there is no neonatal screening and SCA
9 diagnosis is usually made during the first hospitalized complication. The huge majority of patients
10 with SCA are HU free, whatever their clinical evolution. The first objective of the present study was to
11 investigate the clinical and biological effects of the three main SCA genetic modifiers in a pediatric
12 Senegalese population without the abovementioned bias and limitations. The second one was to
13 investigate the combined effects of alpha-thalassemia and HbF QTL on the occurrence of vaso-
14 occlusive events and on the main biological variables.

30 MATERIALS AND METHODS

31 CLINICAL FOLLOW-UP OF THE SCA COHORT

32
33 Between January 2016 and August 2017, 301 children and young adults with SCA (169 males
34 and 132 females) aged from 2 to 23 years (median age 9.1) were consecutively enrolled during a
35 routine follow-up visit at Albert Royer Children's Hospital, Dakar, Senegal. They had not been
36 hospitalized for SCA complication and did not receive any blood transfusion in the past two months
37 and none of them was currently treated with HU. The study was approved by the Ethics Committee
38 of the University Cheikh Anta Diop of Dakar (0079/2015/CER/UCAD) and all patients and/or legal
39 caregivers gave their consent for the genetic diagnosis of SCA, including the modifier genes. Their
40 medical records were retrospectively reviewed to recover the age of the diagnosis of SCA and the
41 number of hospitalized VOC over the past two years.

42 SCA modifier genes and data analysis

43
44 In a previous epidemiological article (Gueye Tall, *et al* 2017), we reported the allelic
45 frequencies of alpha-thalassemia (-3.7 Kb, -4.2 Kb, -20.5 Kb, MED and SEA deletions), G6PD
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 deficiency (Med, A (-) and Betica variants) and *XmnI* polymorphism in our SCA cohort. For the present
4
5 study, these data were completed by the genotyping of two other HbF QTL (rs1427407 G>T in intron
6
7 2 of the *BCL11A* gene and rs28384513 A>C in the HMIP region) using in-house high-resolution
8
9 melting (HRM) protocols on the Light Cycler® 480 device (Roche Diagnostics, Meylan, France). A
10
11 composite HbF QTL score ranging from 0 to 6 and corresponding to the number of HbF-promoting
12
13 alleles was calculated with the *XmnI*, *BCL11A* and *HMIP* genotypes. Patients were shared into three
14
15 groups depending on their number of HbF QTL: group A for 0 or 1 QTL, group B for 2 or 3 QTL and
16
17 group C for 4 HbF QTL or more.
18
19

20 21 22 BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS

23
24 The following hematological and biochemical parameters were measured in the context of
25
26 the routine medical follow-up of the patients: (i) total hemoglobin (HB), white blood cells (WBC),
27
28 platelets (PLT) and reticulocytes (RET) counts using a Sysmex XT-4000i device (System Corporation,
29
30 Tokyo, Japan), (ii) lactate dehydrogenase (LDH), total and direct bilirubin (BIL), aspartate amino-
31
32 transferase (ASAT) and C-reactive protein (CRP) using a BA-88 Mindray analyzer (Manwah, NJ, USA)
33
34 while the different hemoglobin fractions were quantified by high-performance liquid
35
36 chromatography (HPLC) using a Variant II device and the beta-thalassemia short program (Biorad,
37
38 Hercules, CA, USA).
39
40

41 42 43 STATISTICAL ANALYSIS

44
45 Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences
46
47 (SPSS) software version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance level was defined at $p < 0.05$.
48
49 Continuous variables were reported as mean \pm standard deviation (SD) and categorical variables as
50
51 number (N) or frequency. The three studied modifier genes were tested in an additive genetic model
52
53 against the recorded clinical and biological parameters using a one-way ANOVA and LSD post-hoc
54
55 tests.
56
57
58
59
60

1
2
3 To evaluate whether the effects of alpha-globin genotype depended on the number of HbF
4 QTL, the corresponding tests were performed again in two sub-groups: patients with 0 to 2 HbF QTL
5 and those with at least 3 HbF QTL. Similarly, the influence of the HbF QTL group (A, B or C) on the
6 recorded clinical and biological parameters was also studied separately on patients with alpha-
7 thalassemia and on those without.
8
9
10
11
12
13
14

15 RESULTS

16 MOLECULAR, CLINICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE COHORT

17
18 The prevalence and allelic frequencies of all studied genetic parameters are presented in
19 Table I. The allelic frequency of the $-\alpha^{3.7}$ deletion was quite low while the other searched alpha-
20 thalassemia deletions were not observed. Betica was the main G6PD deficient variant observed since
21 the two others were either very rare for A (-) or absent for Med. As for the three studied HbF QTL,
22 the *XmnI* polymorphism was very frequent compared to the *BCL11A* and *HMIP* SNPs. The HbF QTL
23 score ranged between 1 and 4 in more than 95% of patients: 51 patients had a score of 0-1 (Group
24 A), 195 had a score of 2-3 (group B) and 55 had a score of 4-6 (group C).
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 Overall clinical and biological data are reported in Table II (supplemental data). The mean age
39 of the first complication was 4.1 years and the mean number of hospitalized VOC during the last two
40 years was 0.7, but a high variability was observed in both cases. The mean total Hb level was very low
41 7.8 (g/dL) contrary to the leucocytes, reticulocytes and platelets counts which were normal or
42 moderately elevated (15.1, 330 and 349 G/L, respectively). Hemolysis and inflammatory parameters
43 were slightly elevated (total and direct bilirubin: 44 and 23 mg/L, ASAT: 61 UI/l, CRP: 4.6 mg/L)
44 except for LDH which also showed a huge variability among patients (940 ± 499 UI/L).
45
46
47
48
49
50
51
52

53 EFFECTS OF COMMON SCA MODIFIERS GENES ON THE OVERALL COHORT 54 (TABLE III)

55 The influence of the HbF QTL score and of alpha-thalassemia and G6PD genotypes on the
56 clinical and biological parameters of the whole cohort are given in table III. The age of the first
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

complication tended to be different ($p = 0.09$) depending on the HbF QTL group, especially between groups A and C ($p = 0.02$). Patients with 2 or 3 (group B) or with 4 to 6 HbF QTL (group C) had significantly lower WBC counts and higher HbF levels than patients with 0 or 1 HbF QTL (group A). The CRP level was significantly lower in group C compared to group A. The other clinical and biological parameters were not different between the three groups.

Neither the age of the first complication nor the number of hospitalized VOC was affected by the alpha-globin genotype. Total and direct bilirubin levels were significantly decreased in presence of the -3.7 Kb deletion while only a slight tendency to higher Hb levels was observed ($p = 0.07$). The other biological parameters were not modulated by the alpha-globin genotype.

Once again, neither the age of the first complication nor the number of hospitalized VOC was affected by the G6PD genotype. Compared to wild-type, HbF level was significantly lower in homozygous or hemizygous G6PD deficient patients. However, the sex ratio was clearly imbalanced in this group (20 males and 7 females) and it is well known that females usually express higher HbF levels than males (Hu, *et al* 2018).

DIFFERENTIAL EFFECTS OF ALPHA-THALASSEMIA ACCORDING TO THE HbF QTL SCORE (FIGURE 1 AND TABLE IV IN SUPPLEMENTAL DATA)

Homozygous alpha-thalassemia was associated with more frequent hospitalized VOC compared to wild-type only for patients whose HbF QTL score ranged from 3 to 6. In this subgroup, patients with a normal alpha-globin genotype had significantly higher WBC count and direct BIL levels compared to heterozygous patients. Conversely, when HbF QTL score ranged from 0 to 2, WBC count was not influenced by alpha-thalassemia while direct BIL level was lower for homozygous alpha-thalassemia patients only. The effects of alpha-thalassemia on the other clinical and biological parameters did not depend on the HbF QTL score.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DIFFERENTIAL EFFECTS OF HbF QTL ACCORDING TO THE ALPHA-GLOBIN GENOTYPE (FIGURE 2 AND TABLE V IN SUPPLEMENTAL DATA)

The age of first complication significantly increased with the number of HbF QTL in presence of alpha-thalassemia only. In the subgroup of patients without alpha-thalassemia, more HbF QTL were associated with less frequent hospitalized VOC, higher HbF levels and lower WBC counts and CRP levels. These effects were not observed for patients with alpha-thalassemia. The effects of HbF QTL on the other biological parameters did not depend on the alpha-globin genotype.

DISCUSSION

Most published studies on SCA modifier genes focused on cohorts from the United States of America, Europe or Brazil where neonatal screening and HU treatment (when necessary) are proposed to patients. Their absence in Senegal for economic reasons is of great interest to study the influence of genetic modifiers in the natural evolution of SCA. Moreover, no study previously focused on the differential effects of the alpha-globin genotype according to the number of HbF QTL, and conversely. Bernaudin *et al.* recently focused on the intrinsic effects of the β^S haplotypes on SCA severity (Bernaudin, *et al* 2018) but the Benin and Bantu ones were largely predominant compared to the Senegal haplotype. Our study is thus complementary and innovative in the field of SCA phenotype-genotype correlation studies.

The biological characteristics of our cohort are roughly similar to those already reported in Senegal (Thiam, *et al* 2017). Compared to children followed in the main French SCA pediatric center (Bernaudin, *et al* 2018), the anemia was a little more pronounced in our cohort (7.8 vs 8.1 g/dL) while the WBC count (15.1 vs 13.7) and all the hemolytic parameters were somewhat more elevated (LDH: 940 vs 852; RET: 330 vs 285; BIL: 44 vs 37). The absence of HU medication in Senegal probably explains these results. Regarding the clinical parameters, the mean age of the first SCA-related hospitalization was quite advanced in our cohort (4.1 ± 3.3 years) compared to developed countries where it frequently occurs before 3 years old (Gill, *et al* 1995). Similarly, the average number of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hospitalized VOC per year was lower in our cohort (about 0.4) than those reported in Cameroon and Mayotte (about 2.0 and 3.8, respectively) where the clinical follow-up of children with SCA is very comparable (Muszlak, *et al* 2015, Wonkam, *et al* 2017). The very high prevalence of the favorable *XmnI* (+) Senegal haplotype in our cohort could explain these differences.

The lower HbF levels in patients with homozygous G6PD deficiency being the consequence of an unbalanced sex-ratio, no clinical or biological effect of the G6PD genotype could be identified in our cohort. To date, G6PD deficiency has been described as a risk factor for cerebral vasculopathy (Bernaudin, *et al* 2008) and for neonatal anemia (Benkerrou, *et al* 2013) in children with SCA. These two conditions were not tested in our study, which focused on the vaso-occlusive complications. Our results confirm that G6PD deficiency, at the heterozygous or homozygous/hemizygous state, is not implied in the pathophysiology of VOC.

The selected SNPs for our HbF QTL score correspond to the three loci responsible for about 50% of all F-cell variability (Menzel, *et al* 2007). For the BCL11A locus, three major SNPs were identified by genome-wide association studies (GWAS) with an allelic frequency of about 0.30: rs11886868, rs4671393 and rs1427407 (Lettre, *et al* 2008). The latter SNP was chosen in our study because it was characterized as the best possible tag-SNP for the prediction of HbF elevation in patients with SCA (Sebastiani, *et al* 2015). The most suitable tag-SNP for the HMIP locus was less obvious. In European cohorts, rs9399137 is frequently chosen (Danjou, *et al* 2014) but its allelic frequency is very low (< 5%) in patients with SCA, except for those with a significant European admixture like in Brazil (Friedrich, *et al* 2016). Consequently, when it is used in African SCA populations, an obvious lack of statistical power blunts the interpretation of genotype-phenotype association studies (Bernaudin, *et al* 2018, Muszlak, *et al* 2015). On the contrary, rs28384513 is much more frequent in African populations with an allelic frequency of about 0.20 in the African American Cooperative Study of Sickle Cell disease (CSSCD) cohort (Lettre, *et al* 2008). Despite a lower association with HbF level than rs9399137, we chose that SNP as a marker of the HMIP locus for our

1
2
3 HbF QTL score. Our study is the first one looking for rs1427407 and rs28384513 in a SCA cohort with
4 such a large majority of Senegal β^S chromosomes (77%). Bernaudin *et al* (Bernaudin, *et al* 2018)
5
6 found that rs1427407 had a lower allelic frequency (about 0.22) in children homozygous for the
7 Bantu haplotype compared to those homozygous for the Benin haplotype (about 0.40). Dineo Pule *et*
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Despite the fact that several genome wide association studies demonstrated the influence of the *XmnI*, *BCL11A* and *HMIP* loci on HbF levels (Creary, *et al* 2009, Lettre, *et al* 2008, Mtatiro, *et al* 2014), only three studies focused on their direct effects on SCA severity. Muszlak *et al.* showed that the SNP BCL11A rs4671393 was associated with a lower hospitalization rate in a cohort of 82 SCD children originating from Mayotte (Muszlak, *et al* 2015). In Brazil (205 SCA patients aged 12 to 68 years), Leonardo demonstrated that patients without any HMIP or BCL11A minor allele SNP had a worse clinical evolution (i.e. priapism, elevated tricuspid resurgence velocity, leg ulcers, osteonecrosis and overt stroke) (Leonardo, *et al* 2016). Last year, Wonkam *et al.* reported that two SNPS on BCL11A (rs11886868 and rs4671393) and two others on HMIP (rs28384513 and rs9494142) were associated with a lower rate of hospitalization for painful events in a Cameroonian cohort (Wonkam, *et al* 2017). As for the biological parameters, an ameliorating effect of the HbF QTL on the CRP level and WBC count was already described (Mtatiro, *et al* 2014, Sheehan, *et al* 2013). In all these studies, these associations were not tested according to the alpha-globin genotype and the additional effect of the *XmnI* polymorphism could not be considered since almost all patients were of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Benin, Bantu or Cameroon β^S haplotypes. Moreover, the confounding effect of HU could not be ruled out. Our study overcomes all these limitations thanks to our large HU-free cohort with a high prevalence of the Senegal *XmnI* (+) β^S haplotype.

Except for the age of the first complication, all the positive effects of the HbF QTL that were identified in our cohort were limited to patients without alpha-thalassemia. Interestingly, we also observed for the first time that HbF levels were not significantly modified by the HbF QTL in patients with alpha-thalassemia. Taken together, these results suggest that co-inheritance of alpha-thalassemia and numerous HbF QTL would be favorable at a very young age (maybe by delaying the HbF to HbS switch) but this association could blunt the elevation of the residual HbF level later. This hypothesis obviously needs confirmation since the alpha-globin chains have never been implied so far in the silencing process of the gamma-globin genes. Moreover, at least two studies concluded that alpha-thalassemia had no influence on SCA severity and HU response in the first years of life; i.e., before spleen involution (Figueiredo, *et al* 2017, Joly, *et al* 2011).

The negative impact of alpha-thalassemia on VOC occurrence was already reported (Platt, *et al* 1994, Renoux, *et al* 2018, Wonkam, *et al* 2017). The admitted pathophysiological explanation is that alpha-thalassemia reduces the intra-cellular concentration of HbS, thus leading to lower hemolytic rate, increased hematocrit and more frequent VOC (Ferrone 2004). In our cohort, homozygous alpha-thalassemia was associated with a higher VOC rate and a lower WBC count only in the sub-group of children with 3 or more HbF QTL. Similarly, the positive effect of alpha-thalassemia on direct BIL level was observed at the heterozygous state while it requires homozygosity when the HbF QTL score ranges from 0 to 2. These results suggest that alpha-thalassemia would favor VOC occurrence if many HbF QTL are present.

Some limitations can be highlighted in this study. The first one is the very low number of patients with homozygous alpha-thalassemia ($n = 7$) despite the important size of our cohort ($n = 301$). It thus prevents to draw definitive conclusions about the differential effects of this genotype

1
2
3 according to the number of HbF QTL. The second limitation is that the biological data at the age of
4
5 the first complication were not available. Consequently, we could not determine if the positive
6
7 effects of HbF QTL in the alpha-thalassemia subgroup were driven by a retardation of the HbS to HbF
8
9 switch or by other biological mechanisms. Finally, since transcranial Doppler examination is not
10
11 performed routinely in Senegal, we could not evaluate if the well-known protective effect of alpha-
12
13 thalassemia on cerebral vasculopathy depends or not on the number of HbF QTL.
14
15

16
17 In conclusion, this study brings important information about the modifying effects of alpha-
18
19 thalassemia and HbF QTL on the clinical severity in SCA. It demonstrates that these two common
20
21 genetic modifiers are inter-related each other and should not be studied separately for an accurate
22
23 clinical prediction. For example, combination of alpha-thalassemia with at least 2 HbF QTL is needed
24
25 to significantly delay the first SCA complication. However, homozygous alpha-thalassemia associated
26
27 with 3 to 6 HbF QTL would promote VOC occurrence later. Consequently, heterozygous alpha-
28
29 thalassemia with at least 2 HbF QTL on two different genetic loci would be the most suitable
30
31 genotype to reduce VOC occurrence.
32
33

34 35 **Authors contribution:**

36
37 FTG was the main investigator of the study and takes primary responsibility for it. She also wrote the
38
39 initial draft of the manuscript.

40
41 PJ, CM, PLS and PC made substantial contribution to acquisition, analysis and interpretation of data.

42
43 IDL and ID were the physicians who follow-up the SCA patients and recruited them

44
45 Help for Biochemical analysis: PMG, AC, PAD and RMD

46
47 Drafting manuscript: CR, PJ, CM and PC

48
49 Given final approval: all authors
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

- 1
2
3
4
5
6
7
8 Belisario, A.R., Rodrigues, C.V., Martins, M.L., Silva, C.M. & Viana, M.B. (2010) Coinheritance of
9 alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with
10 sickle cell anemia. *Hemoglobin*, **34**, 516-529.
- 11 Benkerrou, M., Alberti, C., Couque, N., Haouari, Z., Ba, A., Missud, F., Boizeau, P., Holvoet, L.,
12 Ithier, G., Elion, J., Baruchel, A. & Ducrocq, R. (2013) Impact of glucose-6-phosphate
13 dehydrogenase deficiency on sickle cell anaemia expression in infancy and early childhood: a
14 prospective study. *Br J Haematol*, **163**, 646-654.
- 15 Bernaudin, F., Arnaud, C., Kandem, A., Hau, I., Lelong, F., Epaud, R., Pondarre, C. & Pissard, S.
16 (2018) Biological impact of alpha genes, beta haplotypes, and G6PD activity in sickle cell
17 anemia at baseline and with hydroxyurea. *Blood Adv*, **2**, 626-637.
- 18 Bernaudin, F., Verlhac, S., Chevret, S., Torres, M., Coic, L., Arnaud, C., Kandem, A., Hau, I., Grazia
19 Neonato, M. & Delacourt, C. (2008) G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and
20 hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high
21 cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood*, **112**, 4314-4317.
- 22 Conran, N. & Belcher, J.D. (2018) Inflammation in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc*, **68**,
23 263-299.
- 24 Creary, L.E., Uhug, P., Menzel, S., McKenzie, C.A., Hanchard, N.A., Taylor, V., Farrall, M., Forrester,
25 T.E. & Thein, S.L. (2009) Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in
26 healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients. *PLoS One*, **4**,
27 e4218.
- 28 Danjou, F., Francavilla, M., Ammi, F., Satta, S., Demartis, F.R., Perseu, L., Manca, M., Sollaino, M.C.,
29 Mamunza, L., Mereu, E., Marceddu, G., Pissard, S., Joly, P., Thuret, I., Origa, R., Borg, J.,
30 Forni, G.L., Piga, A., Lai, M.E., Badens, C., Moi, P. & Galanello, R. (2014) A genetic score
31 for the prediction of beta-thalassemia severity. *Haematologica*, **100**, 452-457.
- 32 Dasgupta, T., Fabry, M.E. & Kaul, D.K. (2010) Antisickling property of fetal hemoglobin enhances
33 nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout
34 sickle mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **298**, R394-402.
- 35 Ferrone, F.A. (2004) Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. *Microcirculation*, **11**,
36 115-128.
- 37 Figueiredo, L., Morrone, K., Wei, C., Ireland, K., Cohen, H.W., Driscoll, C. & Manwani, D. (2017)
38 An age dependent response to hydroxyurea in pediatric sickle cell anemia patients with alpha
39 thalassemia trait. *Blood Cells Mol Dis*, **66**, 19-23.
- 40 Friedrisch, J.R., Sheehan, V., Flanagan, J.M., Baldan, A., Summarell, C.C., Bittar, C.M., Friedrisch,
41 B.K., Wilke, II, Ribeiro, C.B., Daudi, L.E. & da Rocha Silla, L.M. (2016) The role of BCL11A
42 and HMIP-2 polymorphisms on endogenous and hydroxyurea induced levels of fetal
43 hemoglobin in sickle cell anemia patients from southern Brazil. *Blood Cells Mol Dis*, **62**, 32-
44 37.
- 45 Geard, A., Pule, G.D., Chetcha Chemegni, B., Ngo Bitoungui, V.J., Kengne, A.P., Chimusa, E.R. &
46 Wonkam, A. (2017) Clinical and genetic predictors of renal dysfunctions in sickle cell
47 anaemia in Cameroon. *Br J Haematol*, **178**, 629-639.
- 48 Gill, F.M., Sleeper, L.A., Weiner, S.J., Brown, A.K., Bellevue, R., Grover, R., Pegelow, C.H. &
49 Vichinsky, E. (1995) Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell
50 disease. *Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood*, **86**, 776-783.
- 51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Guasch, A., Zayas, C.F., Eckman, J.R., Muralidharan, K., Zhang, W. & Elsas, L.J. (1999) Evidence
4 that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell
5 glomerulopathy in humans. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 1014-1019.
- 6
7 Gueye Tall, F., Martin, C., Malick Ndour, E.H., Deme Ly, I., Renoux, C., Chillotti, L., Veyrenche, N.,
8 Connes, P., Madiye Gueye, P., Ndiaye Diallo, R., Lacan, P., Diagne, I., Amadou Diop, P.,
9 Cisse, A., Lopez Sall, P. & Joly, P. (2017) Genetic Background of the Sickle Cell Disease
10 Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift beta-
11 Thalassemia Mutation [HBB: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]. *Hemoglobin*, **41**, 89-95.
- 12
13 Hellani, A., Al-Akoum, S. & Abu-Amero, K.K. (2009) G6PD Mediterranean S188F codon mutation is
14 common among Saudi sickle cell patients and increases the risk of stroke. *Genet Test Mol*
15 *Biomarkers*, **13**, 449-452.
- 16
17 Higgs, D.R., Aldridge, B.E., Lamb, J., Clegg, J.B., Weatherall, D.J., Hayes, R.J., Grandison, Y.,
18 Lowrie, Y., Mason, K.P., Serjeant, B.E. & Serjeant, G.R. (1982) The interaction of alpha-
19 thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med*, **306**, 1441-1446.
- 20
21 Hsu, L.L., Miller, S.T., Wright, E., Kutlar, A., McKie, V., Wang, W., Pegelow, C.H., Driscoll, C.,
22 Hurler, A., Woods, G., Elsas, L., Embury, S. & Adams, R.J. (2003) Alpha Thalassemia is
23 associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children
24 with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, **25**, 622-628.
- 25
26 Hu, J., Gao, J. & Li, J. (2018) Sex and age discrepancy of HbA1c and fetal hemoglobin determined by
27 HPLC in a large Chinese Han population. *J Diabetes*, **10**, 458-466.
- 28
29 Joly, P., Garnier, N., Kebaili, K., Renoux, C., Dony, A., Cheikh, N., Renard, C., Ceraulo, A., Cuzzubbo,
30 D., Pondarre, C., Martin, C., Pialoux, V., Francina, A., Bertrand, Y. & Connes, P. (2016a)
31 G6PD deficiency and absence of alpha-thalassemia increase the risk for cerebral
32 vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol*, **96**, 404-408.
- 33
34 Joly, P., Pondarre, C., Bardel, C., Francina, A. & Martin, C. (2011) The alpha-globin genotype does
35 not influence sickle cell disease severity in a retrospective cross-validation study of the
36 pediatric severity score. *Eur J Haematol*, **88**, 61-67.
- 37
38 Joly, P., Renoux, C., Lacan, P., Bertrand, Y., Cannas, G., Garnier, N., Cuzzubbo, D., Kebaili, K.,
39 Renard, C., Gauthier, A., Pialoux, V., Martin, C., Romana, M. & Connes, P. (2016b) UGT1A1
40 (TA)_n genotype is not the major risk factor of cholelithiasis in sickle cell disease children. *Eur*
41 *J Haematol*, **98**, 296-301.
- 42
43 Lemonne, N., Lamarre, Y., Romana, M., Mukisi-Mukaza, M., Hardy-Dessources, M.D., Tarer, V.,
44 Mouguel, D., Waltz, X., Tressieres, B., Lalanne-Mistrih, M.L., Etienne-Julan, M. & Connes,
45 P. (2013) Does increased red blood cell deformability raise the risk for osteonecrosis in sickle
46 cell anemia? *Blood*, **121**, 3054-3056.
- 47
48 Leonardo, F.C., Brugnerto, A.F., Domingos, I.F., Fertrin, K.Y., de Albuquerque, D.M., Bezerra,
49 M.A., Araujo, A.S., Saad, S.T., Costa, F.F., Menzel, S., Conran, N. & Thein, S.L. (2016)
50 Reduced rate of sickle-related complications in Brazilian patients carrying HbF-promoting
51 alleles at the BCL11A and HMIP-2 loci. *Br J Haematol*, **173**, 456-460.
- 52
53 Lettre, G., Sankaran, V.G., Bezerra, M.A., Araujo, A.S., Uda, M., Sanna, S., Cao, A., Schlessinger, D.,
54 Costa, F.F., Hirschhorn, J.N. & Orkin, S.H. (2008) DNA polymorphisms at the BCL11A,
55 HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in
56 sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11869-11874.
- 57
58 Makani, J., Menzel, S., Nkya, S., Cox, S.E., Drasar, E., Soka, D., Komba, A.N., Mgaya, J., Rooks, H.,
59 Vasavda, N., Fegan, G., Newton, C.R., Farrall, M. & Thein, S.L. (2011) Genetics of fetal
60 hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood*, **117**, 1390-1392.
- 61
62 Menzel, S., Garner, C., Gut, I., Matsuda, F., Yamaguchi, M., Heath, S., Foglio, M., Zelenika, D.,
63 Boland, A., Rooks, H., Best, S., Spector, T.D., Farrall, M., Lathrop, M. & Thein, S.L. (2007) A

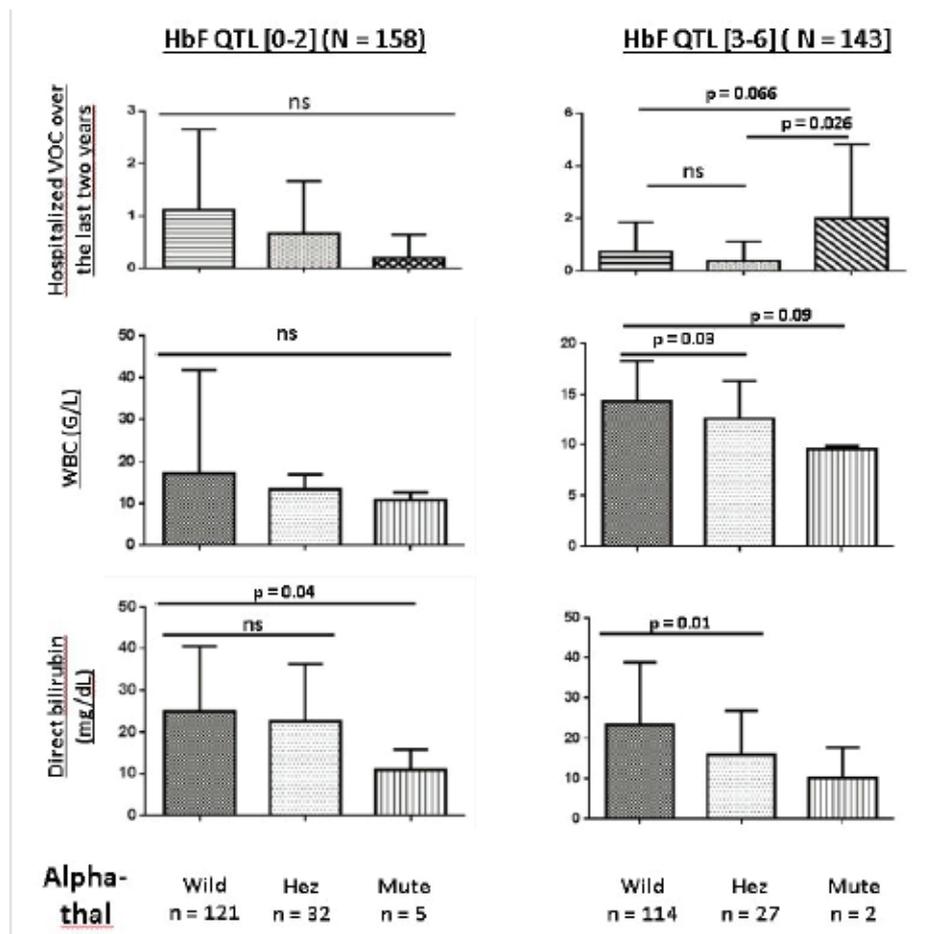
Figure 1:

Figure 1: Influence of the -3.7 Kb alpha-thalassemia deletion on clinical and biological parameters of children with SCA according to the number of HbF QTL. The number of HbF QTL represent the sum of mutated alleles for the three main HbF-inducing loci: *XmnI* on chromosome 11 (*rs7482144 C>T*), *BCL11A* on chromosome 2 (*tag-SNP: rs1427407 G>T*) and the *HBS1L-MYB* inter-genic region (*tag-SNP: rs28384513 A>C*).

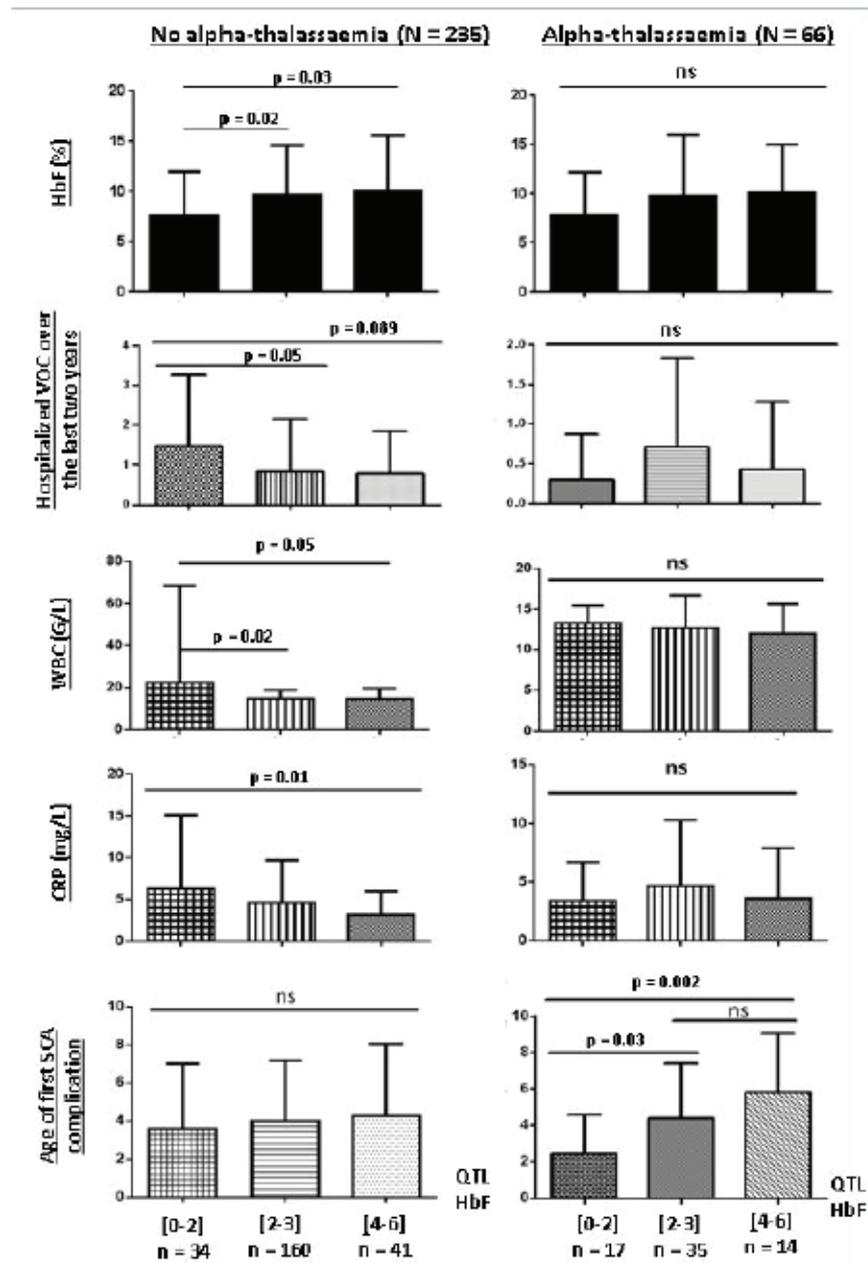


Figure 2: Influence of the HbF QTL group on clinical and biological parameters according to the alpha-thalassaemia status in children with SCA. Three HbF QTL groups are defined according to the number (0 to 6) of favorable alleles when considering the three main HbF-inducing loci: *Xmn1* on chromosome 11 (*rs7482144* C>T), *BCL11A* on chromosome 2 (*tag-SNP: rs1427407* G>T) and the *HBS1L-MYB* inter-genic region (*tag-SNP: rs28384513* A>C).

Table 1. Molecular characteristics of the SCD cohort (n = 301).

Genetic modifiers	Number of children (n)	Prevalence (%)	Allelic frequency or group
<i>G6PD genotypes</i>			
<i>Males (n=169)</i>			
A(-) wild	169	100	0
A(-) hemi	0	0	
Betica wild	149	88.2	0.12
Betica hemi	20	11.8	
<i>Females (n=132)</i>			
A(-) wild	125	94.7	
A(-) Hez	7	5.3	0.02
A(-) Mute	0	0	
Betica wild	107	81.1	
Betica Hez	18	13.6	0.12
Betica Mute	7	5.3	
<i>Alpha -3.7 Kb deletion</i>			
Wild	235	78.1	0.12
Hez	59	19.6	
Mute	7	2.3	
<i>XmnI (rs7482144 C>T)</i>			
Wild	27	9.0	
Hez	84	28.0	0.77
Mute	190	63.0	
<i>BCL11A (rs1427407 G>T)</i>			
Wild	158	52.5	
Hez	120	39.9	0.27
Mute	23	7.6	
<i>HSBIL-MYB (rs28384513 A>C)</i>			
Wild	197	65.4	
Hez	96	31.9	0.18
Mute	8	2.7	
<i>HbF QTL mutated alleles*</i>			
0	7	13.7	Group 0 (n = 51)
1	44	86.3	
2	107	54.9	Group 1 (n = 195)
3	88	45.1	
4	48	87.2	Group 2 (n = 55)
5	6	10.9	
6	1	1.9	

The Hardy-Weinberg equilibrium was checked by the Chi-square test.

Hez: heterozygous. Hemi: hemizygous. QTL: quantitative trait loci.

* for the 3 HbF QTL studied (*XmnI* + *BCL11A* + *HSBIL-MYB*). The population was subdivided into three groups depending on the number of HbF QTL.

Table III: Association between the modifiers genes and the clinical and biological parameters in the SCA cohort (n = 301 patients)

	HbF QTL score (range 0-6)			Alpha-globin genotype			C6PD genotype			p#
	Group A [0-1] [§] n = 51	Group B [2-3] n = 195	Group C [4-6] n = 55	Wild [§] n = 235	-3.7 Kb hez n = 59	-3.7 Kb hom n = 7	Wild [§] n = 249	Hez n = 25	Hom n = 27	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										
21										
22										
23										
24										
25										
26										
27										
28										
29										
30										
31										
32										
33										
34										
35										
36										
37										
38										
39										
40										
41										
42										
43										
44										
45										
46										

VOC: vaso-occlusive crises; Hb: total hemoglobin; WBC: white blood cells; AST: aspartate amino-transferase; LDH: lactate dehydrogenase; CRP: C-reactive protein.

#. ANOVA test between the three groups

§. reference group for post-hoc ANOVA tests: **. 0.01 < p < 0.05; ***: p < 0.01

hez: heterozygous; hom: homozygous

2.3 Résultats obtenus- Conclusion

En plus de l'article soumis, les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une communication lors d'un congrès international (Annexe 0). Les principaux résultats de cette étude montrent :

- **Des effets isolés des gènes modificateurs sur les paramètres cliniques et biologiques**

L'âge de la première complication avait tendance à être différent en fonction du groupe QTL HbF. Les patients avec 2 ou 3 (groupe B) ou avec 4 à 6 QTL HbF (groupe C) présentaient un nombre de leucocytes et un taux d'HbF significativement plus faibles que ceux avec 0 ou 1 QTL (groupe A). Le niveau de CRP était significativement inférieur dans le groupe C par rapport au groupe A. Les autres paramètres cliniques et biologiques n'étaient pas différents entre les trois groupes.

Ni l'âge de la première complication ni le nombre de CVO hospitalisées n'étaient affectés par le génotype alpha-globine. Les taux de bilirubine totale et directe étaient significativement réduits en présence de la délétion alpha-thalassémique -3,7 kb alors qu'une légère tendance à une augmentation du taux d'Hb était observée. Les autres paramètres biologiques n'étaient pas modulés par le génotype alpha-globine.

Ni l'âge de la première complication, ni le nombre de CVO hospitalisées ne sont affectés par le génotype G6PD. Comparés aux homozygotes sauvages, le taux d'HbF était significativement plus bas chez les patients présentant un déficit en G6PD homozygote ou hémizyote. Cependant, la sex-ratio était clairement déséquilibré dans ce groupe (20 hommes et 7 femmes) et il est bien connu que les femmes expriment généralement des taux d'HbF supérieurs à ceux des hommes (597).

- **Des Effets combinés de l'alpha-thalassémie et des QTLs de l'HbF**

L'alpha-thalassémie homozygote était associée à des CVO hospitalisées plus fréquentes que le type sauvage uniquement chez les patients dont le score des QTLs de l'HbF variait de 3 à 6. Dans ce sous-groupe, les patients avec un génotype normal d'alpha-globine présentaient des taux significativement plus élevés de leucocytes et de bilirubine directe par rapport aux patients hétérozygotes. À l'inverse, lorsque le score des QTLs de l'HbF QTL variait de 0 à 2, l'alpha-thalassémie n'influait pas le nombre de leucocytes,

alors que le niveau de bilirubine directe était inférieur pour les patients homozygotes seulement. Les effets de l'alpha-thalassémie sur les autres paramètres cliniques et biologiques ne dépendaient pas du score de QTLs de l'HbF.

L'âge de la première complication augmentait significativement avec le nombre de QTL HbF en présence d'alpha-thalassémie uniquement. Dans le sous-groupe de patients sans alpha-thalassémie, un score élevé de QTLs de l'HbF était associé à des CVO hospitalisées moins fréquentes, à des taux d'HbF plus élevés et à des leucocytes et des taux de CRP plus faibles. Ces effets n'ont pas été observés chez les patients atteints d'alpha-thalassémie. Les effets des HbT QTL sur les autres paramètres biologiques ne dépendaient pas du génotype de l'alpha-globine.

En conclusion, cette étude apporte des informations importantes sur les effets modificateurs de l'alpha-thalassémie et des QTLs de l'HbF sur la sévérité clinique de la drépanocytose. Cela démontre que ces deux modificateurs génétiques communs sont interdépendants et ne doivent pas être étudiés séparément pour une prédiction clinique précise. Par exemple, une combinaison d'alpha-thalassémie avec au moins 2 QTLs de l'HbF est nécessaire pour retarder de manière significative la première complication de la maladie. Cependant, une alpha-thalassémie homozygote associée à 3 à 6 QTLs de l'HbF favoriserait l'apparition de CVO plus tardivement. Par conséquent, une alpha-thalassémie hétérozygote avec au moins deux QTL HbF sur deux locus génétiques différents constituerait le génotype le plus approprié pour limiter le risque de CVO.

Ces gènes modificateurs ayant un effet sur les CVO, cet effet pouvait passer entre autres par une influence sur le stress oxydant. En effet, comme nous l'avons déjà vu, le stress oxydant joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la drépanocytose, en l'occurrence la survenue des crises vaso-occlusives. C'est ainsi qu'une troisième étude a été entreprise pour évaluer les inter-relations entre le stress oxydant systémique, ces principaux gènes modificateurs et la sévérité clinique de la drépanocytose.

Etude 3 : Relations entre stress oxydant, principaux gènes modificateurs de la drépanocytose et sévérité clinique de la maladie.

3.1 Contexte scientifique de l'étude

Le stress oxydant joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la drépanocytose (7, 396, 598, 599). Bien que les résultats de toutes les études sur les produits du stress oxydant (MDA, AOPP) montrent un stress oxydatif élevé dans cette maladie, celles portant sur les activités des enzymes pro- et anti-oxydantes sont le plus souvent contradictoires, que les mesures soient faites dans le plasma ou au niveau intra-érythrocytaire (134, 382, 404, 418). Une revue relativement exhaustive de la littérature effectuée en Annexe 0 illustre parfaitement ce phénomène : quand on compare dans chaque étude les résultats par rapport aux témoins AA, les patients drépanocytaires ont pour chaque enzyme tantôt des activités élevées, tantôt des activités diminuées.

Nous avons confirmé dans notre seconde étude que les gènes modificateurs influent sur la sévérité clinique de la drépanocytose. Mais il y a très peu d'études dans la littérature (134) qui ont porté sur l'influence de ces gènes modificateurs habituels (alpha-thalassémie, G6PD et QTLs HbF) sur les niveaux plasmatiques des produits et enzymes du stress oxydant. De la même façon, très peu d'études ont étudié les liens entre ces produits et enzymes du stress oxydant et la sévérité clinique de la drépanocytose (134, 382). L'alpha – thalassémie peut moduler le taux d'HbS et comme l'HbS a un taux d'oxydation élevé, nous pouvons penser que l'alpha-thalassémie pourrait moduler le niveau du stress oxydatif. Malgré que des études aient rapporté que le déficit en G6PD serait associé à une augmentation du stress oxydant systémique dans la population générale (600, 601), le corollaire reste encore flou chez les patients atteints drépanocytose. Il a été rapporté que l'augmentation du taux d'HbF entraînerait une diminution de la peroxydation lipidique et de l'inflammation chez les patients atteints de drépanocytose (602). De plus, une diminution du taux d'HbF et de sa capacité antioxydante ont été associées à la pathogenèse de la drépanocytose (382). La variation des taux d'HbF étant liées aux QTLs de l'HbF (Xmnl, HMIP, BCL11A) (229, 230), nous pouvons penser que ces QTLs moduleraient également le niveau du stress oxydatif.

La 3ème étude de notre thèse visait donc à adresser ces deux points au sein de notre population pédiatrique drépanocytaire non traitée à l'hydroxyurée et n'ayant pas bénéficié d'un dépistage néonatal (évolution naturelle de la maladie). Cette absence de traitement à l'hydroxyurée est très importante car elle nous permettra de tester l'effet de la maladie et des différents modulateurs génétiques sur le stress oxydant en dehors de toute prise d'hydroxyurée. En effet, les quelques études publiées dans ce champ ont été effectuées sur des populations de patients atteints de drépanocytose traités à l'hydroxyurée qui modulerait le niveau de stress oxydant (250, 603, 604).

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Données cliniques de la cohorte

Nous avons travaillé sur la même cohorte que pour les études précédentes (n = 301 enfants). Les critères d'inclusion et les paramètres cliniques recensés (âge de la première complication, nombre de CVO hospitalisées sur 2 ans, nombre d'hospitalisations sur 2 ans) ont été les mêmes. Trois critères cliniques ont été étudiés pour lesquels les patients ont été classés comme suit :

- ✓ Age de la première complication inférieur à 3 ans (146 enfants) ;
Age de la première complication supérieur à 3 ans (155 enfants)
- ✓ Absence d'hospitalisations (-) au cours des 2 dernières années (165 enfants) ;
Nombre d'hospitalisations (+) au cours des 2 dernières années (136 enfants)
- ✓ Absence de CVO hospitalisées (-) au cours des 2 dernières années (176 enfants) ;
Nombre de CVO hospitalisées (+) au cours des 2 dernières années (125 enfants)

Vingt-cinq personnes du phénotype AA ont également été recrutées en tant que témoins pour la détermination des niveaux plasmatiques des marqueurs et enzymes du stress oxydant.

3.2.2 Alpha-thalassémie, QTLs de l'HbF et statut en G6PD

Les techniques de génotypage utilisés pour la recherche des 5 délétions alpha-thalassémiques (-3.7 kB, -4.2 kB, -20.5 kB, SEA, MED) ainsi que la recherche des deux variants les plus fréquents du déficit en G6PD en Afrique (A (-) et Betica) sont les mêmes que celles décrites dans les études 1 et 2 (Gap Pcr Multiplex pour les délétions alpha-thalassémiques et HRM pour le génotypage G6PD). Il en est de même pour le génotypage des QTLs de l'HbF. En effet, les techniques de génotypage des différents SNPs qui composent

les QTLs de l'HbF (rs1427407 G> T du gène BCL11A, rs28384513 A> C dans la région HMIP et le polymorphisme *Xmnl* rs7482144 C>T dans le promoteur du gène de la bêta-globine) sont également décrites dans ces deux études. Les patients ont été répartis en trois groupes en fonction du nombre de QTL HbF : groupe A pour 0 ou 1 QTL, groupe B pour 2 ou 3 QTL et groupe C pour 4 QTL HbF ou plus.

3.2.3 Dosage des marqueurs du stress oxydant

Le sang a été recueilli dans des tubes vacutainer contenant de l'EDTA. Les échantillons de sang ont ensuite été immédiatement centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 min pour obtenir le plasma. Les échantillons plasmatiques ainsi collectés ont ensuite été stockés à -80 ° C jusqu'à l'analyse. Les produits du stress oxydant étudiés ont été le malondialdéhyde (MDA) et les produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP) ; les enzymes pro-oxydantes étudiées ont été la xanthine oxydase (XO) et la myéloperoxydase (MPO) tandis que les enzymes anti-oxydantes étudiées ont été la catalase (CAT), la Glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD).

AOPP (µmol/L) : les produits avancés de l'oxydation des protéines ont été mesurés selon la méthode semi-automatisée développée par Witko-Sarsat et al. (581) et décrite dans le chapitre 3 (*Chapitre 3 : Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant ; 3.1 Produits avancés de l'oxydation des protéines (AOPP, Advanced Oxidation Protein Products)*).

MDA (µmol/L) : Le dosage du MDA est réalisé par une méthode spectrophotométrie : la méthode d'Ohkawa (582) qui utilise l'acide thiobarbiturique (TBA) (*Chapitre 3: Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant ; 3.2 Malondialdéhyde (MDA)*);

Activité catalase : l'activité catalase a été mesurée par la méthode décrite par Johansson et Borg (586) (*Chapitre 3: Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant ; 3.3 Catalase*).

Activité glutathion Peroxydase (GPx) : c'est la méthode de Paglia et Valentine qui a été utilisée pour la détermination de GPx (587) (*Chapitre 3: Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant ; 3.4 Glutathion Peroxydase (GPx)*).

Activité superoxyde dismutase (SOD) : le protocole de mesure a été mis au point d'après la méthode de Beauchamp et Fridovich (588), modifiée par Oberley (589) (*Chapitre*

3: Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant; 3.5 Superoxyde Dismutase (SOD).

Activité de la xanthine oxydase (XO): la détection de la xanthine oxydase fait partie d'une série de tests « déshydrogénases » récemment mis au point (590). (*Chapitre 3 : Méthodes de dosages biochimiques des paramètres du stress-oxydant ; 3.6 xanthine oxydase*).

Activité de la myéloperoxidase (MPO): la méthode est un immunodosage enzymatique indirect semi-quantitatif utilisant des anticorps anti-MPO humains stabilisés (MPO, Human, clone 266-6K1, HM2164, HycultBiotech). Le complexe MPO / anti-MPO est détecté par spectrophotométrie par ajout d'une solution 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB, Sigma) avec H₂O₂ comme substrat chromogène.

L'activité de toutes ces enzymes est exprimée en $\mu\text{mol/mL/min}$.

3.2.4 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le seuil de significativité a été défini à $p < 0,05$. Les variables continues ont été rapportées sous forme de moyenne \pm écart type (SD) et les variables qualitatives sous forme de nombre (N). L'étude des marqueurs du stress oxydant avec les trois gènes modificateurs étudiés a été faite à l'aide des tests ANOVA et post-hoc ANOVA LSD. L'étude d'association entre les marqueurs du stress oxydatif et les paramètres cliniques qualitatifs et quantitatifs a été respectivement réalisée grâce aux tests de χ^2 et de Student. Le test t de Student a également été utilisé pour les variables quantitatives normalement distribuées entre les groupes AA et SS pour la comparaison des valeurs plasmatiques des produits et enzymes du stress oxydant.

3.2 Résultats

3.3.1 Marqueurs du stress oxydatif chez les drépanocytaires et les témoins AA

Les résultats des dosages sont présentés dans le tableau I :

Tableau I. Statut pro-oxydant et antioxydant plasmatique chez les enfants drépanocytaires et les témoins AA

Marqueurs	SS (N = 301)	AA (N = 25)	*p
AOPP (µmol/L)	50.1 ± 16.2	19.8 ± 15.3	< 0.001
MDA (µmol/L)	37.8 ± 13.1	11.3 ± 9.3	< 0.001
XO, µmol/mL/min	0.80 ± 0.1	0.91 ± 0.2	0.01
MPO, µmol/mL/min	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5	0.7
Catalase, µmol/mL/min	4.5 ± 2.2	2.8 ± 1.8	< 0.001
GPx, µmol/mL/min	48.1 ± 36.8	70.1 ± 14.0	< 0.001
SOD, µmol/mL/min	10.4 ± 3.3	11.8 ± 3.5	0.04

AOPP, advanced oxidation protein products ; MDA, malondialdéhyde ; XO, xanthine oxydase ; MPO, myéloperoxidase ; GPx, glutathion peroxidase ; SOD, superoxide dismutase ; N, nombre de patients. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart type. * Différence significative si $p < 0.05$.

Les enfants SS présentaient des concentrations plasmatiques significativement plus élevées de MDA et d'AOPP par rapport aux témoins AA. L'activité de XO était significativement inférieure chez les patients SS par rapport au groupe témoin. En revanche, l'activité de la MPO sérique n'était pas significativement différente ($p = 0.7$) entre les deux groupes. Concernant les enzymes antioxydantes, les activités de GPx sérique et de SOD sérique étaient significativement inférieures chez les enfants SS par rapport aux témoins AA. L'inverse était observé avec la catalase.

3.3.2 Influence des modulateurs génétiques sur les marqueurs du stress oxydant

Les effets de l'alpha-thalassémie sur les concentrations et les activités plasmatiques des produits et enzymes du stress oxydant chez les enfants SS sont représentés sur la figure 1. La concentration de MDA était significativement plus faible chez les patients ayant la

délétion -3.7 Kb (33.1 ± 8.7 pour les homozygotes et 34.2 ± 8.2 pour les hétérozygotes) par rapport aux homozygotes sauvages (38.7 ± 14.1), sans qu'une différence ne soit observée entre les hétérozygotes et les homozygotes mutés. Il en est de même pour la MPO dont l'activité était également plus réduite chez les patients ayant la délétion de -3.7 Kb (0.10 ± 0.8 pour les homozygotes et 0.38 ± 0.42 pour les hétérozygotes) par rapport aux homozygotes sauvages (0.68 ± 0.78).

En revanche, les activités des enzymes antioxydantes ainsi que les concentrations d'AOPP n'étaient pas significativement différentes entre les différents génotypes alpha, à l'exception toutefois de la catalase dont l'activité a tendance ($p < 0.10$) à être réduite chez les patients hétérozygotes pour la délétion -3.7Kb par rapport aux homozygotes sauvages.

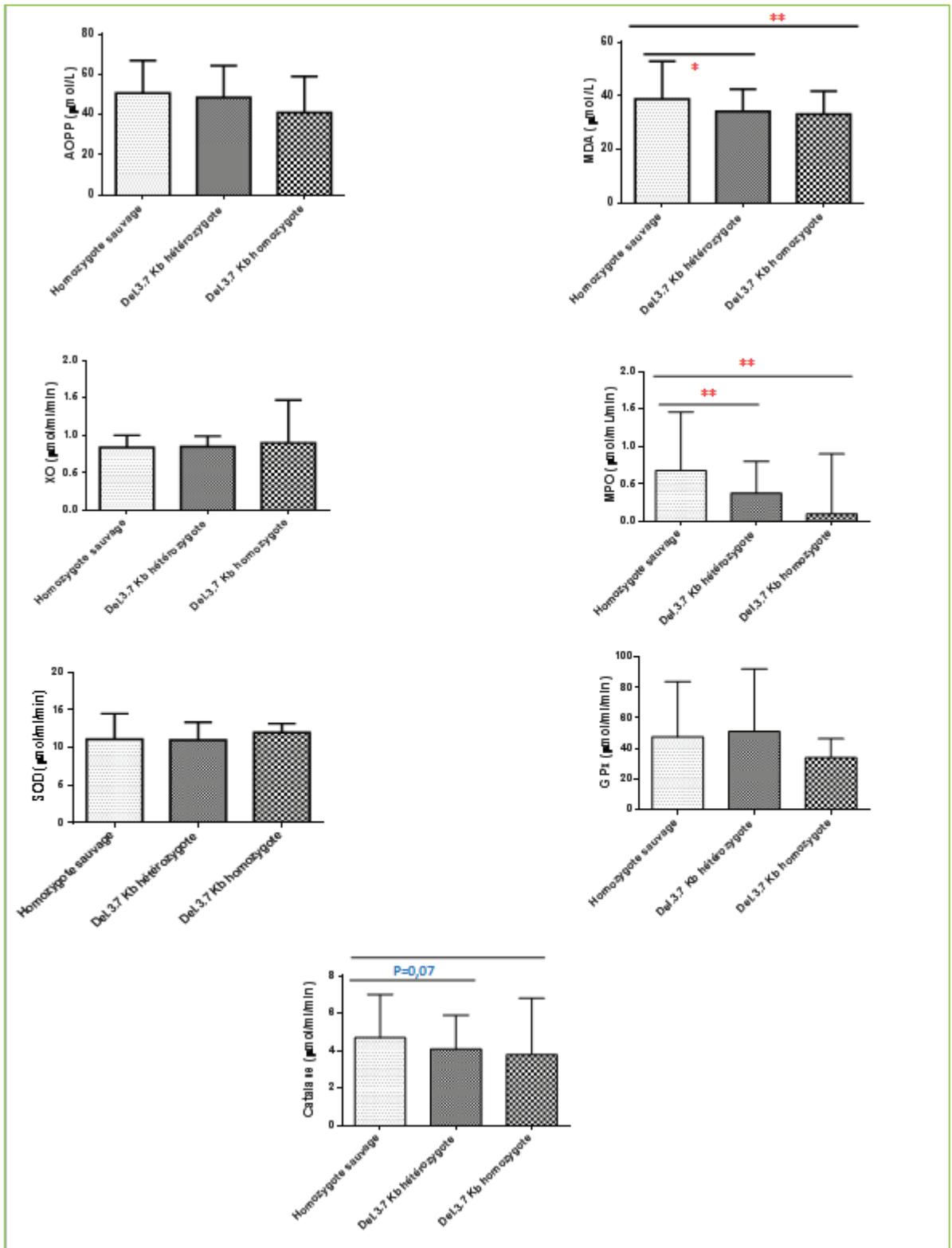


Figure 1. Marqueurs plasmatiques du stress oxydant chez les enfants drépanocytaires en fonction de leur statut alpha-thalassémique. AOPP, advanced oxidation protein products ; MDA, malondialdéhyde ; XO, xanthine oxydase ; MPO, myéloperoxidase ; GPx, glutathion peroxidase ; SOD, superoxide ismutase. ***: $p < 0.005$, **: $0.01 < p < 0.05$.

Aucun lien n'a été observé entre d'un côté les mutations G6PD ou les QTL de l'HbF et de l'autre les concentrations et activités plasmatiques des produits et enzymes du stress oxydant (Tableau III).

Tableau III. Relation entre les QTLs de l'HbF et le génotype G6PD avec les marqueurs du stress oxydatif

	QTLs de l'HbF (0-6)			p	Génotype G6PD			p
	Group [§] 0 [0-1] n = 51	Group 1 [2-3] n = 195	Group 2 [4-6] n = 55		Wild [§] n = 249	Hez n = 25	Mute n = 27	
<u>Marqueurs du stress oxydatif</u>								
<u>Pro-oxydants</u>								
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	48.4 \pm 15.9	50.8 \pm 16.8	49.4 \pm 14.2	0.58	50.2 \pm 16.2	48.7 \pm 16.6	50.3 \pm 15.8	0.89
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	36.7 \pm 8.3	37.8 \pm 9.9	38.2 \pm 23.2	0.82	37.9 \pm 14.1	36.8 \pm 6.6	37.3 \pm 6.5	0.90
XO ($\mu\text{mol/mL/min}$)	0.84 \pm 0.16	0.86 \pm 0.16	0.84 \pm 0.16	0.87	0.84 \pm 0.16	0.86 \pm 0.16	0.84 \pm 0.10	0.83
MPO ($\mu\text{mol/mL/min}$)	0.6 \pm 0.7	0.6 \pm 0.9	0.5 \pm 0.5	0.76	0.6 \pm 0.7	0.5 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5	0.50
<u>Anti-oxydants</u>								
Catalase ($\mu\text{mol/mL/min}$)	4.2 \pm 1.2	4.7 \pm 2.3	4.3 \pm 2.0	0.22	4.6 \pm 2.2	3.8 \pm 1.7	4.6 \pm 1.8	0.24
GPx ($\mu\text{mol/mL/min}$)	46.6 \pm 34.4	49.3 \pm 38.0	45.5 \pm 35.5	0.75	48.3 \pm 37.0	53.9 \pm 38.3	40.8 \pm 32.0	0.42
SOD ($\mu\text{mol/mL/min}$)	11.1 \pm 2.6	11.1 \pm 3.3	11.3 \pm 3.4	0.73	10.3 \pm 3.26	10.8 \pm 3.1	11.5 \pm 3.4	0.31

§ : groupe de référence pour les tests ANOVA post-hoc. AOPP, advanced oxidation protein products; MDA, malondialdéhyde; XO, xanthine oxydase; MPO, myéloperoxidase; GPx, glutathion peroxidase; SOD, superoxide dismutase ; n, nombre de patients. Les valeurs sont exprimées en moyenne avec écart type.

3.3.3 Influence des marqueurs du stress oxydant sur l'expression clinique de la drépanocytose.

Seules certaines activités d'enzymes anti-oxydantes semblent être liées aux paramètres cliniques quantitatifs étudiés (Figure 2).

En effet, les enfants qui ont eu leur première complication assez précocement (< 3 ans) avaient des activités sériques SOD (11.0 \pm 9.7 $\mu\text{mol/mL/min}$) et catalase (5.0 \pm 2.5 $\mu\text{mol/mL/min}$) significativement augmentées (p = 0.001 pour SOD et 0.002 pour catalase) par rapport à ceux qui ont présenté leur première complication après 3 ans.

Par ailleurs, les enfants qui n'ont jamais été hospitalisés sur les deux dernières années ont présentent une activité sérique GPx significativement plus élevée par rapport à ceux qui l'ont été au moins une fois ($54.0 \pm 35.6 \mu\text{mol/mL/min}$ versus $40.9 \pm 37.0 \mu\text{mol/mL/min}$). De même, les enfants n'ayant fait aucune CVO sur les deux dernières années ont une activité GPx augmentée par rapport aux autres ($52.4 \pm \pm 35.2 \mu\text{mol/mL/min}$ versus $42.0 \pm 38.1 \mu\text{mol/mL/min}$).

En revanche, les produits du stress oxydant (AOPP et MDA) et les activités des enzymes pro-oxydantes ne diffèrent pas significativement en fonction des critères cliniques choisis (Tableau IV).

Tableau IV. Relation entre des paramètres cliniques quantitatifs et les marqueurs systémiques du stress oxydant.

	Age de la première complication (années)		Hospitalisations/2 ans		CVO hospitalisées/2 years (n)	
	<3ans n=146	> 3ans n=155	Hospitalisations (-) n = 165	Hospitalisations (+) n = 136	CVO (-) n= 176	CVO (+) n=125
	p	p	p	p	p	p
AOPP (µmol/L)	48.8 ± 16.2	51.4 ± 16.2	49.5 ± 16.2	51.0 ± 16.2	49.6 ± 16.3	51.4 ± 16.1
MDA (µmol/L)	38.2 ± 15.6	37.3 ± 10.2	38.3 ± 14.4	37.0 ± 11.2	38.2 ± 14.2	37.2 ± 11.4
XO (µmol/mL/min)	0.84 ± 0.15	0.85 ± 0.16	0.85 ± 0.16	0.84 ± 0.16	0.84 ± 0.16	0.84 ± 0.16
MPO (µmol/mL/min)	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.7	0.6 ± 0.7

AOPP, advanced oxidation protein products; MDA, malondialdéhyde; XO, xanthine oxydase; MPO, myéloperoxidase; n, nombre de patients. Les valeurs sont exprimées en moyenne avec écart type.

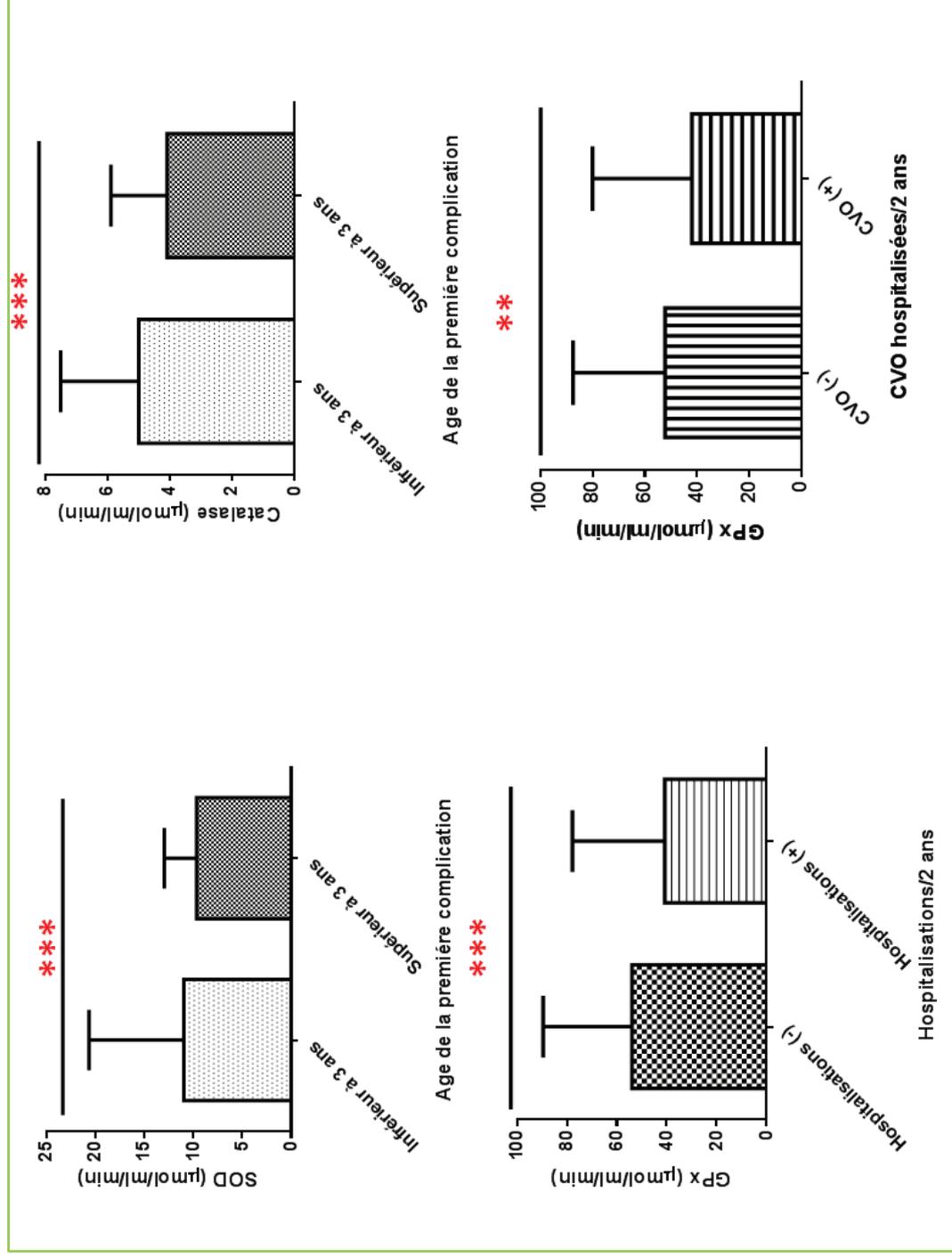


Figure 2. Association entre des marqueurs systémiques du stress oxydant sur certains les paramètres cliniques de la drépanocytose. GPx, glutathion peroxidase ; SOD, superoxide dismutase. ***p<0.005, **: 0.01 < p < 0.05.

3.4 Discussion

Dans notre étude, les patients SS présentaient des concentrations plasmatiques de MDA et d'AOPP significativement plus élevées par rapport à notre groupe de témoins AA. Ceci corrobore tout à fait les études antérieures puisque toutes celles qui ont porté sur le dosage de ces deux produits du stress oxydant, dans les érythrocytes (392, 426, 605) comme dans le plasma (250, 374, 391, 404, 427, 606), ont rapporté une augmentation significative de leurs concentrations chez les patients atteints de drépanocytose. Les ROS, générées en premier lieu par l'auto-oxydation de l'HbS, attaquent directement la membrane des érythrocytes conduisant ainsi à une hémolyse via des altérations des protéines et à des modifications de la chaîne latérale des acides aminés et de la structure des lipides (607). MDA et AOPP reflètent respectivement la lipidopéroxydation et l'oxydation des protéines et leur production excessive pourrait jouer un rôle important dans la physiopathologie des complications chroniques ou aiguës de la drépanocytose (608).

Nous avons en revanche observé une diminution de l'activité XO plasmatique chez les patients SS par rapport à nos témoins AA, ce qui pourrait sembler paradoxal pour une enzyme pro-oxydante (la xanthine oxydase catalyse la génération de radical superoxyde à partir d'hypoxanthine). Nos résultats sont néanmoins en accord avec ceux de Castilhos *et al.* (404) et d'Adelakun *et al.* (609) qui ont respectivement rapporté des activités XO plus faibles ou identiques entre des enfants SS et des témoins AA. Il a été démontré que la production de XO était considérablement accrue chez les souris transgéniques drépanocytaires après une hypoxie (297) et que les patients SS étaient plus sujets aux lésions d'hypoxie-réoxygénation (286, 297). Comme nos patients ont été prélevés à l'état stationnaire (donc pas en condition d'hypoxie), nos résultats suggèrent que la XO pourrait ne pas participer au stress-oxydant à l'état basal.

Les choses sont également complexes en ce qui concerne l'activité plasmatique de la MPO dans la drépanocytose. Dans notre étude, cette activité s'est révélée semblable entre les SS et AA ($p > 0.05$). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Castilhos *et al.* (404) et d'Adelakun *et al.* (609) qui sont eux-mêmes contradictoires entre eux : en effet, les premiers ont rapporté une activité sérique de la MPO plus élevée chez les patients SS par rapport aux témoins AA alors que les seconds ont trouvé exactement l'inverse (Annexe 0). Cette différence inter-groupes pourrait être due aux techniques de dosages utilisées. En effet, il existe de nombreuses techniques pour le dosage de l'activité de la MPO, mais la

plupart souffrent d'un manque de spécificité et d'uniformité (610). De plus, l'activité enzymatique de la MPO peut varier considérablement d'un individu à un autre (611). Ceci est encore compliqué par le fait que la plupart des substrats disponibles (par exemple, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), orto-dianisidine, guaiacol) sont des substrats généraux de la peroxydase, d'où un fort risque de manque de spécificité (dosage des peroxydases totales et non pas de la MPO). Enfin, les inhibiteurs tissulaires de la MPO peuvent interférer avec les tests (612), de même que la myoglobine et l'hémoglobine (613). C'est pour limiter au maximum tous ces biais techniques que nous avons utilisé une méthode dont la spécificité est assurée par un anticorps anti-MPO et qui est, d'après les auteurs, la méthode standard pour mesurer l'activité de la MPO dans les échantillons biologiques (610). L'absence d'augmentation d'activité plasmatique de MPO chez les patients SS par rapport aux AA pourrait également signifier que cette enzyme, tout comme XO, ne participe pas au stress-oxydant 'chronique' dans la drépanocytose. En effet, nos patients ont été prélevés en phase stationnaire, sans infection intercurrente susceptible d'activer les polynucléaires neutrophiles et la libération de la MPO. Sachant que les patients atteints de drépanocytose présentent classiquement une hyperleucocytose, leur activité MPO rapportée au nombre de globules blancs devient même inférieure à celle des témoins AA, ce qui pourrait participer à leur susceptibilité aux infections causées par des agents pathogènes intracellulaires. En effet, il a été rapporté que, dans la drépanocytose, les neutrophiles déficients en myéloperoxydase ne convertissaient pas le H_2O_2 en HOCl. La destruction par les neutrophiles des organismes ingérés s'en trouve ainsi réduite (609). Ce déficit relatif en MPO dans la drépanocytose pourrait être dû au fait que la disponibilité de son substrat soit réduite puisque le peroxyde d'hydrogène est aussi le substrat de la catalase et de la GPx.

Comme évoqué en introduction, les activités des enzymes anti-oxydantes mesurées dans la drépanocytose sont souvent contradictoires d'une étude à l'autre, que ce soit dans les érythrocytes ou dans le plasma. Même en se limitant aux cinq articles recensés dans la littérature qui ont travaillé sur le même type de population (pédiatrique) et dans le même milieu biologique (plasma) que nous, les résultats apparaissent éminemment variables. Pour la catalase, certains auteurs observent comme nous une activité accrue (404) chez les patients drépanocytaires tandis que d'autres font état d'une diminution (427). D'autres, enfin, n'ont pas trouvé de différence significative de l'activité catalase entre les patients SS et les témoins AA (250, 391, 609). Les données sur l'activité de la SOD dans la drépanocytose sont

très hétérogènes entre ces différentes études. En effet, dans notre étude, nous avons observé une activité SOD diminuée chez les patients SS par rapport aux témoins AA, tout comme Biswal *et al.* (427), alors que Renoux *et al.* (250) et Möckresch *et al.* (391) ont observé le contraire. Adalakun (609), quant à lui, n'a pas montré une différence significative entre les patients SS et les témoins AA. Comme pour SOD, l'activité GPx est également diminuée chez nos patients SS ainsi que chez ceux de Biswal *et al.* (427) et Renoux *et al.* (250). En revanche, deux autres études (391, 609) n'ont pas retrouvé de différence significative entre les patients SS et les témoins AA.

Les niveaux d'activité des enzymes anti-oxydantes chez le patient drépanocytaire peuvent être schématiquement représentés comme la « somme algébrique » de deux mécanismes antagonistes : surconsommation des enzymes par les nombreux ROS produits versus synthèse réactionnelle excessive de ces mêmes enzymes médiée par l'activation de facteurs de transcription spécifiques (tels Nrf2) en réponse au stress oxydant chronique. Les différences observées d'une cohorte de patients à l'autre pourraient ainsi être le fait de facteurs environnementaux ou génétiques qui favoriseraient plus ou moins ces deux phénomènes. Dans notre cohorte, deux enzymes anti-oxydantes (GPx et SOD) sur trois sont diminuées chez les SS par rapport aux AA, ce qui semble plutôt en faveur d'une consommation excessive non compensée. En revanche, la catalase pourrait être une enzyme plus inductible que les deux autres (du moins dans un contexte de drépanocytose), ce qui expliquerait que son activité se retrouve augmentée ou semblable par rapport aux AA dans la grande majorité des études. La catalase est une enzyme antioxydante qui facilite l'élimination du peroxyde d'hydrogène toxique en catalysant sa décomposition en oxygène moléculaire et en eau, sans production de radicaux libres (614).

Notre étude est la seconde, après celle de Renoux *et al.* (250), à avoir étudié l'influence potentielle des principaux gènes modificateurs de la drépanocytose sur les marqueurs et enzymes du stress oxydant. Par rapport à cette étude, notre travail bénéficie d'une cohorte beaucoup plus grande (n = 301 versus 62 patients) et non traitée à l'hydroxyurée même pour les cas les plus graves, ce qui renforce la validité biologique des résultats. Nous avons ainsi confirmé leur résultat principal, à savoir que les sujets drépanocytaires alpha-thalassémiques avaient une concentration de MDA réduite par rapport aux autres, reflet d'un stress oxydant moindre. L'alpha-thalassémie diminue en effet le pourcentage de la concentration de l'HbS intra-érythrocytaire (249, 615), réduisant ainsi les cycles d'auto-oxydation, d'hémolyse, de polymérisation / dépolymérisation de l'HbS et

les événements d'ischémie / reperfusion. Ces phénomènes étant connus pour augmenter la production de ROS, il est tout à fait logique que les patients drépanocytaires alpha-thalassémiques présentent un stress oxydant réduit par rapport aux autres. La diminution parallèle de l'activité de la MPO chez ces mêmes patients pourrait refléter une diminution de la synthèse et de l'activation leucocytaire, conséquence directe de la moindre production de ROS. Notre étude est la première à mettre en évidence ce phénomène qui nécessiterait confirmation sur une cohorte indépendante.

Tout comme Renoux *et al.* (250), nous n'avons pas retrouvé de différence significative au niveau des marqueurs du stress oxydant entre les patients porteurs d'un déficit en G6PD et les autres. Au vu de notre effectif important, nos résultats confirment que le déficit en G6PD n'augmente pas le stress oxydatif systémique dans la drépanocytose. Par conséquent, et contrairement aux idées reçues, le déficit en G6PD ne favoriserait pas la vasculopathie cérébrale du patient drépanocytaire via une augmentation relative de la production de radicaux libres mais via un autre mécanisme physiopathologique qu'il conviendra de déterminer. En ce qui concerne les QTLs de l'HbF, aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes, quel que soit le marqueur du stress-oxydant considéré. Nos résultats corroborent ceux de Rusonava *et al.* (382) qui n'avaient pas observé de lien significatif entre les taux d'HbF et les activités enzymatiques de la GPx et de la SOD, de même qu'entre l'activité GPx et les différents haplotypes drépanocytaire (Bénin, Sénégal ou Arabo-Indien et Bantou). Ce résultat pourrait paraître au premier abord un peu surprenant, car l'HbF améliore l'état clinique des patients atteints de drépanocytose. Mais il pourrait s'expliquer par le fait que les populations étudiées étaient des cohortes pédiatriques. Il serait ainsi intéressant de voir si les mêmes résultats sont obtenus chez des patients drépanocytaires adultes, a priori plus concernés par les complications tardives induites par le stress oxydant.

Notre étude est également une des premières à montrer une association entre les marqueurs cliniques habituels de la drépanocytose et l'activité de certaines enzymes du stress oxydatif. Tout d'abord, les enfants qui n'ont jamais été hospitalisés ou qui n'ont jamais fait de CVO sur les deux dernières années de suivi, sont ceux qui présentent une activité de la GPX plus élevée, liée peut-être à une concentration de base plus importante de la protéine (liée peut-être à des facteurs génétiques) chez ces enfants et facilement mobilisable en cas de stress oxydant. Dans le même ordre d'idée, Rusonava *et al.* avaient également observé que les patients avec un phénotype moins sévère de la maladie avaient une activité SOD plus

élevée (382). De façon parallèle, l'âge de la première complication semble être associé à la réponse anti-oxydante puisque l'activité de la catalase et de la SOD apparaît plus élevée chez les enfants drépanocytaires qui ont présenté leur première complication précocement (avant l'âge de 3 ans). Ceci pourrait sembler contradictoire avec l'observation précédente mais il ne faut pas oublier que les dosages de stress-oxydant dans notre étude ont été effectués à un âge moyen de 9 ans et non au moment de la première complication. Cette augmentation de ces deux enzymes antioxydantes pourrait donc être réactionnelle et concerner majoritairement les enfants drépanocytaires présentant les phénotypes les plus sévères, c'est-à-dire ceux pour qui les premières complications apparaissent très tôt.

3.5 Conclusion

Nos résultats confirment la présence d'un stress oxydatif accru chez les patients atteints de drépanocytose, pouvant expliquer, au moins en partie, les manifestations cliniques de ces patients. Ceci malgré une tentative de compensation par les marqueurs antioxydants, qui sont des facteurs contribuant à l'homéostasie rédox cellulaire. De plus, nos résultats montrent que l'alpha-thalassémie semble diminuer le stress oxydatif chez les patients atteints de drépanocytose et pourrait constituer une explication possible du rôle protecteur de l'alpha-thalassémie sur certaines complications du sous-phénotype hémolytique. De plus, les patients qui ont eu moins d'hospitalisations ou moins de CVO semblent présenter une meilleure défense antioxydante. La jeunesse de notre cohorte peut être un facteur limitant pour mieux apprécier le statut oxydant. Il serait donc intéressant de ré-évaluer ce statut oxydant dans 3 à 5 ans pour mieux confirmer ces résultats.

L'importance du stress oxydant dans la drépanocytose pourrait être liée à certains polymorphismes des gènes impliqués dans ce stress oxydant. D'où l'objet de notre quatrième étude qui porte sur l'évaluation de l'effet de certains polymorphismes des gènes du stress oxydatif sur l'expression clinique de la maladie.

Etude 4 : Evaluation des effets de certains polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant sur l'expression clinique et biologique de la drépanocytose.

4.1 Contexte scientifique de l'étude.

L'étude 3 nous a permis de présenter le profil biochimique des patients atteints de drépanocytose relativement aux marqueurs systémiques du stress-oxydant (AOPP et MDA) et aux activités des enzymes pro- et anti-oxydantes (XO, MPO versus GPx, catalase et SOD, respectivement). L'effet des gènes modificateurs habituels de drépanocytose sur ces paramètres a été étudié. En revanche, nous ne nous sommes pas encore intéressés aux effets potentiels de mutations ou polymorphismes sur les gènes codant ces enzymes pro- ou anti-oxydantes. En effet, certaines mutations ou polymorphismes de ces gènes du stress oxydant pourraient influencer sur la synthèse de la protéine correspondante tout en augmentant ou en diminuant son activité enzymatique.

L'étude 3 nous a également permis de montrer qu'il existait une association, chez les patients atteints de drépanocytose, entre certains paramètres systémiques du stress oxydant et certains paramètres cliniques tels que le nombre et la fréquence des CVO hospitalisées. Cette association pourrait aussi se retrouver avec les polymorphismes des gènes du stress oxydant qui pourraient être ainsi des modulateurs génétiques influant sur la sévérité globale de la maladie, à l'instar des QTLs de l'HbF ou du génotype alpha-globine. Ils pourraient aussi possiblement orienter l'évolution clinique plutôt vers le sous-phénotype hémolytique ou vaso-occlusif de la maladie et/ou avoir une influence sur une complication spécifique (comme le déficit en G6PD sur un risque accru d'AVC). Par conséquent, leur détermination pourrait aider à améliorer la prise en charge médicale de nos patients atteints de drépanocytose et non traités à l'HU.

Dans la littérature, seules deux études ont porté sur certains de ces gènes dans un contexte de drépanocytose (571, 574). Farias et *al.* (574) ont étudié l'association entre le polymorphisme rs4880 du gène *SOD2* et l'activité enzymatique de SOD avec la survenue de crise vaso-occlusive (VOC) et la séquestration splénique aiguë (SSA) dans une cohorte de 173 enfants brésiliens âgés de 1 à 9 ans et atteints de drépanocytose. Ils ont rapporté que les enfants présentant ce polymorphisme (à l'état homozygote ou hétérozygote) avaient une

activité enzymatique SOD inférieure. Parallèlement, ces patients faisaient davantage de CVO et de SSA. Ces auteurs ont ainsi suggéré que le polymorphisme rs4880 du gène *SOD2* pourrait être un facteur de susceptibilité à la survenue de crise vaso-occlusive et de séquestration splénique aiguë, sans doute en raison d'une activité enzymatique plus faible de la protéine SOD. De leur côté, Costa et *al.* (571) ont étudié l'association entre le polymorphisme rs2333227 du gène *MPO* et la susceptibilité aux infections dans une cohorte de 91 enfants et adultes brésiliens âgés de 7 à 52 ans. Tous les patients de cette cohorte avaient déjà été immunisés contre le pneumocoque, l'hémophilus influenza et l'hépatite B et trois patients utilisaient des antibiotiques prophylactiques. Ainsi, ces auteurs ont rapporté que la présence du polymorphisme rs2333227 du gène *MPO* à l'état hétérozygote (le nombre de patients homozygotes pour ce SNP était trop petit pour tirer des conclusions significatives) semblait augmenter la susceptibilité aux infections chez les patients atteints de drépanocytose. En revanche, à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur l'association entre les polymorphismes rs207454 du gène *XO* et rs35652124 du gène *NFE2L2* et les paramètres cliniques de la drépanocytose.

Eu égard ces constats, cette étude a été entreprise pour déterminer l'effet de certains polymorphismes (rs2333227; G → A du gène *MPO*, rs4880; T → C du gène *SOD2*, rs207454; G → du gène *XO* et rs35652124; T → C du gène *NFE2L2*) des gènes impliqués dans le stress oxydatif sur la vie de notre cohorte d'enfants atteints de drépanocytose.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Paramètres cliniques et biologiques étudiés

Les critères d'inclusion et les paramètres biologiques et cliniques "quantitatifs" recensés (âge de la première complication, nombre de CVO sur les dernières années précédant l'inclusion, nombre d'hospitalisations) ont été les mêmes que ceux de l'étude 2. En plus de ces paramètres, nous avons rajouté d'autres paramètres cliniques "qualitatifs" : l'ostéomyélite, l'ostéonécrose, le sepsis, l'accident vasculaire cérébral, le syndrome thoracique aigu et la séquestration splénique aiguë. Les marqueurs biologiques étudiés sont des paramètres hématologiques (concentrations en Hb, nombre de leucocytes, nombre de plaquettes et taux de réticulocytes), des marqueurs biochimiques (lactate déshydrogénase (LDH), bilirubine totale et directe (BIL), aspartate amino-transférase (ASAT) et protéine C-réactive (CRP)) et des marqueurs ou enzymes du stress oxydatif (MDA, AOPP, MPO, XO, catalase, GPx, SOD).

4.2.2 Génotypage des polymorphismes des gènes MPO, SOD, XO et NFE2L2

La technique HRM (High Resolution Melting) sur le Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France), a été utilisée pour le génotypage de ces différents polymorphismes (Annexe 0). Pour ces SNPs, de nouvelles amorces ont été conçues avec le logiciel Primer 3 afin d'obtenir des produits PCR de différentes longueurs selon les polymorphismes (Annexe 0). Du séquençage Sanger a été fait pour obtenir des témoins de chacun des trois génotypes avant de pouvoir faire le génotypage par HRM.

4.2.3 Détermination des paramètres biologiques

Les paramètres hématologiques ont été mesurés à l'aide de l'automate Sysmex XT-4000i (System Corporation, Tokyo, Japon) et les paramètres biochimiques à l'aide de l'analyseur BA-88 Mindray (Manwah, NJ, USA). Les différentes fractions de l'hémoglobine ont été quantifiées par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en utilisant l'appareil Variant II (Biorad, Hercules, CA, USA). Quant aux marqueurs du stress oxydatif, ce sont les mêmes que ceux de l'étude 3 (Cf. étude 3). Pour rappel, ces méthodes de dosage de ces marqueurs du stress oxydatif sont :

- Méthode Witko-Sarsat et al. (581) pour le dosage des concentrations d'AOPP ;
- Méthode d'Ohkawa (582) pour le dosage des concentrations de MDA ;
- Méthode décrite par Johansson et Borg (586) pour la détermination de l'activité de la catalase ;
- Méthode de Paglia et Valentine (587) pour la détermination de l'activité de la GPx ;
- Méthode de Beauchamp et Fridovich (588), modifiée par Oberley (589) pour l'évaluation de l'activité de la SOD ;
- La méthode d'évaluation de l'activité de la xanthine oxydase fait partie d'une série de tests « déshydrogénases » récemment mis au point (590) ;
- Méthode immuno-enzymatique indirecte semi-quantitative utilisant des anticorps anti-MPO humains stabilisés pour la détermination de l'activité de la MPO.

4.2.4 Analyses statistiques

Pour chaque variant génétique, la fréquence allélique globale a été calculée et la répartition homogène des trois génotypes possibles dans la population (homozygote

sauvage, hétérozygote et homozygote muté) a été vérifiée par l'équilibre de Hardy-Weinberg (HWE) en utilisant le test de χ^2 avec un seul degré de liberté.

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le niveau de significativité a été défini à $p < 0,05$. Les variables continues ont été rapportées sous forme de moyenne \pm écart type (SD) et les variables qualitatives sous forme de nombre (N). L'étude d'association entre les polymorphismes du stress oxydatif et les paramètres cliniques et biologiques a été réalisée grâce aux tests de χ^2 et le test t de Student sur un modèle dominant (Wild vs Hétérozygotes + homozygotes mutés).

4.3 Résultats

Les données cliniques et biologiques globales de notre cohorte de 301 patients sont rapportées dans le tableau I. L'âge moyen de la première complication était de 4,1 ans et le nombre moyen de CVO hospitalisées au cours des deux dernières années de 0,7. Cependant, une grande variabilité inter-individuelle a été observée dans les deux cas. Les complications qualitatives étudiées se sont révélées peu fréquentes avec une prévalence d'au maximum 10% pour l'asthme. La concentration en Hb était très basse 7,8 (g/dL) contrairement aux valeurs physiologiques. Par ailleurs, les taux de leucocytes, de réticulocytes et de plaquettes, étaient normaux ou modérément élevés (15,1, 330 et 349 G / L, respectivement). Les paramètres d'hémolyse et d'inflammation étaient légèrement élevés (bilirubine totale et directe : 44 et 23 mg / L, ASAT : 61 UI / l, CRP : 4,6 mg / L), à l'exception de la LDH, qui présentait également une grande variabilité entre les patients (940 \pm 499 UI/L). Les marqueurs du stress oxydatif sont également rapportés dans le tableau I. Nous pouvons noter une grande variabilité inter-individuelle pour ces marqueurs, reflétée par des coefficients de variation (CV) qui sont assez élevés à l'exception de SOD (CV = 28.6%

Tableau I - Caractéristiques cliniques et biologiques globales de la cohorte SCA

Paramètres cliniques et biologiques	Moyenne (+/- σ) ou N (Non / Oui)	CV (%)	Valeurs extrêmes ou %
<u>Paramètres cliniques</u>			
Age de la première complication (ans)	4.1 ± 3.3	80.4	0.2 – 15.5
CVO hospitalisées (sur 2 ans)	0.7 ± 1.2	171.4	0 - 10
<u>Autres paramètres cliniques</u>			
Ostéomyélite	286 / 15	na	5%
Asthme	270 / 31	na	10%
Ostéonécrose	292 / 9	na	3%
AVC	289 / 12	na	4%
Séquestration splénique aiguë (SSA)	293 / 8	na	3%
Sepsis	295 / 6	na	2%
Syndrome thoracique aigu (STA)	290 / 11	na	4%
<u>Paramètres biologiques</u>			
Nombre de leucocytes ($10^3/L$)	15.1 ± 16.0	106.0	4.2 - 28.2
Hb (g/dL)	7.8 ± 1.1	14.1	5.5 - 12.0
Taux de réticulocytes ($10^3/L$)	330 ± 166	50.3	28 - 1117
Taux de plaquettes ($10^3/L$)	449 ± 136	30.3	135 - 945
HbF (%)	9.5 ± 5.1	53.7	1.1 - 26.8
TGO (ASAT) (UI/L)	61 ± 34	55.7	20 - 341
Bilirubine totale (mg/dL)	44 ± 24	54.5	7 - 107
Bilirubine directe (mg/dL)	23 ± 15	65.2	2 - 68
LDH (UI/l)	940 ± 499	53.1	148 - 3318
CRP (mg/L)	4.6 ± 5.4	117.4	0.1 - 34.6
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	50.2 ± 16.2	32.3	17.9 - 102.5
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	37.8 ± 13.1	34.6	13.3 - 180.7
XO ($\mu\text{mol/mL/min}$)	0.8 ± 0.2	25.0	0.4 - 1.5
MPO ($\mu\text{mol/mL/min}$)	0.6 ± 0.7	116.7	0.0 – 4.6
SOD ($\mu\text{mol/mL/min}$)	11.2 ± 3.2	28.6	2.1 - 21.3
Catalase ($\mu\text{mol/mL/min}$)	4.6 ± 2.2	47.8	0.6 – 22.8
GPx ($\mu\text{mol/mL/min}$)	48.1 ± 36.8	76.5	7.6 – 267.4

CV: coefficient de variation inter-individuel. MPO: Myéloperoxydase; SOD: Superoxyde Dismutase.; XO: xanthine oxydase. NFE2L2: Nuclear Factor Erythroid 2 Like 2, na: non applicable.

Les prévalences et les fréquences alléliques des quatre SNPs sont décrites dans le tableau II. Des fréquences alléliques de 0.25 et 0.35 ont été rapportées pour les polymorphismes rs2333227 du gène *MPO* et rs4880 du gène *SOD2*, respectivement. Quant aux polymorphismes rs207454 du gène *XO* et rs35652124 du gène *NFE2L2*, ils présentaient

des fréquences alléliques de 0.31 et 0.16, respectivement. Aucune déviation de l'équilibre de Hardy-Weinberg n'a été observée.

Tableau II. Fréquences alléliques des SNPs des gènes du stress oxydant

Gènes du stress oxydant	Nombre d'enfants (N)	Répartition (%)	Fréquence allélique	p*
<u>MPO (rs2333227)</u>				
Homozygotes sauvages	163	54.15	0.25	0.67
Hétérozygotes	123	40.87		
Homozygotes mutés	15	4.98		
<u>SOD2 (rs4880)</u>				
Homozygotes sauvages	132	43.85	0.35	0.55
Hétérozygotes	125	41.53		
Homozygotes mutés	44	14.62		
<u>XO (rs207454)</u>				
Homozygotes sauvages	142	47.18	0.31	0.90
Hétérozygotes	130	43.19		
Homozygotes mutés	29	9.63		
<u>NFE2L2 (rs35652124)</u>				
Homozygotes sauvages	218	72.42	0.16	0.27
Hétérozygotes	69	22.93		
Homozygotes mutés	14	4.65		

*L'équilibre de Hardy-Weinberg a été vérifié par le test du Chi-Deux avec un seul degré de liberté.

MPO: Myéloperoxydase; SOD: Superoxyde Dismutase. ; XO: xanthine oxydase. NFE2L2: Nuclear Factor Erythroid 2 Like 2; p: chi2 de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Les résultats de l'étude d'association entre les polymorphismes des gènes du stress oxydant et les paramètres cliniques étudiés sont rapportés dans les tableaux III-A et III-B. L'âge de la première complication était significativement plus tardif chez les enfants présentant le SNP rs233322 du gène *MPO* (4.5 ± 3.5 ans) par rapport aux homozygotes sauvages (3.7 ± 3.0 ans) (Tableau III-A). Le risque d'être asthmatique tend à être plus important chez les enfants possédant le polymorphisme rs4880 du gène *SOD2*. De la même façon, le risque de faire une ostéonécrose, un sepsis, un STA et le nombre d'hospitalisations sur les deux dernières années tendent à être moins important chez les enfants porteurs du SNP rs207454 du gène *XO*. En revanche, le polymorphisme rs35652124 du gène *NFE2L2* n'avait aucune influence sur la survenue des paramètres cliniques étudiés.

Tableau III-A Effets des polymorphismes des gènes SOD et MPO sur les paramètres cliniques.

	SOD2 (rs4880)		MPO (rs2333227)		p
	Wild n=132	Hez+Mute n=169	Wild n=163	Hez+Mute n=138	
<u>Paramètres cliniques quantitatifs</u>					
Age de la première complication (ans)	4.3±3.3	3.7±3.1	3.7 ± 3.0	4.5 ± 3.5	0.04**
Hospitalisations/2 ans	0.89±1.4	0.79±1.2	0.85 ± 1.4	0.82 ± 1.1	0.82
CVO Hospitalisées / 2 ans	0.80±1.3	0.69±1.1	0.77 ± 1.3	0.71 ± 1.1	0.69
<u>Paramètres cliniques qualitatifs</u>					
(N - Oui / Non)					
Ostéomyélite	124/8	162/7	153/10	133/5	0.31
Asthme	123/9	147/22	146/17	124/14	0.93
Ostéonécrose	129/3	163/6	157/6	135/3	0.44
AVC	124/8	165/4	156/7	133/5	0.76
séquestration splénique aiguë (SSA)	128/4	165/4	157/6	136/2	0.23
Sepsis	129/3	166/3	160/3	135/3	0.83
Syndrome thoracique aigu (STA)	162/6	164/5	156/7	134/4	0.52

** : 0.01 < p < 0.05; Hez + Mute, somme des patients hétérozygotes et homozygotes mutés.

Tableau III-B. Effets des polymorphismes des gènes XO et NFE2L2 sur les paramètres cliniques.

	XO (rs207454)		NFE2L2 (rs35652124)		p
	Wild n=142	Hez+Mute n=159	Wild n=218	Hez+Mute n=83	
<u>Paramètres cliniques quantitatifs</u>					
Age de la première complication (ans)	4.0 ± 3.2	4.0 ± 3.2	4.0 ± 3.2	4.0 ± 3.3	0.95
Hospitalisations/2 ans	0.97 ± 1.4	0.72 ± 1.0	0.83 ± 1.3	0.87 ± 1.2	0.80
CVO Hospitalisées / 2 ans	0.85 ± 1.4	0.65 ± 1.1	0.74 ± 1.25	0.75 ± 1.11	0.96
<u>Paramètres cliniques qualitatifs</u>					
(N - Oui / Non)					
Ostéomyélite	133/9	153/6	209/9	77/6	0.26
Asthme	127/15	143/16	195/23	75/8	0.81
Ostéonécrose	137/5	158/1	211/7	81/2	0.71
AVC	154/5	135/7	210/8	79/4	0.64
Séquestration splénique aiguë (SSA)	137/5	156/3	213/5	80/3	0.52
Sepsis	137/5	158/1	213/5	82/1	0.54
Syndrome thoracique aigu (STA)	134/8	156/3	209/9	81/2	0.48

*: 0.05 < p < 0.10 (tendance); **: 0.01 < p < 0.05 ; Hez + Mute, somme des patients hétérozygotes et homozygotes mutés.

Les associations entre les paramètres clinico-biologiques et les 4 SNPs du stress-oxydant étudiés sont présentés dans les tableaux IV-A et IV-B. Les patients porteurs du polymorphisme *SOD2* rs4880 présentaient un taux de réticulocytes significativement plus bas et une activité GPx significativement augmentée par rapport aux homozygotes sauvages. Une tendance à des activités MPO plus faibles était également observable chez ces mêmes patients. Les enfants porteurs du polymorphisme *MPO* rs2333227 avaient une concentration en Hb significativement plus basse par rapport aux homozygotes sauvages. Par contre leur taux de plaquettes et leur activité catalase étaient significativement plus élevés, de même que leurs concentrations plasmatiques en AOPP. Le polymorphisme rs207454 du gène *XO*, quant à lui, était associé à un nombre de plaquettes plus bas et une tendance à des activités SOD plus augmentées (Tableau IV-B). Comme avec les paramètres cliniques, nous n'avons pas trouvé d'association entre le polymorphisme *NFE2L2* rs35652124 et les paramètres biologiques étudiés, à l'exception d'une tendance à des activités LDH plus basses.

Tableau IV-A. Effets des polymorphismes des gènes SOD et MPO sur les marqueurs biologiques.

	SOD2 (rs4880)			MPO (rs2333227)		
	Wild n=132	Hez+Mute n=169	p	Wild n=163	Hez+Mute n=138	p
Paramètres biologiques						
Nombre de leucocytes (10 ³ /L)	16.0±23.6	14.4±4.4	0.37	16.0 ± 21.4	14.0 ± 3.9	0.28
Hb (g/dL)	7.8 ± 1.0	7.7 ± 1.0	0.24	7.9 ± 1.1	7.6 ± 1.0	0.04**
Taux de réticulocytes (10 ³ /L)	355 ± 176	312 ± 156	0.02**	322.7 ± 154.4	339.6 ± 179.0	0.38
Taux de plaquettes (10 ³ /L)	459.5±145.1	441.8±128.0	0.26	433 ± 128	469 ± 142	0.02**
HbF (%)	9.3±5.0	9.6±5.2	0.58	9.8 ± 5.3	9.0 ± 4.7	0.17
TGO (ASAT) (UI/L)	61.6±32.0	61.0±35.2	0.89	62.3 ± 40.6	59.8 ± 23.2	0.50
Bilirubine totale (mg/dL)	42.3±23.5	45.2±24.6	0.29	45.5 ± 25.0	42.0 ± 22.8	0.21
Bilirubine directe (mg/dL)	21.6±14.6	24.1±15.4	0.16	23.9 ± 16.4	21.9 ± 13.3	0.25
LDH (UI/l)	936.3±544.6	943.6±462.7	0.90	954.0 ± 482.3	924.3 ± 520.3	0.60
CRP (mg/L)	4.3±5.0	4.8±5.7	0.44	4.5 ± 5.3	4.5 ± 5.5	0.90
AOPP (µmol/L)	51.2±16.4	49.4±16.1	0.33	48.1 ± 15.5	52.6 ± 16.8	0.02**
MDA (µmol/L)	37.6±10.7	37.9±14.7	0.87	38.1 ± 14.9	37.2 ± 10.5	0.54
XO (µmol/mL/min)	0.58 ± 0.71	0.67 ± 0.74	0.49	0.6 ± 0.65	0.63 ± 0.81	0.73
MPO (µmol/mL/min)	0.82±0.1	0.86±0.1	0.07*	0.84 ± 0.15	0.84 ± 0.16	0.93
SOD (µmol/mL/min)	10.9±2.9	11.1±3.4	0.22	10.6 ± 3.1	10.1 ± 3.4	0.19
Catalase (µmol/mL/min)	4.3±1.7	4.7±2.5	0.11	4.29 ± 1.87	4.85 ± 2.51	0.02**
GPx (µmol/mL/min)	42.6±33.0	52.4±38.9	0.02**	48.0 ± 36.5	48.3 ± 37.16	0.93

*: 0.05 < p < 0.10 (tendance); **: 0.01 < p < 0.05; Hez + Mute, somme des patients hétérozygotes et homozygotes mutés.

Tableau IV-B. Effets des polymorphismes XO et NFE2L2 sur les marqueurs biologiques.

	Xanthine oxydase (rs207454)		NFE2L2 (rs35652124)		p
	Wild n=142	Hez+Mute n=159	Wild n=218	Hez+Mute n=83	
<u>Paramètres biologiques</u>					
Nombre de leucocytes (10 ³ /L)	14.6 ± 4.3	15.6 ± 21.7	15.5 ± 18.6	14.0 ± 4.4	0.44
Hb (g/dL)	7.8 ± 1.0	7.6 ± 1.0	7.7 ± 1.0	7.7 ± 1.1	0.79
Taux de réticulocytes (10 ³ /L)	333.0 ± 176.0	328.2 ± 157.2	337.7 ± 171.0	311.6 ± 151.7	0.22
Taux de plaquettes (10 ³ /L)	470 ± 143	431 ± 127	448.8 ± 135.1	451.4 ± 138.4	0.87
HbF (%)	9.6 ± 5.4	9.3 ± 4.7	9.4 ± 4.9	9.6 ± 5.4	0.80
TGO (ASAT) (UI/L)	63.7 ± 32.0	58.8 ± 35.1	61.1 ± 29.3	61.3 ± 43.5	0.96
Bilirubine totale (mg/dL)	43.0 ± 24.4	44.8 ± 23.8	43.8 ± 24.5	44.4 ± 24.0	0.84
Bilirubine directe (mg/dL)	23.3 ± 15.5	22.7 ± 14.7	23.1 ± 15.6	22.7 ± 13.7	0.86
LDH (UI/l)	927.3 ± 550.2	952.0 ± 450.7	968.8 ± 536.6	865.8 ± 377.8	0.06*
CRP (mg/L)	4.3 ± 5.4	4.7 ± 5.4	4.5 ± 5.7	4.5 ± 4.6	0.97
AOPP (µmol/L)	49.9 ± 15.1	50.3 ± 17.2	50.1 ± 16.0	50.2 ± 16.8	0.93
MDA (µmol/L)	37.9 ± 9.8	37.6 ± 15.4	37.2 ± 14.0	39.1 ± 10.3	0.26
XO (µmol/mL/min)	0.57 ± 0.65	0.67 ± 0.79	0.60 ± 0.74	0.63 ± 0.68	0.71
MPO (µmol/mL/min)	0.84 ± 0.2	0.85 ± 0.2	0.84 ± 0.1	0.86 ± 0.1	0.30
SOD (µmol/mL/min)	10.0 ± 3.3	10.6 ± 3.2	10.4 ± 3.2	10.1 ± 3.6	0.49
Catalase (µmol/mL/min)	4.49 ± 2.33	4.60 ± 2.08	4.63 ± 2.30	4.34 ± 34.85	0.30
GPx (µmol/mL/min)	45.61 ± 32.16	50.38 ± 40.40	47.13 ± 34.85	50.70 ± 41.47	0.44

*: 0.05 < p < 0.10 (tendance); **: 0.01 < p < 0.05; Hez + Mute, somme des patients hétérozygotes et homozygotes mutés.

4.4 Discussion

La présente étude a examiné les associations entre certains SNPs des gènes du stress oxydatif (rs2333227; G → A du gène *MPO*, rs4880; T → C du gène *SOD2*, rs207454; G → T du gène *XO* et rs35652124; T → C du gène *NFE2L2*) et les paramètres cliniques et biologiques au sein d'une population pédiatrique sénégalaise d'enfants atteints de drépanocytose. Nous avons trouvé des fréquences alléliques de 0.25 et 0.35 pour les polymorphismes rs2333227 du gène *MPO* et rs4880 du gène *SOD2*, respectivement. Ces fréquences sont semblables à celles trouvées dans des populations brésiliennes atteintes de drépanocytose. En effet, Costa *et al.* (571), ont rapporté une fréquence allélique de 0.19 du SNP rs2333227 du gène *MPO* au sein de leur population d'étude. De même, Farias *et al.* (574) ont trouvé une fréquence allélique de 0.35 dans une autre population de patients brésiliens atteints de drépanocytose. Ces similitudes pourraient être dues au fait que ces populations brésiliennes ont des ancêtres d'origine africaine. En effet, certaines mutations peuvent être conservées malgré un métissage de plus en plus important. Par contre, à notre connaissance, c'est la première fois que les fréquences alléliques des SNPs rs207454 du gène *XO* et rs35652124 du gène *NFE2L2* ont été évaluées dans une population de patients atteints de drépanocytose.

De façon surprenante, aucun des 4 polymorphismes étudiés ne s'est révélé avoir une influence sur l'activité enzymatique correspondante, ce qui était pourtant notre hypothèse de départ. Ceci est particulièrement surprenant pour rs4880 *SOD2*, puisque notre résultat se trouve ainsi en contradiction avec l'étude de Farjas citée plus haut (574). Pour les 3 autres SNPs étudiés, cela est plus plausible puisque notre étude est la première à les tester dans un contexte de drépanocytose. Quoiqu'il en soit, des études complémentaires indépendantes sur d'autres cohortes s'avèrent nécessaires pour vérifier ce point. En revanche, des associations croisées entre certains de ces polymorphismes et d'autres marqueurs du stress-ox ont été trouvées (rs4880 de *SOD2* avec GPx; *XO* avec catalase) et seraient à confirmer sur des cohortes indépendantes.

Nos résultats suggèrent que le polymorphisme rs4880 du gène *SOD2* pourrait avoir un effet favorable sur le plan biologique (réticulocytose moindre, activité GPx augmentée) mais que cet effet ne se reflèterait pas sur l'expression clinique de la maladie (l'effet sur l'asthme demandant vraiment à être confirmé dans le temps et sur un plus grand nombre d'évènements). Cette absence d'effet sur les paramètres cliniques de drépanocytose est de nouveau en contradiction avec les résultats de Farias *et al.* (574) qui ont trouvé un effet

aggravateur de ce polymorphisme vis-à-vis des CVO et des SSA. Cette différence pourrait être due au fait que nos données cliniques quantitatives ont été recueillies sur une période de deux ans (2015 à 2017) tandis que pour les patients de Farias *et al.*, les données cliniques ont été recueillies depuis leur dépistage néonatal en 2002 jusqu'en décembre 2012, donc sur une période beaucoup plus longue (574).

Le polymorphisme rs233322 du gène *MPO* semble associé à une diminution de la concentration en Hb, une augmentation du taux de plaquettes ainsi qu'à une augmentation des concentrations d'AOPP et de l'activité catalase. Renoux *et al.* ayant montré une corrélation positive entre la concentration d'AOPP et l'index d'hémolyse (134), nos résultats suggèrent que ce polymorphisme pourrait être associé à une hémolyse plus importante, ce qui expliquerait la baisse associée de l'Hb totale et l'augmentation du taux de plaquettes. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'âge de la première complication, qui est quasi-systématiquement de nature vaso-occlusive dans notre cohorte (184, 616) (syndrome pied-main ou dactylite), était également plus tardif chez les enfants présentant ce polymorphisme. L'activité catalase augmentée pourrait refléter une activation des défenses anti-oxydantes de l'organisme en réponse à l'augmentation du stress-oxydant objectivée par l'augmentation de la concentration en AOPP. L'absence d'effets de ce polymorphisme sur les infections telles que les sepsis, les ostéomyélites et les ostéonécroses, pourrait être liée au fait que tous nos patients ont reçu une antibioprofylaxie. En effet, comme nous l'avons dit tantôt, la seule étude qui rapporté un lien entre ce SNP et les infections dans la drépanopctyose, a été réalisée sur une population certes immunisée (contre le pneumocoque, l'hémophilus influenza et l'hépatite B), mais qui n'avait pas reçu une antibioprofylaxie (à l'exception de 3 patients) (571). De façon fort logique l'antibioprofylaxie masquerait l'effet du polymorphisme rs233322 du gène *MPO* sur la susceptibilité aux infections.

Le polymorphisme rs207454 du gène de la xanthine oxydase, quant à lui, a tendance à avoir un effet protecteur vis-à-vis de certains paramètres cliniques pour les enfants qui présentaient ce SNP dans notre cohorte. Il est en effet intéressant de constater que les tendances sont toutes orientées dans le même sens: diminution des sepsis, des hospitalisations, des STA et des ostéonécroses. Ce polymorphisme pourrait avoir donc un effet protecteur global vis-vis de la maladie, effet protecteur dont l'une des causes pourrait être l'augmentation de l'activité SOD mise en évidence dans notre cohorte. Cependant, comme aucun lien évident n'existe entre les métabolismes SOD et XO, il est plus probable

que l'augmentation de l'activité SOD soit la conséquence et non la cause de la moindre sévérité clinique observée.

Malgré le rôle important du gène *NFE2L2* sur la synthèse des enzymes anti-oxydantes, le polymorphisme rs35652124 de ce gène étudié pour la première fois dans la drépanocytose ne semble pas avoir d'effet sur cette maladie.

4.5 Conclusion

Nos données suggèrent que le polymorphisme rs4880 du gène *SOD2*, aurait un effet favorable chez les enfants présentant ce SNP. A l'inverse, le polymorphisme rs233322 du gène *MPO* serait associé à l'hémolyse qui est à l'origine des complications du sous-phénotype hémolytique. Par ailleurs, le polymorphisme rs207454 du gène *XO* aurait des effets protecteurs vis-à-vis des certaines complications. Des études de confirmation doivent être entreprises, non seulement sur cette cohorte sénégalaise, mais aussi sur d'autres populations de patients atteints de drépanocytose. En effet ces études sont nécessaires pour valider ces polymorphismes comme des gènes modificateurs pouvant être utilisés également dans la bonne prise en charge des patients atteints de drépanocytose.

PARTIE 4 : CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION - PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer les interrelations entre les principaux gènes modificateurs décrits, le stress oxydant systémique, certains polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant et la sévérité clinique de la drépanocytose dans un contexte d'évolution naturelle de la maladie. Pour atteindre ces objectifs nous avons réalisé 4 études.

La première étude épidémiologique nous a permis de déterminer pour la première fois les fréquences alléliques des principaux gènes modificateurs de la drépanocytose (génotype alpha-globine, génotype G6PD et haplotypes β^S) dans une cohorte sénégalaise. Une nouvelle mutation β^0 -thalassémique a ainsi été découverte au sein de notre cohorte : il s'agissait de la mutation `HBB:c.265_266del; p.Leu89Glufs*2` selon la nomenclature HGVS, mutation caractérisée par un décalage du cadre de lecture. Ces résultats épidémiologiques peuvent être un point de départ pour la recherche systématique génétique d'anomalies alpha et bêta-globine et de déficit en G6PD au Sénégal. En résumé, si la recherche d'une alpha-thalassémie peut être réalisée facilement, ça ne sera pas le cas pour déterminer le profil β -thalassémique de nos patients. En effet, la délétion -3.7 Kb étant la seule délétion alpha-thalassémique retrouvée dans notre cohorte avec une prévalence de 21% (617), sa recherche par la technique GAP-PCR (579) pourrait suffire pour établir le profil alpha-thalassémique, du moins dans le cadre de la drépanocytose. Par contre, la diversification des mutations β -thalassémiques ne nous permettra pas de faire des recherches ciblées de certaines mutations par rapport à d'autres. Ce qui revient à dire que pour établir le profil β -thalassémique de patients sénégalais, il faudra réaliser le séquençage Sanger de tout le gène *HBB*. Pour le génotypage G6PD, en plus de la recherche du variant A (-), il faudra systématiquement compléter cette recherche par celle du variant Betica. En effet, malgré beaucoup d'articles qui ont rapporté que le variant A (-) était le variant G6PD déficitaire le plus fréquent en Afrique (618, 619), ce n'est pas le cas au Sénégal et dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest. Au début de ce travail, nous avons ciblé uniquement la recherche du variant A(-), mais la faible fréquence allélique obtenue pour ce variant qui n'était pas superposable aux résultats de la littérature sur la prévalence du déficit biochimique en G6PD (252), nous a poussé à faire une recherche bibliographique approfondie. Cette recherche a révélé que le variant Betica pourrait être le plus fréquent dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest (620, 621), notamment au Sénégal (622). Ce point est encore largement méconnu

dans la communauté scientifique africaine, comme nous avons pu nous en apercevoir en présentant ces résultats aux 18^{èmes} journées médicales de Dakar.

D'un point de vue pratique, la recherche systématique des principaux gènes modificateurs de la drépanocytose au Sénégal pourrait donc permettre d'orienter la prise en charge afin de prévenir au mieux le risque de vasculopathie cérébrale. Comme nous le savons, le déficit en G6PD serait associé à un risque accru de la vasculopathie cérébrale et serait un facteur aggravant des complications hémolytiques de la maladie, notamment la survenue des AVC. A l'inverse, l'alpha-thalassémie représente un facteur protecteur de cette complication (243, 253). Le doppler transcrânien n'étant pas accessible à tous les enfants atteints de drépanocytose, un screening génétique systématique de l'alpha-thalassémie et du déficit en G6PD pourrait permettre de sélectionner les enfants éligibles au premier chef pour cet examen en vue de prévenir les AVC, à savoir les enfants drépanocytaires déficitaires en G6PD et sans alpha-thalassémie associée. Dans notre cohorte, cela représentait 12 % des enfants. Ces enfants à risque pourront donc être identifiés et orientés prioritairement pour faire un DTC dont l'appareil vient d'être acquis par notre centre. Cette recherche systématique de ces gènes modificateurs trouve tout son intérêt dans les pays en voie de développement où les moyens de diagnostic et de prise en charge de la drépanocytose sont insuffisants. Contrairement aux pays développés où cette recherche est certes systématique mais qui ne modifie pas à priori la prise en charge des patients. En effet, quelque soit le profil génotypique du patient, il bénéficie systématiquement d'un DTC et d'une recherche du déficit en G6PD entre autres.

La deuxième étude de notre travail a montré qu'un nombre élevé de QTLs de l'HbF semblait diminuer la survenue des CVO pour les patients sans alpha-thalassémie mais qu'il l'augmenterait en revanche en cas d'alpha-thalassémie homozygote associée. Une explication possible serait que les enfants alpha-thalassémiques homozygotes avec beaucoup de QTLs HbF hémolysent très peu. Le « revers de la médaille » serait un sang plus visqueux, ce qui serait à l'origine de CVO plus fréquentes. En revanche, un nombre élevé de QTLs de l'HbF associé à une alpha-thalassémie hétérozygote semble retarder l'âge de la première complication. Ainsi, à partir de ces constats, pour bénéficier de l'effet positif des QTLs de l'HbF (CVO diminuées et âge de la première complication retardée), le génotype le plus favorable serait donc la coexistence d'une alpha-thalassémie hétérozygote et d'un nombre élevé de QTLs de l'HbF. Cette deuxième étude a permis de montrer pour la première fois que les deux modificateurs génétiques principaux de la drépanocytose, à savoir les QTLs

de l'HbF et le génotype alpha-globine, ne doivent pas être étudiés séparément pour une prédiction clinique optimale. Elle pourra être poursuivie en menant entre autres des études de rhéologie afin d'évaluer la viscosité sanguine de ces différents groupes de patients afin de vérifier notre hypothèse ci-dessus.

Le stress oxydant étant connu comme ayant un rôle majeur dans la physiopathologie de la drépanocytose, nous nous sommes intéressés aux relations qui pourraient exister entre celui-ci, les gènes modificateurs précédemment étudiés et la sévérité clinique de la drépanocytose. Cette deuxième partie du travail a donc fait l'objet de deux études (études 3 et 4). Les résultats de l'étude 3 confirment la présence d'un stress oxydatif chez ces patients (objectivé par les concentrations élevées de MDA et d'AOPP) et pouvant expliquer, au moins en partie, certaines de leurs manifestations cliniques. Malgré une tentative de compensation par les systèmes antioxydants (SOD, GPx et Catalase), qui sont des facteurs contribuant à l'homéostasie rédox cellulaire, ce stress reste élevé comparé aux témoins AA. De plus, nos résultats ont montré que l'alpha-thalassémie homozygote semblait diminuer le stress oxydatif chez les patients atteints de drépanocytose et pourrait constituer une explication possible du rôle protecteur de l'alpha-thalassémie sur certaines complications caractéristiques du sous-phénotype hémolytique. De plus, les patients qui ont eu moins d'hospitalisations ou moins de CVO semblent présenter une meilleure défense antioxydante.

Cet aspect phénotypique de l'effet du stress oxydant sur l'expression clinique de la maladie pourrait être lié à certains polymorphismes de gènes impliqués dans le stress oxydant. En effet, avec l'étude 4 nous avons observé que certains SNPs de gènes du stress oxydant (rs4880 du gène SOD2, rs207454 du gène XO, rs233322 du gène MPO et rs35652124 du gène NFE2L2) seraient corrélés à certaines manifestations cliniques de la maladie. En effet, les polymorphismes rs4880 du gène SOD2 et rs207454 du gène XO, auraient des effets protecteurs vis-à-vis des certaines complications chez les enfants présentant ces SNPs. A l'inverse, le polymorphisme rs233322 du gène MPO serait associé à la survenue des complications caractéristiques du sous-phénotype hémolytique. Cette relation du stress oxydant avec l'hémolyse renforce les résultats de Renoux et *al.*(134), qui ont rapporté une corrélation positive entre le stress oxydant et un index d'hémolyse élevé. Ces observations révéleraient que le stress oxydant aurait tendance à favoriser le sous-phénotype hémolytique.

Toutefois, il faut souligner que cet effet favorable de ces SNPs n'est pas significativement établi sur le plan statistique. En effet, les polymorphismes rs4880 du gène SOD2 et rs207454 du gène XO ont juste tendance à entraîner entre autres des ostéonécroses et sepsis moins fréquents chez les enfants qui ont ces mutations. Ces limites pourraient être dues au fait que notre cohorte est une cohorte pédiatrique caractérisée à priori par de taux d'HbF relativement élevés. Les complications chroniques telles l'ostéonécrose sont donc peu fréquentes dans cette population, ces enfants ont plutôt tendance à faire des complications aiguës.

Toutes les études sur le stress oxydant systémique dans la drépanocytose sont très contradictoires (134, 382, 404). Pour les études sur les gènes impliqués dans le stress oxydant, non seulement elles sont très peu nombreuses mais leurs résultats sont également très divergeants (571, 574). Ces auteurs n'ont peut-être pas pensé à suivre leurs cohortes respectives pour apprécier l'évolution de ce stress. Ainsi, il semblerait intéressant de suivre notre cohorte dans le temps jusqu'à l'âge adulte ; c'est ce que nous envisageons de faire dans les prochaines années. Cette étude que nous avons réalisée est une étude transversale où nous avons évalué le stress oxydant à une période où les enfants avaient un âge moyen de 9 ans. Le suivi consistera à passer à une étude longitudinale en redosant les marqueurs du stress oxydant dans 3 ou 5 ans, lorsque ces enfants auront un âge moyen de 12 ou 14 ans. Ceci nous permettra d'évaluer l'évolution de ce stress oxydant et de confirmer ou d'infirmer les résultats des études de corrélation obtenus avec les marqueurs génétiques précédemment étudiés. En effet, le nombre d'évènements cliniques pour les complications type sepsis, ostéonécrose, asthme, priapisme, etc aura considérablement augmenté. Ces complications n'ont probablement pas de sens physiologique / clinique dans cette population pédiatrique, ça en a plus à partir de l'adolescence, voire chez les adultes. Ce suivi est d'autant plus important pour XO qui présente 4 tendances qui vont dans le même sens avec certaines complications cliniques. Ces tendances seront-elles confirmées ou infirmées ? Des études de confirmation peuvent également être réalisées sur cette cohorte pour des gènes dont certains SNPs ont été associés à une complication particulière de la drépanocytose et qui ont été identifiés par l'approche gène-candidat (623, 624). Parmi ces gènes nous pouvons citer l'IL-1 β et l'IL-6 dont, certains polymorphismes seraient associés à un risque accru d'ostéonécrose, à une pression artérielle pulmonaire élevée et à un nombre de réticulocytes absolu plus bas (IL-1 β + 3954C> T), mais aussi à un risque plus élevé de rétinopathie et d'ulcère de jambe (IL-6-597G> A) (276). Nous avons aussi le gène APOL1 dont

certaines variants (AGGF1, CYP4B1, CUBN, TOR2A, PKD1L2 et CD163) affecteraient le débit de filtration glomérulaire dans la drépanocytose (274, 275).

Il serait aussi intéressant de calculer la mortalité à la même période, ce qui contribuera à évaluer la sévérité de la maladie car lors de la collecte des données cliniques sur les deux ans, nous n'avons pas enregistré de décès. Cette absence de mortalité pourrait être liée à la prédominance de l'haplotype Sénégal qui confère à ces enfants une moindre sévérité clinique. Ces résultats étant obtenus avec l'haplotype Sénégal, il serait intéressant d'établir des collaborations avec d'autres équipes qui travaillent sur des haplotypes plus sévères tels que l'haplotype Bantu ou Bénin afin de confirmer ou d'infirmer nos résultats, à la fois pour les associations QTLs de l'HbF / alpha-thalassémie et pour les gènes du stress oxydant. Il s'agira de refaire ce travail sur des cohortes caractérisées par la prédominance d'un haplotype comme la cohorte de Wonkam et *al.* (235) avec plus de 94 % de l'haplotype Bénin ou celle de Muszlak et *al.* (234) avec plus de 88 % de l'haplotype Bantu. En plus de ces cohortes, ces études de confirmation pourraient se faire également sur une cohorte mixte comme celle de Bernaudin et *al.* (212). En effet, cette cohorte française actuelle de 580 enfants SS est caractérisée par les trois principaux haplotypes β globine qui sont bien représentés avec 74 % d'homozygotie : CAR (Bantou / République centrafricaine) (37,4%), suivis de Bénin (24,3%) et Sénégal (12,1%).

ANNEXES

Annexe 1. Test d'Emmel a l'USAD

Conditions de prélèvement : le prélèvement est effectué sur sang veineux dans un tube avec ou sans anticoagulant et il n'est pas nécessaire d'être à jeun.

Matériel et réactifs : Spatule, Métabisulfite de sodium en poudre, Balance de précision, Eau distillée, Flacon de 125 ml, Papier buvard, Lame, Lamelles, Vernis à ongles.

Technique : D'abord, il faut déposer le papier buvard sur le plateau de la balance et calibrer l'appareil. Ensuite, à l'aide de la spatule, prélever la poudre de métabisulfite et la déposer sur le papier buvard. Puis, il faudra peser exactement 2 grammes de cette poudre et les recueillir dans un flacon de 125 mL contenant 100 mL d'eau distillée. Enfin, mélanger et attendre 15 min environ pour que la solution soit stable et tester la solution de métabisulfite à 2% avec les échantillons positifs de la veille. Le contrôle de qualité interne exige de préparer le métabisulfite tous les jours et de le vérifier sur des échantillons considérés connus positifs et négatifs.

Préparation du test : Déposer sur une lame propre une goutte de sang et une goutte de la solution de métabisulfite. Après mélange des deux gouttes, déposer sur le mélange une lamelle en évitant les bulles d'air puis essuyer délicatement l'excès du mélange avec du papier buvard ou une compresse. Enfin, sceller les bords de la lamelle au vernis à ongles pour empêcher le contact des hématies avec l'oxygène de l'air ambiant (Figure 86).



Figure 86. Technique du test d'Emmel

Lecture : Elle se fait au bout de 15 à 30 mn au microscope à un grossissement 40.

Résultats : Lorsque les hématies gardent leur forme régulièrement arrondie, nous rendons 'Test d'Emmel négatif'. Et lorsqu'il y a la présence de nombreuses hématies en forme de faucille, nous rendons 'Test d'Emmel positif' sans comptage des drépanocytes. Les données cliniques (ainsi que l'origine géographique), hématologiques (taux d'Hb et TCMH au minimum) et biochimiques (ferritinémie et idéalement haptoglobine, bilirubine et LDH) sont indispensables pour une interprétation correcte des résultats.

Annexe 2. Protocole expérimental de multiplex alpha

- Mode opératoire

- Préparer le mélange réactionnel à un volume final de 50 µl dans un tube avec les composants suivants, selon les besoins: 1 µl d'ADN génomique, 1 µl d'amorces directes (α 2/3.7-F, MED-F, SEA-F), 1 µl d'amorce reverse (3.7/20.5- R, α 2-R, 4.2-R, - (α) 20.5, MED-R, SEA-R), 25 µl de Go Taq Green (2X), 10 µl de bêtaïne.
- Compléter le mélange réactionnel à un volume final de 50 µl en ajoutant de l'eau stérile.
- Placer les tubes dans un thermocycleur et effectuer 30 cycles avec les étapes suivantes par cycle: dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, dénaturation à 97°C pendant 45s, hybridation à 61°C pendant 1mn 15s, élongation à 72°C pendant 2mn 30 s et enfin une élongation finale à 72°C pendant 5mn.
- Migration électrophorétique : en fonction des tailles de produit attendues, charger un marqueur base 500 sur un gel d'agarose 1.5 % et passer à 100 V pendant 15 à 20 min dans un tampon Tris-borate-EDTA (TBE) 0.5X. Déposer ensuite 4 µl de produit PCR dans chaque puits. Si une Taq classique a été utilisée à la place de la Go Taq Green (2X), il faudra rajouter 2 µl de colorant orange green aux 4 µl de produit PCR. En effet, ce colorant (encore appelé tampon de charge), présente l'avantage d'alourdir l'échantillon afin qu'il sédimente au fond des puits de dépôt creusés dans le gel.
- Après migration, colorer le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 7 à 10mn. Le BET, agent intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques (à manier avec précaution car cancérigène). Le BET est un agent intercalant qui va présenter une fluorescence orangée sous lumière ultraviolette (U.V. de longueur d'onde 312 nm).
- Après des séries de lavage dans de l'eau stérile, visualiser les bandes avec l'appareil gel doc.

Annexe 3. Protocole expérimental de FRET *Xmnl*

Ce mode opératoire comprend deux étapes : une première étape PCR permettant d'avoir des amplicons et une deuxième étape correspondant à la technique HRM sur LC480.

- **Etape 1 : PCR**

- Préparer le mélange réactionnel à un volume final de 20 µl dans un tube avec les composants suivants, selon les besoins : 1 µl d'ADN génomique, 0.5 µl d'amorce directe *Xmnl*-FRET-F, 0.5 µl d'amorce reverse *Xmnl*-FRET-R, 10 µl de Go Taq G2 colorless mix 2x[®].
- Compléter le mélange réactionnel à un volume final de 20 µl en ajoutant de l'eau stérile.
- Placer les tubes dans un thermocycleur et effectuer 35 cycles avec les étapes suivantes par cycle : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, dénaturation à 95°C pendant 30s, hybridation à 58°C pendant 30s, élongation à 72°C pendant 1mn et enfin une élongation finale à 72°C pendant 5mn.
- Retirer les tubes du thermocycleur. Ajouter 2 µl de colorant orange green à 3 µl de produit PCR, bien vortexer.
- Après des séries de lavage dans de l'eau stérile, visualiser les bandes avec l'appareil gel doc.
- Migration électrophorétique : En fonction des tailles de produit attendues, charger un marqueur base 500 sur un gel d'agarose 1.5 % et passer à 100 V pendant 15 à 20 min dans un tampon Tris-borate-EDTA (TBE) 0.5X.
- Après migration, colorer le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 7 à 10mn.

- **Etape 2 : Technique FRET sur LC480**

- Dans les tubes PCR de l'étape 1, mélanger 1 µl de chaque sonde.
- Vortexer, centrifuger et déposer dans une plaque blanche Light Cycler (96 puits).
- Recouvrir d'un film autocollant transparent (pas de doigt sur la plaque).
- Centrifuger à 1500 tours pendant 5 secondes.
- Passer au Light Cycler avec le protocole de fusion suivant : dénaturation à 99°C pendant 10 mn, hybridation des sondes à 50°C pendant 10 s, augmentation progressive de température avec acquisition continue de fluorescence entre 50 à 75°C (transition 0.1°C/s).
- Les résultats seront directement lus sur le graphe avec les températures de fusion suivantes : allele (+) 55-58°C ; allele (-) 62-65°C.

Annexe 4. Exemple de protocole experimental d'HRM

Ce mode opératoire comprend deux étapes : une première étape PCR permettant d'avoir des amplicons et une deuxième étape correspondant à la technique HRM sur LC480.

- **Etape 1 : PCR**

- Préparer le mélange réactionnel à un volume final de 20 µl dans un tube avec les composants suivants, selon les besoins : 2 µl d'ADN génomique, 0.2 µl d'amorce directe et 0.2 µl d'amorce reverse, 10 µl de Go Taq G2 Green®.
- Compléter le mélange réactionnel à un volume final de 20 µl en ajoutant de l'eau stérile.
- Placer les tubes dans un thermocycleur et selon le génotypage (Betica et A-), QTLs HbF et stress oxydant),
- Retirer les tubes du thermocycleur. Ajouter 2 µl de colorant orange green à 3 µl de produit PCR, bien vortexer.
- Après des séries de lavage dans de l'eau stérile, visualiser les bandes avec l'appareil gel doc.
- Migration électrophorétique : En fonction des tailles de produit attendues, charger un marqueur base 500 sur un gel d'agarose 1.5 % et passer à 100 V pendant 15 à 20 min dans un tampon Tris-borate-EDTA (TBE) 0.5X.
- Après migration, colorer le gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 7 à 10mn.

- **Etape 2 : Technique HRM sur LC480**

- Dans un second temps, 1µl d'une solution de Syto9 à 5 mM a été ajouté à 15 µl du produit PCR.
- Vortexer, centrifuger et déposer dans une plaque blanche Light Cycler (96 puits).
- Recouvrir d'un film autocollant transparent (pas de doigt sur la plaque).
- Centrifuger à 1500 tours pendant 5 secondes.
- Passer au Light Cycler avec le protocole de fusion suivant : dénaturation à 99°C pendant 10 mn, hybridation des sondes à 50°C pendant 10 s, augmentation progressive de température avec acquisition continue de fluorescence entre 50 à 75°C (transition 0.1°C/s).

Les résultats seront directement lus sur le graphe avec les températures de fusion selon le type de génotypage (Betica et A-, QTLs HbF et stress oxydant).

Annexe 5. Amorces utilisées pour les génotypages HRM de notre thèse

Gene	NCBI Reference Sequence	SNPs	Méthodes	Amorces	Séquences	Product size (pb)
XDH	NC_000002.12	rs207454	HRM	XDH-HRM_F	5'-CTTAGTGCGCAGGTCAGGGTT-3'	66
				XDH-HRM_R	5'-TGAGGAGAGGAGATGGCCAT-3'	
MPO	NC_000017.11	rs2333227	HRM	MPO-new-HRM-F	5'-ACTCTGACCTCAAGTGATCCA-3'	508
				MPO-taqMan-R	5'-GAAATCTTGGGCTGGTAGTGC-3'	
NFE2L2	NC_000002.12	rs35652124	HRM	NFE2L2-HRM_F	5'-CTAGGGGAGATGTGGACAGC-3'	79
				NFE2L2-HRM_R	5'-GAGACACGTGGGAGTTCAGA-3'	
SOD2	NC_000006.12	rs4880	HRM	SOD2-SEQ-F	5'CACCAGCACTAGCAGCATGT-3'	106
				SOD2-SEQ-R	5'-GGTGACGTTTCAGGTTGTTCA-3'	
G6PD A-, Exon 4	NM_000402.3	c.376A>G; rs105029, c.202G>A	HRM	G6PD A(-) Exon 4 F	5'-CTTCTGCCCGAAAAACACCTT-3'	63
				G6PD A(-) Exon 4 R	5'-ACACCCACCCTTGAAAGG-3'	
G6PD BETICA	NM_000402.3	c.376A>G; c.968T>C	HRM	G6PD-HRM BETICA_F	5'-GGCGAGGCCACCACAAAGG TA-3'	76
				G6PD-HRM BETICA_R	5'-GAGGACGAGGGCTGCAAAAGT-3'	
BCL11A	NC_000002.12	rs4671393	HRM	2p93_F	5'-ACAGCATCAAGGTTCCACACA-3'	100
				2p93_R	5'-GAGCGAGGGGAATCTTAAT-3'	
BCL11A	NC_000002.12	rs1427407	HRM	2P07_F	5'-AACCTTCTAGCACCACCAAAA-3'	38
				2P07_R	5'-CATGTTACTGCAACTTGCTTTT-3'	
HMIP	NC_000006.11	rs28384513	HRM	6q13_F	5'-GAGCGCATAGCTTTCAGAT-3'	82
				6q13_R	5'-GGGAACCTTGAGCTACCTAC-3'	

Annexe 6. Valorisation nationale et internationale de l'étude 1

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

15 – 17 May 2016
Radisson Blu,
Dakar, Sénégal.

9th Meeting of the African Society of Human Genetics (AfSHG)
9^{ème} Congrès de la Société Africaine de Génétique Humaine (AfSHG)

Scientific Program and Abstracts book
Programme Scientifique et Livre des Résumés

Logos at the bottom: CERC, wellcome trust, Galton Institute, PLOS ONE, ALLIANCE, and others.

CF12 Prévalence de l'alpha-thalassémie au sein de la population drépanocytaire sénégalaise

Auteurs /Authors :

Tall Gueye F(1); Ly Dème I(2);Ndour E M(1);Ndiaye Diallo R(1);Gueye P M(1);Diop P A(1);Diagne I(2);Cissé A(1);Joly P(3);Sall Lopez P(1)

1- Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique. Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie.Université Cheikh Anta Diop 2- Hôpital d'Enfants Albert Royer. 3- Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire. Unité de Pathologie Moléculaire de l'hémoglobine. GROUPEMENT HOSPITALIER EDOUARD HERRIOT. Université Claude Bernard Lyon1.

Introduction : La drépanocytose est une affection résultant d'une mutation unique au niveau du gène β -globine, caractérisée par une symptomatologie clinique variable. Différents facteurs génétiques modulateurs ont déjà été validés ou proposés pour leur influence directe ou indirecte sur sa sévérité clinique globale et ses risques de complications spécifiques. Le principal gène modificateur de la drépanocytose validé à ce jour est l'alpha-thalassémie qui oriente la clinique vers les complications vaso-occlusives de la maladie alors qu'elle protégerait contre la survenue des complications hémolytiques.

Objectifs / goals :Au Sénégal, peu de données relatives à la prévalence de l'alpha-thalassémie dans la drépanocytose étant disponibles, notre étude visait dans un premier temps à en déterminer la fréquence allélique globale sur un échantillon représentatif de la population drépanocytaire pédiatrique.

Méthodologie / Method:Trois cent drépanocytaires âgés de 1 à 17 ans (sex-ratio H/F = 1.29) ont été recrutés de façon prospective de janvier 2015 à décembre 2015. Une technique de GAP PCR MULTIPLEX a été utilisée pour rechercher les délétions alpha-thalassémiques les plus communes, à savoir les délétions -3.7, MED, SEA, -20.5 et -4.2. La fréquence allélique de l'alpha-thalassémie a été calculée et sa répartition équilibrée dans la population a été vérifiée au moyen de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

Résultats / Results :Seule la délétion -3.7 kb a été retrouvée. Sa prévalence était de 21% avec 19% pour la forme hétérozygote et 2% pour la forme homozygote. L'application de l'équilibre de Hardy-Weinberg et le test de chi2 ont montré que cette délétion était répartie de façon homogène au sein de notre population d'étude ($p=0,72>0.05$).

Conclusion :Eu égard à la prévalence non négligeable de la délétion -3.7, soit 21%,et de sa répartition homogène au sein de notre population et compte tenu de son implication prouvée dans la symptomatologie de la drépanocytose, il serait important de pouvoir réaliser cette recherche en systématique.

Mots clés /keywords :

Drépanocytose, alpha-thalassémie, gènes modificateurs

Auteur présentateur / presenting author:

Dr Fatou Gueye Tall, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie



XVIII èmes
JOURNEES
MEDICALES
DE DAKAR



MEDECINE • PHARMACIE • ODONTO • VETERINAIRE

LIVRE DES RESUMES

Du 10 au 13 Avril 2017
Faculté de Médecine, de Pharmacie
et d'Odontologie

FRÉQUENCE DES MUTATIONS RESPONSABLES DU DÉFICIT EN GLUCOSE-6-PHOSPHATE DÉSHYDROGÉNASE AU SEIN D'UNE POPULATION DRÉPANOCYTAIRE SÉNÉGALAISE.

GUEYE TALL FATOU1,3,5, MARTIN C.3,4, NDOUR EHM1,5, CONNES P.3,4,8, DÉME LY I.5,6, RENOUX C.2,3, GUEYE PM.1, NDIAYE DIALLO R. 1, LACAN L.2, DIAGNE I.6,7, DIOP PA.1, CISSÉ A.1, LOPEZ SALL P. 1,5, JOLY P.2,3,4
1 LABORATOIRE DE BIOCHIMIE PHARMACEUTIQUE-FMPO, UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP, DAKAR, SENEGAL
2 UF PATHOLOGIE MOLECULAIRE DU GLOBULE ROUGE, LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE GRAND-EST, HOPITAL EDOUARD HERRIOT, HOSPICES CIVILS DE LYON, LYON, FRANCE.
3 LABORATOIRE INTERUNIVERSITAIRE DE BIOLOGIE DE LA MOTRICITE (LIBM) EA7424, EQUIPE «BIOLOGIE VASCULAIRE ET DU GLOBULE ROUGE», UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1, COMUE LYON, FRANCE
4 LABORATOIRE D'EXCELLENCE SUR LE GLOBULE ROUGE (LABEX GR-EX), PARIS, FRANCE
5 CENTRE HOSPITALIER NATIONAL D'ENFANTS ALBERT ROYER- DAKAR, SENEGAL
6 SERVICE UNIVERSITAIRE DE PEDIATRIE-FMPO, UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP, DAKAR, SENEGAL.
7 UFR DES SCIENCES DE LA SANTE - UNIVERSITE GASTON BERGER, SAINT-LOUIS, SENEGAL
8 INSTITUT UNIVERSITAIRE DE FRANCE, PARIS, FRANCE

INTRODUCTION : Le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) est une enzymopathie héréditaire touchant environ 400 millions de personnes dans le monde. La maladie est liée au sexe et se transmet sur le mode récessif. Elle survient suite à des mutations ponctuelles sur le gène G6PD (chromosome X) codant l'enzyme. Les déficits en G6PDH associés à la drépanocytose ne sont pas rares et plusieurs études ont démontré qu'ils étaient associés à un risque accru de vasculopathie cérébrale. Il existe plusieurs variants déficitaires de la G6PD, mais le plus fréquent en Afrique est la G6PD A(-) (c.376A>G; c.202G>A). Les quelques rares études menées au Sénégal sur le déficit en G6PD se sont majoritairement résumées à la détermination de l'activité de l'enzyme, à l'exception d'une qui a mis en évidence une fréquence élevée du variant Betica (c.376A>G; c.968T>C) dans une ethnie particulière (Sérère). Notre travail avait donc pour but d'étudier les prévalences respectives de ces deux variants dans la population drépanocytaire de Dakar, considérée comme représentative de l'ensemble du pays.

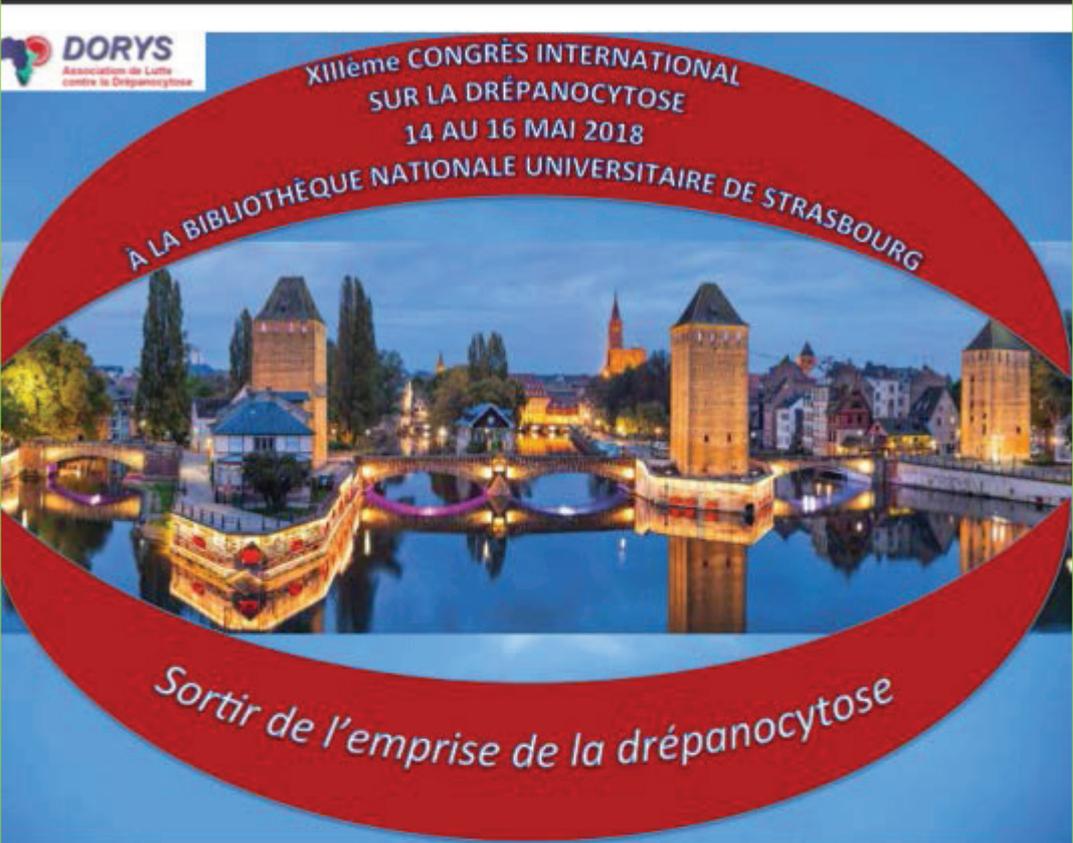
METHODES : Deux cent quatre-vingt-quinze drépanocytaires (167 de sexe masculin et 128 de sexe féminin) âgés de 1 à 17 ans ont été recrutés de façon prospective de janvier 2015 à décembre 2015 au décours d'une hospitalisation pour crise ou d'une consultation de suivi à l'hôpital d'Enfants Albert Royer. Deux protocoles spécifiques HRM (High Resolution Melting) concernant les déficits en G6PD A(-) et Betica ont été utilisés pour rechercher ces variants grâce à un automate de PCR en temps réel, le Light Cycler® 480 (Roche Diagnostics ; Mannheim ; Allemagne). Les fréquences alléliques globales de ces deux variants ont été calculées et leur répartition équilibrée dans la population (homozygotes sauvages, hétérozygotes, homozygotes mutés) a été vérifiée au moyen de l'équilibre de Hardy-Weinberg.

RESULTATS : Après génotypage, le variant Betica était prédominant avec une fréquence allélique de 0,13 pour les deux sexes; la fréquence du variant A (-) était très faible (<0,01 chez les sujets de sexe masculin et 0,02 chez les sujets de sexe féminin). L'application de l'équilibre de Hardy-Weinberg et le test de chi² ont montré que ces mutations étaient réparties de façon homogène au sein de notre population d'étude (p>0.05).

CONCLUSION : Au vu de la quasi-absence du variant A(-) dans notre population d'étude, nous pensons que la recherche isolée spécifique du variant Betica pourrait être suffisante dans le bilan génotypique d'un patient drépanocytaire, en lieu et place de la détermination de l'activité enzymatique. En effet, ce dernier paramètre peut facilement être faussé dans une transfusion ou une crise hémolytique récente et il ne permet pas le dépistage des femmes déficitentes hétérozygotes qui ont la plupart du temps une activité G6PD normale ou sub-normale. Cependant, il est vrai que ceci n'aurait un intérêt clinique que si on démontrait de façon formelle que ces femmes ont une évolution clinique plus péjorative.

Mots clés : Drépanocytose, G6PD A(-), G6PD Betica, HRM

Annexe 7. Valorisation nationale et internationale de l'étude 2



DORYS
Association de Lutte
contre la Drépanocytose

XIII^{ème} CONGRÈS INTERNATIONAL
SUR LA DRÉPANOCYTOSE
14 AU 16 MAI 2018
À LA BIBLIOTHÈQUE NATIONALE UNIVERSITAIRE DE STRASBOURG

Sortir de l'emprise de la drépanocytose



Bibliothèque Nationale Universitaire de Strasbourg
6 Place de la République 67000 Strasbourg



**L'auditorium de la BNU de
Strasbourg**

BIENVENUE
WELCOME

MERCI À TOUS
Constant VODOUHE, président de DORYS

15 mai

2ème JOUR / 2nd DAY

15th May

- 08.15 – 08.40 : Actualités thérapeutiques. **Frédéric GALACTÉROS, Créteil - France**
- 08.40 – 09.15 : Pain research update - pathway to pain-free Sickle Cell Disease.
Kalpna GUPTA, Minneapolis - USA
- 09.15 – 09.40 : Hydroxyurée dans la drépanocytose. Retour sur 30 ans d'expérience et perspectives. **Bernard DAUVERGNE, Paris - France**
- 09.40 – 10.05 : Mécanismes d'actions et utilisation de l'Hydroxyurée chez le patient adulte. **Pablo BARTOLUCCI, Créteil - France**
- 10.15 – 10.30 : Pause**
- 10.30 – 11.00 : Les complications aiguës graves de la drépanocytose.
Armand MÉKONTSO-DESSAP, Créteil - France
- 11.00 – 11.25 : La place de la radiographie interventionnelle dans l'anévrisme cérébral.
Rémy BEAUJEU, Strasbourg, France
- 11.25 – 12.05 : Les atteintes rénales – cas des patients atteints de la drépanocytose.
Vincent AUDARD, Créteil - France
- 12.05 – 12.30 : Drépanocytose : l'interaction clinico-biologique. **Rébecca KOKODÉ, Joigny - France**
- 12.40 – 14.00 : Déjeuner**
- 14.00 – 14.45 : **Greffe haploidentique : expérience de l'hôpital de Cleveland.**
Rabi HANNA, Cleveland - USA
- 14.45 – 15.10 : Greffe chez le patient drépanocytaire : l'expérience française.
Françoise BERNAUDIN, Créteil - France
- 15.10 – 15.35 : Essais cliniques de thérapie génique des hémoglobinopathies sévères.
Yves BEUZARD, Paris - France
- 15.35 – 15.50 : **Discussion**
- 15.50 – 16.10 : Effets combinés des QTLs de l'HbF et de l'alpha-thalassémie sur la sévérité clinique de la drépanocytose dans une population pédiatrique sénégalaise.
Fatou GUEYE TALL, Lyon-Dakar, France-Sénégal
- 16.10 – 16.25 : **Pause**
- 16.40 – 17.05 : Témoignages : Vivre avec la drépanocytose entre la RD Congo et la Belgique
Mimi Minsiemi Maboloko et Esther Cisse Bilambo, Bruxelles, Belgique
- 16.40 – 17.05 : L'infection palustre chez une population d'enfants drépanocytaires sous prophylaxie systématique par la sulfadoxine-pyriméthamine au CRLD de Bamako au Mali. **Dapa DIALLO, Bamako – Mali**
- 17.05 – 17.30 : Corrélation Drépanocytose et Paludisme en zone rurale au Gabon.
Lucrèce DÉLICAT-LOEMBET, Franceville - Gabon
- 17.30 – 18.00 : Rôle de deux mutations chez les drépanocytaires homozygotes Duffy -46C/C dans la faible susceptibilité au VIH et dans la lente progression de l'infection.
Philomène LUNGU ANZWAL, Kinshasa – RDC

Effets combinés des QTLs de l'HbF et de l'alpha-thalassémie sur la sévérité clinique de la drépanocytose dans une population pédiatrique sénégalaise.

Fetou Gueye-Tall^{1,2}, Cyril Martin², Céline Renoux², Philippe Connes^{2,3,4}, Camille Fees², El-hadji Malick Ndour¹, Aynine Cissé¹, Philomène Sell Lopez² et Philippe Joly² → ¹ Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique-FMPO, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal. ² Laboratoire Interuniversitaire de Biologie de la Motricité (UBM) EA7424, Equipe "Biologie vasculaire et du globule rouge", Université Claude Bernard Lyon 1, COMUE Lyon, France. ³ Labex GRex, Paris, France. ⁴ Institut Universitaire de France, Paris, France.

Introduction : La drépanocytose est une maladie génétique caractérisée par une grande variabilité inter-individuelle. Les polymorphismes inducteurs d'HbF (ou quantitative trait loci, QTLs), l'alpha-thalassémie et le déficit en G6PD ont été décrits comme gènes modificateurs de la maladie. Cependant, peu d'études ont étudié leurs effets (isolés ou combinés) sur une population pédiatrique non traitée à l'hydroxyurée, traitement connu pour moduler l'expression d'HbF.

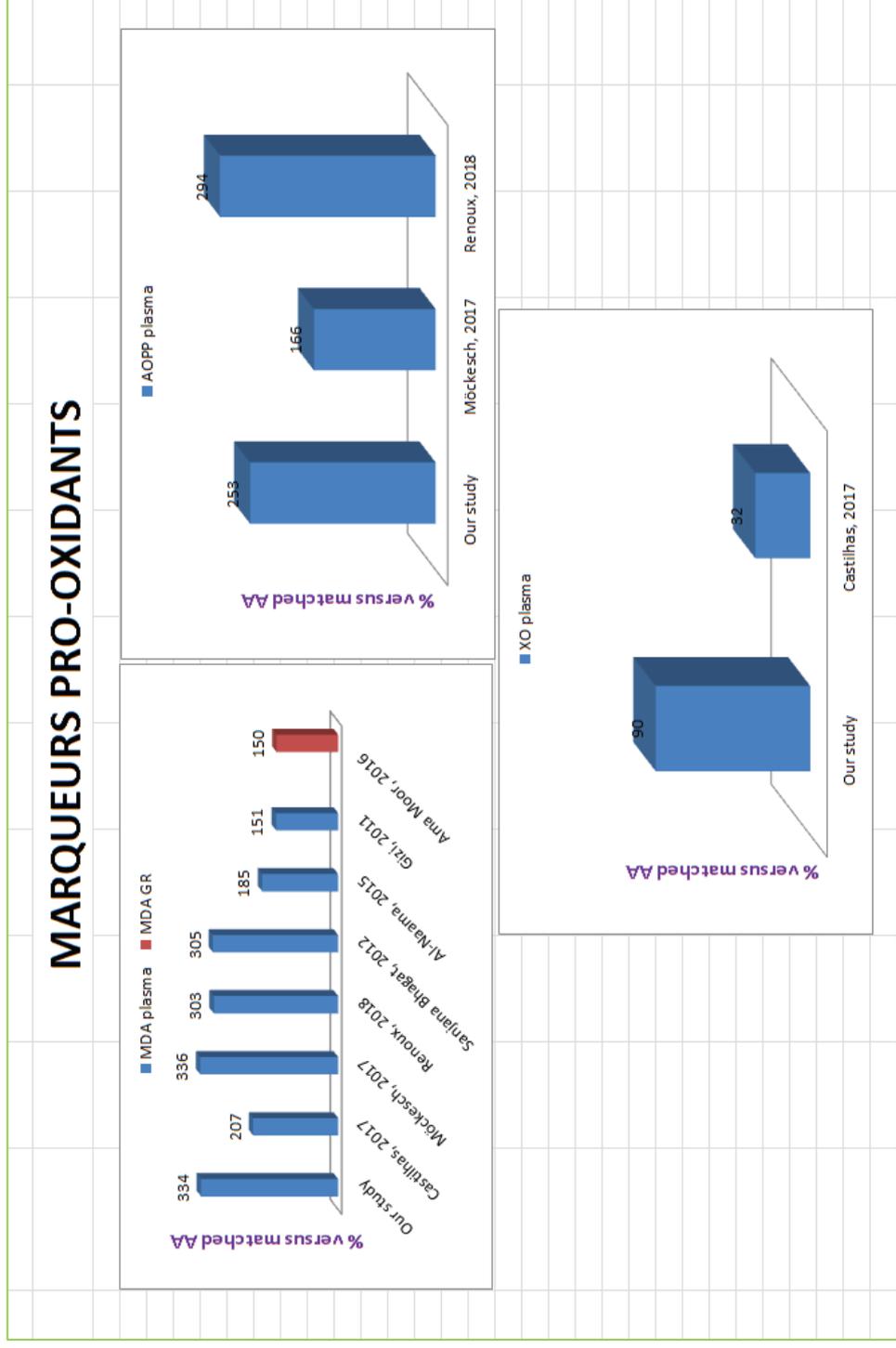
Méthodologie : 301 enfants drépanocytaires sénégalais (âge médian : 9 ans) ont été recrutés à l'hôpital pédiatrique de Dakar. Les principales délétions alpha-thalassémiques (-3.7Kb, MED, SEA, -20.5-Kb et -4.2-Kb) et les principaux variants déficitaires de la G6PD (A-, MED et Betica) ont été recherchés respectivement par gap-PCR multiplex et PCR de fusion haute résolution (ou high resolution melting, HRM). Trois QTLs de l'HbF ont été étudiés soit par HRM, soit par technique de transfert d'énergie par résonance de la fluorescence (fluorescence resonance energy transfer, FRET) : rs7482144 (dit *XmnI*) sur le promoteur *HbG2*, rs4671393 (*BCL11A*) et rs28384513 (espace inter-génique *HBS1L-MYB*). Les allèles mutés ont ensuite été additionnés pour constituer un score de 0 à 6 et les patients ont été classés en 3 groupes selon le nombre de QTLs : [0-1], [2-3] et [4 à 6]. Ces facteurs génétiques ont été corrélés avec les principaux paramètres biologiques mesurés à l'état de base, et trois marqueurs de sévérité clinique : l'âge de la première complication, le nombre de crises vaso-occlusives (CVO) et le nombre d'hospitalisations sur les 2 années précédant l'inclusion. L'effet des QTLs de l'HbF a ensuite été étudié en fonction du génotype alpha : sauvage (population non porteuse de la délétion 3.7Kb), n=235 ou muté (population présentant la délétion), n=66. De même, l'influence du génotype alpha a été étudiée après subdivision de la cohorte en deux selon le nombre de QTLs : [0 à 2], n=158 et [3 à 6], n=143.

Résultats : Le nombre de QTLs de l'HbF était corrélé négativement au taux de globules blancs et de protéine C-réactive à l'état de base. La première complication clinique apparaissait également à un âge significativement plus tardif dans le groupe avec 4 à 6 QTLs ($p < 0.02$). L'alpha-thalassémie, à l'état hétérozygote ou homozygote, entraînait une diminution significative des taux de bilirubine totale et directe. Un déficit homozygote ou hémizygotique en G6PD était associé à un taux significativement plus bas d'HbF ($p = 0.019$), indépendamment du nombre de QTLs HbF et de l'âge. En revanche, les taux d'hémoglobine (Hb) totale, de lactate déshydrogénase et de réticulocytes n'étaient pas modifiés significativement par ces différents facteurs génétiques. L'étude de l'effet combiné de l'alpha-thalassémie et des QTLs de l'HbF sur les paramètres cliniques a montré des résultats très intéressants :

- (i) l'effet protecteur des QTLs de l'HbF sur l'âge de la 1^{ère} complication clinique n'apparaît que pour la sous-population porteuse d'une alpha-thalassémie;
- (ii) une alpha-thalassémie homozygote est associée à des CVO plus fréquentes uniquement chez les enfants avec 3 à 6 QTLs (taux moyens d'HbF et d'Hb totale respectivement de 10.1% et de 7.7 g/dL);
- (iii) un effet protecteur des QTLs de l'HbF sur le nombre d'hospitalisations et sur le nombre de CVO ($p = 0,055$) a été mis en évidence uniquement dans la sous-population non porteuse d'une alpha-thalassémie.

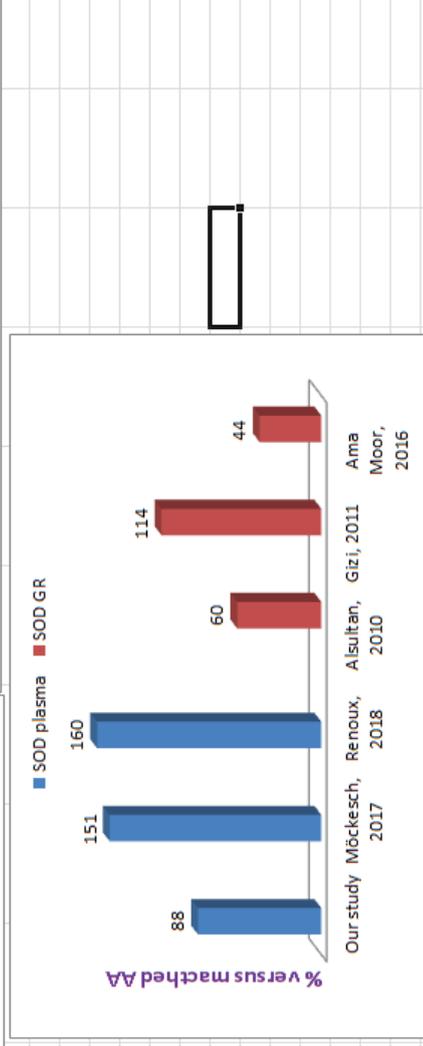
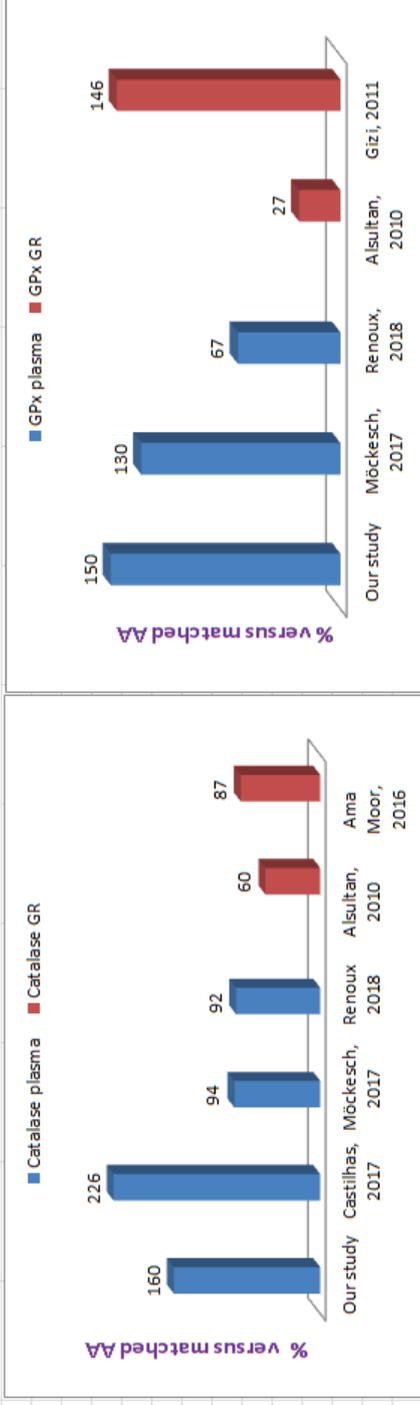
Conclusion : Un nombre élevé de QTLs de l'HbF associé à une alpha-thalassémie semble retarder l'âge de la première complication. Pour la suite de l'évolution clinique, les QTLs de l'HbF semblent diminuer la survenue de CVO pour les patients sans alpha-thalassémie mais ils l'augmenteraient en revanche en cas d'alpha-thalassémie homozygote associée. Selon les critères cliniques retenus, une alpha-thalassémie hétérozygote associée à de nombreux QTLs de l'HbF apparaît donc a priori comme le génotype le plus favorable. Par ailleurs, nous avons montré pour la première fois un effet indépendant du déficit en G6PD sur le taux d'HbF qui reste à confirmer sur une autre cohorte.

Annexe 8. Comparaison des marqueurs du statut oxydant de nos patients avec ceux d'autres études



Pour chaque graphe, les valeurs numériques indiquées représentent les concentrations ou activités exprimées en % de ceux observés chez des témoins AA dosés dans la même étude et avec la même technique.

MARQUEURS ANTI-OXIDANTS



Pour chaque graphe, les valeurs numériques indiquées représentent les concentrations ou activités exprimées en % de ceux observés chez des témoins AA dosés dans la même étude et avec la même technique.



Increased Prevalence of Type 2 Diabetes–Related Complications in Combined Type 2 Diabetes and Sickle-Cell Trait

<https://doi.org/10.2337/dc18-1289>

Sarah C. Skinner,^{1,2} Mor Diaw,³ Vincent Pialoux,^{2,2,4} Maïmouna Ndour Mbaye,⁵ Pauline Mury,^{1,2} Philomène Lopez,⁶ Delphine Bousquet,⁷ Fatou Gueye,⁶ Demba Diedhiou,⁵ Philippe Joly,^{1,2,8} Céline Renoux,^{1,2,8} Djiby Sow,⁵ Saliou Diop,⁹ Brigitte Ranque,^{2,10} Agnès Vinet,¹¹ Abdoulaye Samb,³ Nicolas Guillot,⁷ and Philippe Connes^{1,2,4}

OBJECTIVE

The prevalence of type 2 diabetes (T2D) is rapidly increasing in Sub-Saharan Africa, where sickle-cell trait (SCT) is also frequent. Although SCT is generally considered a benign condition, evidence suggests that SCT could exaggerate vascular dysfunction in T2D. However, it remains unclear whether SCT could increase the risk of the development of T2D complications. Therefore, this study was conducted to determine whether T2D complications were more prevalent among Senegalese individuals with SCT and T2D than among those with T2D only.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Rates of hypertension, retinopathy, peripheral neuropathy, peripheral artery disease, and impaired renal function as well as arterial stiffness, blood rheology, and concentrations of plasma advanced glycation end products (AGEs) and cytokines were compared between groups of Senegalese individuals with combined SCT and T2D (T2D-SCT) ($n = 60$), T2D ($n = 52$), SCT ($n = 53$), and neither T2D nor SCT (control) ($n = 56$). Human aortic endothelial cell (HAEC) expression of inflammatory and adhesion factors were measured after treatment with tumor necrosis factor- α and subjects' plasma. Effects of AGE inhibition or tiron on HAEC expression of E-selectin was measured.

RESULTS

Retinopathy, hypertension, and reduced renal function were more prevalent, and arterial stiffness, blood viscosity at high shear rates, and thixotropic index were higher in the SCT group compared with the other groups. Multivariable analysis showed that plasma AGE concentration was significantly associated with arterial stiffness. E-selectin expression was elevated in HAECs treated with T2D-SCT plasma compared with the other groups, but AGE inhibition reversed this.

CONCLUSIONS

SCT could potentially augment the risk of the development of T2D-related complications, including retinopathy, nephropathy, and hypertension.

Type 2 diabetes (T2D) is an insidious disease characterized by progressive insulin resistance, resulting in elevated levels of blood glucose (1). Hyperglycemia results in increased levels of advanced glycation end products (AGEs), oxidative stress, chronic low-grade inflammation, and platelet hyperactivity (2). These biological alterations lead to impaired endothelial function, increased vasoconstriction, abnormal

¹Inter-university Laboratory of Biology of Motor Function EA7424, Vascular Biology and the Red Blood Cell Team, Claude Bernard University Lyon 1, University de Lyon 1, Villeurbanne, France

²Laboratory of Excellence GR-EX, Paris, France

³Laboratory of Physiology and Functional Exploration, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

⁴Institute of Universities of France, Paris, France

⁵Medical Clinic II, Abass Ndao Hospital Center, Dakar, Senegal

⁶Laboratory of Pharmaceutical Biochemistry, University of Medicine, of Pharmacy, and Odontology, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

⁷Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM 1060, Institut National des Sciences Appliquées 1397, Université Claude Bernard Lyon1, Institut National des Sciences Appliquées Lyon, Villeurbanne, France

⁸Laboratory of Biochemistry of Erythrocyte Pathologies, Biology Center East, Bron, France

⁹Laboratory of Hemato-Immunology, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Dakar, Senegal

¹⁰INSERM, UMR_S970, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

¹¹Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Université d'Avignon, Avignon, France

Corresponding author: Philippe Connes, pconnes@yahoo.fr.

Received 15 June 2018 and accepted 24 September 2018.

N.G. and P.C. contributed equally to this work.

© 2018 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. More information is available at <http://www.diabetesjournals.org/content/license>.

blood rheology, and a prothrombotic state, thereby augmenting the risk of microvascular and macrovascular complications (2). An estimated 425 million people around the globe have T2D, and current projections indicate that this number will increase by 48% by 2045 (3). The prevalence of T2D is increasing particularly rapidly in Africa, where urbanization, lifestyle changes, and an aging population contribute to an expected 162% increase in the disease by 2045 (3).

Sickle-cell trait (SCT), the heterozygous form of sickle-cell anemia, is highly frequent in Sub-Saharan African countries, with an estimated prevalence of 6–10% in Senegal (4). Sickle-cell anemia is caused by the mutation of the sixth amino acid of the β -globin gene, and results in the production of abnormal hemoglobin, called hemoglobin S (HbS) (5). Under deoxygenated conditions, HbS polymerizes and rigidifies, leading to severe acute and chronic complications (5). Unlike sickle-cell anemia, SCT is generally considered to be benign (6). However, accumulating evidence shows that individuals with SCT have altered blood rheology and increased coagulation activity (6–8). Moreover, studies show that SCT may increase the risk of stroke, venous thromboembolism, chronic kidney disease, and end-stage renal disease (9).

The high and increasing rates of T2D in Sub-Saharan Africa indicate that there is likely a large and growing population of individuals with both SCT and T2D. This could become problematic as a recent study suggests that SCT could exaggerate vascular dysfunction and arterial stiffness in T2D, and also could amplify blood rheological alterations, oxidative stress, AGE, and inflammation (10). However, it remains unclear whether SCT could increase the risk of the development of diabetes-related vascular complications (11–14).

Therefore, the primary objective of this study was to determine whether T2D complications are more prevalent among individuals with combined T2D and SCT (T2D-SCT) than among individuals with T2D alone. The secondary objective was to explore the possible mechanisms implicated in the pathogenesis of vascular complications in individuals with both SCT and T2D.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Setting and Participants

This study was performed at the Cheikh Anta Diop University in Dakar, Senegal. A total of 221 subjects were recruited from the Diabetic Centre at the Hospital Abass Ndao, from the National Center of Blood Transfusion, and from the general population in Dakar. Subjects were screened for T2D and SCT, and then assigned to one of the following four groups: subjects with T2D-SCT ($n = 60$); subjects with T2D ($n = 52$); subjects with SCT ($n = 53$); and subjects with neither SCT nor T2D (control group; $n = 56$). Calculations conducted prior to subject recruitment demonstrated that a minimum total sample size (all groups combined) of 57 participants would be required to address the main objective of the study ($\alpha = 0.05$, power = 90%). T2D was defined using the American Diabetes Association *Standards of Medical Care in Diabetes* guidelines (15). Biological analyses were conducted to confirm whether subjects were carriers of the HbS gene. Briefly, blood was screened using isoelectric focusing. Results were then confirmed using citrate agar electrophoresis, hemoglobin fraction quantification using high-performance liquid chromatography, and a solubility test to confirm the presence of HbS. The high-performance liquid chromatography results were also used to confirm that subjects had no other hemoglobinopathies.

Individuals who smoked as well as women who were pregnant or using oral contraception were excluded from the study. The majority of subjects in the T2D (71.2%) and T2D-SCT (71.7%) groups were treated with metformin, sulfonylureas, insulin, or a combination of these. The other T2D and T2D-SCT subjects were not taking any other medications to treat T2D. All participants were Senegalese. The study protocol was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Cheikh Anta Diop University (reference: 0221/2016/CER/UCAD). All subjects gave informed, written consent.

Clinical Examination

Blood Sampling

Subjects arrived at the Laboratory of Medical Physiology (Cheikh Anta Diop University) at 8:00 AM, after an overnight fast. All of the subjects were instructed to

refrain from physical activity for 24 h before the visit. Blood was drawn into heparin tubes for lipid measurement, fluoride tubes for glucose measurement, and EDTA tubes for analyses of hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}), blood rheology, AGEs, and cytokines. The blood samples used to measure AGEs and the cytokines were immediately centrifuged, and the plasma was then stored at -80°C until analyses were conducted.

Blood Pressure and Pulse Wave Velocity

Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured in the left arm using a manual sphygmomanometer (Omron M3; Intellisense, Kyoto, Japan), while the subject remained in a seated position. The measurements were taken three times after a 30-min period of rest. Mean arterial pressure (MAP) was calculated as $\text{DBP} + (\text{SBP} - \text{DBP})/3$. The carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) was measured using an automated system (Pulse Pen; DiaTecne, Milan, Italy). The carotid and femoral waveforms were measured simultaneously using two pressure-sensitive transducers. The transit time of the pulse wave was calculated by the system software. The distance between the carotid and femoral measurement sites was measured over the body surface using a tape measure. The PWVs were calculated as the distance between the two measurement sites divided by the transit time (in meters per second). In order to cover the entire respiratory cycle, at least 12 readings were performed successively on each subject. The mean of three consecutive measures was calculated and used as the PWV value. The same trained individual performed all PWV measurements.

T2D-Associated Complications

All subjects were screened for hypertension, retinopathy, peripheral neuropathy, peripheral artery disease, and impaired renal function. Hypertension was defined as SBP >130 mmHg or DBP >80 mmHg, or the use of antihypertensive drugs (16). Indirect ophthalmoscopy with a noncontact slit lens lamp was used to assess the presence of retinopathy. The subjects were screened for diabetic peripheral neuropathy using the Semmes-Weinstein Monofilament Examination on three test sites (the great toe, the third metatarsal, and the fifth metatarsal) (17). Ankle brachial pressure

was calculated using a Doppler probe to confirm the presence or absence of peripheral artery disease (ankle brachial systolic pressures index <0.90).

Urinary albumin concentration (UAC) was measured using early morning spot urine (HemoCue Albumin 201 System). Serum creatinine level was measured using the standard Jaffe method. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiological Equation, and the appropriate corrections for race and sex were applied (18). Subjects with an eGFR <60 mL/min/1.73 m² were classified as having reduced renal function (moderately or severely decreased eGFR) (18).

Laboratory Analyses

Biochemical Parameters

Fasting glucose was measured using an enzymatic glucosidase-peroxidase method (Urit Medical Electronic Co., Guilin, People's Republic of China). HbA_{1c} was measured using capillary electrophoresis on a Capillary 3 Tera device (Sebia, Lisses, France). Plasma lipids (triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, and LDL cholesterol) were evaluated using standard enzymatic methods.

Hemorheological Parameters

Hematocrit was measured after blood microcentrifugation. Plasma viscosity was measured at 37°C using a cone-plate viscometer at a shear rate of 375 s⁻¹. Oxygenated whole blood at native hematocrit was used to measure whole-blood viscosity at varying shear rates (5.62, 11.25, 22.5, 45, 90, 225, and 375 s⁻¹), at 37°C, using a cone-plate viscometer (Pro DV-II+, with CPE40 spindle; Brookfield, Middleboro, MA). Furthermore, a "loop protocol" was used to characterize the blood thixotropic index, a measure that reflects the impact of altered red blood cell aggregation, and deformability (to a lesser extent), on blood viscosity (19). For this method, a cone-plate viscometer is used to measure blood viscosity because the shear rate is increased every 30 from an initial shear rate of 22.5 s⁻¹ to a maximum shear rate of 225 s⁻¹ (curve 1). The shear rate is then decreased every 30 progressively back to the original shear rate (curve 2). The difference between the blood viscosities at each shear rates on curve 1 and curve 2 were calculated for each subject, and then plotted versus

shear rate. The area under the curve for this graph was calculated for each subject and corresponded to the thixotropic index (19,20).

AGEs and Cytokines

ELISA kits were used to measure plasma concentrations of AGEs (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA) and interleukin (IL)-1 β (Genetex, Irvine, CA). The ELISA assays were carried out according to the manufacturer instructions. The Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-Plex Immunoassay Kit (Bio-Rad) was used to measure concentrations of IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interferon- γ , and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in subjects' plasma. The assays were performed following the instructions with the kit, and cytokine concentrations were measured using the MAGPIX xPONENT 4.2 System (Luminex Corporation, Austin, TX).

Human Aortic Endothelial Cells Culture and Treatment

A subset of 25 plasma samples (control $n = 7$; T2D $n = 7$; SCT $n = 5$; T2D-SCT $n = 6$) was randomly selected from the whole cohort for use in cell culture experiments. Human aortic endothelial cells (HAECs) from PromoCell were grown in Endothelial Cell Medium MV2 (PromoCell) and treated with TNF- α (0.3 ng/mL), either alone or together with plasma (5%), for 4 h.

Flow Cytometry: E-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1

HAECs were detached using accutase (Thermo Fisher Scientific), labeled with FITC-conjugated antibodies against CD106 (vascular cell adhesion molecule-1 [VCAM-1], clone STA; Thermo Fisher Scientific) and phycoerythrin-conjugated antibody against CD62E (E-selectin, clone P2H3; eBioscience), and then analyzed using an Accuri C6 Flow Cytometer (Becton Dickinson).

Flow Cytometry: The Effect of an Antioxidant (Tiron) or AGE Inhibition on HAEC E-Selectin Expression

The effects of reactive oxygen species and AGEs on HAEC E-selectin expression were tested in control subjects ($n = 5$) and individuals with T2D-SCT ($n = 6$) using tiron (ab146234; Abcam), a cell-permeable superoxide scavenger and antioxidant, or aminoguanidine hydrochloride (ab120123; Abcam), an AGE inhibitor. HAECs from PromoCell were grown in

Endothelial Cell Medium MV2 (PromoCell) and treated for 4 h with TNF- α (0.3 ng/mL) together with plasma (5%) from control subjects or subjects with T2D-SCT, with plasma (5%) from control subjects or subjects with T2D-SCT and tiron (5 mmol/L), or with plasma (5%) from control subjects or subjects T2D-SCT and aminoguanidine hydrochloride (5 mmol/L).

HAECs were detached using accutase (Thermo Fisher Scientific), labeled with a phycoerythrin-conjugated antibody against CD62E (E-selectin, clone P2H3; eBioscience), and then analyzed using an Accuri C6 Flow Cytometer (Becton Dickinson).

Real-Time Quantitative PCR: Zonula Occludens-1 and Nuclear Factor- κ B

Analysis of HAECs was performed using established protocols. Total RNA was isolated from cells using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Real-time quantitative PCR was performed using diluted cDNAs and LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche). Triplicate assays were performed for both genes (nuclear factor- κ B [NF- κ B] and zonula occludens-1 [ZO-1]). Gene expression was normalized with TATA-binding protein.

Western Blotting

HAEC lysate preparation and Western blotting were performed as previously described (21). Semiquantitative assessment of band density was performed using ImageJ software. Band density for the protein of interest was normalized to β -actin. Antibodies against phospho- and total p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) were purchased through Cell Signaling Technology (Danvers, MA). β -Actin antibody was purchased from Sigma-Aldrich.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SD. One-way ANOVA tests were performed with Tukey post hoc tests (to answer the primary objective) and with the Holm-Bonferroni correction (to answer the secondary objective, which is more exploratory) to compare differences among groups for mean age; SBP; DBP; MAP; PWV; anthropometric, biochemical, and biological parameters; microalbumin; serum creatinine; and eGFR. Differences between groups for PWV were also determined by ANCOVA, using MAP as a covariate. χ^2 tests were used to compare

the sex distribution, and the frequency of hypertension, retinopathy, peripheral neuropathy, peripheral artery disease, and impaired renal function between groups. A multivariate linear regression model was used to predict the independent associations between PWV and several parameters of interest. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. Analyses were conducted using SPSS Statistics software (version 24; IBM, Chicago, IL).

RESULTS

Anthropometrics, Blood Pressures, and Biochemical Parameters

There were no significant differences in sex distribution or age among the four groups (Table 1). The duration of

diabetes did not differ between the T2D (6.7 ± 5.7 years) and T2D-SCT (5.9 ± 4.6 years) groups. Furthermore, there was no significant difference between the proportion of subjects receiving metformin (T2D group 63.4%; T2D-SCT group 50.0%), sulfonylurea (T2D group 21.2%; T2D-SCT group 16.7%), or insulin (T2D group 5.7%; T2D-SCT group 10.0%) treatment between the T2D and T2D-SCT groups.

BMI, SBP, MAP, HbA_{1c}, and fasting glucose levels were higher in subjects with T2D compared with those without T2D (Table 1). DBP was significantly higher in the T2D group compared with the SCT group, and was significantly higher in the T2D-SCT group compared with the control and SCT groups. LDL

cholesterol was elevated in the two groups with T2D compared with the control group. Total cholesterol level was higher in the T2D group compared with the control and SCT groups, and was elevated in the T2D-SCT group compared with the control group (Table 1). Triglyceride levels were higher in the T2D-SCT group compared with the three other groups (Table 1). HDL cholesterol was lower in the two groups with T2D compared with the control group (Table 1).

T2D-Associated Complications

Retinopathy, hypertension, and reduced renal function were significantly more frequent in the T2D-SCT group compared with the three other groups (Table 2). The prevalence of neuropathy was elevated

Table 1—Participant characteristics and biochemical parameters

	Control	T2D	SCT	T2D-SCT
N (male/female)	18/38	15/37	13/40	12/48
Age (years)	50.0 ± 6.5	53.1 ± 8.4	49.3 ± 5.7	50.8 ± 8.8
Years since diagnosis		6.7 ± 5.7		5.9 ± 4.6
Weight (kg)	70.6 ± 11.4	74.5 ± 11.7	67.9 ± 10.5	76.3 ± 13.2†
BMI (kg/m ²)	23.7 ± 3.6	26.1 ± 4.6**	23.3 ± 3.2	27.1 ± 4.5**†
DBP (mmHg)	73 ± 10	79 ± 12†	72 ± 10	82 ± 11**†
SBP (mmHg)	118 ± 11	135 ± 23**†	120 ± 13	131 ± 21**†
Mean arterial BP (mmHg)	87.9 ± 8.6	88.2 ± 9.1**†	97.4 ± 14.3	98.6 ± 12.3**†
HDL cholesterol (mmol/L)	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2*	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.3*
LDL cholesterol (mmol/L)	0.1 ± 0.5	1.5 ± 0.6*	1.2 ± 0.6	1.5 ± 0.6*
T-chol (mmol/L)	1.6 ± 0.5	2.2 ± 0.6**†	1.8 ± 0.6	2.1 ± 0.6*
TG (mmol/L)	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.6	0.9 ± 0.4	1.3 ± 0.9**†
FPG (mg/dL)	93.4 ± 23.3	162.4 ± 75.2**†	87.0 ± 14.8	186.7 ± 80.0**†
HbA _{1c} (%)	5.2 ± 0.6	7.0 ± 1.9**†	5.1 ± 0.8	7.6 ± 2.4**†
HbA _{1c} (mmol/mol)	33.8 ± 6.9	53.4 ± 20.8**†	32.5 ± 9.0	59.6 ± 26.3**†
UAC (mg/L)	13.3 ± 12.3	80.2 ± 96.2*	59.1 ± 51.2*	79.1 ± 100.3*
Serum creatinine (mg/dL)	0.76 ± 0.2	1.1 ± 0.4	0.98 ± 0.3	1.5 ± 1.0**†
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	115.0 ± 115.0	83.7 ± 26.6*	87.6 ± 25.1*	67.7 ± 34.6**†
Hematocrit (%)	40.5 ± 2.5	40.6 ± 2.0	40.3 ± 2.4	41.1 ± 2.3
Plasma viscosity (cP)	1.5 ± 0.34	1.6 ± 0.42	1.4 ± 0.43	1.6 ± 0.36
Blood viscosity (cP) at 5.62 s ⁻¹	9.9 ± 1.3	11.2 ± 1.2*	10.4 ± 1.2	11.6 ± 1.6**†
Blood viscosity (cP) at 11.25 s ⁻¹	8.9 ± 1.2	9.9 ± 1.1**†	9.2 ± 1.1	9.9 ± 1.2**†
Blood viscosity (cP) at 22.5 s ⁻¹	7.8 ± 1.1	8.8 ± 0.98**†	8.0 ± 0.8	8.5 ± 1.1*
Blood viscosity (cP) at 45 s ⁻¹	6.7 ± 1.0	7.3 ± 0.9*	6.9 ± 0.8	7.5 ± 1.0**†
Blood viscosity (cP) at 90 s ⁻¹	5.8 ± 0.7	6.2 ± 0.7*	6.0 ± 0.6	6.7 ± 1.0**†
Blood viscosity (cP) at 225 s ⁻¹	4.7 ± 0.6	5.5 ± 0.6*	5.3 ± 0.7*	6.0 ± 1.0**†
Blood viscosity (cP) at 375 s ⁻¹	4.1 ± 0.5	4.8 ± 0.5*	4.6 ± 0.7*	5.1 ± 0.9**†
Thixotropic index	1,748 ± 416	1,744 ± 433	1,680 ± 495	2,038 ± 381**†
AGEs (μg/mL)	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.5	1.5 ± 0.4	1.9 ± 0.7**†
IL-1β (pg/mL)	9.0 ± 1.7	9.5 ± 2.5	9.0 ± 1.6	9.2 ± 1.3
IL-6 (pg/mL)	0.00028 ± 0.0002	0.00031 ± 0.0002	0.00032 ± 0.0002	0.00023 ± 0.0002
IL-8 (pg/mL)	0.0030 ± 0.002	0.0036 ± 0.002	0.0032 ± 0.001	0.0034 ± 0.001
TNF-α	0.0048 ± 0.002	0.0055 ± 0.002	0.0049 ± 0.002	0.0049 ± 0.002

Data are the mean ± SD. cP, centipoise; FPG, fasting plasma glucose; T-chol, total cholesterol; TG, triglyceride. *Different from control. †Different from T2D. ‡Different from SCT, according to the *P* value established by the Holm-Bonferroni correction.

Table 2—Prevalence of hypertension, retinopathy, neuropathy, peripheral artery disease, and reduced renal function in the control, T2D, SCT, and T2D-SCT groups

Target organ complication	Control	T2D	SCT	T2D-SCT	P value
N	56	52	53	60	
Hypertension	14 (25%)	27 (51.9%)	18 (34.0%)	41 (68.3%)	<0.001
Retinopathy	0 (0.0%)	14 (28%)	3 (5.7%)	31 (51.7%)	<0.001
Neuropathy	0 (0%)	7 (17.5%)	0 (0%)	8 (17.4%)	0.001
PAD	0 (0%)	1 (2.5%)	0 (0%)	2 (4.3%)	0.399
Reduced renal function	0 (0%)	10 (19.2%)	3 (5.7%)	23 (38.3%)	<0.001

PAD, peripheral artery disease. Reduced renal function is classified as eGFR <60 mL/min/1.73 m².

in the two T2D groups compared with the control and SCT groups (Table 2). Finally, the prevalence of peripheral artery disease did not vary significantly among the four groups (Table 2). The average values for UAC, serum creatinine concentration, and eGFR for each group are displayed in Table 1. UAC was higher in the T2D and T2D-SCT groups compared with the control group. Serum creatinine concentration was significantly higher in the T2D-SCT group compared with the other three groups. The eGFR was higher in the control group compared with the other three groups, and was lower in the T2D-SCT group compared with the other three groups. Three subjects in the SCT group presented with retinal hemorrhages, which occur in the early stages of diabetic and nondiabetic retinopathy.

PWV

PWV was higher in the T2D group compared with the control group only. Additionally, PWV was significantly higher in the T2D-SCT group compared with the other three groups, even when MAP was fixed as a covariate (Fig. 1).

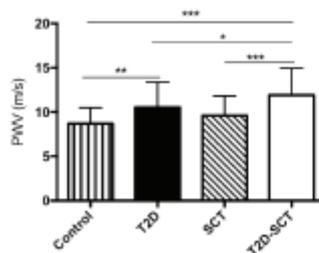


Figure 1—PWV values of patients with T2D with SCT (T2D-SCT) or without SCT (T2D) and of individuals without T2D with SCT or without SCT (Control). The two extremities of the horizontal bars indicate the difference between two given groups (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$). Results are presented as the mean \pm SD.**

Multivariate Analysis

Five variables were included in the model to predict PWV: plasma AGE concentration, blood viscosity at 225 s, age, triglyceride level, and HbA_{1c}. The other variables, which were significantly different between groups by univariate analyses were not included into the model because of the high risk of collinearity effect (variance inflation factor >3) with one of the five variables included. The overall model was statistically significant ($R^2 = 0.09$; $df = 5$; $P < 0.05$). AGE concentration was significantly associated with PWV ($\beta = 0.16$; $P = 0.04$), and blood viscosity was marginally associated with PWV ($\beta = 0.15$; $P = 0.08$).

Hemorheological Parameters

No significant differences in hematocrit or plasma viscosity were observed between groups (Table 1). Whole-blood viscosity was higher in the two T2D groups compared with the control and SCT groups at low shear rates ranging from 5.62 to 45 s⁻¹ with the following exceptions: at 22.5 s⁻¹ blood viscosity was higher in the T2D-SCT group compared with the control group only (Table 1). At higher shear rates (90–375 s⁻¹), blood viscosity in the T2D group was elevated only in comparison with the control group, whereas blood viscosity was higher in the T2D-SCT group compared with the other three groups (Table 1). Furthermore, blood viscosity was higher in the SCT group compared with the control group at the two highest shear rates (225–375 s⁻¹) (Table 1). The thixotropic index was significantly greater in the T2D-SCT group compared with the other three groups (Table 1).

Plasma AGEs and Cytokines

Plasma concentrations of AGEs were significantly increased in the T2D-SCT

group compared with the control and SCT groups, and there was a trend for elevated AGE levels in the T2D-SCT group compared with the T2D group after application of the Holm-Bonferroni correction ($P = 0.03$) (Table 1). Plasma concentrations of IL-1 β did not vary among groups (Table 1). No statistical differences in plasma concentrations of IL-6, IL-8, and TNF- α were found among groups (Table 1). The plasma concentrations of IL-2, IL-4, IL-10, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon- γ were very low, and below the limits of detection of the kits used.

FACS: E-Selectin and VCAM-1

After incubation with plasma, HAEC expression of E-selectin was significantly higher in the T2D-SCT group compared with the other three groups. No differences in the expression of VCAM-1 were observed among the groups (Fig. 2A).

Incubation of HAECs with plasma and aminoguanidine hydrochloride significantly reduced the HAEC expression of E-selectin in the T2D-SCT group only, whereas incubation of HAECs with plasma and tiron resulted in reduced HAEC expression of E-selectin in both the control and T2D-SCT groups (Fig. 2B).

mRNA Expression

Real-time quantitative PCR revealed no significant difference in the expression of ZO-1 mRNA. NF- κ B mRNA expression was significantly higher in the T2D group compared with the control group (Fig. 2C).

Western Blot

There were no significant differences in expression of phospho- and total p38 MAPK in HAECs among groups (Fig. 2D).

CONCLUSIONS

The primary finding of the current study was that retinopathy, hypertension, and reduced renal function were more prevalent in subjects with SCT and T2D than in those with T2D alone. Our study also found increased arterial stiffness, blood viscosity, thixotropic index, and plasma AGE concentrations in the T2D-SCT group compared with the other three groups. Our results corroborate the findings of a previous study by Diaw et al. (10), which observed amplified vascular dysfunction in individuals with T2D and SCT compared with subjects with T2D, subjects with SCT, and control subjects. However,

few previous studies have evaluated whether SCT could increase the risk of the development of T2D-related complications, and the results of these studies have been contradictory. Indeed, several studies (11,13,14,22) have reported that SCT does not aggravate microvascular or macrovascular complications, whereas several other studies (10,12,23) indicate that SCT could potentially increase the risk of vascular complications in male patients or in all patients with T2D. These conflicting results could be attributed to the fact that the ethnic and racial backgrounds of the study populations varied widely between studies. Furthermore, most of the previous studies had small overall sample sizes, and/or a small number of subjects with T2D-SCT. In the current study, however, all groups were matched for age, ethnicity, and sex.

Interestingly, our results showed no significant differences in urine albumin concentration among the T2D, SCT, and T2D-SCT groups, although eGFR was significantly lower in the T2D-SCT group compared with the other three groups. However, several studies have shown that renal disease in individuals with T2D is heterogeneous, and that renal insufficiency can occur in the absence of albuminuria in individuals with T2D (24).

A large body of evidence suggests that arterial stiffness plays an important role in the pathogenesis of T2D and its complications (25). Indeed, previous studies (25,26) have shown that increased arterial stiffness is associated with the development and progression of hypertension, nephropathy, and retinopathy in individuals with diabetes. Our findings are in accordance with these studies as arterial stiffness was highest in the T2D-SCT group, which also had the highest rates of these complications. PWV, which is considered one of the most reliable measures of arterial stiffness, is strongly associated with blood pressure (27). However, in our study, PWV remained elevated in the T2D-SCT group even when MAP was fixed as a covariate, indicating that differences in arterial pressure are probably not completely responsible for differences in PWV among the groups. In T2D, accelerated arterial stiffening is partially attributed to the formation of AGEs in the arterial wall, which leads to cross-linking

of collagen molecules, resulting in decreased collagen elasticity (26). In our study, plasma AGE concentrations were elevated in the T2D-SCT group. Additionally, the results of our multivariate analysis suggest that the plasma concentrations of AGEs could be the most important factor contributing to the elevated arterial stiffness in the T2D-SCT group. These results suggest that SCT could potentially exaggerate the nonenzymatic glycation cross-linking of collagen, thereby contributing to increased arterial rigidity in these individuals.

Hyperglycemia is one of the primary factors contributing to AGE formation (28). However, in the current study we found no significant differences in HbA_{1c} or fasting glucose levels between the T2D-SCT and the T2D groups, although concentrations of AGEs were significantly higher in the T2D-SCT group. In addition to glucose concentration, AGE concentrations can also be enhanced by oxidative stress (29). Therefore, the elevated AGE concentrations found in the T2D-SCT group could be attributed to the elevated levels of oxidative stress that have been previously observed in individuals with T2D-SCT (10).

Evidence suggests that AGE accumulation promotes the progression of diabetic complications, including nephropathy, retinopathy, and macroangiopathy, both through the formation of cross-links in the basement membrane of the extracellular matrix, and through interaction with the receptor for AGEs (RAGE) (30). AGE-RAGE interaction activates nuclear transcription factors, such as NF- κ B, which can upregulate the transcription of inflammatory proteins, such as VCAM-1 and E-selectin (30). E-selectin is expressed by endothelial cells during inflammation and plays an essential role in mediating leukocyte adhesion to the endothelium (31). Furthermore, increased E-selectin expression may contribute to the pathogenesis of vascular disease in T2D (32). We found that E-selectin expression was upregulated in HAECs treated with plasma from individuals with T2D-SCT compared with HAECs treated with plasma from the other three groups. Furthermore, when the HAECs were treated with plasma from the individuals with T2D-SCT and an inhibitor of AGE formation, the expression of E-selectin significantly decreased; however, there was no significant effect

of AGE inhibition on HAEC E-selectin expression in the control group. These results confirm that AGEs likely contribute to the upregulation of E-selectin expression in the T2D-SCT group.

Our results showed that NF- κ B mRNA expression was not elevated in the T2D-SCT group, and that there were no differences in VCAM-1 expression among groups. These findings suggest that a pathway other than AGE-RAGE activation of NF- κ B could cause the elevated expression of E-selectin found in the T2D-SCT group. The p38 MAPK signaling pathway is another mechanism that modulates the expression of E-selectin (33,34). However, our findings showed no differences in p38 MAPK expression among the groups, suggesting that a different mechanism is most likely responsible for the increased E-selectin protein expression observed in the T2D-SCT group.

Elevated concentrations of proinflammatory cytokines can contribute to the development of vascular dysfunction and microvascular and macrovascular complications in T2D (35). However, in this study, no differences in plasma concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-8, or TNF- α were found among groups, indicating that differences in these proinflammatory cytokines likely do not explain the increased arterial stiffness or the increased rates of vascular complications observed in the T2D-SCT group.

Elevated whole-blood viscosity has been shown to play an important role in the pathogenesis of hypertension (36), diabetic retinopathy (37), and chronic kidney disease (38). In our study, whole-blood viscosity was significantly increased at high shear rates (90–375 s) in the T2D-SCT group compared with the other three groups. Whole-blood viscosity is dependent on plasma viscosity, hematocrit, and red blood cell rheological properties, including red blood cell aggregation and deformability (39). However, hematocrit and plasma viscosity did not vary among groups. Therefore, the increased blood viscosity observed in the T2D-SCT group is likely due to alterations in red blood cell rheological properties (39). The impact of red blood cell rheological properties on blood viscosity is highly dependent on shear rate (39). At low-to-moderate shear rates, red blood cell aggregation is the main determinant of blood viscosity, whereas red blood cell deformability plays a more important

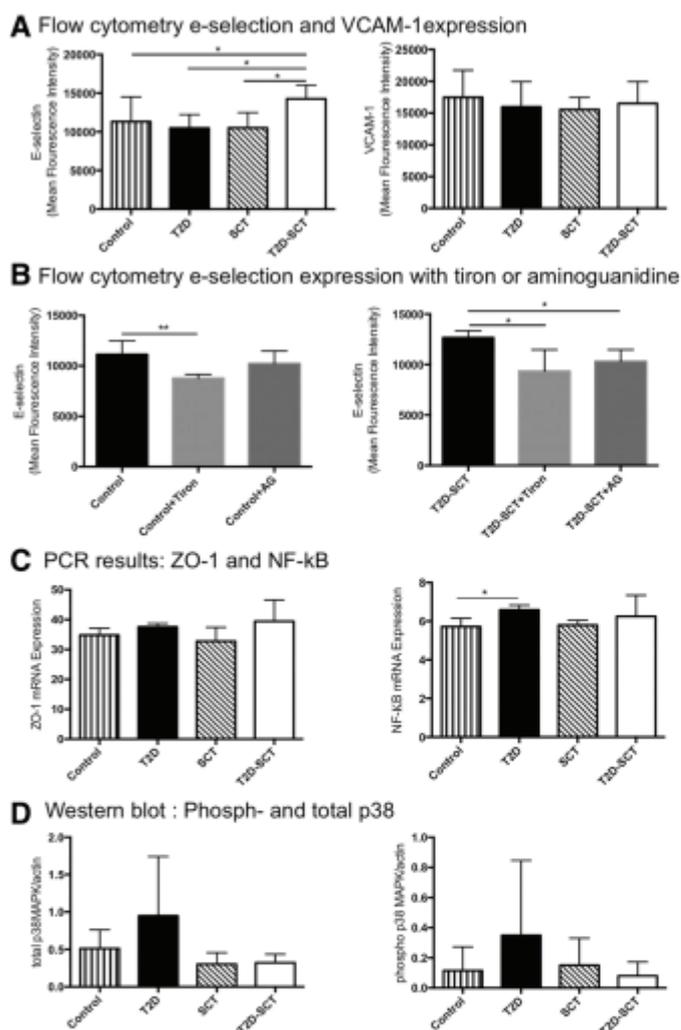


Figure 2—Flow cytometry, real-time quantitative PCR, and Western blot results for subjects with T2D and SCT (T2D-SCT) or without SCT (T2D), and subjects without T2D with SCT (SCT), or without SCT (Control). **A:** Flow cytometry results for E-selectin and VCAM-1 expression in HAECs incubated with TNF- α and plasma from subjects; * $P < 0.05$. **B:** Flow cytometry results for E-selectin expression in HAECs incubated with TNF- α and either control or T2D-SCT plasma (Control or T2D-SCT), control or T2D-SCT plasma and the antioxidant tiron (Control+Tiron or T2D-SCT+Tiron), and control or T2D-SCT plasma with the AGE inhibitor aminoguanidine hydrochloride (Control+AG or T2D-SCT+AG); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **C:** Real-time quantitative PCR for results showing relative mRNA expression of NF- κ B and ZO-1 in HAECs incubated with TNF- α and plasma from subjects; * $P < 0.05$. **D:** Western blot results showing the relative expression of phospho- and total p38 MAPKase in HAECs incubated with TNF- α and plasma from subjects. Results are presented as the mean \pm SD.

role at high shear rates. Decreased red blood cell deformability contributes to increased blood viscosity in both T2D and SCT (8). Indeed, SCT red blood cells contain HbS and have been shown to have increased lactate transporter

activity, which could increase lactate and hydrogen ion accumulation in the red blood cells, thereby decreasing red blood cell deformability (8). Furthermore, in T2D, hyperglycemia leads to increased nonenzymatic glycation of

hemoglobin and membrane proteins in red blood cells, and these alterations are associated with decreased membrane fluidity (39). Evidently, the combination of these factors could potentially amplify decreased red blood cell deformability, and thus increase whole-blood viscosity, in individuals with T2D-SCT. Additionally, the elevated plasma AGE concentrations observed in the T2D-SCT group suggest that nonenzymatic glycation of red blood cell membrane proteins could be increased in these individuals, thereby contributing to the increased red blood cell rigidity (40).

We also observed a higher thixotropic index in the T2D-SCT group compared with the other three groups. Blood is considered a thixotropic fluid because its viscosity depends not only on shear rate, but also on the previous history of motion of the fluid (19). Indeed, at low shear rates, red blood cells form large, reversible aggregates, thereby increasing blood viscosity (19,38). However, as the shear rate rises, viscosity gradually decreases as the aggregates separate into smaller aggregates, and eventually into individual red blood cells (19). If the shear rate is then reduced, red blood cell aggregates will gradually reform, and blood viscosity will increase again (19). Therefore, the increased thixotropic index observed in the T2D-SCT group may reflect the amplified red blood cell alterations present in the T2D-SCT group. Furthermore, the high thixotropic index in the T2D-SCT group could potentially increase vascular disease risk in these individuals because an increased thixotropic index has been linked to the occurrence of microvascular and macrovascular disorders in sickle-cell anemia and coronary artery disease (20, 41).

In conclusion, our study found that hypertension, retinopathy, and decreased renal function were more prevalent in individuals with both SCT and T2D than in those with T2D only. Furthermore, our results suggest that SCT could exacerbate multiple factors that increase the risk of development of T2D-related vascular complications, including arterial stiffness, blood hyperviscosity, AGE accumulation, and increased E-selectin expression. Overall, our results indicate that individuals with T2D-SCT should be monitored more frequently for diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, and hypertension. Additionally, SCT is not

only prevalent in Sub-Saharan Africa, but also in the Middle East, India, and populations of African ancestry in Europe and the Americas; the prevalence of T2D is projected to increase in all of these populations (3,4). Therefore, additional studies are needed to confirm whether or not SCT increases the risk of development of T2D-related vascular complications across all populations (4).

Acknowledgments. The authors would like to thank the personnel of the Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire du Lyon-Est, and of the Laboratoire de Biochimie du Centre Lyon-Sud for their help with measurements of HbA_{1c}. Funding. This work has been partly funded by Campus France.

Duality of Interest. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported. **Author Contributions.** S.C.S. contributed to, implemented, and designed the study; wrote the first draft of the manuscript; and carefully read and approved the final version of the manuscript. M.D. contributed to, implemented, and designed the study; and carefully read and approved the final version of the manuscript. V.P., P.M., and D.S. contributed to the study, and carefully read and approved the final version of the manuscript. M.N.M., P.L., D.B., F.G., D.D., P.J., C.R., S.D., and A.S. contributed to and implemented the study, and carefully read and approved the final version of the manuscript. B.R. and A.V. contributed to and designed the study, and carefully read and approved the final version of the manuscript. N.G. contributed to, implemented, and designed the study; and carefully read and approved the final version of the manuscript. P.C. contributed to and designed the study, reviewed and revised the manuscript, and carefully read and approved the final version of the manuscript. P.C. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

References

- Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* 2016;20:546–551
- Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:2216–2231
- Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 2018;138:271–281
- Piel FB, Patil AP, Howes RE, et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet* 2013;381:142–151
- Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376:2018–2031
- Key NS, Connes P, Derebail VK. Negative health implications of sickle cell trait in high income countries: from the football field to the laboratory. *Br J Haematol* 2015;170:5–14
- Amin C, Adam S, Mooberry MJ, et al. Coagulation activation in sickle cell trait: an exploratory study. *Br J Haematol* 2015;171:638–646
- Connes P, Sara F, Hardy-Dessources MD, Etienne-Julian M, Hue O. Does higher red blood cell (RBC) lactate transporter activity explain impaired RBC deformability in sickle cell trait? *Jpn J Physiol* 2005;55:385–387
- Naik RP, Haywood C Jr. Sickle cell trait diagnosis: clinical and social implications. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2015;2015:160–167
- Diaw M, Pialoux V, Martin C, et al. Sickle cell trait worsens oxidative stress, abnormal blood rheology, and vascular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:2120–2127
- Al Harbi M, Khandekar R, Kozak I, Schatz P. Association between sickle cell trait and the prevalence and severity of diabetic retinopathy. *PLoS One* 2016;11:e0159215
- Oli JM, Reid HL. Do Nigerian diabetics with haemoglobin genotype Hb AS have greater risks of developing renal complications and hypertension? A preliminary report. *Trop Geogr Med* 1985;37:309–313
- Oli JM, Watkins PJ, Wild B, Adegoke OJ. Albuminuria in Afro-Caribbeans with Type 2 diabetes mellitus: is the sickle cell trait a risk factor? *Diabet Med* 2004;21:483–486
- Page MM, MacKay JM, Paterson G. Sickle cell trait and diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1979;63:837–838
- American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* 2018;41(Suppl. 1):S13–S27
- Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APHA/ASH/ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:e127–e248
- Feng Y, Schlösser FJ, Sumpio BE. The Semmes Weinstein monofilament examination as a screening tool for diabetic peripheral neuropathy. *J Vasc Surg* 2009;50:675–682, 682.e1.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–612
- Barnes HA. Thixotropy: a review. *J Non-Newton Fluid Mech* 1997;70:1–33
- Vent-Schmidt J, Waltz X, Romana M, et al. Blood thixotropy in patients with sickle cell anaemia: role of haematocrit and red blood cell rheological properties. *PLoS One* 2014;9:e114412
- Guillot N, Kollins D, Gilbert V, et al. BAMB1 regulates angiogenesis and endothelial homeostasis through modulation of alternative TGFβ signaling. *PLoS One* 2012;7:e39406
- Bleyer AJ, Reddy SV, Sujata L, et al. Sickle cell trait and development of microvascular complications in diabetes mellitus. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1015–1020
- Ajayi AA, Kolawole BA. Sickle cell trait and gender influence type 2 diabetic complications in African patients. *Eur J Intern Med* 2004;15:312–315
- Kramer HJ, Nguyen QD, Curhan G, Hsu CY. Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2003;289:3273–3277
- Prenner SB, Chirinos JA. Arterial stiffness in diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 2015;238:370–379
- Stehouwer CD, Henry RM, Ferreira I. Arterial stiffness in diabetes and the metabolic syndrome: a pathway to cardiovascular disease. *Diabetologia* 2008;51:527–539
- Kim EJ, Park CG, Park JS, et al. Relationship between blood pressure parameters and pulse wave velocity in normotensive and hypertensive subjects: invasive study. *J Hum Hypertens* 2007;21:141–148
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995;46:223–234
- Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 2015;5:194–222
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597–605
- Cij L, Cornelis MC, Kraft P, et al. Genetic variants in ABO blood group region, plasma soluble E-selectin levels and risk of type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 2010;19:1856–1862
- Hellemons ME, Kerschbaum J, Bakker SJ, et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Diabet Med* 2012;29:567–577
- Read MA, Whitley MZ, Gupta S, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997;272:2753–2761
- Zhong L, Huot J, Simard MJ. p38 activation induces production of miR-146a and miR-31 to repress E-selectin expression and inhibit trans-endothelial migration of colon cancer cells. *Sci Rep* 2018;8:2334
- van Greevenbroek MMJ, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med* 2013;71:174–187
- Feher MD. Hypertension in non-insulin dependent diabetes mellitus and its management. *Postgrad Med J* 1991;67:938–946
- Merimee TJ. Diabetic retinopathy. A synthesis of perspectives. *N Engl J Med* 1990;322:978–983
- Gordge MP, Patel A, Faint RW, Rylance PB, Neild GH. Blood hyperviscosity and its relationship to progressive renal failure in patients with diabetic nephropathy. *Diabet Med* 1990;7:880–886
- Baskurt OK, Meiselman HJ. Blood rheology and hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:435–450
- Watala C. Altered structural and dynamic properties of blood cell membranes in diabetes mellitus. *Diabet Med* 1993;10:13–20
- Dintenfass L. Thixotropy of blood and proneness to thrombus formation. *Sogo Rinsho* 1962;11:233–239

Profil épidémiologique et clinique des enfants et adolescents atteints de syndromes drépanocytaires majeurs admis en situation d'urgence en consultation drépanocytose à Dakar

Epidemiological and clinical profile of children and adolescents with emergency in sickle cell pediatric consultation in Dakar

Dème/Ly Indou(1), Ba ID(1), Thiongane A(1), Guèye/Tall F(1), Ba Ai(1), Ba Ab(1), Niang B(1), Ly/Faye F(2), KeitaY(3), Thiam L(4), Diouf FN (4), Lorraine YA(1), Dieng YJ(1), Cissé DF, Mbodj/Diop YF(1), Achnin O(1), Faye PM(1), Fall AL(1), Diouf S(5), Camara B(2), Diagne I(6), Ndiaye O(1).

(1) : Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR) Dakar, Sénégal

(2) : Pédiatrie Centre Hospitalier National de Pikine, Dakar, Sénégal

(3) : Pédiatrie Hôpital Aristide le Dantec Dakar, Sénégal

(4) : Hôpital de la paix, Université Assane Seck de Ziguinchor, Sénégal

(5) : Pédiatrie Centre Hospitalier National Dalal Diam Dakar, Sénégal

(6) : UER Sciences et Santé Université Gaston Berger Saint-Louis, Sénégal

Auteur correspondant : Dr Indou DEME/LY Maître-Assistant Faculté Médecine Pharmacie Odontologie Université Cheikh Anta Diop Dakar, Sénégal. Pédiatre : Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR) Dakar, Sénégal. BP : 25755 Dakar Fann. Tel : 00221 33 859 47 47. Port : 00221 77 657 52 30. E-mail : indou.deme@ucad.edu.sn

Résumé

Introduction : La drépanocytose est caractérisée par un risque de complications aiguës, à l'origine de consultations d'urgences. Notre objectif était de déterminer leur fréquence les caractériser et étudier leur évolution. **Patients et Méthodes** : il s'agit d'une étude rétrospective, de janvier à décembre 2015, au Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR). Nous avons inclus les patients porteurs de syndromes drépanocytaires majeurs, régulièrement suivis et reçus pour situations d'urgences entre 8h et 14h. Ceux reçus en consultation générale du matin, et à la garde n'étaient pas inclus. Les données sociodémographiques, cliniques, para cliniques et évolutives ont été analysées. **Résultats** : Au total, 1715 consultations étaient enregistrées, dont 295 urgences, soit une fréquence de 17,2%, avec 96,3% d'homozygotes SS. Le sex-ratio était de 1 et l'âge médian de 98 mois avec des extrêmes de 15 et 238 mois (19,8 ans). La crise vaso-occlusive (CVO) était observée chez 50,8% des patients. La prise en charge était essentiellement ambulatoire (51,5%) avec évolution favorable (97%). **Conclusion** : Les urgences drépanocytaires au CHNEAR sont dominées par les CVO. Leur prise en charge optimale nécessite un cadre adapté avec des protocoles codifiés.

Mots clés : urgences ; drépanocytose ; enfants; adolescents; Dakar.

Summary

Introduction: Sickle-cell anemia is characterized by a risk of acute complications, with emergency consultations. Our aim was to determine their frequency and characterize their evolution. **Patients and Methods**: It was a retrospective study from January to December 2015 at the Albert Royer National Children's Hospital (CHNEAR). We included patients with major sickle cell syndromes, monitored and received for emergencies, in consultation sickle cell disease, between 8 am and 2 pm. Those received at general consultation in the morning and at the custody are not included. Sociodemographic, clinical, para-clinical and outcome datas were collected and analyzed with Excel. **Results**: A total of 1715 consultations were recorded, with 295 emergencies, and frequency of 17.2%, with 96.3% SS homozygotes. Sexual intercourse was 1.01 and the median age was 98 months with extremes of 15 and 238 months (19.8 years). The vaso-occlusive crisis (CVO) was observed in 50.8% of patients. Management was essentially ambulatory (51.5%) with a favorable outcome (97%). **Conclusion**: Sickle cell emergencies at CHNEAR are dominated by CVO. Their charge price corresponds to a framework adapted to the codified protocols.

Keywords: emergencies, sickle cell anemia, children Dakar.

INTRODUCTION

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) plus de 330 000 enfants naissent chaque année avec une hémoglobinopathie, dont 83% des cas de drépanocytose [1].

En Afrique, la prévalence de cette maladie dans sa forme homozygote est estimée à au moins 2 % dans certains pays [2]. Elle est caractérisée par un risque de complications aiguës, à l'origine de consultations d'urgences qui nécessitent une prise en charge précoce et adaptée. En perspective de l'ouverture d'une unité dédiée à la prise en charge des enfants et adolescents drépanocytaires à Dakar, une évaluation de la situation des urgences était nécessaire au sein de la consultation drépanocytose du Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR). Notre objectif était de déterminer la fréquence des situations d'urgences drépanocytaires pédiatriques au sein de cette spécialisée drépanocytose, de les caractériser, et d'étudier leur évolution.

PATIENTS ET METHODES

Nous avons mené une étude rétrospective, du 02 janvier au 31 décembre 2015, au Centre Hospitalier National d'Enfants Albert Royer (CHNEAR). Nous avons inclus tous les patients porteurs de syndromes drépanocytaires majeurs, régulièrement suivis et reçus pour situations d'urgences, au sein de la consultation drépanocytose, entre 8h et 14h.

L'urgence était définie par toute consultation motivée par la survenue d'un évènement aigu, en dehors des rendez-vous de suivi ou la découverte d'un évènement aigu lors d'un rendez-vous de suivi. Un patient était régulièrement suivi, lorsqu'il était vu au rendez-vous au moins deux fois dans la même année.

Nous n'avons pas inclus les patients reçus à consultation générale du matin, ni ceux vus à la garde (après-midi, nuit, week-end et jours fériés).

Les données étaient recueillies à partir des dossiers médicaux, à l'aide d'une fiche de collecte de données. Nous avons analysé les

paramètres sociodémographiques, cliniques, para cliniques et évolutifs.

RESULTATS

Pendant la période d'étude, 1715 consultations des enfants présentant un syndrome drépanocytairaire majeur ont été enregistrées, 295 d'entre elles ont été réalisées par 187 patients et l'étaient du fait d'une urgence. Cependant, 266 consultations, réalisées par 163 patients ont été analysées dans ce travail.

Le sex-ratio était de 1. L'âge médian au moment de l'épisode d'urgence était de 98 mois avec des extrêmes de 15 mois et 20 ans et une prédominance de la tranche de 5 – 10 ans (Tableau I).

Tableau I : Répartition du nombre d'épisodes d'urgences selon l'âge (en années)

Age	CVO	Infections	Anémie	STA	AVC
[0 - 5[42	32	14	2	0
[5-10[55	33	21	1	2
[10-15[28	20	7	0	0
15 et plus	10	8	2	0	0

Le génotype homozygote SS était observé chez 157 patients (96,3%). Le taux moyen d'hémoglobine de base était de $7,9 \pm 1,01$ g/dl, celui de l'hémoglobine F était en moyenne de $20,1 \pm 9,7\%$. Le taux de couverture des vaccins recommandés était de 78,2% pour le vaccin anti-pneumococcique, 80,8% pour le vaccin anti-méningococcique et 74,8% pour le vaccin anti-typhique. L'antibioprophylaxie orale à la pénicilline V était observée chez 79/163 patients (48,5%). Dans notre étude, le principal motif de consultations était la douleur observée lors de 191 consultations (71,8%). La fréquence de la splénomégalie était de 8,3%. Le taux moyen d'hémoglobine était de $7,5 \pm 1,6$ g/dl. La positivité de la C-Réactive Protéine (CRP) était de 25,6% et celle de la goutte épaisse 1,1%. L'hémoculture était réalisée lors de 12 consultations (4,5%) et était positive à *Citrobacter freundii* une fois. La radiographie du thorax, réalisée 63 cas objectivait une pneumonie dans 25 cas (39,7%).

Les principales urgences diagnostiques rencontrées étaient les crises vaso-occlusives (CVO) 135/266 (50,6%), avec une localisation essentiellement osseuse lors de 98/135 épisodes (72,6%) (figure 1).

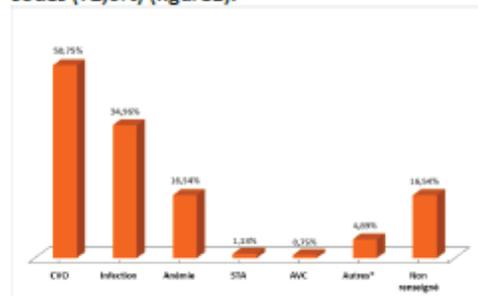


Figure 1: Répartition des situations d'urgences selon leur fréquence

Légende : Autres* = crise d'asthme – dermite-syndrome hystérique

Les pics de fréquence étaient observés de janvier à mars et de juillet à septembre (figure 2).

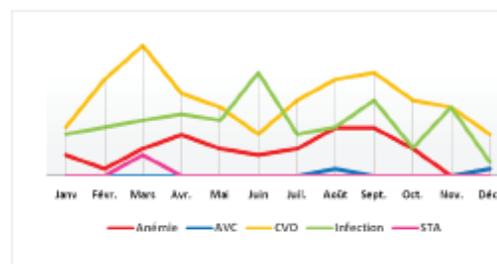


Figure 2: Répartition des situations d'urgences durant l'année

Le froid était le principal facteur déclenchant (31,3%). Les infections représentaient la seconde urgence diagnostique, 93 consultations (35%), avec une localisation essentiellement pulmonaires, 39/93 épisodes. Elles étaient fréquemment observées en juin, septembre et novembre (figure 2).

L'anémie aiguë venait en troisième position des urgences diagnostiquées, 43 consultations (16,17%), avec deux épisodes de séquestration splénique aiguë chez un même patient

(4,5%). Elle était plus fréquente en avril, août et septembre (figure 2).

Le syndrome thoracique aigu (STA) était diagnostiqué lors de 3 consultations (1,1%) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC), lors de 2 consultations (0,6%) (Figure 2). Dans notre étude, les pics de fréquence des CVO, infections et anémie étaient globalement observés chez les enfants de 5 -10 ans (Tableau I).

La prise en charge était faite essentiellement en ambulatoire 137/266 (52%). Une hospitalisation de jour était demandée pour 13 urgences/266 (4,9%).

L'évolution était favorable sous traitement pour la quasi-totalité des épisodes d'urgences 258/266 (97%). Sept complications (2,6%) ont été recensées essentiellement infectieuses, 5/7(71,4%), et un décès a été observés (0,6%) chez un patient de 4 ans.

DISCUSSION

Notre échantillon (163 patients) était assez faible comparé à la série nigériane D'ADEGOKE (240 patients) [3]. Cette différence est en partie liée au mode de recrutement de nos patients. En réalité, la plupart des urgences drépanocytaires sont vues à la garde. Néanmoins, en termes de nombre de consultations (266), nos résultats sont comparables. Cela est lié au fait que certains parents préfèrent la consultation spécialisée du matin à la garde, du fait des difficiles conditions d'accueil et d'attente lors de la garde.

La tranche d'âge des 5-10 ans était la plus exposée aux situations d'urgences (moyenne de 8,5 ans), comme rapporté dans l'étude d'ADEGOKE et al. [3]. Le génotype homozygote SS était le plus fréquent (96,3%), comparativement à une série nigériane [3]. En effet, cette forme est associée à un taux élevé de mortalité infantile de l'ordre de 50-90% en l'absence de prise en charge [4,5]. Quant au taux d'Hb de base, il était comparable à celui retrouvé par certains auteurs au Burkina, avec NACOULMA [6] et au Congo avec TSHILOLO [7]. La variation du taux d'hémoglobine de base observée dans les différentes séries s'expliquerait par les caractéristiques des différents haplotypes rencontrés [8].

Chez nos patients, le taux moyen d'Hb F était de 20,1% alors que DIAGNE trouvait une moyenne de $6,8 \pm 5,9\%$ en 2000 [9]. Ces résultats sont largement supérieurs à ceux observés en Afrique centrale [8], épicentre de l'haplotype Bantou. En effet, cette différence pourrait s'expliquer en partie par la prédominance de l'haplotype Sénégal, associé à un niveau élevé d'Hb F [10] avec une meilleure tolérance de la maladie. Le taux de couverture pour les vaccins recommandés était considérablement plus élevé par rapport à celui de 2000 [9], du fait d'une campagne de vaccination gratuite en 2009.

Dans notre étude, la douleur était le principal motif de consultation (71,8%). Néanmoins, son évaluation restait subjective du fait de l'absence d'utilisation des échelles conventionnelles. Au Mali, DIAKITE trouvait 70 cas de crises douloureuses dans une cohorte de 70 patients [11]. Dans une étude réalisée aux USA, 1 % des patients avait plus de six épisodes par an et 5,2 % avaient 3 à 10 épisodes par an [12].

Sur le plan biologique, la faible positivité de la goutte épaisse (1,1%) pourrait s'expliquer d'une part par la réalisation du Test de Diagnostic Rapide (TDR) en première intention et d'autre part, par l'efficacité des mesures préventives contre le paludisme. En effet, une chimio-prophylaxie anti palustre est prescrite durant chaque hivernage, en plus des conseils d'utilisation de la Moustiquaire Imprégnée d'Insecticide de Longue Durée d'Action (MIL-DA).

Concernant la CRP, sa forte positivité en situation de crise peut être un critère de sévérité de la CVO ou la preuve d'une infection bactérienne [13]. Ces infections étaient rarement confirmées, du fait d'une insuffisance d'examens bactériologiques. Un seul germe (*Citrobacterfrundii*) a été isolé dans une hémoculture.

Chez nos patients, l'urgence diagnostique la plus fréquente était la CVO (50,6%), surtout osseuse (72,6%), observée dans toutes les tranches d'âge, particulièrement chez les enfants âgés de 5 à 10 ans. Nos résultats étaient

similaires à ceux de MABIALA-BABELA [14]. Nous avons observé une fréquence plus élevée que DIAGNE qui trouvait 44% [9]. Des fréquences plus élevées étaient rapportées par d'autres auteurs : 66,3% au Nigéria selon ADEGOKE [3] et 82,1% au Congo selon MABIALA-BABELA [14]. La répartition saisonnière montrait des pics de fréquence de janvier à mars, correspondant au début de la saison froide à Dakar en 2015, et de juillet à septembre correspondant à la saison chaude et pluvieuse. Le froid était le principal facteur déclenchant.

Dans la drépanocytose, la CVO favorise l'infection qui à son tour entretient l'infection, avec risque de mise en jeu du pronostic vital du nourrisson et du jeune enfant [15]. Dans notre étude, la fréquence des infections était de 35% (93/266 consultations), surtout chez les enfants de moins de 10 ans et pendant les saisons chaudes (juin, septembre). Les localisations pulmonaires étaient les plus fréquemment rencontrées (41,9%). Le pneumocoque est le germe le plus redoutable, avec un risque réel de morbi-mortalité [15]. Toutefois, la pénicillino-prophylaxie et la vaccination contre ce germe ont considérablement réduit le risque d'infections invasives à pneumocoque.

L'anémie aiguë occupait la 3^{ème} position (16,5%) après les CVO et les infections, essentiellement chez les patients de 5-10 ans. Elle était plus fréquente en avril, août et septembre, correspondant aux périodes de chaleur de fin de saison sèche (avril) et de pleine saison pluvieuse (août-septembre). Dans la majorité des cas, elle accompagnait une CVO ou une infection, surtout le paludisme.

La séquestration splénique aiguë représentait 4,5% des causes d'anémie aiguë. Ce taux était aussi faible que dans d'autres études [16], tandis qu'en France, il était de 12,6% [17]. En réalité, cette complication grave peut entraîner un décès précoce, avant même la confirmation du diagnostic de la drépanocytose [17].

Le syndrome thoracique aigu (1,1%) était rarement évoqué dans notre série. En effet,

c'est une urgence fréquente chez les adolescents et adultes, sous diagnostiquée chez l'enfant et parfois confondue avec une infection pulmonaire ou à une CVO thoracique, qui en sont les principales causes [18]. Dans la série de DIAGNE, la fréquence était de 1% dans la même cohorte mais l'âge des patients était de 10-15 ans [9]. La fréquence était plus élevée au Cameroun avec 6,2% et au Nigeria avec 11,3% [19, 3].

Les cas d'AVC étaient rares (0,8%) avec 2 cas chez des patients de 5-10 ans. Ce résultat est quasi constant dans notre cohorte depuis 2000 [9]. En effet, cette tranche d'âge serait associée à une augmentation des vitesses circulatoires dans les artères cérébrales chez l'enfant. Ce qui prédisposerait à la survenue d'accidents vasculaires cérébraux [20]. Ces résultats sont inférieurs à ceux d'ADEGOKE [3] qui trouvait une prévalence de 2,9%. Dans une cohorte de 71 patients drépanocytaires suivis en consultation neuro-pédiatrique, l'AVC représentait 45% des motifs de suivi [21]. La prise en charge de nos patients était faite en ambulatoire dans plus de la moitié des situations, 137/266 consultations (51,5%). Certains étaient mis en observation sous forme d'hospitalisation de jour. L'évolution était globalement favorable, cependant, des complications infectieuses étaient observées. Un décès était survenu à domicile chez un patient, après une hospitalisation pour anémie aiguë et CVO.

CONCLUSION

Les urgences représentent 17,2% des consultations drépanocytaires au CHNEAR. Elles sont dominées par les CVO, surtout chez les enfants de 5-10 ans et leur évolution est favorable. La prise en charge optimale nécessite un cadre adapté avec des protocoles codifiés et un personnel formé.

REFERENCES

1. Profil épidémiologique des hémoglobino-pathies: étude transversale descriptive autour du cas index. Dahmani F, Benkirane S, Kouzih J, Woumki A, Mamad H, Masrar A. *Pan Afr Med J.* 2017 Jun 29;27:150.
2. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Rapport 60^{ème} session Comité Régional de l'Afrique, Malabo, Guinée équatoriale, 30 août – 3 septembre 2010.
3. Adegoke SA, Adeodu OO, Adekile AD. Sick-le cell disease clinical phenotypes in children from South-Western, Nigeria. *Niger J ClinPract*2015; 18:95-101.
4. Fleming AF, Storey J, Molineaux L, Iroko EA, Attai ED. Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. *Ann Trop Med Parasitol*1979; 73:161-72.
5. Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN. Sickle Cell Disease in Africa: A Neglected Cause of Early Childhood Mortality. *Am J Prev Med* 2011; 41(6S4): S398-S405.
6. Nacoulma E, Sakandé J, Kafando E, Kpou-bie ED, Guissou IP. Profil hématologique et biochimique des drépanocytaires SS et SC en phase stationnaire au centre hospitalier national YalgadoOuedraogo de Ouagadougou. *Mali Med* 2006; 21(1) :8-11.
7. TshiloloLI, Wembonyama S, Summa V, Avvisati G. L'hémogramme de l'enfant drépanocytaire congolais au cours des phases stationnaires. *Med Trop*2010;70(5-6):459-63.
8. Ngasia B, Sica L, Makani J, Loko G, Shrinkande, Tshilolo L et al. L'hémogramme du drépanocytaire de l'Afrique centrale, Martinique et de l'Inde au cours des phases stationnaires. REDAC, 19 février 2013, Fort de France, Martinique.
9. Diagne I, Ndiaye O, Moreira C, Signate-SY H, Camara B, Fall M et al. Les syndromes drépanocytaires majeurs en pédiatrie à Dakar (Sénégal). *Arch Pediatr* ; 2000;7(1):16-24.
10. Lesprit E, Reinert P. Prévention des infections chez l'enfant drépanocytaire. *Développement et santé : revue de perfectionnement médical et sanitaire en pays tropical.* 2006;182:20-22.
11. Diakité AA, Coulibaly Y, Dicko-Traoré F, Traoré B, Togo B, Keita MM et al. Prise en charge de la douleur au cours de la drépanocytose selon les critères OMS. *Mali Medical*2009;24(2):25-27.

12. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; 325(1):11-6.
13. Krishnan S, Setty Y, Betal SG, Vijender V, Rao K, Dampier C, Stuart M. Increased levels of the inflammatory biomarker C-reactive protein at baseline are associated with childhood sickle cell vasocclusive crises. *British journal of haematology*, 2010; 148(5):797-804.
14. Mabilia Babela JR, Nzingoula S, Senga P. Les crises vaso-occlusives drépanocytaires chez l'enfant et l'adolescent à Brazzaville, Congo. *Etude rétrospective de 587 cas. Bull Soc PatholExot*, 2005 ; 98(5):365-370.
15. Driscoll MC, Hurler A, Styles L, et al. Stroke risk in siblings with sickle cell anaemia. *Blood* 2003; 101:2401-4.
16. A Chekoury, M Laporte, E Dupuy. Les accidents vasculaires cérébraux dans la drépanocytose. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2008;20(2):77-81.
17. Brousse V, Elie C, Benkerrou M, Odievre MH, Lesprit E, Bernaudin F, Grimaud M, Guitton C, Quinet B, Dangiolo S, De Montalembert M. Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: cohort study of 190 pediatric patients. *BJH* 2012; 156:643-648.
18. Bertholdt S, Lê PQ, Heijmans C, Huybrechts S, Dedeken L, Forester A et al. Les complications respiratoires de la drépanocytose chez les enfants. Le syndrome thoracique aigu. *Rev Med Brux*2012:138-144.
19. Nansseu J, Yanda A, Chelo D, Tatah S, Mbassi H, Seungue J, Koki P. The acute chest syndrome in Cameroonian children living with sickle cell disease. *BMC pediatrics* 2015; 15:131.
20. Adams RJ, Brambilla D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in SCD. *N Engl J Med* 2005; 353:2769-78.
21. Dème/Ly I, Ba ID, Ba A, Sabino C, Niang B, Sarr M et al. Manifestations neurologiques et drépanocytose en milieu hospitalier pédiatrique. *DakarMed*.2015;60(1).

PRÉVALENCE DE L'ALPHA-THALASSÉMIE AU SEIN D'UNE POPULATION DRÉPANOCYTAIRE SÉNÉGALAISE

GUEYE TALL F¹, NDOUR EHM¹, LY DÉME I², NDIAYE DIALLO R¹, GUEYE PM¹, DIOP P A¹, DIAGNE I², CISSÉ A¹, JOLY P³, LOPEZ SALL P¹

RESUME

Introduction : La drépanocytose est une affection monogénique résultant d'une mutation au niveau du gène β -globine (HBB), caractérisée par une symptomatologie clinique variable. Différents facteurs génétiques modulateurs ont été identifiés ou suspectés pour leur influence directe ou indirecte sur la sévérité clinique de la maladie. Parmi ces facteurs, l'alpha-thalassémie serait associée à une plus grande fréquence de crises douloureuses et de syndrome thoracique aigu, alors qu'elle protégerait partiellement contre la survenue d'accident vasculaire cérébral. Peu de données relatives à l'alpha-thalassémie étant disponibles au Sénégal, cette étude visait à en déterminer la prévalence au sein d'une population drépanocytaire sénégalaise.

Méthodes : Il s'agit d'une étude prospective portant sur 300 drépanocytaires âgés de 1 à 17 ans, régulièrement suivis à l'Hôpital d'Enfants Albert Royer. Une technique dédiée de gap-PCR Multiplex a été utilisée pour rechercher les délétions alpha-thalassémiques les plus communes, à savoir les délétions -3.7, MED, SEA, -20.5 et -4.2 kb. L'homogénéité de répartition des allèles alpha-thalassémiques a été vérifiée au moyen de l'équilibre de Hardy-Weinberg (seuil de significativité à $p < 0,05$).

Résultats : Sur les 300 patients, le sex ratio H/F était de 1,29. Seule la délétion -3.7 kb a été retrouvée. Sa prévalence était de 21% avec 19 % pour la forme hétérozygote et 2% pour la forme homozygote. L'application de l'équilibre de Hardy-Weinberg a montré que cette délétion était répartie de façon homogène au sein de notre population d'étude ($p=0,72$).

Conclusion : Eu égard à la prévalence non négligeable de la délétion -3.7 kb, soit 21%, et de sa répartition homogène au sein de notre population d'étude, il serait intéressant de rechercher la délétion 3.7 chez tous les enfants de façon systématique et de proposer un doppler trans-cranien (DTC), en priorité aux 80% des patients avec un génotype alpha normal.

Mots clés : drépanocytose, gènes modificateurs, alpha-thalassémie

ABSTRACT

PREVALENCE OF ALPHA-THALASSEMIA AMONG A SENEGALESE POPULATION WITH SICKLE CELL DISEASE

Introduction: Sickle cell disease is a monogenic disorder resulting from a mutation in the β -globin gene (HBB), characterized by a diverse clinical symptomatology different between individuals. Different genetic modulators have been identified or suspected for their direct or indirect influence on the clinical severity of the disease. Among these factors, alpha-thalassemia is associated with a higher frequency of pain crisis and acute chest syndrome, while partially protective against the onset of stroke. Few data on the alpha-thalassemia are available in Senegal, so this study aimed to determine its prevalence in a Senegalese population with sickle cell disease.

Methods: This is a prospective study concerning 300 children with sickle cell disease from 1 to 17 years old, regularly monitored at the Hôpital d'Enfants Albert Royer. A dedicated technical gap Multiplex-PCR was used to seek for most common alpha-thalassemia deletions, namely -3.7, MED, SEA, -20.5 and -4.2 kb. The homogeneity of distribution of alpha-thalassemia alleles has been verified using the Hardy-Weinberg's equilibrium (significance level at $p < 0.05$).

Results: Of the 300 patients, the sex ratio M/F was 1.29. Only the -3, 7 kb deletion was found. Its prevalence was 21% with 19% for the heterozygous form and 2% for the homozygous one. The application of Hardy-Weinberg's equilibrium showed that this deletion was equally distributed through the population under study ($p=0,72$).

Conclusion: Taking into account the significant prevalence of -3.7 Kb deletion (21%), and its homogeneous distribution in our study population, it would be interesting to have a systematic screening for the -3.7 Kb deletion in all children and to propose a trans-cranial Doppler in priority for 80% of patients with a normal alpha genotype.

Keywords: Sickle cell disease, modifiers genes, alpha-thalassemia

1 Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique- Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie-Université Cheikh Anta Diop-Dakar (Sénégal).

2 Hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar (Sénégal)

3 Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire. Unité de Pathologie Moléculaire du Globule Rouge. Groupement Hospitalier Edouard Herriot. Université Claude Bernard Lyon1.

Auteur correspondant : Fatou Gueye Tall : email: fatougueye82@yahoo.fr, Téléphone : 775550334/ 00 33 6 64 72 58 40

INTRODUCTION

La drépanocytose, maladie génétique la plus fréquente dans le monde, est surtout observée chez les sujets de race noire. Elle constitue ainsi un véritable problème de santé publique en Afrique où sa prévalence varie de 10 à 40% des porteurs de gènes, selon les régions. Au Sénégal, la prévalence est estimée entre 8 et 10% dans la population générale [1]. Au plan moléculaire, elle est due au remplacement d'un acide glutamique par une valine. Ce remplacement résulte d'une mutation ponctuelle transformant une seule base du codon GAG en GTG. L'hémoglobine qui en résulte est appelée HbS. Cette HbS, sous forme homozygote, est responsable du syndrome drépanocytaire majeur (SDM). Ce syndrome drépanocytaire majeur est également observé lorsque l'allèle β^S coexiste avec un allèle β -thalassémique ou un allèle β^x ($X = \text{HbC}, \text{Hb D-Punjab}, \text{Hb O-Arab}$ ou Hb Lepore) ; cela a pour conséquence l'absence ou la réduction de la synthèse des chaînes β -globine normales. Dans ce cas on parle d'hétérozygotie composite. La forme homozygote et les hétérozygoties composites constituent les formes les plus graves de la maladie drépanocytaire.

Bien que la drépanocytose soit génétiquement caractérisée par une mutation ponctuelle unique, il existe divers gènes modulateurs qui peuvent influencer sur le phénotype de cette maladie. Parmi ces gènes, nous avons l'alpha-thalassémie qui serait associée à la survenue des crises douloureuses et du syndrome thoracique aigu, alors qu'elle protégerait contre la survenue d'accident vasculaire cérébral [2, 3]. Au plan clinique, la maladie peut se manifester à divers degrés de gravité clinique, d'un patient à un autre. En effet, certains patients vont développer peu de complications et peuvent atteindre l'âge de 60 à 70 ans, d'autres vont faire de nombreuses crises vaso-occlusives et de nombreux syndromes thoraciques aigus très précocement. Une troisième catégorie de patients présentera une vasculopathie cérébrale pouvant aller jusqu'à l'accident vasculaire cérébral, pendant l'enfance ou l'adolescence [2]. On distingue deux classes d'alpha-thalassémies : les alpha-thalassémies délétionnelles plus fréquentes [4,5] et les alpha-thalassémies non délétionnelles dues à des mutations dans le locus α [6]. Dans la population noire, la délétion -3.7 kb (- $\alpha^3.7$) est plus fréquente [7, 8, 9] alors que la délétion -4.2 kb (- $\alpha^4.2$) est plus retrouvée en Asie [8]. La délétion d'un ou de plusieurs gènes conduit à une synthèse déséquilibrée des chaînes α et β -globines. En conséquence, les chaînes γ et β forment alors des homotétramères solubles appelés Hb Bart's (γ_4) et Hb H (β_4). On distingue les α -thalassémies des α^0 selon que, au niveau du locus α , la thalassémie affecte l'expression de l'un ou des deux gènes. Les génotypes $-\alpha/\alpha$, $-\alpha/\alpha$ et $-/\alpha$ entraînent des défauts de synthèse de

globine respectivement de 20%, 40% et 50% et se manifestent simplement par une microcytose et une hypochromie sans perturbation du taux d'HbA2. Le génotype $-\alpha/-$ encore appelé hémoglobinose H se manifeste dès la vie fœtale et elle est responsable d'une anémie hémolytique chronique, hypochrome avec hyper réticulocytose. Le défaut $-/-$, incompatible avec la vie, conduit à une mort in utero dès le 5^{ème} mois de gestation. Pour le cas particulier de la délétion -3.7 kb, il y a une disparition de la fin du gène α^2 et du début du gène α^1 , créant un gène de fusion $\alpha^2\alpha^1$. Ainsi, au lieu de quatre gènes fonctionnels, il y en aura trois donnant l'alpha-thalassémie mineure. Au plan clinique, l'alpha-thalassémie protégerait contre les complications hémolytiques telles que les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension artérielle pulmonaire [3]. Par contre, elle favoriserait les complications vaso-occlusives telles que les crises douloureuses, le syndrome thoracique aigu [10]. La délétion -3.7 kb a été observée dans le monde entier, avec des fréquences plus élevées dans certaines populations africaines et méditerranéennes [11, 12,13]. C'est ainsi qu'une prévalence élevée a été retrouvée chez les patients drépanocytaires homozygotes en Inde (32%) [14], au Royaume-Uni, chez les afro-britanniques (34%) [15], en Guadeloupe (36%) [16], en Arabie Saoudite (40%) [17], aux Etats Unis, chez les afro-américains (41%) [18], en Oman (43%) [19], en France chez les africains (48%) [20], en Tanzanie (58%) [21], au Cameroun (37%) [22]. Par contre des prévalences de 20,8% et 17% ont été retrouvées respectivement en Guinée Conakry [23] et au Brésil [13,24].

Au Sénégal, très peu de données ont été rapportées sur l'alpha-thalassémie. C'est ainsi que cette étude visait à en déterminer la prévalence au sein de la population drépanocytaire sénégalaise.

MATÉRIELS ET MÉTHODES :

- Population d'étude

Il s'agit d'une étude prospective (janvier 2015 – décembre 2015). La population d'étude est constituée de 300 drépanocytaires homozygotes (SS et $\text{s}\beta$ -thalassémie), tous suivis à l'Hôpital d'Enfants Albert Royer de Dakar. Le consentement éclairé a été obtenu des parents /tuteurs avant l'inclusion. Les informations suivantes figuraient dans les dossiers des malades : profil phénotypique drépanocytaire (SS et $\text{s}\beta$ -thalassémie) et les paramètres anthropologiques (âge et sexe).

- Techniques génétiques

L'ADN a été extrait à partir de sang total recueilli sur tube EDTA, à l'aide du kit QIAmp® DSP DNA Blood Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne). La PCR a été réalisée dans un thermocycleur TProfessional Basic (Biometra, Göttingen, Allemagne) et les produits PCR ont

été visualisés à l'aide de l'appareil Gel doc XR (Bio-rad, Paris, France).

La technique GAP PCR MULTIPLEX a été utilisée pour rechercher les délétions alpha-thalassémiques les plus communes, notamment les délétions -3.7 kb, MED, SEA, -20.5, -4.2 kb [4]. La GAP PCR est une variante de la PCR classique, couramment utilisée pour la mise en évidence de délétions. Le principe consiste à utiliser des amorces assez éloignées l'une de l'autre encadrant juste les points de cassure. Si l'allèle est non délété, l'intervalle entre les deux amorces sera trop grand et l'amplification n'aura pas lieu. En revanche, si l'allèle est délété, les deux amorces seront artificiellement rapprochées et l'amplification aura lieu (Figure 1).

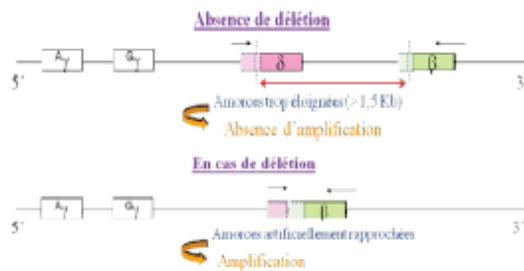


Figure 1 : Principe de la technique GAP PCR MULTIPLEX

- Analyse statistique

La fréquence allélique globale de l'alpha-thalassémie a été calculée et sa répartition équilibrée dans la population (homozygotes sauvages, hétérozygotes, homozygotes mutés) a été vérifiée au moyen de l'équilibre de Hardy-Weinberg via un test de χ^2 comparant, à partir de la fréquence allélique calculée, les répartitions observées et théoriques entre homozygotes sauvages, hétérozygotes et homozygotes mutés. L'équilibre de Hardy-Weinberg stipule que les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques (c'est-à-dire la structure génétique de la population) reste stable de génération en génération. On dit alors que la population est à l'équilibre et il existe une relation simple entre les fréquences alléliques et les fréquences génotypiques :

- Soit p la fréquence allélique de l'allèle sauvage,
 - Soit q la fréquence allélique de l'allèle muté (del -3.7 kb).
 - Si l'équilibre de Hardy-Weinberg est respecté :
 - Proportion théorique des homozygotes sauvages = p^2
 - Proportion théorique des homozygotes mutés = q^2
 - Proportion théorique des hétérozygotes = $2pq$
- Ainsi $p+q=1$ donc $(p+q)(p+q)=1 \implies p^2 + 2pq + q^2 = 1$

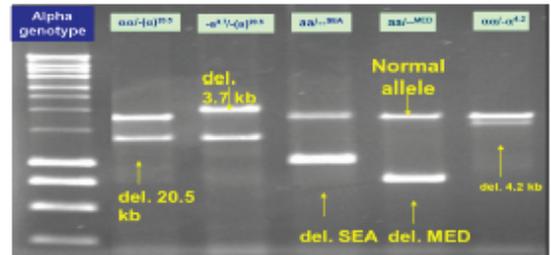


Figure 2 : Gel de référence représentant les cinq délétions alpha-thalassémiques les plus communes

RÉSULTATS

Au plan démographique, la répartition des patients en fonction de l'âge a montré que la tranche d'âge de 6 à 10 ans était la plus représentée avec un pourcentage de 51%. Quant à la répartition de la population en fonction du sexe, les patients de sexe masculin étaient plus nombreux ($n=169$) avec un sex ratio H/F de 1,29. Pour le statut alpha-thalassémique, sur les cinq délétions recherchées à savoir -3.7, MED, SEA, -20.5 kb, -4.2 kb (Figure 2), seule la délétion -3.7 kb a été retrouvée (Figure 3).

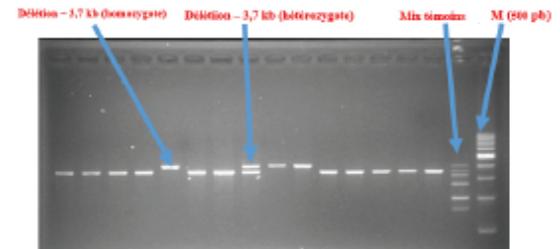


Figure 3 : Délétion -3,7 kb (2022 pb) retrouvée par technique GAP PCR MULTIPLEX

Soixante-deux (62) des 300 patients présentaient la délétion -3,7 kb, soit une prévalence de 21% dont 19% (56 patients) pour la forme hétérozygote et 2% (6 patients) pour la forme homozygote (Figure 4).

Prévalence de la délétion -3,7 kb

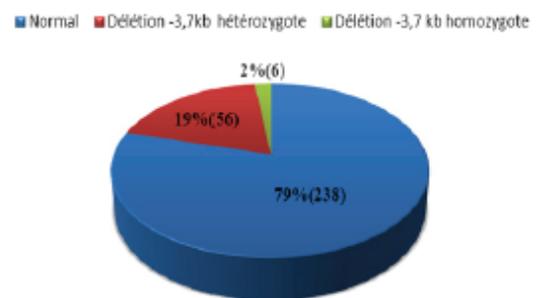


Figure 4 : Prévalence de la délétion -3,7 kb au sein de notre population d'étude.

- Utilisation de l'équilibre de Hardy-Weinberg :

Soit p = fréquence de l'allèle sauvage

q = fréquence de l'allèle muté

p^2 = fréquence des sauvages

q^2 = fréquence des homozygotes

$2pq$ = fréquence des hétérozygotes

Nous avons une population de 300 patients: 238 sauvages, 56 hétérozygotes et 6 homozygotes

Chaque sujet = 2 allèles => 600 allèles au total

- $p = ((2 \times 238) + 56) / 600 = 0.89$ (nombre de fois où l'allèle sauvage apparaît / nombre total d'allèles)

- $q = ((2 \times 6) + 56) / 600 = 0.11$ (nombre de fois où l'allèle muté apparaît / nombre total d'allèles).

-->Fréquence des génotypes:

- Sauvages $p^2 = 0,792$
- Hétérozygotes $2pq = 0,196$
- Homozygotes $q^2 = 0,012$

-->Effectifs attendus:

- Sauvages: $0.792 \times 300 = 237,6$ soit 238 patients
- Hétérozygotes: $0,196 \times 300 = 58,8$ soit 59 patients
- Homozygotes $0,012 \times 300 = 3,6$ soit 3 patients.

Ainsi l'équilibre de Hardy-Weinberg nous a permis d'avoir les effectifs théoriques. Et le test de χ^2 , est utilisé pour comparer ces effectifs théoriques à ceux observés dans notre population pour chaque génotype (Tableau I).

Tableau I : Amorces utilisées pour l'étude des cinq délétions alpha-thalassémiques à l'aide de la GAP PCR MULTIPLEX [11].

Séquences d'amorces (5'----->3'sequence)	GenBank ID : Nu- cleotides	Tailles des frag- ments (pb)	Génotypes
$\alpha 2/3.7$ -F CCCCTCGCCAAGTCCACCC	HUMHBA4 : 5676 -----> 5694	2022/2029 pb (délétion - 3,7)	$\alpha+$ -thalassémie: $-\alpha 3.7$
3.7/20.5- R AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4 : 11514 -----> 1494	1800 pb (ampli- mère $\alpha 2\alpha 2$)	Gène sauvage (Normal)
$\alpha 2$ -R AGACCAGGAAGGGCCGGTG	HUMHBA4 : 7475-----> 7457		
4.2-R CCCGTTGGATCTTCTCATTCCC	HUMHBA4 : 8942 -----> 8920	1628 pb	$\alpha+$ -thalassémie: $-\alpha 4.2$
4.2-F GGTTCACCATGTGGTGCCTC	HUMHBA4 : 3064 -----> 3084		
$-(\alpha)$ 20.5-F GCCCAACATTCCGGAGTACATG	HSGG1 : 17904 ----->17924	1175 pb	$\alpha\alpha$ -thalassémie: $-(\alpha)$ 20.5
$-(\alpha)$ 20.5 -R AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	HUMHBA4 : 11514 ----->11494		
MED-F TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	HSGG1 : 23123 ----->23144	875 pb	$\alpha+$ -thalassémie: $-MED$
MED-R TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	HSGG1 : 41203 ----->41183		
SEA-F CGATCTGGGCTCTGTGTTCTC	HSGG1 : 26120 ----->26140	1349 pb	$\alpha+$ -thalassémie: $-SEA$
SEA-R AGCCCACGTTGTGTTTCATGGC	HSGG1 : 3817----->3797		

La délétion -3,7 kb était répartie de façon homogène au sein de notre population d'étude. En effet, le test du χ^2 n'a pas retrouvé de différence statistiquement significative entre les effectifs observés et les effectifs théoriques selon les fréquences alléliques calculées ($p = 0,72$) (Tableau II).

Tableau II : Répartition homogène de la délétion -3,7 kb au sein de notre population d'étude

	Sauvages	Hétérozygotes	Homozygotes	p
Effectifs observés	238	56	6	0,72
Effectifs théoriques selon les fréquences alléliques calculées	238	59	3	

DISCUSSION

La délétion -3.7 kb a été observée dans le monde entier, avec des fréquences plus élevées dans certaines populations africaines et méditerranéennes. [11,12]. Dans notre étude, nous avons retrouvé une prévalence de 21% pour cette délétion avec 19% pour la forme hétérozygote et 2 % pour la forme homozygote. Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres pays notamment en Guinée Conakry (20,8%) [23] et au Brésil (17%) [13, 24]. Concernant la Guinée, les résultats, superposables à ceux du Sénégal, pourraient s'expliquer par la proximité, les mouvements migratoires, le brassage et le métissage des deux peuples très voisins à tous points de vue. Quant au Brésil, la prévalence est superposable à la nôtre, mais elle reste néanmoins moins élevée (17%). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans ce pays, le métissage ethnique est plus prononcé, mais l'influence africaine y est moindre, comparée à d'autres pays touchés par l'esclavage. En effet, il y a eu, au Brésil, moins d'esclaves d'origine africaine en raison de l'absence de ports adéquats [28]. Dans ce pays, la corrélation entre l'alpha-thalassémie et le groupe ethnique a effectivement été rapportée. C'est ainsi que Wagner et al. [27] ont évalué la prévalence dans divers groupes ethniques en divisant la population d'étude en descendants africains et européens. Ils ont alors observé une prévalence plus grande dans le premier groupe (23,1%) que dans le second (4,5%), corroborant ainsi la forte corrélation entre l'alpha-thalassémie et le groupe ethnique. Par ailleurs, les résultats d'une étude américaine ont rapporté une prévalence de 17% chez une population pédiatrique drépanocytaire afro-américaine, prévalence comparable à la nôtre (21%). Cette prévalence monte à 49% dans une population constituée de drépanocytaires âgés de plus de 20 ans. Ceci serait dû au fait que l'effet de l'alpha-thalassémie, sur la clinique chez l'enfant drépanocytaire, est inhibé par l'hémoglobine F qui est un facteur protecteur. Ainsi l'influence de l'alpha-thalassémie sur la clinique serait plus visible après le switch $\beta\gamma$. Ces résultats, montrent encore une fois qu'il est nécessaire de considérer l'anémie drépanocytaire, non seulement comme un défaut

d'un seul gène, mais comme une maladie dont l'expression clinique est le résultat d'un groupe de gènes capables d'interagir au niveau phénotypique [29]. Des prévalences nettement plus élevées que les nôtres, ont par contre été signalées chez d'autres populations de drépanocytaires homozygotes : en Inde (32%) [14], au Royaume-Uni, chez les afro-britanniques (34%) [15], en Guadeloupe (36%) [16], en Arabie Saoudite (40%) [17], aux Etats Unis, chez les afro-américains (41%) [18], en Oman (43%) [19], en France chez les africains (48%) [20], en Tanzanie (58%) [21]. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que ces études ont été réalisées sur des populations adultes, ce qui nous ramène au contexte du switch $\beta\gamma$ déjà évoqué.

Nos résultats sur l'alpha-thalassémie suggèrent que d'autres axes méritent d'être explorés, notamment la corrélation entre l'alpha-thalassémie et certains paramètres biologiques. En effet, des études sur des patients drépanocytaires homozygotes SS ont montré que l'alpha-thalassémie serait associée à une augmentation du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite, ainsi qu'à un taux de réticulocytes et une bilirubinémie plus faibles. Ces résultats suggéreraient que l'alpha-thalassémie diminue le degré d'anémie en réduisant le degré d'hémolyse [30, 31, 32, 33].

Toutefois, il faut souligner que la modulation génétique du taux d'hémoglobine F, des haplotypes du locus β -globine et l'alpha-thalassémie n'ont pas de valeur pronostique individuelle. Des études ont effectivement montré que des patients drépanocytaires, présentant un taux élevé d'HbF ou une alpha-thalassémie, sont capables de développer une forme sévère de la maladie [34]. Ces trois facteurs n'expliquent donc qu'une partie de la variabilité clinique, ce qui soulève l'hypothèse d'autres gènes modificateurs.

CONCLUSION

Eu égard d'une part à la prévalence non négligeable de l'alpha-thalassémie (21%) et de sa répartition homogène au sein de notre population d'étude, et d'autre part à son implication dans la symptomatologie clinique de la maladie, il serait important de pouvoir réaliser cette recherche en routine. Cela permettrait non seulement de prévenir les complications hémolytiques (AVC) pour les enfants ne présentant pas la délétion alpha-thalassémique -3.7 kb (80%) par la mise en œuvre du Doppler Trans-Cranien, mais également une meilleure prise en charge des complications vaso-occlusives chez les enfants ayant cette délétion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS, « Rapport du secrétariat-Prévalence de la drépanocytose », 24 avr. 2006, disponibles sur le site. [apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA59/A59_9-fr.pdf].
2. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology* 2012 ; 87: 795–803.
3. Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, Schultz WH, Driscoll C, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 2011; 117: 6681–6684.
4. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletion determinants of alpha-thalassemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):360-362.
5. Higgs DR, Pressley L, Olde JM, Hunt DM, Clegg JB, Weatherall DJ, and Serjeant GR. Negro alpha-thalassemia is caused by deletion of single alpha-globin gene. *Lancet* 1979; 2(8137): 272-276.
6. Higgs DR, Pressley L, Aldridge B, Clegg JB, Weatherall DJ, Cao A, Hadjiminias MG, Kattamis C, Metaxatou-Mavromati A, Rachmilewitz EA, and Sophocleous T. Genetic and molecular diversity in non deletion Hb H disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78(9): 5833-5837.
7. Orkin SH, Old J, Lazarus H, Altay C, Gurgey A, Weatherall DJ. and Nathan DJ The molecular basis of alpha-thalassemia: frequent occurrence of dysfunctional alpha loci among non-Asians with Hb H disease. *Cell* 1979; 17(1): 33-42.
8. Embury SH, Miller A, Dozy AM, Kan YW, Chan V and Todd D. Two different molecular organizations account for the single alpha-globin gene of the thalassemia-2 genotype. *J Clin Invest* 1980; 66(6): 1319-1325.
9. Keclard L, Romana M, Lavocat E, Saint-Martin C, Berchel C and Merault G. Sickle cell disorder, beta-globin gene cluster haplotypes and alpha-thalassemia in neonates and adults from Guadeloupe. *Am J Hematol* 1997; 55(1): 24-27.
10. Darbari DS, Onyekwere O, Nouraie M, Minniti CP, Luchtman-Jones L, et al. Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *Journal of Pediatrics* 2012; 160: 268–290.
11. Samuel S, Corinne D, Douglas R and Garry R. Single-tube multiplex –PCR screen for common deletion determinants of α -thalassemia. *Blood* 2000; 95:360-362.
12. Higgs DR and Weatherall DJ. The alpha thalassaemias. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:1154-1162.
13. Belisário AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of a α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* 2010; 34: 516–529.
14. Pandey S, Pandey S, Mishra RM, Sharma M, Saxena R. Genotypic influence of α -deletions on the phenotype of Indian sickle cell anemia patients. *Korean Journal of Hematology* 2011; 46: 192–195.
15. Day TG, Drasar ER, Fulford T, Sharpe CC, Thein SL. Association between hemolysis and albuminuria in adults with sickle cell anemia. *Haematologica* 2012; 97: 201–205.
16. Tarer V, Etienne-Julian M, Diara JP, Belloy MS, Mukizi-Mukaza M, et al. Sickle cell anemia in Guadeloupe: pattern and prevalence of acute clinical events. *European Journal of Hematology* 2006; 76: 193–199.
17. Alsultan A, Aleem A, Ghabbour H, AlGahtani FH, Al-Sheri A, et al. Sickle cell disease subphenotypes in patients from South Western province of Saudi Arabia. *Journal of Pediatric Hematology Oncology* 2012; 34: 79–84.
18. Guasch A, Zayas CF, Eckman JR, Muralidhoron K, Zhang W, et al. Evidence that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell glomerulopathy in humans. *Journal of the American Society of Nephrology* 1999; 10: 1014–1019.
19. Wali YA, Al-Lamki Z, Hussein SS, Bererhi H, Kumar D, et al. Splenic function in Omani children with sickle cell disease: correlation with severity index, hemoglobin phenotype, iron status, and alpha-thalassemia trait. *Pediatric Hematology Oncology* 2002; 19: 491–500.
20. Bemaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Cioc L, et al. G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood* 2008; 112: 4314–4317.
21. Cox SE, Makani J, Newton CR, Prentice AM, Kirkham FJ. Hematological and genetic predictors of

daytime hemoglobin saturation in Tanzanian with and without sickle cell anemia. International Scholarly Research Network Hematology 2013; 1-6.

22. Rumaney MB, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramasar R, Kengne AP, et al. The Co-Inheritance of Alpha-Thalassemia and Sickle Cell Anemia is associated with Better Hematological Indices and Lower Consultations Rate in Cameroonian Patients and Could Improve Their Survival. PLoS ONE 2014; 9(6): e100516. doi:10.1371/journal.pone.0100516.

23. Millimono TS, Loua KM, Rath SL, Relvas L, Bento C, et al. High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Guinea (West Africa). Hemoglobin 2012; 50:118-125.

24. Nagel R. L., Erlingsson S., Fabry M.E., Croizat H., Susuka S. M., Lachman H. et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African-American sickle cell anemia patients. Blood 1991; 77 (6): 1371-1375.

25. Kinney T. R., Helms R. W., O'Branski E. E., Ohene-Frempong K., Wang W. and al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. Pediatric Hydroxyurea Group. Blood 1999; 94(5): 1550-1554.

26. Harteveld CL, Higgs DR. Alpha-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases 2010; 5: 13.

27. Wagner SC, Castro SM Castro SM, Gonzalez TP, Santin AP, Filippon L, Zaleski CF, Azevedo LA, Amorin B, Callegari-Jacques SM and Hutz M. Prevalence of common α -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. Genet Mol Biol 2010; 33:641-645

28. Cascudo LC (1984) História do Rio Grande do Norte. 2 edition. Fundação José Augusto, Natal, 524 pp.

29. Fabry ME, Mears JG, Patel P, Schaefer-Rego K, Carmichael LD, et al. Dense cells in sickle cell anemia: the effects of gene interaction. Blood 1984; 64: 1042-1046.

30. Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR, Klemm KM and al. Concurrent sickle cell-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. N Engl Med 1982; 306(5): 270-274.

31. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ and al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med 1982; 306(24): 1441-1446.

32. Steinberg MH and Embury SH Alpha-thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. Blood 1986; 68(5): 985-990.

33. Adams RJ, Kutlar A., McKie V, Carl E., Nichols FT, Liu JC and al. Alpha-thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. Am J Hematol 45 (4):279-282.

34. Inati A, Taher A, Bou Alawi W, Koussa S, Kaspar H and al. Beta-globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. Eur J Haematol 70(2): 79-83.



Aggravation de l'anémie et polymorphisme de l'haptoglobine au cours de la drépanocytose au Sénégal

P.M. GUEYE^{1*}, F. GUEYE-TALL¹, M. SECK², M.O. KANE³, R. NDIAYE DIALLO¹
M. DIATTA¹, M. SECK⁴, E.M. NDOUR¹, D. DOUPA⁵, B. FAYE², S. DIOP²,
P. LOPEZ SALL¹, A. CISSE¹ et P.A. DIOP¹

¹ Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique-FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal.

² Centre National de Transfusion Sanguine, Dakar, Sénégal.

³ Laboratoire de Physiologie Pharmaceutique-FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal.

⁴ Laboratoire de Chimie Organique et Thérapeutique-FMPO, UCAD, Dakar, Sénégal.

⁵ Laboratoire de Biochimie-UFR des Sciences de la Santé, UGB, Saint-Louis, Sénégal.

*Auteur correspondant ; E-mail : papa.madiye.gueye@ucad.edu.sn

RESUME

La drépanocytose homozygote s'accompagne d'une augmentation de l'hémoglobine (Hb) plasmatique, susceptible d'exposer les hématies à un stress oxydant. L'haptoglobine présente trois phénotypes majeurs (Hp 1-1, Hp 2-1 et Hp 2-2) susceptibles de fixer l'hémoglobine extracellulaire avec une efficacité différente. L'objectif de ce travail est de voir si la connaissance du phénotype d'Hp pouvait constituer un élément prédictif de l'anémie sévère. Pour cela, il a été recruté 68 drépanocytaires homozygotes, âgés de 5 à 31 ans. Pour chaque patient, un témoin de même sexe et de même âge \pm 2 ans a été recruté. Le phénotypage de l'Hp a été réalisé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les résultats du dosage de l'Hb font ressortir que les taux d'Hb sont significativement différentes chez les patients comparées à celles des témoins ($p = 0,001$). Lorsque la répartition a été faite en fonction du phénotype d'Hp, une différence statistiquement significative a été retrouvée entre le phénotype Hp1-1 et le phénotype Hp2-2 ($p < 0,001$) chez les patients et non chez les témoins. Les résultats de cette étude préliminaire suggéreraient que la connaissance du phénotype d'Hp serait un facteur prédictif de l'anémie sévère au cours de la drépanocytose.

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Drépanocytose, anémie, phénotypes d'haptoglobine.

INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie génétique dans laquelle l'hémoglobine A normale ($\alpha_2\beta_2$) est remplacée par l'hémoglobine S, produit d'une mutation sur la chaîne β de la globine substituant au niveau du 6^{ème} codon une adénine par une thymine, d'où le remplacement d'un acide glutamique par une valine ($\beta_6\text{Glu-Val}$) (Bernaudin, 2000).

Cette maladie génétique pose un problème de santé publique dans certains pays, notamment en Afrique. C'est l'hémoglobinopathie la plus répandue au monde. On estime à plus de 50 millions les sujets porteurs du trait drépanocytaire (Galacteros, 2000).

La forme homozygote SS est une maladie hémolytique chronique susceptible de 3 types d'accidents aigus surajoutés: anémies

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i3.13>

graves, infections bactériennes graves et accidents ischémiques vaso-occlusifs (AVO) secondaires aux conflits entre les petits vaisseaux et les drépanocytes (Galacteros, 2000). Des complications organiques et infectieuses diverses peuvent également survenir (Raynal et al., 2007 ; Diop et al., 2010 ; Diagne et al., 2003). Les mécanismes physiopathologiques qui sont à la base de la plupart des complications aussi bien aiguës que chroniques comportent une part importante liée au stress oxydant. Dans ce contexte, la drépanocytose associée à une anémie chronique peut s'accompagner d'une augmentation de l'hémoglobine plasmatique, susceptible d'exposer les globules rouges à un stress oxydant à l'origine d'une aggravation de l'anémie (Buehler et Alayash, 2004).

Des auteurs ont récemment rapporté que l'hémoglobine libre (extra-érythrocytaire) était susceptible d'entraîner des effets délétères sur le globule rouge en termes de stress oxydant pouvant provoquer une hyperhémolyse (Buehler et Alayash, 2004; Gueye et al., 2006 ; Gueye et al., 2010). L'haptoglobine constitue le premier mécanisme de défense de l'organisme contre les effets délétères de l'hémoglobine. En effet, cette protéine fixe de manière stable l'hémoglobine en formant un complexe Hp-Hb, ce qui inhibe en grande partie sa capacité oxydante. La formation de ce complexe favorise son élimination grâce à la fixation de ce dernier sur le récepteur CD163 des monocytes-macrophages (Kristiansen et al., 2001). L'haptoglobine est un anti-oxydant du fait de sa capacité à prévenir les dommages oxydants dus à l'hémoglobine. Elle présente trois phénotypes majeurs (Hp1-1, Hp 2-1 et Hp2-2), entre lesquels il existe des différences, tant au plan structural qu'au plan fonctionnel (Langlois et Delanghe, 1996). Les différences fonctionnelles sont en rapport avec d'importantes conséquences sur l'évolution de certaines pathologies.

Par ailleurs, il a été rapporté de profondes disparités de sévérité même chez des patients ayant le même phénotype (homozygote SS, hétérozygote composite SC, entre autres), ce qui laisse suggérer que

d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux interviennent dans la modulation de la sévérité des complications observées au cours de la drépanocytose (Dossou-Yovo, 2010).

C'est dans ce contexte que nous nous sommes fixés comme objectif de voir si la connaissance du phénotype d'haptoglobine pouvait constituer un élément prédictif de la fréquence et/ou de la sévérité de certaines complications, notamment l'anémie sévère.

MATERIEL ET METHODES

Sujets

Ce travail a porté sur soixante huit (68) patients homozygotes de type SS âgés de 5 à 31 ans, suivis depuis au moins deux ans au niveau du centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) avec une bonne observance thérapeutique. Les patients présentant une autre pathologie ont été exclus de l'étude. Au recrutement, sous la supervision du médecin traitant, les patients ont été informés des objectifs de l'étude et ont été recrutés après leur consentement éclairé. Pour chaque patient, un témoin de même sexe et de même âge ± 2 ans a été recruté parmi les donneurs de sang.

Méthodes

Les prélèvements sanguins sur EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid), réalisés chez les sujets au repos, à jeun, au niveau du pli du coude ont été immédiatement centrifugés. Les plasmas ont été séparés pour être immédiatement traités ou conservés à -20°C . Aussi bien chez les patients que chez les témoins, nous avons réalisé les analyses suivantes : phénotypage de l'Hp, numération-formule sanguine (NFS), et dosage de la protéine C réactive (CRP). La numération-formule sanguine (NFS) a été réalisée à l'aide d'un compteur de globules (Sysmex1000i, Baden, Suisse) et le dosage de la CRP par immunoturbidimétrie sur automate A15 (Biosystèmes, Barcelone, Espagne). Le phénotypage de l'haptoglobine a été réalisé selon la méthode de Raymond (Raymond, 1962) par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 5% en utilisant le système

Mini-Protean-II (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) sous 200 V pendant 2 heures. L'électrophorèse en milieu alcalin a été réalisée en tampon contenant 0,1 mol/l de Tris et 0,09 mol/l d'acide borique, pH 8,6. L'électrophorèse à pH neutre a été réalisée en tampon phosphate 0,03 mol/l, pH 7,0.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview en utilisant le test de Mann Whitney pour comparer les variables entre patients et témoins et le test de Kruskal Wallis pour déterminer les différences significatives des variables chez les différents types de phénotypes d'haptoglobine. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme significative.

RESULTATS

Les phénotypages de l'haptoglobine réalisés avec 68 plasmas de sujets sains révèlent respectivement des fréquences de l'ordre de 27,94%, 41,17%, et 30,88% pour les phénotypes Hp1-1, Hp2-1 et Hp2-2. Chez les sujets de type SS, les fréquences retrouvées sont respectivement de l'ordre de 22,06%, 38,23% et 36,76% pour les phénotypes Hp1-1 ; Hp2-1 et Hp2-2. Les résultats de l'étude du polymorphisme de Hp chez les patients et les témoins sont représentés sur la Figure 1. La comparaison des fréquences dans les deux groupes n'a pas montré de différence statistiquement

significative. Trois plasmas de patients n'ont pas pu être classés par électrophorèse en milieu alcalin. Après électrophorèse à pH neutre, deux se sont révélés être du type 1-1 ; un seul n'a pas pu être classé et a été assimilé comme ne contenant pas d'haptoglobine décelable.

Les dosages de la CRP ont été effectués pour apprécier l'état stationnaire ou en crise des patients. Les résultats obtenus aussi bien chez les patients que chez les témoins sont répertoriés sur la Figure 2. La comparaison entre les 2 groupes n'a pas montré de différences statistiquement significatives.

Les dosages de l'hémoglobine ont été effectués aussi bien chez les patients que chez les témoins pour apprécier le degré d'anémie. Les résultats représentés sur la Figure 3 font ressortir que les moyennes des taux d'Hb sont significativement différentes chez les patients comparés aux témoins ($p = 0,001$).

Lorsque la répartition a été faite en fonction du phénotype Hp, les résultats révèlent chez les témoins (Figure 4) qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative des moyennes en Hb en fonction des trois phénotypes majeurs ($p = 0,88$). Par contre, chez les patients (Figure 5), une différence statistiquement significative a été retrouvée entre le phénotype Hp1-1 et le phénotype Hp2-2 ($p < 0,001$). Les autres comparaisons inter-phénotypes n'ont pas montré de différence statistiquement significative.

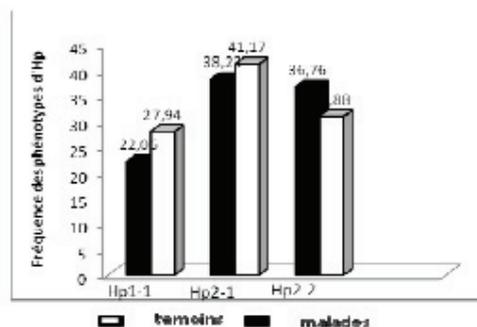


Figure 1 : Fréquences des phénotypes d'haptoglobine chez les malades et les témoins.

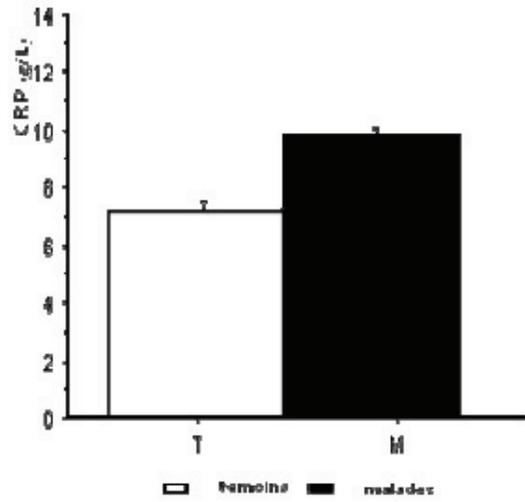


Figure 2 : Concentrations de Protéine C Réactive (CRP) chez les malades et les témoins.

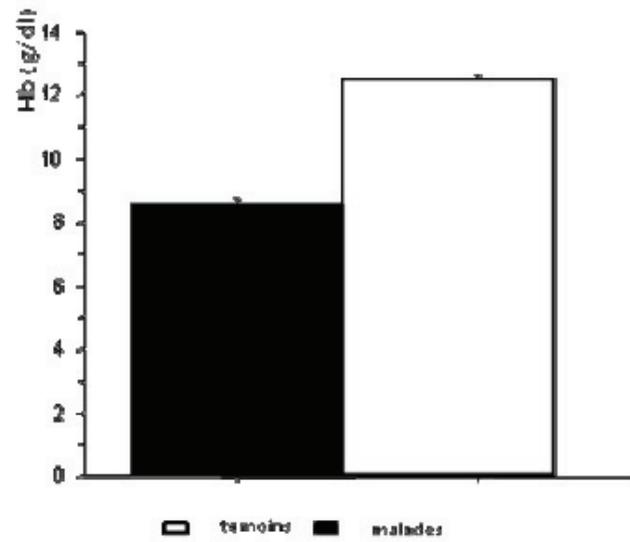


Figure 3 : Taux moyens de l'hémoglobine chez les patients et les témoins.

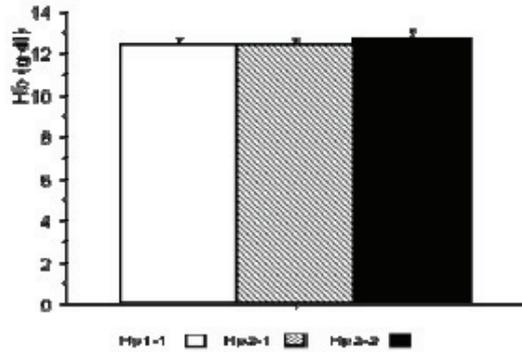


Figure 4 : Taux d'Hb en fonction des phénotypes d'Hp chez les témoins.

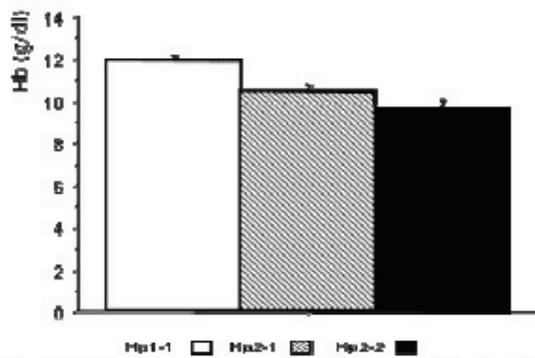


Figure 5 : Sévérité de l'anémie en fonction des phénotypes d'Hp chez les malades.

DISCUSSION

Le phénotypage de l'haptoglobine réalisé sur 68 plasmas de témoins a montré respectivement des fréquences de l'ordre 28%, 41%, et 31% pour les phénotypes Hp1-1, Hp2-1 et Hp2-2. Ces fréquences sont relativement différentes de celles retrouvées par Moulicc dans une population dakaroise en 1960. Ce dernier avait trouvé 37,19% pour le Hp1-1, 46,48 % pour le Hp2-1 et 11,81% pour le Hp2-2 (Moulicc et al., 1960). En effet, on retrouve des fréquences assez variables un peu partout en Afrique, notamment en Gambie, avec 30,57% de phénotypes Hp1-1, 21,66% de phénotypes Hp2-1 et 7,01% de phénotypes Hp2-2 (Harris et al., 1959).

Chez les drépanocytaires de type SS, les fréquences des phénotypes Hp sont de 22,06% ; 38,23% et 36,76% respectivement pour les phénotypes Hp1-1, Hp2-1 et Hp2-2. Lorsque ces fréquences sont comparées avec celles retrouvées chez les témoins, nous remarquons une baisse de la fréquence du phénotype Hp1-1 alors que celle du Hp2-2 augmente. Toutefois, les différences observées n'ont pas été significatives.

Lors du recrutement, nous avons utilisé le dosage de la CRP pour trier les patients en phase stationnaire de ceux en état de crise drépanocytaire. Les résultats obtenus montrent une légère augmentation chez les patients comparés aux témoins. Toutefois, les

différences observées n'ont pas été statistiquement significatives.

Dans notre étude, un plasma d'un patient type SS n'a présenté aucune bande caractéristique d'Hp (possédant une activité peroxydasique) après électrophorèse en présence d'hémoglobine ni à pH alcalin, ni à pH neutre nous amenant à classer le patient dans le groupe de sujets à Hp non détectable. Un tel fait pourrait faire penser qu'il s'agit d'un individu atteint d'hypo voire d'anahaptoglobinémie. En effet, des cas, bien que rares (1/1000) de déficit congénital en haptoglobine, ont été rapportés (Koda et al., 2000). Par contre, des fréquences d'anahaptoglobinémie plus élevées ont été rapportées en Australie (1,7%), ainsi que chez des populations noires (30%) en Afrique du sud, au Cameroun et au Nigeria (Delanghe et al., 1998). A ce titre, il est important de différencier l'anahaptoglobinémie (phénotype Hp 0-0) qui est due à l'absence d'expression du gène de l'Hp (Langlois et Delanghe, 1996 ; Koda, 2000), des hypohaptoglobinémies qui peuvent être secondaires à une maladie congénitale comme les désordres hémolytiques (drépanocytose, déficit en glucose-6-phosphate-déshydrogénase, thalassémie. (Atkinson SH, 2006).

Les résultats de la détermination du taux d'Hb chez les patients de type SS comparés aux témoins ont montré une diminution significative. Ces résultats sont en accord avec des données rapportées par plusieurs auteurs, qui relatent l'existence d'une anémie chronique chez les sujets drépanocytaires de type SS (Bernaudin, 2000, Galacteros, 2000).

Chez les patients de type SS, les sujets de phénotype Hp2-2 présentaient des taux moyens d'Hb significativement plus bas comparés à ceux retrouvés chez les patients Hp1-1 et Hp2-1. Les résultats obtenus pourraient s'expliquer en partie par le fait que l'hémoglobine S constitue un facteur de risque de peroxydation pour la membrane

érythrocytaire (Silva et al., 2013). Ainsi, chez ces patients, la peroxydation lipidique au niveau des membranes des globules rouges jouerait un rôle dans l'aggravation de l'anémie. Dans une étude antérieure (Gueye et al., 2006), nous avons montré que l'hémoglobine extra-érythrocytaire pouvait induire, sur le globule, un stress oxydant se traduisant par une lyse précoce. En effet, en dehors du globule rouge et de son contenu antioxydant, la toxicité oxydative de l'Hb s'affirme et va produire, via la réaction de Fenton, des radicaux libres qui vont attaquer la membrane des globules rouges et entraîner leur lyse précoce (Silva et al., 2013). L'action anti-oxydante de l'haptoglobine étant phénotype-dépendante (Asleh et al., 2005 ; Gueye et al., 2006), cela pourrait expliquer en partie le fait que l'anémie retrouvée chez les patients de type SS soit plus intense chez les patients de type Hp2-2 comparée à celle retrouvée au niveau des 2 autres phénotypes. En effet, ce phénotype étant moins efficace dans la fixation de l'Hb et la neutralisation de son pouvoir oxydant, les patients concernés seraient plus prédisposés à une aggravation de l'anémie comparée aux sujets des autres phénotypes. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence, d'autant plus que d'autres facteurs comme le taux d'Hb fœtale pourraient intervenir dans la modulation de la sévérité des signes cliniques (Nacoulma et al., 2006).

Conclusion

Au cours de ce travail préliminaire, nous avons étudié l'influence du polymorphisme de l'haptoglobine dans la survenue d'une anémie grave chez des patients drépanocytaires. Les résultats obtenus sont en faveur d'une prédisposition des sujets de phénotype Hp2-2 à présenter une aggravation de l'anémie. Cette étude préliminaire devrait être complétée par la réalisation d'une étude à plus grande échelle, afin de confirmer ces résultats obtenus à partir

d'un faible échantillonnage. Une évaluation des marqueurs de peroxydation lipidique comme les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) et la détermination de l'activité des enzymes du globule rouge ainsi que la prise en compte d'autres facteurs comme le taux d'Hb foetale devraient permettre d'élucider les mécanismes de protection de l'haptoglobine vis-à-vis de la survenue d'une aggravation de l'anémie. L'ensemble de ces résultats pourrait éventuellement permettre d'envisager une stratégie thérapeutique notamment par l'utilisation d'antioxydants chez les patients à risque.

REFERENCES

- Bernaudin F. 1999 Résultats et indications actuelles de l'allogreffe de la moelle dans la drépanocytose. *Path Biol.*, 47: 59-64.
- Galacteros F. 2000. Drépanocytose. *Encyclopedie Orphaned*, 3: 351-360.
- Raynal G, Bracq A, Tillou X, Limani K, Petit J. 2007. Les complications rénales de la drépanocytose. *Progrès en Urologie*, 17 : 794-795.
- Diop S, Diop D, Seck M, Guèye Y, Faye A, Dièye TN, Touré Fall AO, Sall Diallo A, Thiam D, Diakhaté L. 2010. Predictive factors of chronic complications in adult sickle cell anemia patients in Dakar, Senegal. *Med Trop.*, 70(5-6): 471-474.
- Diagne I, Gueye NDR, Signaté-Sy H, Camara B, Lopez-Sall P, Mbaye D, Sarr AM, Ba M, Sow HD, Kuakuvi N. 2003. Prise en charge de la drépanocytose chez l'enfant en Afrique : expérience de la cohorte de l'HEAR de Dakar. *Med Trop.*, 63: 513-520.
- Buehler PW, Alayash AI. 2004. Toxicities of hemoglobin solutions: in search of in-vitro and in-vivo model systems. *Transfusion*, 44(10): 1516-1530.
- Gueye PM, Glasser N, Ferard G, Lessinger JM. 2006. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clin Chem Lab Med.*, 44(5): 542-547.
- Gueye PM, Bertrand F, Duportail G, Lessinger JM. 2010. Extracellular haemoglobin, oxidative stress and quality of red blood cells relative to perioperative blood salvage. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 48(5): 677-83.
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. 2001. Identification of the hemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409: 198-201.
- Langlois MR, Delanghe JR. 1996. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin. Chem.*, 42(10): 1589-1600.
- Dossou-Yovo OP. 2010. *Gènes Modificateurs De l'Expression Phénotypique de la Drépanocytose : Modulation Clinique de la Drépanocytose*. Editions Universitaires Européennes: United Kingdom.
- Raymond S. 1962. A convenient apparatus for vertical gel electrophoresis. *Clin. Chem.*, 8: 455-470.
- Moullec J, Fine JM, Linhard J. 1960 Les groupes d'haptoglobine dans un échantillon de population africaine de Dakar. *Revue d'Hématologie*, 15: 174-182.
- Harris H, Robson EB, Simiscalco M. 1959. *Genetics of the Plasma Protein Variants. Biochemistry of Human Genetics, Ciba Foundation Symposium*. Churchill, Edition: Londres; 151.
- Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, Shimada E, Nishimura M, Morishita K, Moriya S, Mitsunaga S, Tadokoro K, Kimura H. 2000. Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoalbuminemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 95(4): 1138-1143.

- Delanghe J, Langlois M, De Buyzere. 1998. Congenital anhaptoalbuminemia versus acquired hypohaptoalbuminemia. *Blood*, 91(9): 3524.
- Atkinson SH, Rockett K, Sirugo G, Bejon PA, Fulford A, O'Connell MA, Bailey R, Kwiatkowski DP, Prentice AM. 2006. Seasonal childhood anaemia in West Africa is associated with the haptoglobin 2-2 genotype. *Plos Med.*, 3(5): 652-658.
- Silva DG, Belini JE, De Almeida EA, Bonini-Domingos CR. 2013. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies *Free Radic. Biol. Med.*, 65: 1101-1109.
- Asleh R, Guetta J, Litman SK, Lotan RM, Levy AP. 2005. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res.*, 96(4): 435-441.
- Nacoulma EVC, Sawadogo D, Sakandé J, Sangaré A, Sess ED. 2006. Influence de l'hémoglobine fœtale sur le stress oxydant chez le drépanocytaire homozygote vivant à Abidjan, Côte d'Ivoire. *Bull. Soc. Path. Exo.*, 99: 241-244.

PERTURBATIONS DE PARAMÈTRES LIPIDIQUES AU COURS DE LA DRÉPANOCYTOSE

Gueye Tall F¹, Ndour EHM¹, Cissé F², Gueye PM¹, Ndiaye Diallo R¹, Diatta A², Lopez Sall P¹, Cissé A¹

RESUME

La drépanocytose homozygote est caractérisée par une anémie normochrome normocytaire, une réaction inflammatoire et une lipidoperoxydation. Cette dernière serait impliquée dans l'apparition de nombreuses maladies cardiovasculaires telles les accidents vasculaires cérébraux qui constituent une des complications de la maladie drépanocytaire. Dans ce contexte, cette étude a pour but de comparer les valeurs sériques du cholestérol et de ses fractions d'une part et d'autre part les triglycérides et la CRP. Notre population d'étude était constituée de 105 drépanocytaires (56 homozygotes et 49 hétérozygotes) et de 36 témoins donneurs de sang, tous recrutés au Centre National de Transfusion Sanguine de Dakar (Sénégal). En comparant les homozygotes aux hétérozygotes et aux témoins, nous avons observé chez les homozygotes, une augmentation des triglycérides ($1,80 \pm 0,80$ g/l vs $1,76 \pm 0,68$ g/l vs $0,68 \pm 0,80$ g/l) et de l'indice d'athérogénicité ($5,28 \pm 2,40$ vs $3,4 \pm 1,4$ vs $2,2 \pm 0,90$) avec une baisse du cholestérol total ($1,09 \pm 0,30$ g/l vs $1,49 \pm 0,30$ g/l vs $1,52 \pm 0,40$ g/l) et du c-HDL ($0,24 \pm 0,12$ g/l vs $0,51 \pm 0,20$ g/l vs $0,62 \pm 0,23$ g/l). Malgré la présence d'une hypocholestérolémie, une concentration de CRP augmentée, en même temps que l'indice d'athérogénicité a été aussi notée chez les homozygotes. Cela militerait en faveur d'un risque athérogène.

Mots-clés : drépanocytose, lipides, athérosclérose, dyslipidémies.

ABSTRACT

LIPID PARAMETERS IN SICKLE CELL DISEASE
Homozygous sickle cell is characterized by normochromic normocytic anemia, inflammatory reaction and lipidoperoxydation. The latter is involved in the development of many heart and vessels diseases such as stroke, which constitute one of the complications of sickle cell disease. In this context, this study aims to compare the serum values of cholesterol and its fractions on one hand and on the other triglycerides and CRP. Our study population consisted of 105 patients with sickle cell disease (56 homozygous and 49 heterozygous) and 36 controls blood donors, all recruited at the Centre National de Transfusion Sanguine of Dakar (Senegal). Comparing homozygous and heterozygous with controls, we observed in homozygous, increased triglycerides (1.80 ± 0.80 g/l vs 1.76 ± 0.68 g/l vs 0.68 ± 0.80 g/l) and atherogenic index (5.28 ± 2.40 vs 3.4 ± 1.4 vs 2.2 ± 0.90) but lowered total cholesterol (1.09 ± 0.30 g/l vs 1.49 ± 0.30 g/l vs 1.52 ± 0.40 g/l) and HDL-c (0.24 ± 0.12 g/l vs 0.51 ± 0.20 g/l vs 0.62 ± 0.23 g/l). Despite presence of hypocholesterolemia, with increased CRP levels was observed as well as atherogenic index in homozygous. So, homozygous may be considered as at risk of atherosclerosis.

Keywords: Sickle cell disease, lipids, atherosclerosis, dyslipidemia

1 Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique- Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie- Université Cheikh Anta Diop- Dakar (Sénégal).

2 Laboratoire de Biochimie Médicale- Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie- Université Cheikh Anta Diop- Dakar (Sénégal)

Auteur correspondant : Fatou Gueye Tall : email : fatougueye82@yahoo.fr Téléphone : 775550334

INTRODUCTION

La drépanocytose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive caractérisée par la présence de l'hémoglobine S responsable de la déformation des hématies en faucilles en cas d'hypoxie. Cette hémoglobine S résulte de la mutation ponctuelle du sixième codon du gène β globine, GAG qui est remplacé par GTG. Cette mutation va provoquer le remplacement de l'acide glutamique par la valine dans la chaîne β globine, toujours en position 6[1, 2].

La drépanocytose, maladie génétique la plus fréquente dans le monde, est surtout observée chez les sujets de race noire. Elle constitue ainsi un véritable problème de santé publique en Afrique où sa prévalence varie de 10 à 40% des porteurs de gènes selon les régions. Au Sénégal, la prévalence est estimée

entre 8 et 10% dans la population générale[3]. Plusieurs formes cliniques ont été décrites dont la forme hétérozygote typiquement asymptomatique et les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) regroupant la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par association de l'hémoglobine S à d'autres hémoglobines anormales (SC, S β thalassémies). Les SDM sont des maladies graves, en particulier la forme homozygote SS qui a une évolution fatale dans près de 50% des cas dans les cinq premières années de vie, en l'absence d'une prise en charge appropriée. La drépanocytose homozygote SS est caractérisée par des crises douloureuses vaso-occlusives, une réaction inflammatoire, un stress oxydatif [4-7] et un risque athérogène[8, 9]. Ce risque a été longtemps considéré comme faible chez le drépanocyttaire du fait de la baisse du taux plasmatique de cholestérol total, surtout en période de crise. Par ailleurs, des études récentes ont rapporté des perturbations des autres marqueurs du bilan lipidique notamment une augmentation des concentrations plasmatiques des triglycérides, de l'ApoB et des rapports ApoB/Apo A1, c-LDL/c-HDL, CT/c-HDL (indice d'athérogénicité)[10, 11].

Ces anomalies lipidiques pourraient être à l'origine de la survenue de maladies cardiovasculaires chez les drépanocytaires. L'objectif de ce travail est d'évaluer le risque athérogène et de rechercher une éventuelle corrélation entre certains paramètres lipidiques et la CRP, marqueur prédictif des maladies cardiovasculaires (MCV).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Notre population d'étude est constituée de 105 drépanocytaires (56 homozygotes et 49 hétérozygotes) et de 36 témoins donneurs de sang, tous recrutés au Centre National de Transfusion Sanguine de Dakar (Sénégal). Les critères d'inclusion étaient les suivants : être âgé de 18 ans et plus, accepter de participer à l'étude, après consentement éclairé. Les transfusions remontant à moins de deux mois, la grossesse, la prise de contraceptifs et/ou de médicaments susceptibles de perturber le métabolisme des lipides, l'usage de tabac et la consommation d'alcool constituaient les critères de non inclusion.

Les drépanocytaires étaient âgés de 18 à 48 ans et la population témoin était appariée en âge par rapport aux drépanocytaires.

Les prélèvements ont été effectués chez les sujets à jeun, au repos, au niveau du pli du coude. Le sang a été recueilli dans un tube sans anticoagulant pour le dosage des paramètres lipidiques et de la CRP.

La CRP a été déterminée par immunoturbidimétrie. Les concentrations sériques de cholestérol total (CT) et de cholestérol-HDL (c-HDL) ont été déterminées sur automate COBAS Integra (Roche, Mannheim Allemagne) par la méthode enzymatique à la cholesté-

rol esterase/cholestérol oxydase/peroxydase.

Les triglycérides (TG) ont été dosés par la technique utilisant le système lipase/glycérol phosphate/oxydase/peroxydase sur COBAS C111 (Roche, Mannheim, Allemagne). La formule de Friedwald, après exclusion des sujets ayant une triglycéridémie ≥ 4 g/l, a servi à calculer les concentrations du LDL-cholestérol (c-LDL). L'indice d'athérogénicité (IA) a été déterminé par le rapport CT/c-HDL.

Le test de Kruskal Wallis a été utilisée pour la comparaison des trois groupes de population (AA, AS, SS) en fonction de l'âge mais aussi en fonction du sexe. Avec le t-test, les paramètres biochimiques ont été comparés entre les différentes populations, la différence étant considérée statistiquement significative pour $p < 0,05$. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RÉSULTATS

Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les trois groupes de population concernant l'âge ($p = 0,507$). Par contre il existe une différence significative entre les trois groupes de population concernant le sexe ($p = 0,038$) (Tableau I).

Tableau I : Caractéristiques démographiques

	Homozygotes	Hétérozygotes	Témoins	p
Effectif, n	56	49	36	0,507
Age (ans)	27,3 \pm 7,3	28,4 \pm 6,7	28, 8 \pm 6,3	
Sexe	Homozygotes	Hétérozygotes	Témoins	p
Féminin (n, %)	33 (59%)	37 (75,5%)	17 (47,2%)	0,038
Masculin (n, %)	23 (41%)	12 (24,5%)	19 (52%)	

Certains paramètres lipidiques présentent une variation significative entre les trois groupes étudiés. De même, la distribution des concentrations de CRP au sein de la population d'étude présente une variation inégale.

C'est ainsi que la comparaison entre homozygotes et témoins pour les différents paramètres lipidiques étudiés révèle que les moyennes des concentrations sériques de cholestérol total (1,09 \pm 0,30g/l vs 1,52 \pm 0,4g/l; $p < 0,001$), de triglycérides (1,80 \pm 0,80g/l vs 0,68 \pm 0,80g/l; $p = 0,012$), de c-HDL (0,24 \pm 0,12g/l vs 0,62 \pm 0,23g/l; $p < 0,001$) et l'indice d'athérogénicité (5,28 \pm 2,40 vs 2,2 \pm 0,98; $p < 0,001$), sont significativement différents. Par contre, les concentrations de c-LDL sont superposables (0,72 \pm 0,40g/l vs 0,71 \pm 0,4g/l; $p = 0,760$) (Figure 1).

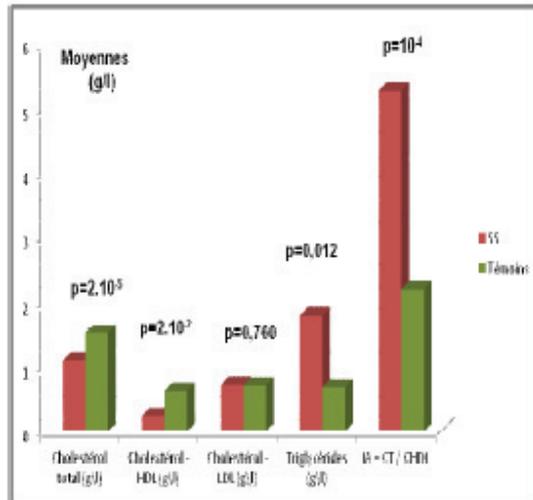


Figure 1 : Paramètres biochimiques des drépanocytaires homozygotes et des témoins

De même, les moyennes de ces mêmes paramètres lipidiques sont significativement différentes chez les drépanocytaires hétérozygotes comparativement aux témoins pour le c-LDL : $0,96 \pm 0,5 \text{ g/l}$ vs $0,71 \pm 0,4 \text{ g/l}$, les triglycérides : $1,76 \pm 0,68 \text{ g/l}$ vs $0,68 \pm 0,80$, et l'indice d'athérogénicité : $3,4 \pm 1,4$ vs $2,2 \pm 0,98$ avec des valeurs de p respectives de 0,035, 0,002, 10^{-5} . En revanche, il n'y a pas de différence significative pour le cholestérol total : $1,49 \pm 0,3 \text{ g/l}$ vs $1,52 \pm 0,4 \text{ g/l}$ et le c-HDL : $0,51 \pm 0,20 \text{ g/l}$ vs $0,62 \pm 0,23 \text{ g/l}$ (Figure 2).

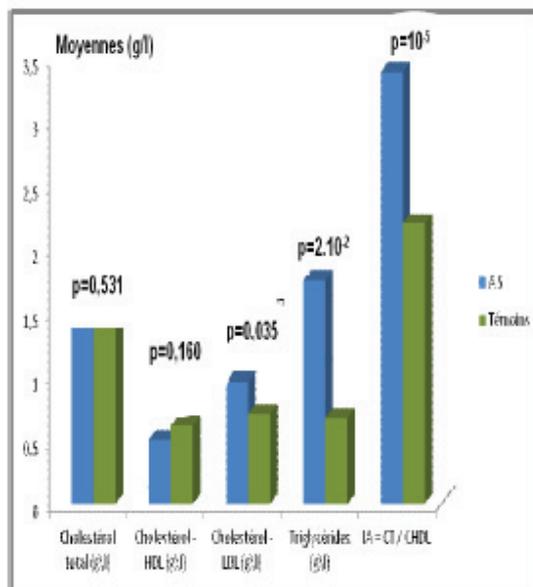


Figure 2 : Paramètres biochimiques des drépanocytaires hétérozygotes et des témoins

La figure 3 montre qu'il y a des différences significatives, en comparant homozygotes et hétérozygotes, uniquement entre les moyennes des concentrations du cholestérol total et de ses fractions, mais aussi de l'indice d'athérogénicité ($p < 0,001$ pour le cholestérol total, le c-LDL, l'indice d'athérogénicité et pour le c-HDL, $p = 0,002$).

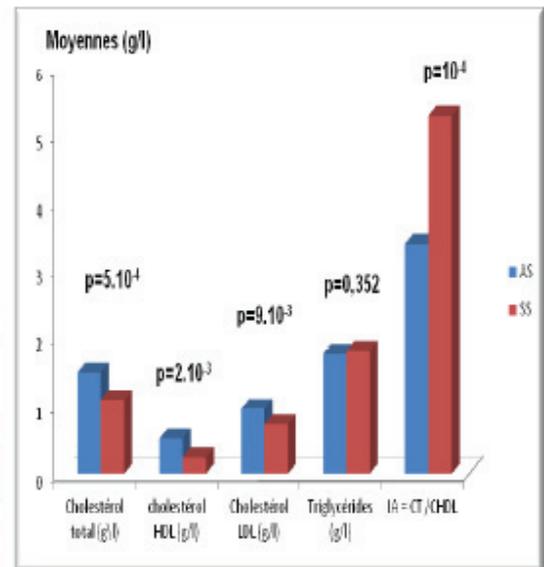


Figure 3 : Paramètres biochimiques des drépanocytaires homozygotes et des hétérozygotes.

L'étude de la distribution des concentrations de CRP, révèle que les homozygotes en crise ($n = 17$) ont des concentrations de CRP significativement plus élevées ($33,7 \pm 27,9 \text{ mg/l}$ avec $p < 0,001$). En outre, la comparaison de ces concentrations de CRP entre les trois groupes étudiés a fait ressortir des différences statistiquement significatives entre certains d'entre eux. Il en est ainsi entre homozygotes et témoins. En effet, nous avons une différence significative des valeurs de la CRP des homozygotes comparées à celles des témoins ($13,2 \pm 20,5 \text{ mg/l}$ vs $3,5 \pm 3,2 \text{ mg/l}$; $p = 0,001$) ; de même entre hétérozygotes et homozygotes ($5,6 \pm 8,5 \text{ mg/l}$ vs $13,6 \pm 20,5 \text{ mg/l}$; $p = 0,014$). (Tableau II).

Tableau II : Distribution des concentrations de CRP au sein de la population d'étude

Patients	Effectif	Moyennes \pm SD (mg/l)	p(T-Test)
Drépanocytaires homozygotes en crise	17	33,7 \pm 27,9	p = 2.10-4
Drépanocytaires homozygotes en phase stationnaire	39	4,2 \pm 3,20	
SS	56	13,2 \pm 20,5	p = 10-3
Témoins	36	3,5 \pm 3,2	
AS	49	5,6 \pm 8,5	p = 0,108
Témoins	36	3,5 \pm 3,2	
AS	49	5,6 \pm 8,5	p = 0,014
SS	56	13,2 \pm 20,5	

Seules la cholestérolémie totale (corrélation de Pearson = -0,622 et p=0,008) et la LDL-cholestérolémie (corrélation de Pearson = -0,521 et p= 0,032) sont négativement corrélées à la CRP. Pour les autres paramètres aucune corrélation n'a été observée (Tableau III).

Tableau III : Etude de corrélation entre la CRP et les paramètres lipidiques chez les homozygotes en crise.

Corrélations		
Chol total (g/l)	Corrélation de Pearson	-0,622
	P	0,008
	N	17
CHDL (g/l)	Corrélation de Pearson	-0,353
	P	0,165
	N	17
CLDL(g/l)	Corrélation de Pearson	-0,521
	P	0,032
	N	17
TG (g/l)	Corrélation de Pearson	-0,045
	P	0,863
	N	17
IA	Corrélation de Pearson	-0,154
	P	0,554
	N	17

DISCUSSION

Population d'étude

Elle est constituée de drépanocytaires âgés de 18 à 48 ans. En effet, nous avons choisi cette tranche d'âge, en raison de la survenue tardive des complications cardio-vasculaires qui, sur le plan biologique, se traduisent par des anomalies du bilan lipidique. En outre, cette tranche d'âge rend compte également de l'allongement de l'espérance de vie des drépanocytaires dont 80% mouraient autrefois à un âge plus jeune [10]. La répartition de la population d'étude se-

lon l'âge, montre une homogénéité (p = 0,507) ; ce que confirme l'appariement en âge des différentes sous-populations.

La répartition de la population d'étude en fonction du sexe, indique une différence statistiquement significative entre les trois groupes de population (p<0,038) et un nombre plus élevé de patients de sexe féminin (Tableau I).

Contrairement aux malades, le nombre de donneurs de sang de sexe masculin est plus élevé que celui des donneurs de sexe féminin. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les hommes donnent beaucoup plus souvent leur sang que les femmes, celles-ci étant, périodiquement soumises à des pertes de sang liées aux menstrues.

Comparaison entre les drépanocytaires homozygotes et les témoins (figure 1)

L'étude comparative des paramètres lipidiques a montré une baisse significative du cholestérol total (1,09 \pm 0,30 g/l vs 1,52 \pm 0,40 g/l, p< 0,001), et du cholestérol-HDL (0,24 \pm 0,12 g/l vs 0,62 \pm 0,23 g/l, p<0,020) chez les homozygotes par rapport aux témoins. Par ailleurs, les concentrations moyennes de cholestérol-LDL, (0,72 \pm 0,40 g/l vs 0,71 \pm 0,40 g/l, p<0,760), sont superposables, alors que celles des triglycérides (1,80 \pm 0,80 g/l vs 0,68 \pm 0,37 g/l, p<0,012) de même que l'indice d'athérogénicité (5,28 \pm 2,40 vs 2,2 \pm 0,90 p< 0,001), sont significativement augmentés chez les homozygotes par rapport aux témoins. L'augmentation de l'indice d'athérogénicité observée dans notre série malgré une baisse du cholestérol total et du cholestérol HDL pose la problématique du risque d'athérosclérose au cours de la maladie drépanocytaire, l'hypocholestérolémie étant reconnue comme facteur protecteur.

Ces données confirment les résultats rapportés par certains auteurs [10, 12, 13] pour qui, la diminution du cholestérol total et de ses fractions, ainsi que l'augmentation des triglycérides seraient des perturbations habituelles chez les drépanocytaires homozygotes. En effet, la drépanocytose est génératrice de stress oxydatif responsable de la peroxydation des lipides membranaires. Cette peroxydation toucherait également les lipides et lipoprotéines plasmatiques. L'hypocholestérolémie pourrait être la conséquence de l'utilisation accrue du cholestérol plasmatique pour la reconstitution de la membrane érythrocytaire lésée par la lipidoperoxydation [13].

En revanche, NJOKU et coll. [14] ont trouvé des résultats différents des nôtres. Ces auteurs ont observé une élévation du cholestérol total et des phospholipides chez une population de drépanocytaires homozygotes. L'hypercholestérolémie aggraverait la viscosité des cellules sanguines des drépanocytaires, avec pour conséquences une sévérité des crises et une possible obstruction des artères, d'où la nécessité de proposer à ces patients un régime diététique

pauvre en cholestérol.

La baisse du cholestérol total observée chez les homozygotes de notre série, est accompagnée d'une diminution du cholestérol-HDL. Nos résultats sont superposables à ceux trouvés par Diatta et al.[10] ($0,32 \pm 0,05$ g/l) qui ont étudié les dyslipidémies dans une population de drépanocytaires homozygotes âgés de 15 à 36 ans. L'intervention de la LCAT serait un des mécanismes impliqués dans la réduction du cholestérol-HDL. En effet, la lipoprotéine préférencée comme substrat pour la LCAT humaine est le HDL. Ceci pourrait expliquer la réduction du cholestérol-HDL[10].

La concentration de cholestérol-LDL retrouvée chez les homozygotes ($0,72 \pm 0,40$ g/l) contre $0,71 \pm 0,40$ g/l pour les témoins, ($p < 0,760$) est comparable à celle rapportée par Diatta et al.[10]. Cependant selon ces auteurs la LDL-cholestérolémie située dans l'intervalle des valeurs usuelles ne refléterait pas la situation réelle chez le drépanocytaire homozygote et serait plutôt une conséquence du stress oxydatif qui transformerait une partie des LDL en LDL oxydées. Quant à l'hypertriglycéridémie enregistrée dans notre étude, ($1,80 \pm 0,80$ g/l pour les homozygotes contre $0,68 \pm 0,37$ g/l pour les témoins, $p < 0,012$), nous pourrions emprunter l'explication de Monnet et coll. : elle serait due à la baisse d'activité de la lipoprotéine lipase, baisse liée au processus de stress oxydatif. Une autre explication pourrait être la production accrue de lipides endogènes parmi lesquels les VLDL et le cholestérol ; le cholestérol serait utilisé pour la reconstitution des membranes lésées, alors que les triglycérides non utilisés s'accumuleraient [13]. Des études épidémiologiques prospectives, ont montré, en outre, que l'hypertriglycéridémie est indépendamment reliée au risque cardiovasculaire après ajustement pour le cholestérol-HDL aussi bien chez l'homme que chez la femme. Ces études montrent que l'hypertriglycéridémie peut avoir des conséquences athérogènes et thrombogènes suggérant ainsi que les drépanocytaires homozygotes de notre série seraient exposés au risque cardio-vasculaire[15].

Comparaison entre les drépanocytaires hétérozygotes et les témoins (figure 2)

L'analyse comparative des valeurs moyennes des paramètres lipidiques entre les hétérozygotes et les témoins a fait ressortir :

- une superposition des concentrations plasmatiques du cholestérol total ($1,49 \pm 0,3$ g/l pour les hétérozygotes contre $1,52 \pm 0,4$ g/l pour les témoins $p < 0,531$) et du cholestérol -HDL ($0,51 \pm 0,20$ g/l pour les hétérozygotes contre $0,62 \pm 0,23$ g/l pour les témoins $p < 0,160$).
- Ces résultats suggèrent les mêmes commentaires que ceux évoqués entre homozygotes et témoins.
- une augmentation significative de la concentra-

tion plasmatique du cholestérol- LDL tout en restant dans les limites physiologiques ($0,96 \pm 0,5$ g/l pour les hétérozygotes contre $0,71 \text{g/l} \pm 0,4$ g/l pour les témoins $p < 0,035$).

- Nos résultats se rapprochent de ceux de Djoumessi et al. qui enregistrent des concentrations plasmatiques de cholestérol-LDL significativement plus élevées chez les hétérozygotes comparativement aux témoins ($1,84 \pm 0,10$ g/l vs $1,17 \pm 0,30$ g/l) à la différence que ces valeurs sont supérieures aux valeurs usuelles [16].
- une augmentation statistiquement significative de la triglycéridémie ($1,76 \pm 0,68$ g/l pour les hétérozygotes contre $0,68 \pm 0,37$ g/l pour les témoins $p < 0,001$), comme c'était le cas chez les homozygotes.

Comparaison entre les drépanocytaires homozygotes et hétérozygotes (Figure 3)

L'estimation des valeurs moyennes des paramètres lipidiques signale une baisse significative du taux de cholestérol total chez les homozygotes comparés aux hétérozygotes ($1,09 \pm 0,5$ g/l vs $1,49 \pm 0,3$ g/l $P < 0,0001$). Cette différence serait le reflet de la perte accentuée du cholestérol chez les homozygotes, notamment en période de crise du fait d'une fragilité plus prononcée de la membrane érythrocytaire et donc d'une utilisation accrue du cholestérol pour le remodelage de cette membrane.

En outre une baisse significative du cholestérol-HDL a été enregistrée chez les homozygotes ($0,24 \pm 0,12$ g/l pour les homozygotes contre $0,51 \pm 0,20$ g/l pour les hétérozygotes $p < 0,002$). Cette diminution serait en faveur d'une majoration du risque athérogène, ce qui est confirmé par l'indice d'athérogénicité qui est supérieur aux valeurs usuelles ($5,28 \pm 2,4$ les homozygotes vs $3,4 \pm 1,4$ pour les hétérozygotes ; $p < 0,001$).

La concentration de cholestérol-LDL est quant à elle significativement abaissée chez les homozygotes par rapport aux hétérozygotes ($0,72 \pm 0,4$ g/l vs $0,96 \pm 0,5$ g/l $p < 0,009$). Ce résultat pourrait être en rapport non seulement avec la baisse de la cholestérolémie totale, mais également avec le niveau du stress oxydatif observé dans ce contexte. En effet, une diminution du cholestérol total entrainerait celle du cholestérol LDL de même que la présence du stress oxydatif provoquerait l'oxydation des LDL, d'où une baisse du cholestérol-LDL. Cette oxydation serait plus prononcée chez les homozygotes. Aussi, serait-il plus intéressant de déterminer la proportion de LDL oxydées en vue d'une évaluation plus objective du stress oxydatif au cours de la drépanocytose, le dosage du cholestérol-LDL présentant certaines limites.

Concernant les triglycérides, il n'a été noté aucune différence significative au sein de ces deux sous-groupes ($1,80 \pm 0,80$ g/l pour les homozygotes vs

1,76 ± 0,68 g/l pour les hétérozygotes $p < 0,352$). Ces résultats montrent que les facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires sont plus prononcés chez les homozygotes qui sont plus exposés aux phénomènes de stress oxydatif et donc aux crises, alors que les hétérozygotes seraient plutôt asymptomatiques.

Si nous considérons les valeurs moyennes des paramètres lipidiques des témoins, des hétérozygotes et des homozygotes, nous constatons que les facteurs de risque cardio-vasculaire les plus pertinents seraient l'indice d'athérogénicité et les triglycérides. Le cholestérol, quant à lui n'est pas suffisamment expressif puisqu'il est utilisé pour le remodelage de la membrane lésée.

Les protéines de l'inflammation

L'évaluation de la CRP chez les drépanocytaires homozygotes, a montré que ceux qui étaient en phase stationnaire sont plus nombreux ($n=39$ avec $4,2 \pm 3,20$ mg/l) que ceux qui étaient en crise ($n=17$ avec $33,7 \pm 27,9$ mg/l).

Par ailleurs, les concentrations de CRP sont significativement plus élevées chez les homozygotes ($13,2 \pm 20,52$ mg/l) comparés aux témoins ($3,5 \pm 3,22$ mg/l avec $p < 0,001$) et aux hétérozygotes ($5,6 \pm 8,52$ mg/l avec $p < 0,014$). Par contre, hétérozygotes et témoins ont des taux comparables, avec un $p < 0,108$. Ces données montrent que les homozygotes font beaucoup plus de crises que les hétérozygotes qui seraient plutôt asymptomatiques. Nos résultats confirment ceux de Monnet et coll. [17] et de Benjamin et coll. [18]. En effet, Monnet et coll. [17] ont observé une augmentation nette et significative des concentrations sériques de CRP et d' $\alpha 1$ -glycoprotéine acide ($\alpha 1$ -GPA) avec une diminution de la transferrinémie, justifiant l'existence du caractère aigu d'une réaction inflammatoire lors de la crise drépanocytaire. D'après ces résultats, les concentrations sériques de CRP et de l' $\alpha 1$ -GPA varient en fonction de l'état clinique du malade : en crise ou en phase stationnaire. Toutefois ils soulignent une augmentation légère et significative de l' $\alpha 1$ -GPA, au cours de la phase stationnaire, alors que la CRP reste inchangée. L'augmentation de l' $\alpha 1$ -GPA serait la conséquence d'une réaction inflammatoire résiduelle consécutive à une crise précédente plus ou moins récente. Il est également noté que, lors de la crise, l'élévation des deux protéines est concomitante. L'ensemble de ces données suggèrent que la CRP à cinétique d'évolution plus rapide, serait le marqueur de choix du début de la crise.

- Relations entre la CRP et les paramètres lipidiques
La CRP est négativement corrélée au cholestérol total ($r = -0,622$ avec $p < 0,002$), au cholestérol LDL ($r = -0,521$ avec $p < 0,032$) chez les homozygotes en crise. Pour les autres paramètres, nous n'avons noté aucune corrélation. Ces associations pourraient s'expliquer par le fait que lors de la crise drépanocytaire,

l'inflammation s'accompagne d'une accentuation de l'hémolyse érythrocytaire et donc d'une diminution du taux d'hémoglobine. L'hémolyse entraînant une lyse des membranes lésées, le cholestérol plasmatique est utilisé pour la reconstitution des membranes biologiques, d'où sa diminution.

CONCLUSION

Cette étude confirme les perturbations des paramètres lipidiques antérieurement rapportées dans la drépanocytose. La diminution du cholestérol total associée à une augmentation des triglycérides, pourrait être la caractéristique des drépanocytaires homozygotes. Aussi, malgré la baisse du cholestérol-HDL, l'élévation de l'indice d'athérogénicité et l'hypertriglycéridémie serait-elle en faveur d'un risque majoré chez les homozygotes. Pour réduire ce risque, il serait indiqué de mettre en place des mesures hygiéno-diététiques, mais surtout d'assurer un suivi biologique de manière périodique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ingram VM, R.M., Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. Nature 1957;4581: 326-328.
2. Pauling L, I.H., Singer SJ, Wells IC, Sickle cell anemia: a molecular disease. Science 1949; 110:543-48.
3. Sall-Lopez P, D.I., Cissé A, Mahou CMS, Niang-Sylla M, Gueye PM, Sall ND, Sarr M, Diarra M, Apport des récepteurs solubles de la transferrine dans l'évaluation du statut en fer au cours de la drépanocytose. Ann Biol Clin 2004; 62(4).
4. Arnal C, G.R., Balédert F, Drépanocytose chez l'adulte. Encycl. Méd. Chir. (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), 2002. Hématologie, 13-006-D-16, 15p.
5. Oztaz EY, S.S., Unal S, Ozgunes N, Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. Clin. Exp. Med. 2011; 11:195-198.
6. Nnodim JK, O.A., Nwanjo HU, Ibeaja OA, Plasma lipid profile in sickle cell disease patients in Owerri, Nigeria. Pak. J. Nutr. 2012; 11(1): 64-65.
7. Nacoulma EWC, S.J., Profil hématologique et biochimique des drépanocytaires SS et SC en phase stationnaire au centre hospitalier national Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou. Mali Médical 2006; 9: 8-11.
8. Itabe H, E.R., Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2009; 37(1): 4-11.
9. Peluso I, M.G., Urban L, Loannone F, Serfini M, Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets 2012; 12(4): 351-360.
10. Diatta A, C.F., Gueye Tall F, Diallo F, Touré Fall AO, Sarr GN,

Lopez Sall P, Sall ND, Touré M, Serum lipids and oxidized low density lipoprotein levels in sickle cell disease: Assesment and pathobiological significance. *African J. Biochemistry Research* 2014; 8(2), 39-42.

11. Mokondjimobe E, L.-M.B., Ovono-Abessolo F, Gombet T, Guie G, Ngou-Milama E, Parra HJ, Lipid, lipoproteins and atherogenesis profiles in sickle cell disease among Central African patients. *Ann Biol Clin* 2012; 70(2): 183-188.

12. Marzouki ZM, K.S., Plasma and blood cells membrane lipid concentration of sickle cell disease patients. *Saudi Med. J.* 2003; 24(4): 376-8.

13. Monnet D, S.A., Yapo AE, La lipoprotéine (a) et les protéines de la phase aiguë de l'inflammation au cours de la crise drépanocytaire homozygote. *Ann. Biol. Clin.* 2002; 60(1): 101-103.

14. Njoku O.U, O.I., Alumunan EO, Nwanjoh J, serum lipids, ABO blood group and sickle cell disease. *Indian J Physiol Pharmacol* 1996; 40(2): 171-174.

15. B. V., Risque cardiovasculaire et dyslipidémies. *Annales d'Endocrinologie* 1998; 59: 335-343.

16. Djoumessi S, Z.L., Lando G, Zeukeng D, Serum lipids and atherogenic risk in sickle cell trait carriers. *Ann Biol Clin* 1994; 52: 663-665.

17. Monnet D, S.A., Yapo AE, Intérêt clinique du dosage de la protéine C-reactive, de l'alpha-glycoprotéine acide et de la transferrine au cours de la drépanocytose homozygote. *Bull. Soc. Path. Ex.* 1993; 86: 282-285.

18. Benjamin L.J, H.S., Rouaud C, Biochemical and cellular alterations in sickle cell anemia crisis markers and therapeutic monitors. *INSERM* 1985; 141: 451-454.

Full Length Research Paper

Serum lipids and oxidized low density lipoprotein levels in sickle cell disease: Assessment and pathobiological significance

Diatla Alassane^{1*}, Cissé Fatou¹, Guèye Tall Fatou², Diallo Fatou¹, Touré Fall Awa Oumar³, Sarr Gaston Ndéné¹, Lopez Sall Philomène², Sall Niama Diop¹ and Touré Méissa¹

¹Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, UCAD, Senegal.

²Pharmaceutical Biochemistry Laboratory, Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, UCAD, Senegal.

³Hematology Laboratory, Aristide Le Dantec Hospital, Dakar, Senegal.

Accepted 24 January, 2014

One hundred and eighteen (118) subjects aged 15 to 36 years divided into control subjects (AA n = 42), heterozygous sickle cell patients (AS n = 33) and homozygous sickle cell patients (SS n = 43) were investigated for a lipid profile including the measurement of oxidized low density lipoprotein (LDL) to assess the risk of early atherosclerosis in sickle cell disease. The results show that total, high density lipoprotein (HDL) and LDL plasma cholesterol levels are significantly lower in the sickle cell patients than in control group ($p < 0.05$). In contrast, the triglyceride levels, the ratio of triglycerides to HDL-cholesterol and the oxidized LDL fraction are higher in patients ($p < 0.05$). These lipid abnormalities could represent a cardiovascular risk for sickle cell disease patients.

Key words: Atherosclerosis, dyslipidemia, oxidized low density lipoprotein (LDL), sickle cell disease.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is a genetic disorder caused by a single substitution (GTG for GAG) at the beta globin gene on chromosome 11. This gene defect codes for the sickle beta-hemoglobin characterized by the substitution of valine for glutamic acid at the sixth position of the beta-chain (Pauling et al., 1949; Ingram, 1957). This inherited affection also called Sickle cell anemia (SCA) is a condition characterized by defect in plasma and erythrocyte lipids associated with a chronic oxidative stress (Oztaz et al., 2011). These two morbid processes disturb lipid homeostasis (Rice et al., 1986; Diatta et al., 2002) and induce lipid peroxidation which promotes the accumulation of malondialdehyde, lysophosphatides and oxidizing agents (Diatta et al., 1999; Hebbel et al., 1982). These products, which are found at higher levels in the erythrocytes and plasma of SCA patients, act as powerful

catalysts for LDL oxidation. The generated hydroperoxides and oxidized low density lipoproteins (oxLDL) induce an atherogenic process and serial deleterious effects (Peluso et al., 2012; Itabe, 2009). They promote a defect in lipid metabolism and abnormalities in lipids homeostasis by compromising the Lecithin cholesterol acyltransferase and the paraoxonase activity (Bielicki and Forte, 1999; Aviram et al., 1999). These two enzymes have been shown to play a key role in esterification of cholesterol on high density lipoprotein (Santamarina-Fojo et al., 2000) and in the lipid oxidation (Hine et al., 2012).

Consistent with these data involved in atherogenesis, the aim of this study is to evaluate plasma lipids and oxidized LDL concentrations in SCA patients in order to verify the presence of an atherogenic lipid profile.

*Corresponding author. E-mail: adiatta@refer.sn. Tel: 00221 645 71 30. Tel/Fax: 33 991 68 09.

Table 1. Lipid profiles in homozygous sickle disease (SS) and sickle cell traits (AS) compared to healthy controls (AA).

Biological parameter	AA (n=42)	AS (n=33)	SS (n=43)
Chol (mg/ml)	1.63 ± 0.42	1.57 ± 0.38	1.18 ± 0.21*
HDL-c (mg/ml)	0.47 ± 0.14	0.43 ± 0.13	0.32 ± 0.07*
LDL-c (mg/ml)	0.98 ± 0.33	1.00 ± 0.32	0.69 ± 0.18*
Triglyceride (mg/ml)	0.79 ± 0.22	0.84 ± 0.27	0.94 ± 0.39*
Oxidized LDL (U/L)	59.79 ± 12.84	42.75 ± 13.7	70.05 ± 0.82*
LDL-c /HDL-c	2.16 ± 1.06	2.47 ± 0.99	2.21 ± 0.82
Triglyceride/HDL-c	1.67 ± 0.66	2.22 ± 1.51	3.08 ± 1.99 *

The values are expressed as mean ± standard deviation. *significantly different from the control group (AA) ($p < 0.05$).

MATERIALS AND METHODS

The subjects of this study were randomly selected from Aristide Le Dantec hospital and from two monitoring centers for SCA patients, namely the CNTS (Centre National de Transfusion Sanguine) and Albert Royer Children's Hospital of Fann.

These health facilities are located in Dakar in Senegal. Eligibility criteria of this study population included absence of traditional cardiovascular risk factors (obesity, diabetes mellitus, hypertension, tabagism, alcoholism) and absence of any therapy or affection underlying dyslipidemia. Informed consent from each subject was obtained for participation in the study. Then, 5 ml-blood was collected, by venipuncture in the antecubital fossa, in a tube containing lithium heparin and 5 ml in a dry tube. The serum obtained from the dry tubes was divided into aliquots and frozen at -80°C for the lipid profile and quantification of oxidized LDL. The heparin tubes were used for Emmel test and hemoglobin electrophoresis.

Plasma cholesterol and triglycerides were determined by enzymatic methods according to the manufacturer instructions on COBAS INTEGRA 400 analyzer (Roche Diagnostic[®], Germany). HDL and LDL cholesterol were determined on the same instrument by direct methods. Oxidized LDL was quantified by ELISA method using kits marketed by Mercodia (Mercodia[®], Sweden). Mercodia oxidized LDL ELISA is an enzyme immunoassay based on a direct sandwich technique utilizing anti-oxLDL antibodies as first antibody. Before the ELISA test, serum was diluted in order to obtain the same concentration of total LDL (0.5 g/L). This normalization concerns both patients and control subjects.

Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation. Statistical analysis was carried out using EPI INFO 6. Student's test was used for comparing the different concentrations obtained. A difference to the value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

This study population is composed of 118 individuals aged 15 to 36 years divided into three groups according to the electrophoretic patterns of hemoglobin and the Emmel test: 43 homozygous sickle cell patients (SS), 33 heterozygous sickle cell patients (AS) and 42 control subjects (AA). The individuals in the various groups were

matched for age and sex. The lipid plasma concentrations (total, HDL and LDL cholesterol and triglycerides) of the three groups are shown in Table 1. Total, LDL and HDL cholesterol are significantly lower in homozygous SCA patients compared to the control groups ($p < 0.001$); triglycerides are significantly higher in SCA patients than in control group (Table 1). The decrease in LDL cholesterol is associated to an increase in LDL particle oxidized fraction (Table 1). Really, the oxidized LDL level per Gramm of total LDL is significantly higher in SCA patients than in the control groups ($p < 0.05$). Table 1 shows also the results of lipid indexes. The LDL/HDL ratio is not significantly different from one group to another among the study participants. In contrast, the ratio of triglycerides to HDL-c (TG/HDL- ratio) is significantly higher in SCA patients than in controls.

Table 2 presents the lipid data of the AA and SS groups according to the sex: apparently the differences between control subjects and SCA patients are more pronounced in males for all parameters but HDL- cholesterol and triglyceride levels show a more pronounced difference in females.

DISCUSSION

The hypocholesterolemia (total and LDL) observed in this study SCA patients confirms the results of a number of studies (El-hazim et al., 1987; Oztaz et al., 2011; Rahimi et al., 2006; Shores et al., 2003; Vanderjagt et al., 2001; Mokondjimob et al., 2012); the mean cholesterol concentration in this study patients is however particularly low (1.18 g/L).

The more pronounced difference observed in males has also been already reported by Shores et al. (Shores et al., 2003). The decrease of both LDL and HDL status attenuates the variation of the LDL-c/HDL-c ratio. In this case, the lipid index losses in this study the clinical utility reported by Fernandez and Webb (2008).

Hypocholesterolemia may be caused by several mechanisms. Plasma cholesterol is essential to the renewal of erythrocyte membranes and it is mobilized from plasma

Table 2. Sex-related Lipid variations among Sickle hemoglobin carriers compared to healthy controls.

Biological parameter	Males (n=44)		Females (n=74)	
	AA	SS	AA	SS
Chol (mg/ml)	1.60 ± 0.37	1.30 ± 0.21*	1.64 ± 0.45	1.36 ± 0.32*
HDL-c (mg/ml)	0.42 ± 0.10	0.38 ± 0.09*	0.50 ± 0.14	0.38 ± 0.10*
LDL-c (mg/ml)	1.00 ± 0.33	0.76 ± 0.20*	0.97 ± 0.30	0.87 ± 0.25*
Triglyceride (mg/ml)	0.80 ± 0.20	0.85 ± 0.25*	0.78 ± 0.20	0.90 ± 0.21*
Triglycerides/HDL	1.58 ± 0.66	2.83 ± 1.15	1.83 ± 0.71	3.16 ± 2.41*

The values are expressed as mean ± standard deviation. *significantly different from the control group (AA) (p < 0.05).

for this function. This turnover is exacerbated in SCA as a result of the alteration of erythrocyte components by intense oxidative stress (Diatta et al., 1999, 2002; Rice et al., 1986; El-hazmi et al., 1987; Ngogang et al., 1989). Hypocholesterolemia may also result from hemodilution caused by the decreased size of red blood cells resulting in an increased plasma volume and having thus a dilution effect on plasma constituents (Shores et al., 2003).

The concomitant decrease in HDL cholesterol is consistent with data reported by several authors (Vanderjagt et al., 2001; Mokondjimobe et al., 2012; Seixas et al., 2010; Nnodim et al., 2012). Other reports describe either no difference (Shores et al., 2003) or an increase in SCA patients compared to controls (Rahimi et al., 2006).

It is well known that HDL levels are associated with age. In women, HDL-Cholesterol levels increase progressively to the fifth decade and then decrease with menopause (Kim et al., 2000). This mechanism may influence the data on HDL Cholesterol concentrations reported by Rahimi et al. (2006): this study concerns women (with SS or AS phenotypes) who are older than the control subjects (23.7, 34.8 and 20.6 years respectively). This is probably the reason for the increase in HDL cholesterol in SCA patients observed by Rahimi et al. (2006). Another finding of this study is the higher triglyceride concentration observed in SCA patients. The atherogenic link between triglycerides (TG) and low HDL-c is better demonstrated, in this study, by the ratio of triglycerides to HDL-cholesterol (TG/HDL-c ratio). The raise in this index and in the triglycerides, strongly implicated in the atherogenic process (Gotto, 1998; Da Luz et al., 2008) suggests an increased risk of atherosclerosis during SCA.

In the studied population, the depletion in HDL cholesterol, recognized as a protective factor (Filippatos and Elisaf, 2013; Besler et al. 2010), raises the issue of a possible atherosclerotic risk hidden by hypocholesterolemia in SCA patients. This cardiovascular risk, little studied in sickle cell disease, is underpinned in this study by low HDL-cholesterol levels associated both with a rise in the fraction of oxidized LDL, in the serum triglycerides and in the TG/HDL-c ratio. The atherogenic potential of these lipid disorders has been reported by several authors

(Mokondjimobe et al., 2012; Daugherty and Roselaar, 1995; Gotto, 1998; Da Luz et al., 2008).

Indeed the role of oxidized LDL or Ox LDL in atherogenesis is well known (Belcher et al., 1999; Huang et al., 2008; Itabe, 2009). Their internalization mediated by macrophage receptors leads to the formation of foam cells (Nagy et al., 1998). The release of the contents of these cells induces inflammation which, in synergy with cytokines, causes the formation of atherosclerotic plaque (Daugherty and Roselaar, 1995; Berliner et al. 1995; Chilsom et al., 1999). The outgrowth obtained then increases to the point of obstructing the lumen. In parallel, protein fibrous cap overlying the atheroma is degraded by the metalloproteinases released by macrophages and smooth muscle cells. This erosion promotes thrombus formation. Thus, the large fraction of oxidized LDL in this sickle cell population appears to be a significant risk factor for atherosclerosis. The presence of an atherogenic phenotype in SCA patients has been already reported (Seixas et al., 2010).

The combined effects of decrease in HDL-cholesterol, increased oxidized LDL status, raised triglyceridemia and TG/HDL-c ratio in SCA patients, despite the global hypocholesterolemia, could present a not negligible cardiovascular risk.

Conclusion

The exploration of classical lipid parameters and oxidized LDL in the sickle cell disease shows that in addition to the qualitative abnormality of hemoglobin, an abnormal lipid profile which includes a decrease in HDL cholesterol level, an increase in triglycerides, in TG/HDL-c ratio and a high rate of oxidized LDL is observed in these patients. These lipid disorders by their powerful atherogenic potential can possibly carry an early cardiovascular risk. Without care, the atherogenic risk could be an obstacle to the improvement of the survival of patients with sickle cell disease.

REFERENCES

- Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul R, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is

- inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (7-8): 892-904.
- Belcher JD, Marker RH, Geiger R, Girotti AW, Steinberg MH, Hebbel R, Vercellotti GM (1999). Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. *J. Lab. Clin. Med.* 133:605-12.
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 91 (9): 2488-2496.
- Besler C, Heinrich K, Riwanto M, Lüscher TF, Landmesser U (2010). High density lipoprotein-mediated anti-atherosclerotic and endothelial-protective effects: a potential novel therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* 16(13): 1480 – 93.
- Bielicki JK, Forte TM (1999). Evidence that lipid hydroperoxides inhibit plasma lecithin:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 40(5): 948-954.K
- Chilson GM, Hazen SI, Fox PL, Cathcart MK (1999). The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages: biochemical and biological mechanisms. *J. Biol. Chem.* 274 (37): 25959-25962.
- Da luz PL, Favarato D, Faria-Neto Jr JR, Lemos P, Chagas ACP (2008). High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clinics* 64: 427-432.
- Daugherty A, Roselaar SE (1995). Lipoprotein oxidation as a mediator of atherogenesis: insights from pharmacological studies. *Cardiovasc. Res.* 29 (3): 297-311.
- Diatta A, Diallo F, Sarr NG, Traoré S, Diagne I, Sall PL, Sall ND, et Touré M (2002). Lésions peroxidatives des phospholipides érythrocytaires au cours de la drépanocytose. *Dakar Médical* 47 (1): 33-37.
- Diatta A, Sall ND, Sarr GN, Diallo F et Touré M (1999). Evaluation du stress oxydatif dans la maladie drépanocytaire. *L'Eurobiologiste* 33 (241): 57-60
- El-hazmi MA, Jabbar FA, Warys AS (1987). Cholesterol and triglyceride level in patients with sickle cell anaemia. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47(4): 351-4.
- Fernandez ML, Webb D (2008). The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. *J. Am. Coll. Nutr.* 27 (1): 1-5.
- Filippatos TD, Elisaf MS (2013). High density lipoprotein and cardiovascular diseases. *World J. Cardiol.* 5(7): 210-214.
- Gotto AM Jr (1998). Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 82(9A):22Q-25Q.
- Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH(1982). Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 70(6):1253-9.
- Hine D, Mackness B and Mackness M (2012).Coincubation of PON1, APO A1 and LCAT Increases the time HDL is able to prevent LDL oxidation. *IUBMB Life* 64(2): 157-161.
- Huang H, Mai W, Liu D, Hao Y, Tao J, Dong Y (2008). The oxidation ratio of LDL: a predictor for coronary artery disease. *Dis. Markers* 24 (6): 341-349.
- Ingram VM (1957). Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle haemoglobin. *Nature* 180 (4581): 326-328
- Itabe H (2009). Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 37(1): 4-11.
- Kim CJ, Kim TH, Ryu WS, Ryou UH (2000). Influence of menopause on High density lipoprotein-cholesterol and lipids. *J. Korean Med. Sci.* 15: 380-386.
- Mokondjimobe E, Longo-Mbenza B, Ovono-Abessolo F, Gombet T, Guie G, Ngou-Milama E, Parra HJ (2012). Lipid, lipoproteins and atherogenesis profiles in sickle cell disease among Central African patients. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 70(2): 183-188.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR- δ . *Cell* 93: 229-240.
- Ngogang J, Mouray H, Lebreton De Vonne T, Raisonnier A (1989). Erythrocyte and plasma cholesterol exchange in sickle cell anemia. *Clin. Chim. Acta.* 179: 295-304.
- Nnodim JK, Opara AU, Nwanjo HU, Ibeaja OA (2012). Plasma lipid profile in sickle cell disease patients in Owerri, Nigeria. *Pak. J. Nutr.* 11(1): 64-65.
- Oztaz EY, Sabuncuoğlu S, Unal S, Ozgunes N (2011). Hypocholesterolemia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. *Clin. Exp. Med.* 11: 195-198.
- Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC (1949). Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science* 110: 543-48.
- Peluso I, Morabito G, Urban L, Loannone F, Serafini M (2012). Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 12(4): 351-360.
- Rahimi Z, Merat A, Haghshenas M, Madani H, Rezaei M, Nagel RL (2008). Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL cholesterol in sickle cell trait. *Clin. Chim. Acta* 365: 217-220.
- Rice EC, Omorphos SC, Baysal E (1986). Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem. J.* 237: 265-269.
- Santamarina-Fojo S, Lambert G, Hoeg JM, Brewer HB (2000). Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 267-275.
- Seixas Mo, Rocha Lc, Carvalho Mb, Menezes JF, Lyra IM, Nascimento VML, Couto RD, Atta AM, Reis MG, Goncalves MS (2010). Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids Health Dis.* 9: 91.
- Shores J, Peterson J, Vanderjagt D and Glew RH (2003). Reduced cholesterol levels in african-american adults with sickle cell disease. *J. Natl. Med. Assoc.* 95:813-817.
- Vanderjagt Dj, Shores J, Okorodudu A, Okolo SN, Glew RH (2001). Hypocholesterolemia in Nigerian children. *J. Trop. Pediatr.* 47:1-6.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaul DK, Nagel RL. Sick cell vasoocclusion: many issues and some answers. *Experientia*. 1993 Jan 15;49(1):5-15.
2. Ashley-Koch A, Yang Q, Olney RS. Sick cell hemoglobin (HbS) allele and sick cell disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2000 May 1;151(9):839-45.
3. Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell-disease. *Lancet*. 2004 Oct 9-15;364(9442):1343-60.
4. Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sick cell disease: relevance to children. *Pediatr Hematol Oncol*. 2007 Apr-May;24(3):159-70.
5. Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y. Complications associated with sick cell trait: a brief narrative review. *Am J Med*. 2009 Jun;122(6):507-12.
6. Chaves MA, Leonart MS, do Nascimento AJ. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*. 2008 Jun;13(3):187-92.
7. Schnog JB, Mac Gillavry MR, van Zanten AP, Meijers JC, Rojer RA, Duits AJ, et al. Protein C and S and inflammation in sick cell disease. *Am J Hematol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 May;76(1):26-32.
8. Katz MA. The expanding role of oxygen free radicals in clinical medicine. *West J Med*. 1986 Apr;144(4):441-6.
9. Hebbel RP, Morgan WT, Eaton JW, Hedlund BE. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sick cell hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(1):237-41.
10. Sheng K, Shariff M, Hebbel RP. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3467-70.
11. Herrick CJ. The Evolution of Intelligence and Its Organs. *Science*. 1910 Jan 7;31(784):7-18.
12. Emmel VE. Observations Regarding the Erythrocytic Origin of Blood Platelets. *J Med Res*. 1917 Sep;37(1):67-74 1.
13. Hahn EaEG. Sick cell anemia: report of a case improved by splenectomy; experimental study of sick cell formation. *Arch Intern Med*. 1927;39:233-257.
14. Diggs LaRC. Pathology of sick cell anemia. *South Med J*. 1934;27 / 8396845.
15. Pauling L, Itano HA, et al. Sick cell anemia a molecular disease. *Science*. 1949 Nov 25;110(2865):543-8.
16. Neel JV. The inheritance of the sickling phenomenon, with particular reference to sick cell disease. *Blood*. 1951 May;6(5):389-412.
17. Harris JW. Studies on the destruction of red blood cells. VIII. Molecular orientation in sick cell hemoglobin solutions. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1950 Oct;75(1):197-201.
18. Perutz MF, Mitchison JM. State of haemoglobin in sick cell anaemia. *Nature*. 1950 Oct 21;166(4225):677-9.
19. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sick cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956 Oct 13;178(4537):792-4.
20. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sick cell haemoglobin. *Nature*. 1957 Aug 17;180(4581):326-8.
21. Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sick cell haemoglobins by fingerprinting. *Biochim Biophys Acta*. 1958 Jun;28(3):539-45.

22. Ingram VM. Abnormal human haemoglobins. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochim Biophys Acta*. 1959 Dec;36:402-11.
23. Piel FB. [Sickle-cell disease: geographical distribution and population estimates]. *Med Sci (Paris)*. Nov;29(11):965-7.
24. D.A. Diallo AG, B.A. Touré , Y.S. Sarro , M. Sima, O. Tessougué, M.A. Baraika, P. Guindo, M. Traoré, M. Diallo, A. Dorie. Dépistage néonatal ciblé de la drépanocytose : limites du test de falciformation (test d'Emmel) dans le bilan prénatal en zone ouest africaine. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2018;66(3):181-185.
25. Lehmann H, Raper AB. Maintenance of high sickling rate in an African community. *Br Med J*. 1956 Aug 11;2(4988):333-6.
26. Haldane J. Disease and Evolution. *Rlc Sci*. 1949;19 : 68-76.
27. Willcox M, Bjorkman A, Brohult J, Pehrson PO, Rombo L, Bengtsson E. A case-control study in northern Liberia of *Plasmodium falciparum* malaria in haemoglobin S and beta-thalassaemia traits. *Ann Trop Med Parasitol*. 1983 Jun;77(3):239-46.
28. Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, et al. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet*. 2002 Apr 13;359(9314):1311-2.
29. Roth EF, Jr., Friedman M, Ueda Y, Tellez I, Trager W, Nagel RL. Sickling rates of human AS red cells infected in vitro with *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*. 1978 Nov 10;202(4368):650-2.
30. Shear HL, Roth EF, Jr., Fabry ME, Costantini FD, Pachnis A, Hood A, et al. Transgenic mice expressing human sickle hemoglobin are partially resistant to rodent malaria. *Blood*. 1993 Jan 1;81(1):222-6.
31. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. *Nat Commun*. Nov 2;1:104.
32. HUNT JA IV. Abnormal human haemoglobins. IV. The chemical difference between normal human haemoglobin and haemoglobin C. *Biochim Biophys Acta*. Aug 1960;26;42:409-21.
33. FN Sack MS, B Faye, S Diop. MORBIDITÉ ET ASPECTS EVOLUTIFS DE LA DRÉPANOCYTOSE SC : UNE ÉTUDE DE 129 PATIENTS AU SERVICE D'HÉMATOLOGIE CLINIQUE DE DAKAR. *Health Sci Dis*. 2016;17 (4) : 57 - 62.
34. Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looareesuwan S, et al. Strong linkage disequilibrium of a HbE variant with the (AT)9(T)5 repeat in the BP1 binding site upstream of the beta-globin gene in the Thai population. *J Hum Genet*. 2005;50(1):7-11.
35. Silvestroni E, Bianco I. [a New Kind of Drepanocytic Anemia: Hemoglobin a-Hemoglobin Lepore Disease]. *Prog Med (Napoli)*. 1963 Sep 30;19:545-8.
36. Monplaisir N, Merault G, Poyart C, Rhoda MD, Craescu C, Vidaud M, et al. Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(24):9363-7.
37. Nagel RL, Daar S, Romero JR, Suzuka SM, Gravell D, Bouhassira E, et al. HbS-oman heterozygote: a new dominant sickle syndrome. *Blood*. 1998 Dec 1;92(11):4375-82.
38. Romana M, Gerard N, Chout R, Krishnamoorthy R, Marianne-Pepin T. Origin of Hb S Antilles. *Am J Hematol*. 2002 Aug;70(4):331-2.
39. Kan YW, Dozy AM. Antenatal diagnosis of sickle-cell anaemia by D.N.A. analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet*. 1978 Oct 28;2(8096):910-2.
40. Nagel RL, Steinberg MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2001 Mar-Apr;20(2):123-36.

41. Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, Rouabhi F, Dunda-Belkhodja O, Chardin P, et al. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Apr;82(7):2111-4.
42. Nagel RL, Steinberg MH. Genetics of the β^S gene: origins, genetic epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs D, Nagel RL, editors. *Disorders of hemoglobin*. First ed. New-York: Cambridge University Press; 2001. p. 711-55.
43. Orkin SH, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, et al. Linkage of beta-thalassaemia mutations and beta-globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature*. 1982 Apr 15;296(5858):627-31.
44. Zago MA, Silva WA, Jr., Dalle B, Gualandro S, Hutz MH, Lapoumeroulie C, et al. Atypical beta(s) haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *Am J Hematol*. 2000 Feb;63(2):79-84.
45. Zago MA, Silva WA, Jr., Gualandro S, Yokomizu IK, Araujo AG, Tavela MH, et al. Rearrangements of the beta-globin gene cluster in apparently typical betaS haplotypes. *Haematologica*. 2001 Feb;86(2):142-5.
46. Liu L, Muralidhar S, Singh M, Sylvan C, Kalra IS, Quinn CT, et al. High-density SNP genotyping to define beta-globin locus haplotypes. *Blood Cells Mol Dis*. 2009 Jan-Feb;42(1):16-24.
47. Magana MT, Ibarra B, Luevano KE. Analysis of linkage disequilibrium between the 5' and 3' haplotypes of the beta-globin gene cluster in Mexican afro-mestizos. *Blood Cells Mol Dis*. Mar-Apr;44(2):89-94.
48. Carragher B, Bluemke DA, Becker M, McDade WA, Potel MJ, Josephs R. Structural analysis of polymers of sickle cell hemoglobin. III. Fibers within fascicles. *J Mol Biol*. 1988 Jan 20;199(2):383-8.
49. Carragher B, Bluemke DA, Gabriel B, Potel MJ, Josephs R. Structural analysis of polymers of sickle cell hemoglobin. I. Sickle hemoglobin fibers. *J Mol Biol*. 1988 Jan 20;199(2):315-31.
50. Bluemke DA, Carragher B, Potel MJ, Josephs R. Structural analysis of polymers of sickle cell hemoglobin. II. Sickle hemoglobin macrofibers. *J Mol Biol*. 1988 Jan 20;199(2):333-48.
51. Dykes G, Crepeau RH, Edelstein SJ. Three-dimensional reconstruction of the fibres of sickle cell haemoglobin. *Nature*. 1978 Apr 6;272(5653):506-10.
52. Edelstein SJ, Telford JN, Crepeau RH. Structure of fibers of sickle cell hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Apr;70(4):1104-7.
53. Eaton WA, Hofrichter J. Sickle cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem*. 1990;40:63-279.
54. Samuel RE, Salmon ED, Briehl RW. Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin. *Nature*. 1990 Jun 28;345(6278):833-5.
55. Labie D, Elion J. [Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia]. *Pathol Biol (Paris)*. 1999 Jan;47(1):7-12.
56. Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1998 Mar;11(1):163-84.
57. Kuypers FA. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am*. Apr;28(2):155-79.
58. Harrington DJ, Adachi K, Royer WE, Jr. The high resolution crystal structure of deoxyhemoglobin S. *J Mol Biol*. 1997 Sep 26;272(3):398-407.
59. Allan D, Raval P. Some morphological consequences of uncoupling the lipid bilayer from the plasma membrane skeleton in intact erythrocytes. *Biomed Biochim Acta*. 1983;42(11-12):S11-6.

60. Blumenfeld N, Zachowski A, Galacteros F, Beuzard Y, Devaux PF. Transmembrane mobility of phospholipids in sickle erythrocytes: effect of deoxygenation on diffusion and asymmetry. *Blood*. 1991 Feb 15;77(4):849-54.
61. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):R795-805.
62. Dodge JT, Phillips GB. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. *J Lipid Res*. 1967 Nov;8(6):667-75.
63. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1071-7.
64. Kuypers FA. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:68-73.
65. Kuypers FA, de Jong K. The role of phosphatidylserine in recognition and removal of erythrocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004 Mar;50(2):147-58.
66. Dupuy AM, Terrier N, Senecal L, Morena M, Leray H, Canaud B, et al. [Is C-reactive protein a marker of inflammation?]. *Nephrologie*. 2003;24(7):337-41.
67. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sickle cell disease. *Nat Rev Dis Primers*. Mar 15;4:18010.
68. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007 May;21(3):157-71.
69. Westerman M, Pizzey A, Hirschman J, Cerino M, Weil-Weiner Y, Ramotar P, et al. Microvesicles in haemoglobinopathies offer insights into mechanisms of hypercoagulability, haemolysis and the effects of therapy. *Br J Haematol*. 2008 Jul;142(1):126-35.
70. Westerman M, Porter JB. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol Dis*. 2016 Jul;59:134-9.
71. Alayash AI. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells Mol Dis*. 2017 May;70:78-86.
72. Hebbel RP, Key NS. Microparticles in sickle cell anaemia: promise and pitfalls. *Br J Haematol*. 2016 Jul;174(1):16-29.
73. Jacques Elion DL. Bases physiopathologiques moléculaires et cellulaires du traitement de la drépanocytose. *Hématologie*. 1996;2 (6) :499-510.
74. Nash GB, Johnson CS, Meiselman HJ. Rheologic impairment of sickle RBCs induced by repetitive cycles of deoxygenation-reoxygenation. *Blood*. 1988 Aug;72(2):539-45.
75. Evans EA, Mohandas N. Membrane-associated sickle hemoglobin: a major determinant of sickle erythrocyte rigidity. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1443-9.
76. Kuypers FA. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2014 Apr;28(2):155-79.
77. Seakins M, Gibbs WN, Milner PF, Bertles JF. Erythrocyte Hb-S concentration. An important factor in the low oxygen affinity of blood in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1973 Feb;52(2):422-32.
78. Rogers SC, Ross JG, d'Avignon A, Gibbons LB, Gazit V, Hassan MN, et al. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. *Blood*. 2013 Feb 28;121(9):1651-62.
79. Zhang Y, Berka V, Song A, Sun K, Wang W, Zhang W, et al. Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. *J Clin Invest*. 2014 Jun;124(6):2750-61.

80. Sun K, Zhang Y, Bogdanov MV, Wu H, Song A, Li J, et al. Elevated adenosine signaling via adenosine A2B receptor induces normal and sickle erythrocyte sphingosine kinase 1 activity. *Blood*. 2015 Mar 5;125(10):1643-52.
81. Sun Y, Hong F, Zhang L, Feng L. The sphingosine-1-phosphate analogue, FTY-720, promotes the proliferation of embryonic neural stem cells, enhances hippocampal neurogenesis and learning and memory abilities in adult mice. *Br J Pharmacol*. 2016 Sep;173(18):2793-807.
82. Eaton WA, Hofrichter J, Ross PD. Editorial: Delay time of gelation: a possible determinant of clinical severity in sickle cell disease. *Blood*. 1976 Apr;47(4):621-7.
83. Ferrone FA. The delay time in sickle cell disease after 40 years: A paradigm assessed. *Am J Hematol*. 2015 May;90(5):438-45.
84. Uzunova VV, Pan W, Galkin O, Vekilov PG. Free heme and the polymerization of sickle cell hemoglobin. *Biophys J*. 2010 Sep 22;99(6):1976-85.
85. Noguchi CT, Schechter AN. Sickle hemoglobin polymerization in solution and in cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1985;14:239-63.
86. Brugnara C, de Franceschi L, Alper SL. Inhibition of Ca(2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *J Clin Invest*. 1993 Jul;92(1):520-6.
87. Hebbel RP, Boogaerts MA, Eaton JW, Steinberg MH. Erythrocyte adherence to endothelium in sickle-cell anemia. A possible determinant of disease severity. *N Engl J Med*. 1980 May 1;302(18):992-5.
88. Bookchin RM, Balazs T, Landau LC. Determinants of red cell sickling. Effects of varying pH and of increasing intracellular hemoglobin concentration by osmotic shrinkage. *J Lab Clin Med*. 1976 Apr;87(4):597-616.
89. Briehl RW, Ewert S. Effects of pH, 2,3-diphosphoglycerate and salts on gelation of sickle cell deoxyhemoglobin. *J Mol Biol*. 1973 Nov 5;80(3):445-58.
90. Connes P, Alexy T, Detterich J, Romana M, Hardy-Dessources MD, Ballas SK. The role of blood rheology in sickle cell disease. *Blood Rev*. 2016 Mar;30(2):111-8.
91. Pries AR KW. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 1):1-40.
92. Florey. The endothelial cell. *Br Med J*. Aug 1966;27;2(5512):487-90.
93. Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997 Sep 11;337(11):762-9.
94. Hebbel RP, Vercellotti GM. The endothelial biology of sickle cell disease. *J Lab Clin Med*. 1997 Mar;129(3):288-93.
95. Kaul DK, Nagel RL, Chen D, Tsai HM. Sickle erythrocyte-endothelial interactions in microcirculation: the role of von Willebrand factor and implications for vasoocclusion. *Blood*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1993 May 1;81(9):2429-38.
96. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 5;99(5):3047-51.
97. Telen MJ, Batchvarova M, Shan S, Bovee-Geurts PH, Zennadi R, Leitgeb A, et al. Sevuparin binds to multiple adhesive ligands and reduces sickle red blood cell-induced vaso-occlusion. *Br J Haematol*. Dec;175(5):935-48.
98. Hoover R, Rubin R, Wise G, Warren R. Adhesion of normal and sickle erythrocytes to endothelial monolayer cultures. *Blood*. 1979 Oct;54(4):872-6.

99. Hebbel RP, Eaton JW, Steinberg MH, White JG. Erythrocyte/endothelial interactions in the pathogenesis of sickle-cell disease: a "real logical" assessment. *Blood Cells*. 1982;8(1):163-73.
100. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):850-8.
101. Telen MJ. Erythrocyte blood group antigens: polymorphisms of functionally important molecules. *Semin Hematol*. 1996 Oct;33(4):302-14.
102. Fabry ME NR. Heterogeneity of red cells in the sickler: a characteristic with practical clinical and pathophysiological implications. *Blood Cells*. 1982;8(1):9-15.
103. Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources MD, Mougénel D, Beltan E, Chalabi T, et al. Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. *Haematologica*. 2009 Aug;94(8):1060-5.
104. Brittain JE, Parise LV. The alpha4beta1 integrin in sickle cell disease. *Transfus Clin Biol*. 2008 Feb-Mar;15(1-2):19-22.
105. D Labie JE. L'endothélium vasculaire, composante majeure de la maladie drépanocytaire: les cellules circulantes en sont le reflet. *médecine/sciences*. 1998;3 (14) : 352-5.
106. Phelan M, Perrine SP, Brauer M, Faller DV. Sick erythrocytes, after sickling, regulate the expression of the endothelin-1 gene and protein in human endothelial cells in culture. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):1145-51.
107. Yanagisawa M KH, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl*. 1988;Dec;6(4):S188-91.
108. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2863-7.
109. Hocher B, Thone-Reineke C, Bauer C, Raschack M, Neumayer HH. The paracrine endothelin system: pathophysiology and implications in clinical medicine. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997 Mar;35(3):175-89.
110. Finsnes F, Christensen G, Lyberg T, Sejersted OM, Skjonsberg OH. Increased synthesis and release of endothelin-1 during the initial phase of airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov;158(5 Pt 1):1600-6.
111. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990 Feb;85(2):587-90.
112. Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, et al. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res*. 1990 Apr;66(4):1088-94.
113. Rivera A, Rotter MA, Brugnara C. Endothelins activate Ca²⁺-gated K⁺ channels via endothelin B receptors in CD-1 mouse erythrocytes. *Am J Physiol*. 1999 Oct;277(4):C746-54.
114. Rivera A, Jarolim P, Brugnara C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):357-603.
115. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 15;44(8):1506-28.
116. Myers RA, DeFazio A, Kelly MP. Chronic carbon monoxide exposure: a clinical syndrome detected by neuropsychological tests. *J Clin Psychol*. 1998 Aug;54(5):555-67.
117. Grau M, Pauly S, Ali J, Walpurgis K, Thevis M, Bloch W, et al. RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One*. 2013;8(2):e56759.

118. Grau M, Mozar A, Charlot K, Lamarre Y, Weyel L, Suhr F, et al. High red blood cell nitric oxide synthase activation is not associated with improved vascular function and red blood cell deformability in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2015 Mar;168(5):728-36.
119. Rodgers GP, Schechter AN, Noguchi CT, Klein HG, Nienhuis AW, Bonner RF. Periodic microcirculatory flow in patients with sickle-cell disease. *N Engl J Med*. 1984 Dec 13;311(24):1534-8.
120. Hammerman SI, Kourembanas S, Conca TJ, Tucci M, Brauer M, Farber HW. Endothelin-1 production during the acute chest syndrome in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):280-5.
121. Lapoumeroulie C, Benkerrou M, Odievre MH, Ducrocq R, Brun M, Elion J. Decreased plasma endothelin-1 levels in children with sickle cell disease treated with hydroxyurea. *Haematologica*. 2005 Mar;90(3):401-3.
122. Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, et al. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest*. 2008 May;118(5):1924-33.
123. Brun M BS, Couraud PO, Elion J, Krishnamoorthy R, Lapoumeroulie C. Hydroxyurea downregulates endothelin-1 gene expression and upregulates ICAM-1 gene expression in cultured human endothelial cells. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(4):215-26.
124. Rees DC, Cervi, P. , Grimwade, D. , O'Driscoll, A. , Hamilton, M. , Parker, N. E. and Porter, J. B. . The metabolites of nitric oxide in sickle-cell disease. *British Journal of Haematology*. 1995;91: 834-837.
125. Diwan BA, Gladwin MT, Noguchi CT, Ward JM, Fitzhugh AL, Buzard GS. Renal pathology in hemizygous sickle cell mice. *Toxicol Pathol*. 2002 Mar-Apr;30(2):254-62.
126. Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Nov-Dec;22(6):515-20.
127. Stuart MJ, Setty BN. Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1555-60.
128. Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*. 2013 Jun 1;98(3):334-43.
129. Serjeant GR. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Oct 1;3(10):a011783.
130. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary complications of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2008 Nov 20;359(21):2254-65.
131. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev*. 2007 Jan;21(1):37-47.
132. Morris CR. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:177-85.
133. Hebbel RP. Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the "hyperhemolysis paradigm" for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am J Hematol*. 2011 Feb;86(2):123-54.
134. Renoux C JP, Faes C, Mury P, Eglenen B, Turkay M, Yavas G, Yalcin O, Bertrand Y, Garnier N, Cuzzubbo D, Gauthier A, Romana M, Möckesch B, Cannas G, Antoine-Jonville S, Pialoux V, Connes P. Association between Oxidative Stress, Genetic Factors, and Clinical Severity in Children with Sickle Cell Anemia. *J Pediatr* 2018; Apr 195:228-235.
135. Wonkam A MK, Ngo Bitoungui VJ, Chetcha Chemegni B, Chimusa ER, Dandara C, Kengne AP. Clinical and genetic factors are associated with pain and hospitalisation rates in sickle cell anaemia in Cameroon. *Br J Haematol*. 2018;Jan;180(1):134-146.

136. Platt OS BD, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994.;un 9;330(23):1639-44.
137. FA. F. Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. *Microcirculation* 2004.;Mar;11(2):115-28.
138. Steinberg MH, Sebastiani P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2012 Aug;87(8):795-803.
139. Morris CR. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. *Haematologica.* 2011 Jan;96(1):1-5.
140. Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 1953 Nov;47(1):148-59.
141. Cotton F, Malaviolle X, Vertongen F, Gulbis B. Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. *Clin Lab.* 2009;55(5-6):217-21.
142. Riou J, Pissard S, Goossens M, Wajcman H. Improvements in phenotype studies of hemoglobin disorders brought by advances in reversed-phase chromatography of globin chains. *Int J Lab Hematol.* 2015 Apr;37(2):279-86.
143. Wajcman H, Riou J. Globin chain analysis: an important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. *Clin Biochem.* 2009 Dec;42(18):1802-6.
144. Vichinsky E, Hurst D, Earles A, Kleman K, Lubin B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. *Pediatrics.* 1988 Jun;81(6):749-55.
145. Consensus conference. Newborn screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. *JAMA.* 1987 Sep 4;258(9):1205-9.
146. Bardakdjian-Michau J. [Neonatal screening of sickle cell disease in France]. *Arch Pediatr.* 2008 Jun;15(5):738-40.
147. Bardakdjian-Michau J, Guilloud-Bataillie M, Maier-Redelsperger M, Elion J, Girot R, Feingold J, et al. Decreased morbidity in homozygous sickle cell disease detected at birth. *Hemoglobin.* 2002 Aug;26(3):211-7.
148. Rahimy MC, Gangbo A, Ahouignan G, Adjou R, Deguenon C, Goussanou S, et al. Effect of a comprehensive clinical care program on disease course in severely ill children with sickle cell anemia in a sub-Saharan African setting. *Blood.* 2003 Aug 1;102(3):834-8.
149. Kafando E, Sawadogo M, Cotton F, Vertongen F, Gulbis B. Neonatal screening for sickle cell disorders in Ouagadougou, Burkina Faso: a pilot study. *J Med Screen.* 2005;12(3):112-4.
150. Diallo DA. [Sickle cell disease in Africa: current situation and strategies for improving the quality and duration of survival]. *Bull Acad Natl Med.* 2008 Oct;192(7):1361-72; discussion 72-3.
151. Diallo DA, Guindo A, Toure BA, Sarro YS, Sima M, Tessougue O, et al. [Targeted newborn screening for sickle-cell anemia: Sickling test (Emmel test) boundaries in the prenatal assessment in West African area]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2018 May;66(3):181-5.
152. Tshilolo L, Aissi LM, Lukusa D, Kinsiyama C, Wembonyama S, Gulbis B, et al. Neonatal screening for sickle cell anaemia in the Democratic Republic of the Congo: experience from a pioneer project on 31 204 newborns. *J Clin Pathol.* 2009 Jan;62(1):35-8.
153. K Ohene-Frempong AB, H Tetteh & F K Nkrumah. Newborn Screening for Sickle Cell Disease in Ghana. *Pediatric Research.* 2005;58, page 401.
154. De Montalembert M, Tshilolo L. [Is therapeutic progress in the management of sickle cell disease applicable in sub-Saharan Africa?]. *Med Trop (Mars).* 2007 Dec;67(6):612-6.
155. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2010 Dec 11;376(9757):2018-31.

156. Ballas SK. Sick cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;68(2-3):105-28.
157. Ballas SK, Gupta K, Adams-Graves P. Sick cell pain: a critical reappraisal. *Blood.* 2012 Nov 1;120(18):3647-56.
158. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med.* 1991 Jul 4;325(1):11-6.
159. McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Curr Opin Hematol.* 2011 May;18(3):158-65.
160. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N Engl J Med.* 1995 May 18;332(20):1317-22.
161. Shaiova L, Wallenstein D. Outpatient management of sickle cell pain with chronic opioid pharmacotherapy. *J Natl Med Assoc.* 2004 Jul;96(7):984-6.
162. McGann PT, Flanagan JM, Howard TA, Dertinger SD, He J, Kulharya AS, et al. Genotoxicity associated with hydroxyurea exposure in infants with sickle cell anemia: results from the BABY-HUG Phase III Clinical Trial. *Pediatr Blood Cancer.* Aug;59(2):254-7.
163. Ware RE, Davis BR, Schultz WH, Brown RC, Aygun B, Sarnaik S, et al. Hydroxycarbamide versus chronic transfusion for maintenance of transcranial doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia-TCD With Transfusions Changing to Hydroxyurea (TWITCH): a multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet.* Feb 13;387(10019):661-70.
164. Ballas SK, Barton FB, Waclawiw MA, Swerdlow P, Eckman JR, Pegelow CH, et al. Hydroxyurea and sickle cell anemia: effect on quality of life. *Health Qual Life Outcomes.* 2006 Aug 31;4:59.
165. Kaul DK, Tsai HM, Liu XD, Nakada MT, Nagel RL, Collier BS. Monoclonal antibodies to alphaVbeta3 (7E3 and LM609) inhibit sickle red blood cell-endothelium interactions induced by platelet-activating factor. *Blood.* 2000 Jan 15;95(2):368-74.
166. Adams-Graves P, Kedar A, Koshy M, Steinberg M, Veith R, Ward D, et al. RheothRx (poloxamer 188) injection for the acute painful episode of sickle cell disease: a pilot study. *Blood.* 1997 Sep 1;90(5):2041-6.
167. Ohnishi ST, Ohnishi T. In vitro effects of aged garlic extract and other nutritional supplements on sickle erythrocytes. *J Nutr.* 2001 Mar;131(3s):1085S-92S.
168. Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogunmola GB. Green tea extract and aged garlic extract inhibit anion transport and sickle cell dehydration in vitro. *Blood Cells Mol Dis.* 2001 Jan-Feb;27(1):148-57.
169. Ballas SK. Hydration of sickle erythrocytes using a herbal extract (*Pfaffia paniculata*) in vitro. *Br J Haematol.* 2000 Oct;111(1):359-62.
170. Singh PC, Ballas SK. Emerging drugs for sickle cell anemia. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2015 Mar;20(1):47-61.
171. Ballas SK, Bauserman RL, McCarthy WF, Castro OL, Smith WR, Waclawiw MA. Hydroxyurea and acute painful crises in sickle cell anemia: effects on hospital length of stay and opioid utilization during hospitalization, outpatient acute care contacts, and at home. *J Pain Symptom Manage.* 2010 Dec;40(6):870-82.
172. Gladwin MT, Kato GJ, Weiner D, Onyekwere OC, Dampier C, Hsu L, et al. Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2011 Mar 2;305(9):893-902.
173. Head CA, Swerdlow P, McDade WA, Joshi RM, Ikuta T, Cooper ML, et al. Beneficial effects of nitric oxide breathing in adult patients with sickle cell crisis. *Am J Hematol.* 2010 Oct;85(10):800-2.

174. Walters MC, Storb R, Patience M, Leisenring W, Taylor T, Sanders JE, et al. Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. Multicenter investigation of bone marrow transplantation for sickle cell disease. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1918-24.
175. Walters MC. Bone marrow transplantation for sickle cell disease: where do we go from here? *J Pediatr Hematol Oncol*. 1999 Nov-Dec;21(6):467-74.
176. Buchanan G, Vichinsky E, Krishnamurti L, Shenoy S. Severe sickle cell disease--pathophysiology and therapy. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jan;16(1 Suppl):S64-7.
177. Locatelli F, Pagliara D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 Aug;59(2):372-6.
178. B. F. Gene therapy G. In: Embury SH, Hebble, R. P., Mohandas, N., Steinberg, M. H., editor. *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice*. New York: Raven Press. 1994;pp. 853-60.
179. Cole-Strauss A, Yoon K, Xiang Y, Byrne BC, Rice MC, Gryn J, et al. Correction of the mutation responsible for sickle cell anemia by an RNA-DNA oligonucleotide. *Science*. 1996 Sep 6;273(5280):1386-9.
180. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):318-22.
181. Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. Mar 2;376(9):848-55.
182. Antoniani C, Meneghini V, Lattanzi A, Felix T, Romano O, Magrin E, et al. Induction of fetal hemoglobin synthesis by CRISPR/Cas9-mediated editing of the human beta-globin locus. *Blood*. 2018 Apr 26;131(17):1960-73.
183. Dever DP, Bak RO, Reinisch A, Camarena J, Washington G, Nicolas CE, et al. CRISPR/Cas9 beta-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):384-9.
184. Thiam L, Drame A, Coly IZ, Diouf FN, Seck N, Boiro D, et al. [Epidemiological, clinical and hematological profiles of homozygous sickle cell disease during the intercritical period among children in Ziguinchor, Senegal]. *Pan Afr Med J*. 2017;28:208.
185. Diagne I, Ndiaye O, Moreira C, Signate-Sy H, Camara B, Diouf S, et al. [Sickle cell disease in children in Dakar, Senegal]. *Arch Pediatr*. 2000 Jan;7(1):16-24.
186. Boiro D GM, Thiongane A et al. . Drépanocytose chez l'enfant: profils clinique et évolutif à propos de 138 cas suivis au service de pédiatrie de l'hôpital Abass Ndao de Dakar. *Med Afr Noir*. 2016;63(6):326-332.
187. Diagne I, Diagne-Gueye ND, Signate-Sy H, Camara B, Lopez-Sall P, Diack-Mbaye A, et al. [Management of children with sickle cell disease in Africa: experience in a cohort of children at the Royal Albert Hospital in Dakar]. *Med Trop (Mars)*. 2003;63(4-5):513-20.
188. I. Diagne ON, 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 (Sénégal). *Archives de pédiatrie*. 2000; Janv 7 (1): 16-24.
189. I. Diagne MB, C. Moreira I, H. Signate-Sy I., Ndiaye I, P. Lopez-Sail, G. Preira-Sylla I, B. Camara I, S. Diouf I, A. Diack-Mbaye I, M. Fall. Lithiase biliaire et drépanocytose homozygote en pédiatrie à Dakar (Sénégal) *Archives de Pédiatrie*. 1999;6(12):1286-1292.
190. Diop S. DD, Seck M.L. Facteurs prédictifs des complications chroniques de la drépanocytose homozygote chez l'adulte à Dakar (Sénégal). *Med Trop*. 2010;70:471-474.

191. Dème-Ly I DI, Tamouza R, Dièye TN Sylla A, Diagne-Guèye NR, Fall AL, Labie D, Sow HD. HLA-E et susceptibilité aux infections bactériennes sévères chez les enfants et adolescents drépanocytaires homozygotes sénégalais. *Dakar Med.* 2012;57(2).
192. Matar SECK1 CS, Papa Madièye GUEYE, Insa SECK, Mbaye Diaw DIOUM, Zhou LEMBACHAR, Rokhaya Sylla GUEYE, Djibril FALL, Mamadou FALL et Tandakha Ndiaye DIEYE. Etude de l'activité antifalcémiant d'extraits de racines de *Leptadenia hastata* Decne. (Asclepiadaceae). *Int J Biol Chem Sci.* 2015;9(3): 1375-1383.
193. Cheikh SALL MS, Babacar FAYE, Mbaye Diaw DIOUM, Insa SECK, Papa Madièye GUEYE, Samba Fama NDOYE, Rokhaya Sylla GUEYE, Djibril FALL, Mamadou FALL et Tandakha NDIAYE DIEYE. Étude in vitro de l'effet antifalcémiant des globules rouges et de l'activité antioxydante d'extraits de la poudre de racines de *Maytenus senegalensis* Lam (Celastraceae). *Int J Biol Chem Sci.* 2016;10(3): 1017-1026.
194. P. LOPEZ-SALL PAD, I. DIAGNE, A. CISSE, C.M.S. MAHOU, M. NIANG-SYLLA, P.M. GUEYE, M. DIARRA. Apport des récepteurs solubles de la transferrine dans l'évaluation du statut en fer au cours de la drépanocytose. *Ann Biol Clin.* 2004;62 (4): 415 – 421.
195. DIATTA A. DF, SARR N.G., TRAORE S., DIAGNE I., LOPEZ-SALL P., SALL N.D., TOURE M. Lésions peroxydatives des phospholipides érythrocytaires au cours de la drépanocytose AS. *Dakar Médical.* 2002;47 (1) :133 – 137.
196. DIATTA A. T-FAO, SARR N.G., DIALLO F., DIAGNE I., LOPEZ-SALL P., WONE I., VASSAULT.A., SALL, N.D., THIAM D., TOURE M. Prévalence des anticorps antiphospholipides au cours de la drépanocytose homozygote. *Ann Biol Clin.* 2004;mai-juin 63 (3): 291-294.
197. P.M. GUEYE FG-T, M.SECK, M. O. KANE, R. NDIAYE DIALLO, M. DIATTA, M. SECK, E.M NDOUR, D. DOUPA, B. FAYE, S.DIOP, P. LOPEZ SALL, A. CISSE, P.A. DIOP. . Aggravation de l'anémie et polymorphisme de l'haptoglobine au cours de la drépanocytose au Sénégal. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 2014;8(3), pp 975-982.
198. GUEYE TALL F NE, CISSE F, GUEYE PM, NDIAYE DIALLO R, DIATTA A, LOPEZ SALL P, CISSE A. Perturbations de paramètres Lipidiques au cours de la Drépanocytose. *Rev CAMES SANTE* 2014;Décembre ; 2 (2): pp35- 41.
199. DIATTA A CF, GUÈYE TALL F, DIALLO F, TOURÉ FALL A. O, SARR G. ND., LOPEZ SALL P, SALL N.D and TOURÉ M. . Serum lipids and oxidized low density lipoprotein levels in sickle cell disease: Assessment and pathobiological significance. *African Journal of Biochemistry Research.* 2014;February; 8(2): pp 39-42.
200. Brigitte Ranque AM, Ibrahima Bara Diop an al. Early renal damage in patients with sickle cell disease in sub-Saharan Africa: a multinational, prospective, cross-sectional study. *Lancet Haematol* 2014;1: 64–73.
201. Diaw M, Connes P, Samb A, Sow AK, Sall ND, Sar FB, et al. Intraday blood rheological changes induced by Ramadan fasting in sickle cell trait carriers. *Chronobiol Int.* 2013 Nov;30(9):1116-22.
202. Diaw M, Pialoux V, Martin C, Samb A, Diop S, Faes C, et al. Sickle Cell Trait Worsens Oxidative Stress, Abnormal Blood Rheology, and Vascular Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care.* 2015 Nov;38(11):2120-7.
203. Murray N, Serjeant BE, Serjeant GR. Sickle cell-hereditary persistence of fetal haemoglobin and its differentiation from other sickle cell syndromes. *Br J Haematol.* 1988 May;69(1):89-92.
204. Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ, Sebastiani P, Alsultan A. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood.* Jan 23;123(4):481-5.
205. de Montalembert M. [Stimulation of fetal hemoglobin production in children with sickle cell anemia]. *Arch Pediatr.* 1996 Mar;3(3):207-9.
206. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994 Jun 9;330(23):1639-44.

207. Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene Therapy for beta-Hemoglobinopathies. *Mol Ther.* 2017 May 3;25(5):1142-54.
208. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1049-51.
209. Akinsheye I, Solovieff N, Ngo D, Malek A, Sebastiani P, Steinberg MH, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: molecular characterization of the unusually high fetal hemoglobin phenotype in African Americans. *Am J Hematol.* 2011 Feb;87(2):217-9.
210. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med.* 1985 Apr 4;312(14):880-4.
211. Nagel RL, Rao SK, Dunda-Belkhodja O, Connolly MM, Fabry ME, Georges A, et al. The hematologic characteristics of sickle cell anemia bearing the Bantu haplotype: the relationship between G gamma and HbF level. *Blood.* 1987 Apr;69(4):1026-30.
212. Bernaudin F, Arnaud C, Kamdem A, Hau I, Lelong F, Epaud R, et al. Biological impact of alpha genes, beta haplotypes, and G6PD activity in sickle cell anemia at baseline and with hydroxyurea. *Blood Adv.* 2018 Mar 27;2(6):626-37.
213. Labie D, Dunda-Belkhodja O, Rouabhi F, Pagnier J, Ragusa A, Nagel RL. The -158 site 5' to the G gamma gene and G gamma expression. *Blood.* 1985 Dec;66(6):1463-5.
214. Pissard S, Beuzard Y. A potential regulatory region for the expression of fetal hemoglobin in sickle cell disease. *Blood.* 1994 Jul 1;84(1):331-8.
215. Gilman JG, Huisman TH. A mutation associated with elevated G gamma chain in sickle cell anemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Prog Clin Biol Res.* 1985;191:141-9.
216. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araujo AS, Uda M, Sanna S, et al. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Aug 19;105(33):11869-74.
217. Mohammdai-Asl J, Ramezani A, Norozi F, Alghasi A, Asnafi AA, Jaseb K, et al. The Influence of Polymorphisms in Disease Severity in beta-Thalassemia. *Biochem Genet.* 2015 Oct;53(9-10):235-43.
218. Galarneau G, Palmer CD, Sankaran VG, Orkin SH, Hirschhorn JN, Lettre G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet.* Dec;42(12):1049-51.
219. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 5;105(5):1620-5.
220. Sebastiani P, Farrell JJ, Alsultan A, Wang S, Edward HL, Shappell H, et al. BCL11A enhancer haplotypes and fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2015 Mar;54(3):224-30.
221. Labie D. [BCL11A controls the expression of the human fetal hemoglobin]. *Med Sci (Paris).* 2012 Nov;28(11):923-5.
222. Urkude Vikas MA, Yadav Mahavir and Tiwari Archana. RNA Silencing: An Approach for the Treatment of β -Thalassemia. *J Cell Sci Ther.* 2012;3 (7): 2 - 4.
223. Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood.* 2011 Jul 7;118(1):19-27.
224. Wonkam A, Ngo Bitoungui VJ, Vorster AA, Ramesar R, Cooper RS, Tayo B, et al. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. *PLoS One.* 2014;9(3):e92506.

225. Lai Y, Chen Y, Chen B, Zheng H, Yi S, Li G, et al. Genetic Variants at BCL11A and HBS1L-MYB loci Influence Hb F Levels in Chinese Zhuang beta-Thalassemia Intermedia Patients. *Hemoglobin*. 2016 Nov;40(6):405-10.
226. Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11346-51.
227. Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajani-refah A, Pourfarzad F, van Ijcken W, et al. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest*. 2014 Apr;124(4):1699-710.
228. Farrell JJ, Sherva RM, Chen ZY, Luo HY, Chu BF, Ha SY, et al. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*. 2011 May 5;117(18):4935-45.
229. Menzel S, Rooks H, Zelenika D, Mtatiro SN, Gnanakulasekaran A, Drasar E, et al. Global genetic architecture of an erythroid quantitative trait locus, HMIP-2. *Ann Hum Genet*. 2014 Nov;78(6):434-51.
230. Leonardo FC, Brugnerotto AF, Domingos IF, Fertrin KY, de Albuquerque DM, Bezerra MA, et al. Reduced rate of sickle-related complications in Brazilian patients carrying HbF-promoting alleles at the BCL11A and HMIP-2 loci. *Br J Haematol*. 2016 May;173(3):456-60.
231. Thein SL. Molecular basis of beta thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2018 May;70:54-65.
232. Creary LE, Ulug P, Menzel S, McKenzie CA, Hanchard NA, Taylor V, et al. Genetic variation on chromosome 6 influences F cell levels in healthy individuals of African descent and HbF levels in sickle cell patients. *PLoS One*. 2009;4(1):e4218.
233. Mtatiro SN, Singh T, Rooks H, Mgaya J, Mariki H, Soka D, et al. Genome wide association study of fetal hemoglobin in sickle cell anemia in Tanzania. *PLoS One*. 2014;9(11):e111464.
234. Muszlak M, Pissard S, Badens C, Chamouine A, Maillard O, Thuret I. Genetic Modifiers of Sickle Cell Disease: A Genotype-Phenotype Relationship Study in a Cohort of 82 Children on Mayotte Island. *Hemoglobin*. 2015;39(3):156-61.
235. Wonkam A, Mnika K, Ngo Bitoungui VJ, Chetcha Chemegni B, Chimusa ER, Dandara C, et al. Clinical and genetic factors are associated with pain and hospitalisation rates in sickle cell anaemia in Cameroon. *Br J Haematol*. 2017 Jan;180(1):134-46.
236. Sheehan VA, Luo Z, Flanagan JM, Howard TA, Thompson BW, Wang WC, et al. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. *Am J Hematol*. 2013 Jul;88(7):571-6.
237. Nebor D, Broquere C, Brudey K, Mougengel D, Tarer V, Connes P, et al. Alpha-thalassemia is associated with a decreased occurrence and a delayed age-at-onset of albuminuria in sickle cell anemia patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2010 Aug 15;45(2):154-8.
238. Lamarre Y, Romana M, Lemonne N, Hardy-Dessources MD, Tarer V, Mougengel D, et al. Alpha thalassemia protects sickle cell anemia patients from macro-albuminuria through its effects on red blood cell rheological properties. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;57(1):63-72.
239. Steinberg MH, Hebbel RP. Clinical diversity of sickle cell anemia: genetic and cellular modulation of disease severity. *Am J Hematol*. 1983 Jun;14(4):405-16.
240. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal*. 2009 Jan 18;9:46-67.
241. Belisario AR, Rodrigues CV, Martins ML, Silva CM, Viana MB. Coinheritance of alpha-thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin*. 2010;34(6):516-29.

242. Hsu LL, Miller ST, Wright E, Kutlar A, McKie V, Wang W, et al. Alpha Thalassemia is associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Aug;25(8):622-8.
243. Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Cheikh N, et al. G6PD deficiency and absence of alpha-thalassemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol*. 2016 Apr;96(4):404-8.
244. Vasavda N, Menzel S, Kondaveeti S, Maytham E, Awogbade M, Bannister S, et al. The linear effects of alpha-thalassaemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2007 Jul;138(2):263-70.
245. Joly P, Renoux C, Lacan P, Bertrand Y, Cannas G, Garnier N, et al. UGT1A1 (TA)_n genotype is not the major risk factor of cholelithiasis in sickle cell disease children. *Eur J Haematol*. 2017 Mar;98(3):296-301.
246. Geard A, Pule GD, Chetcha Chemegni B, Ngo Bitoungui VJ, Kengne AP, Chimusa ER, et al. Clinical and genetic predictors of renal dysfunctions in sickle cell anaemia in Cameroon. *Br J Haematol*. 2017 Aug;178(4):629-39.
247. Guasch A, Zayas CF, Eckman JR, Muralidharan K, Zhang W, Elsas LJ. Evidence that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell glomerulopathy in humans. *J Am Soc Nephrol*. 1999 May;10(5):1014-9.
248. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med*. 1982 Jun 17;306(24):1441-6.
249. Embury SH, Clark MR, Monroy G, Mohandas N. Concurrent sickle cell anemia and alpha-thalassemia. Effect on pathological properties of sickle erythrocytes. *J Clin Invest*. 1984 Jan;73(1):116-23.
250. Renoux C, Joly P, Faes C, Mury P, Eglenen B, Turkay M, et al. Association between Oxidative Stress, Genetic Factors, and Clinical Severity in Children with Sickle Cell Anemia. *J Pediatr*. 2018 Apr;195:228-35.
251. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2005 May;129(4):465-81.
252. Diop S, Sene A, Cisse M, Toure AO, Sow O, Thiam D, et al. [Prevalence and morbidity of G6PD deficiency in sickle cell disease in the homozygote]. *Dakar Med*. 2005;50(2):56-60.
253. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, et al. G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4314-7.
254. Nouraie M, Reading NS, Campbell A, Minniti CP, Rana SR, Luchtman-Jones L, et al. Association of G6PD with lower haemoglobin concentration but not increased haemolysis in patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2010 Jul;150(2):218-25.
255. Miller ST, Milton J, Steinberg MH. G6PD deficiency and stroke in the CSSCD. *Am J Hematol*. 2011 Mar;86(3):331.
256. Rees DC, Lambert C, Cooper E, Bartram J, Goss D, Deane C, et al. Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency is not associated with cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2009 Jul 16;114(3):742-3; author reply 3-4.
257. Belisario AR, Rodrigues Sales R, Evelin Toledo N, Velloso-Rodrigues C, Maria Silva C, Borato Viana M. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Brazilian Children With Sickle Cell Anemia is not Associated With Clinical Ischemic Stroke or High-Risk Transcranial Doppler. *Pediatr Blood Cancer*. 2016 Jun;63(6):1046-9.

258. Benkerrou M, Alberti C, Couque N, Haouari Z, Ba A, Missud F, et al. Impact of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency on sickle cell anaemia expression in infancy and early childhood: a prospective study. *Br J Haematol*. 2013 Dec;163(5):646-54.
259. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood*. 1994 Dec 1;84(11):3613-36.
260. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1332-40.
261. Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J*. 2001 Aug;15(10):1771-3.
262. Mejias R, Villadiego J, Pintado CO, Vime PJ, Gao L, Toledo-Aral JJ, et al. Neuroprotection by transgenic expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in dopaminergic nigrostriatal neurons of mice. *J Neurosci*. 2006 Apr 26;26(17):4500-8.
263. Agarwal R, Rami A. Redistribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to cerebral ischemia in rat brain. *Indian J Clin Biochem*. 2003 Jul;18(2):64-70.
264. Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med*. 2007 Dec 1;43(11):1469-83.
265. Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Sep;34(9):926-32.
266. Connes P, Verlhac S, Bernaudin F. Advances in understanding the pathogenesis of cerebrovascular vasculopathy in sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2013 May;161(4):484-98.
267. Crawford JM, Ransil BJ, Narciso JP, Gollan JL. Hepatic microsomal bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. The kinetics of bilirubin mono- and diglucuronide synthesis. *J Biol Chem*. 1992 Aug 25;267(24):16943-50.
268. Schubert TT. Hepatobiliary system in sickle cell disease. *Gastroenterology*. 1986 Jun;90(6):2013-21.
269. Carpenter SL, Lieff S, Howard TA, Eggleston B, Ware RE. UGT1A1 promoter polymorphisms and the development of hyperbilirubinemia and gallbladder disease in children with sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2008 Oct;83(10):800-3.
270. Chaar V, Keclard L, Diara JP, Leturdu C, Elion J, Krishnamoorthy R, et al. Association of UGT1A1 polymorphism with prevalence and age at onset of cholelithiasis in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2005 Feb;90(2):188-99.
271. Chaar V, Keclard L, Etienne-Julan M, Diara JP, Elion J, Krishnamoorthy R, et al. UGT1A1 polymorphism outweighs the modest effect of deletional (-3.7 kb) alpha-thalassemia on cholelithogenesis in sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2006 May;81(5):377-9.
272. Haverfield EV, McKenzie CA, Forrester T, Bouzekri N, Harding R, Serjeant G, et al. UGT1A1 variation and gallstone formation in sickle cell disease. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):968-72.
273. Passon RG, Howard TA, Zimmerman SA, Schultz WH, Ware RE. Influence of bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A promoter polymorphisms on serum bilirubin levels and cholelithiasis in children with sickle cell anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001 Oct;23(7):448-51.
274. Schaefer BA, Flanagan JM, Alvarez OA, Nelson SC, Aygun B, Nottage KA, et al. Genetic Modifiers of White Blood Cell Count, Albuminuria and Glomerular Filtration Rate in Children with Sickle Cell Anemia. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164364.
275. Kormann R, Jannot AS, Narjoz C, Ribeil JA, Manceau S, Delville M, et al. Roles of APOL1 G1 and G2 variants in sickle cell disease patients: kidney is the main target. *Br J Haematol*. 2017 Oct;179(2):323-35.

276. Vicari P, Adegoke SA, Mazzotti DR, Cancado RD, Nogutti MA, Figueiredo MS. Interleukin-1beta and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2015 Mar;54(3):244-9.
277. Sebastiani P, Solovieff N, Hartley SW, Milton JN, Riva A, Dworkis DA, et al. Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-wide association study. *Am J Hematol*. 2010 Jan;85(1):29-35.
278. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature*. 1954 Oct 9;174(4432):689-91.
279. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956 Jul;11(3):298-300.
280. Audrey Carrière AG, Yvette Fernandez, Maria-Carmen Carmona, Luc Pénicaud et Louis Casteilla. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. *MEDECINE/SCIENCES*. 2006;22 (1): 47-53.
281. Camille Migdal MS. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*. 2011; 27 (4) : 405-412.
282. Murphy RC. Free radical-induced oxidation of glycerophosphocholine lipids and formation of biologically active products. *Adv Exp Med Biol*. 1996;416:51-8.
283. Geronzi U, Lotti F, Grosso S. Oxidative stress in epilepsy. *Expert Rev Neurother*. 2018 May;18(5):427-34.
284. Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol*. 2018 Apr;175(8):1279-92.
285. Chirico EN, Pialoux V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*. 2012 Jan;64(1):72-80.
286. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys*. 2004 Sep;23(3):265-95.
287. O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry*. 1997 Dec 9;36(49):15216-23.
288. Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*. 1967 Jan 14;213(5072):137-9.
289. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003 Oct 15;552(Pt 2):335-44.
290. Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem*. 2002 Mar;80(5):780-7.
291. Baskaran A, Chua KH, Sabaratnam V, Ravishankar Ram M, Kuppusamy UR. *Pleurotus giganteus* (Berk. Karun & Hyde), the giant oyster mushroom inhibits NO production in LPS/H2O2 stimulated RAW 264.7 cells via STAT 3 and COX-2 pathways. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Jan 13;17(1):40.
292. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1245049.
293. Zeeshan HM, Lee GH, Kim HR, Chae HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *Int J Mol Sci*. 2016 Mar 2;17(3):327.
294. U F. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;Jun;5(6):338-49.
295. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 Nov-Dec;2(5):259-69.

296. Parks DA, Granger DN. Ischemia-induced vascular changes: role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol.* 1983 Aug;245(2):G285-9.
297. Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood.* 2000 Jul 1;96(1):314-20.
298. Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M. Oxidative stress in beta-thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol.* 2015 Dec;6:226-39.
299. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.
300. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):181-9.
301. Banfi B, Molnar G, Maturana A, Steger K, Hegedus B, Demarex N, et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):37594-601.
302. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood.* 1984 Nov;64(5):959-66.
303. Iles KE, Forman HJ. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res.* 2002;26(1-3):95-105.
304. Lee S, Jadhav V, Ayer R, Rojas H, Hyong A, Lekic T, et al. The antioxidant effects of melatonin in surgical brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl.* 2008;102:367-71.
305. Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR. Oxidized cholesterol in the diet is a source of oxidized lipoproteins in human serum. *J Lipid Res.* 2003 Apr;44(4):705-15.
306. Basu-Modak S, Tyrrell RM. Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. *Cancer Res.* 1993 Oct 1;53(19):4505-10.
307. Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol.* 2015;74:35-84.
308. D. SERTEYN SG, T. FRANCK, A. MOUITHYS-MICKALAD, G. DEBY-DUPONT. La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann Méd Vét.* 2003;147, 79-93.
309. Kusic B, Miric D, Dragojevic I, Rasic J, Popovic L. Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1069743.
310. Liu SC, Yi TC, Weng HY, Zhang L, Li YX, Mohetaboer M, et al. [Prognostic value of myeloperoxidase concentration in patients with acute coronary syndrome]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2018 Apr 24;46(4):284-91.
311. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003 Sep 23;108(12):1440-5.
312. Hunt JV, Wolff SP. The role of histidine residues in the nonenzymic covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein. *Free Radic Res Commun.* 1991;14(4):279-87.
313. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 2003 Apr;9(4):169-76.
314. Chiu-Braga YY, Hayashi SY, Schafranski M, Messias-Reason IJ. Further evidence of inflammation in chronic rheumatic valve disease (CRVD): high levels of advanced oxidation protein products (AOPP) and high sensitive C-reactive protein (hs-CRP). *Int J Cardiol.* 2006 May 10;109(2):275-6.
315. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005 Jan;45(1):39-47.

316. Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, Aizawa T, Ohno M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2002 May;162(1):221-5.
317. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998 Sep 1;161(5):2524-32.
318. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*. 2013 Jan;51:15-25.
319. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
320. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Sep;85(17):6465-7.
321. Ames BN, Shigenaga MK, Gold LS. DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1993 Dec;101 Suppl 5:35-44.
322. Cortopassi GA, Arnheim N. Using the polymerase chain reaction to estimate mutation frequencies and rates in human cells. *Mutat Res*. 1992 Sep;277(3):239-49.
323. Grandjean V, Yaman R, Cuzin F, Rassoulzadegan M. Inheritance of an epigenetic mark: the CpG DNA methyltransferase 1 is required for de novo establishment of a complex pattern of non-CpG methylation. *PLoS One*. 2007 Nov 7;2(11):e1136.
324. Kobayashi T, Tsunawaki S, Seguchi H. Evaluation of the process for superoxide production by NADPH oxidase in human neutrophils: evidence for cytoplasmic origin of superoxide. *Redox Rep*. 2001;6(1):27-36.
325. Davis W, Jr., Ronai Z, Tew KD. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jan;296(1):1-6.
326. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993 Jul;49(3):481-93.
327. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986 May 1;246(2):501-14.
328. Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Nov 20;854:118-27.
329. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jan;26(1-2):202-26.
330. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:Keap1 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 Nov 1;47(9):1304-9.
331. Dhakshinamoorthy S, Long DJ, 2nd, Jaiswal AK. Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr Top Cell Regul*. 2000;36:201-16.
332. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46:113-40.
333. Charrin E. Drépanocytose Entrainement physique Inflammation Monoxyde d'azote Oxyde nitrique Récepteur aux AGE Souris transgéniques Stress oxydant Stress oxydatif. *Thèse Physiologie*. 2016.
334. Sasaki H, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Sato K, Maehara K, Wang H, et al. Electrophile response element-mediated induction of the cystine/glutamate exchange transporter gene expression. *J Biol Chem*. 2002 Nov 22;277(47):44765-71.

335. Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Dec 15;1517(1):19-26.
336. Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):459-73.
337. Banning A, Brigelius-Flohe R. NF-kappaB, Nrf2, and HO-1 interplay in redox-regulated VCAM-1 expression. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Jul-Aug;7(7-8):889-99.
338. Singh A, Rangasamy T, Thimmulappa RK, Lee H, Osburn WO, Brigelius-Flohe R, et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Dec;35(6):639-50.
339. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 Feb 15;46(4):443-53.
340. Na HK, Surh YJ. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol*. 2008 Apr;46(4):1271-8.
341. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 15;40(2):341-7.
342. Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. [Oxidative stress]. *Rev Med Liege*. 2007 Oct;62(10):628-38.
343. Hermes-Lima M. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Storey, KB, Ed, *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, 319-368. 2004.
344. Kim YS, Gupta Vallur P, Phaeton R, Mythreye K, Hempel N. Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. *Antioxidants (Basel)*. 2017 Nov 3;6(4).
345. L.J. Thénard. Observations sur des nouvelles combinaisons entre l'oxygène et divers acides *Annal Chim Phys*. 1818;2e série, vol. 8, 1818, p. 306-312.
346. Bonnefont-Rousselot D TP, Delattre J. Radicaux libres et antioxydants. In : Delattre J, Durand G, Jardillier JC, eds. *Biochimie pathologique. Aspects moléculaires et cellulaires*. Paris : Flammarion Médecine/Sciences : 59-81. 2003.
347. Catapano AL. Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology*. 1997 Jan;48(1):39-44.
348. Ogata M. Acatalasemia. *Hum Genet*. 1991 Feb;86(4):331-40.
349. Shull S, Heintz NH, Periasamy M, Manohar M, Janssen YM, Marsh JP, et al. Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J Biol Chem*. 1991 Dec 25;266(36):24398-403.
350. Tsan MF, White JE, Treanor C, Shaffer JB. Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *Am J Physiol*. 1990 Dec;259(6 Pt 1):L506-12.
351. White CW, Ghezzi P, McMahan S, Dinarello CA, Repine JE. Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl Physiol (1985)*. 1989 Feb;66(2):1003-7.
352. Pietarinen-Runtti P, Raivio KO, Saksela M, Asikainen TM, Kinnula VL. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Aug;19(2):286-92.
353. Diaz-Llera S, Gonzalez-Hernandez Y, Prieto-Gonzalez EA, Azoy A. Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes. *Mutat Res*. 2002 May 27;517(1-2):13-20.
354. Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Taylor WR. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. *Hypertension*. 2005 Oct;46(4):732-7.

355. Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res*. 2004 Nov 26;95(11):1075-81.
356. Pamplona R, Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Oct;301(4):R843-63.
357. Thérond P. DB. Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote: effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In: Delatte J, Beaudeau J, Bonnefont-Rousselot D, editors (eds), Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques Cachan, France: Éditions Médicales internationales, pp 114–167. 2005.
358. Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Aug;283(2):L246-55.
359. Matés JM P-GC, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32(8):595-603.
360. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*. 1999 Nov;58(4):1025-33.
361. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci*. 1997 Jun;15(3):353-63.
362. Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* (1985). 1992 Feb;72(2):549-54.
363. Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*. 1998 Feb 27;423(3):275-80.
364. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000 Aug;72(2 Suppl):647S-52S.
365. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:97-112.
366. Zowczak M, Iskra M, Paszkowski J, Manczak M, Torlinski L, Wysocka E. Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum of cancer patients. *J Trace Elem Med Biol*. 2001;15(2-3):193-6.
367. Bureau I, Laporte F, Favier M, Faure H, Fields M, Favier AE, et al. No antioxidant effect of combined HRT on LDL oxidizability and oxidative stress biomarkers in treated post-menopausal women. *J Am Coll Nutr*. 2002 Aug;21(4):333-8.
368. Maughan RJ, Leiper JB. Limitations to fluid replacement during exercise. *Can J Appl Physiol*. 1999 Apr;24(2):173-87.
369. Speich M, Pineau A, Ballereau F. Minerals, trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clin Chim Acta*. 2001 Oct;312(1-2):1-11.
370. Aslan M, Ryan TM, Townes TM, Coward L, Kirk MC, Barnes S, et al. Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*. 2003 Feb 7;278(6):4194-204.
371. Nur E, Biemond BJ, Otten HM, Brandjes DP, Schnog JJ. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *Am J Hematol*. 2011 Jun;86(6):484-9.
372. Alsultan AI, Seif MA, Amin TT, Naboli M, Alsuliman AM. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010 Jun;14(6):527-38.
373. El-Ghamrawy MK, Hanna WM, Abdel-Salam A, El-Sonbaty MM, Youness ER, Adel A. Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study. *J Pediatr (Rio J)*. 2014 May-Jun;90(3):286-92.

374. Gizi A, Papassotiriou I, Apostolakou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I, et al. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol Dis*. 2011 Mar 15;46(3):220-5.
375. Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH, Santin AP, Brandao VD, Wagner S, et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc*. 2008 Aug;100(8):897-902.
376. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*. 1998 Nov 15;92(10):3924-35.
377. Torres Lde S, da Silva DG, Belini Junior E, de Almeida EA, Lobo CL, Cancado RD, et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*.34(6):421-5.
378. Torres Lde S, da Silva DG, Belini Junior E, de Almeida EA, Lobo CL, Cancado RD, et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(6):421-5.
379. Oztas Y, Durukan I, Unal S, Ozgunes N. Plasma protein oxidation is correlated positively with plasma iron levels and negatively with hemolysate zinc levels in sickle-cell anemia patients. *Int J Lab Hematol*. 2012 Apr;34(2):129-35.
380. Belini Junior E, da Silva DG, Torres Lde S, de Almeida EA, Cancado RD, Chiattoni C, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. *Ann Hematol*. 2012 Apr;91(4):479-89.
381. Das SK, Nair RC. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br J Haematol*. 1980 Jan;44(1):87-92.
382. Rusanova I, Escames G, Cossio G, de Borace RG, Moreno B, Chahboune M, et al. Oxidative stress status, clinical outcome, and beta-globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *Eur J Haematol*. 2010 Dec;85(6):529-37.
383. Aslan M, Thornley-Brown D, Freeman BA. Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:375-91.
384. Fasola F, Adedapo K, Anetor J, Kuti M. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. *J Natl Med Assoc*. 2007 Aug;99(8):891-4.
385. Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):402-10.
386. Natta CL, Chen LC, Chow CK. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol*. 1990;83(3):130-2.
387. Emokpae MA, Uadia PO, Gadzama AA. Correlation of oxidative stress and inflammatory markers with the severity of sickle cell nephropathy. *Ann Afr Med*. 2010 Jul-Sep;9(3):141-6.
388. Hasanato RM. Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Ann Saudi Med*. 2006 Jan-Feb;26(1):17-21.
389. Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir Res*. 2001;2(5):280-5.
390. Okorie CP, Nwagha T, Ejezie F. Assessment of some indicators of oxidative stress in nigerian sickle cell anemic patients. *Ann Afr Med*. 2018 Jan-Mar;17(1):11-6.
391. Mockesch B, Connes P, Charlot K, Skinner S, Hardy-Dessources MD, Romana M, et al. Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease. *Br J Haematol*. 2017 Aug;178(3):468-75.

392. Titus J, Chari S, Gupta M, Parekh N. Pro-oxidant and anti-oxidant status in patients of sickle cell anaemia. *Indian J Clin Biochem.* 2004 Jul;19(2):168-72.
393. Akohoue SA, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, et al. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res.* 2007 Feb;61(2):233-8.
394. Jain SK. The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J Biol Chem.* 1984 Mar 25;259(6):3391-4.
395. Capo C, Bongrand P, Benoliel AM, Depieds R. Non-specific recognition in phagocytosis: ingestion of aldehyde-treated erythrocytes by rat peritoneal macrophages. *Immunology.* 1979 Mar;36(3):501-8.
396. Hebbel RP, Miller WJ. Unique promotion of erythrophagocytosis by malondialdehyde. *Am J Hematol.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1988 Dec;29(4):222-5.
397. Asakura T, Minakata K, Adachi K, Russell MO, Schwartz E. Denatured hemoglobin in sickle erythrocytes. *J Clin Invest.* 1977 Apr;59(4):633-40.
398. Rifkind JM, Nagababu E. Hemoglobin redox reactions and red blood cell aging. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jun 10;18(17):2274-83.
399. Nagababu E, Fabry ME, Nagel RL, Rifkind JM. Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2008 Jul-Aug;41(1):60-6.
400. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med.* 2002 Dec;8(12):1383-9.
401. Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003 Dec;54(4):469-87.
402. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Oct 15;90(20):9285-9.
403. Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercellotti GM, Eaton JW, et al. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 2002 Aug 1;100(3):879-87.
404. Castilhos LG, de Oliveira JS, Adefegha SA, Magni LP, Doleski PH, Abdalla FH, et al. Increased oxidative stress alters nucleosides metabolite levels in sickle cell anemia. *Redox Rep.* 2017 Nov;22(6):451-9.
405. George A, Pushkaran S, Konstantinidis DG, Koochaki S, Malik P, Mohandas N, et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood.* 2013 Mar 14;121(11):2099-107.
406. Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J.* 2005 Jun;19(8):989-91.
407. van Beers EJ, van Wijk R. Oxidative stress in sickle cell disease; more than a DAMP squib. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;68(2-3):239-50.
408. Zhang H, Jing X, Shi Y, Xu H, Du J, Guan T, et al. N-acetyl lysyltyrosylcysteine amide inhibits myeloperoxidase, a novel tripeptide inhibitor. *J Lipid Res.* 2013 Nov;54(11):3016-29.
409. Houston PE, Rana S, Sekhsaria S, Perlin E, Kim KS, Castro OL. Homocysteine in sickle cell disease: relationship to stroke. *Am J Med.* 1997 Sep;103(3):192-6.
410. Sangokoya C, Telen MJ, Chi JT. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. *Blood.* 2010 Nov 18;116(20):4338-48.

411. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, Jeney V, Chora A, Palha NR, et al. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell*. 2011 Apr 29;145(3):398-409.
412. Belcher JD, Mahaseth H, Welch TE, Otterbein LE, Hebbel RP, Vercellotti GM. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):808-16.
413. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Zhang P, Abdulla F, Nguyen P, et al. Control of Oxidative Stress and Inflammation in Sickle Cell Disease with the Nrf2 Activator Dimethyl Fumarate. *Antioxid Redox Signal*. 2017 May 10;26(14):748-62.
414. Travassos LH, Vasconcellos LR, Bozza MT, Carneiro LA. Heme and iron induce protein aggregation. *Autophagy*. 2017 Mar 4;13(3):625-6.
415. Ghosh S, Tan F, Yu T, Li Y, Adisa O, Mosunjac M, et al. Global gene expression profiling of endothelium exposed to heme reveals an organ-specific induction of cytoprotective enzymes in sickle cell disease. *PLoS One*. 2011 Mar 31;6(3):e18399.
416. Faës. C. Effets d'un exercice ou d'un stress d'hypoxie / réoxygénation sur le stress oxydant, l'adhésion vasculaire et la biodisponibilité de l'oxyde nitrique dans la drépanocytose. Thèse de doctorat. 2014.
417. Macari ER, Lowrey CH. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):5987-97.
418. Pullarkat V, Meng Z, Tahara SM, Johnson CS, Kalra VK. Proteasome inhibition induces both antioxidant and hb f responses in sickle cell disease via the nrf2 pathway. *Hemoglobin*. 2014;38(3):188-95.
419. Zimmerman CP, Natta C. Glutathione peroxidase activity in whole blood of patients with sickle cell anaemia. *Scand J Haematol*. 1981 Mar;26(3):177-81.
420. Schacter L, Warth JA, Gordon EM, Prasad A, Klein BL. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *FASEB J*. 1988 Mar 1;2(3):237-43.
421. Beretta L, Gerli GC, Ferraresi R, Agostoni A, Gualandri V, Orsini GB. Antioxidant system in sickle red cells. *Acta Haematol*. 1983;70(3):194-7.
422. Al-Naama LM, Hassan MK, Mehdi JK. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia. *Qatar Med J*. 2016;2015(2):14.
423. Abiodun EM, Aisha KG. The association of transfusion status with antioxidant enzymes and malondialdehyde level in Nigerians with sickle cell disease. *Asian J Transfus Sci*. 2014 Jan;8(1):47-50.
424. Marwah SS, Blann AD, Rea C, Phillips JD, Wright J, Bareford D. Reduced vitamin E antioxidant capacity in sickle cell disease is related to transfusion status but not to sickle crisis. *Am J Hematol*. 2002 Feb;69(2):144-6.
425. Marwah SS, Wheelwright D, Blann AD, Rea C, Beresford R, Phillips JD, et al. Vitamin E correlates inversely with non-transferrin-bound iron in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2001 Sep;114(4):917-9.
426. Ama Moor VJ, Pieme CA, Chetcha Chemegne B, Manonji H, Njinkio Nono BL, Tchoula Mamiafo C, et al. Oxidative profile of sickle cell patients in a Cameroonian urban hospital. *BMC Clin Pathol*. 2016;16:15.
427. Biswal S, Rizwan H, Pal S, Sabnam S, Parida P, Pal A. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. *Hematology*. 2018 Jul 16:1-9.
428. Hermann PB, Pianovski MA, Henneberg R, Nascimento AJ, Leonart MS. Erythrocyte oxidative stress markers in children with sickle cell disease. *J Pediatr (Rio J)*. 2016 Jul-Aug;92(4):394-9.

429. Silva DG, Belini Junior E, Torres Lde S, Ricci Junior O, Lobo Cde C, Bonini-Domingos CR, et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2011 Jun 15;47(1):23-8.
430. Mukuku O, Sungu JK, Mutombo AM, Mawaw PM, Aloni MN, Wembonyama SO, et al. Albumin, copper, manganese and cobalt levels in children suffering from sickle cell anemia at Kasumbalesa, in Democratic Republic of Congo. *BMC Hematol*. 2018;18:23.
431. Sungu JK, Mukuku O, Mutombo AM, Mawaw P, Aloni MN, Luboya ON. Trace elements in children suffering from sickle cell anemia: A case-control study. *J Clin Lab Anal*. 2018 Jan;32(1).
432. Kuvibidila SR, Sandoval M, Lao J, Velez M, Yu L, Ode D, et al. Plasma zinc levels inversely correlate with vascular cell adhesion molecule-1 concentration in children with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*. 2006 Aug;98(8):1263-72.
433. Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr*. 2004 Oct;92(4):557-73.
434. Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol*. 2006 Jan;132(1):108-13.
435. Niklowitz P, Menke T, Wiesel T, Mayatepek E, Zschocke J, Okun JG, et al. Coenzyme Q10 in plasma and erythrocytes: comparison of antioxidant levels in healthy probands after oral supplementation and in patients suffering from sickle cell anemia. *Clin Chim Acta*. 2002 Dec;326(1-2):155-61.
436. Jain SK, Ross JD, Duett J, Herbst JJ. Low plasma prealbumin and carotenoid levels in sickle cell disease patients. *Am J Med Sci*. 1990 Jan;299(1):13-5.
437. Chiu D, Lubin B. Abnormal vitamin E and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia: evidence for increased susceptibility to lipid peroxidation in vivo. *J Lab Clin Med*. 1979 Oct;94(4):542-8.
438. Natta CL, Machlin LJ, Brin M. A decrease in irreversibly sickled erythrocytes in sickle cell anemia patients given vitamin E. *Am J Clin Nutr*. 1980 May;33(5):968-71.
439. Tatum VL, Chow CK. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. *Free Radic Res*. 1996 Aug;25(2):133-9.
440. Tangney CC, Phillips G, Bell RA, Fernandes P, Hopkins R, Wu SM. Selected indices of micronutrient status in adult patients with sickle cell anemia (SCA). *Am J Hematol*. 1989 Nov;32(3):161-6.
441. Essien EU. Plasma levels of retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol in sickle cell anaemia. *Cent Afr J Med*. 1995 Feb;41(2):48-50.
442. Nauseef WM, McCormick S, Goedken M. Impact of missense mutations on biosynthesis of myeloperoxidase. *Redox Rep*. 2000;5(4):197-206.
443. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jun 15;28(12):1717-25.
444. Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Theroux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J*. 2001 Aug;142(2):336-9.
445. Liu D, Liu L, Hu Z, Song Z, Wang Y, Chen Z. Evaluation of the oxidative stress-related genes ALOX5, ALOX5AP, GPX1, GPX3 and MPO for contribution to the risk of type 2 diabetes mellitus in the Han Chinese population. *Diab Vasc Dis Res*. 2018 Jul;15(4):336-9.
446. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem*. 1996 Jun 14;271(24):14412-20.

447. de Oliveira RM, Figueiredo CVB, Santiago RP, Yahouedehou S, Carvalho SP, da Paz SS, et al. Genetic Polymorphisms Associated with Environmental Exposure to Polycyclic Derivatives in African Children. *Dis Markers*. 2018;2018:9078939.
448. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Genetic polymorphisms involved in the inflammatory response and lung cancer risk: a case-control study in Japan. *Cytokine*. 2014 Jan;65(1):88-94.
449. London SJ, Lehman TA, Taylor JA. Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res*. 1997 Nov 15;57(22):5001-3.
450. Cheng TY, King IB, Barnett MJ, Ambrosone CB, Thornquist MD, Goodman GE, et al. Serum phospholipid fatty acids, genetic variation in myeloperoxidase, and prostate cancer risk in heavy smokers: a gene-nutrient interaction in the carotene and retinol efficacy trial. *Am J Epidemiol*. 2013 May 15;177(10):1106-17.
451. Choi JY, Neuhaus ML, Barnett MJ, Hong CC, Kristal AR, Thornquist MD, et al. Iron intake, oxidative stress-related genes (MnSOD and MPO) and prostate cancer risk in CARET cohort. *Carcinogenesis*. 2008 May;29(5):964-70.
452. Meng Q, Wu S, Wang Y, Xu J, Sun H, Lu R, et al. MPO Promoter Polymorphism rs2333227 Enhances Malignant Phenotypes of Colorectal Cancer by Altering the Binding Affinity of AP-2alpha. *Cancer Res*. 2018 May 15;78(10):2760-9.
453. Roszak A, Lutkowska A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of myeloperoxidase gene polymorphism 463G>A in development of cervical squamous cell carcinoma. *Int J Biol Markers*. 2016 Dec 23;31(4):e440-e5.
454. Shi X, Li B, Yuan Y, Chen L, Zhang Y, Yang M, et al. The possible association between the presence of an MPO -463 G>A (rs2333227) polymorphism and cervical cancer risk. *Pathol Res Pract*. 2018 Aug;214(8):1142-8.
455. Guo X, Zeng Y, Deng H, Liao J, Zheng Y, Li J, et al. Genetic Polymorphisms of CYP2E1, GSTP1, NQO1 and MPO and the Risk of Nasopharyngeal Carcinoma in a Han Chinese Population of Southern China. *BMC Res Notes*. 2010 Jul 27;3:212.
456. Haslacher H, Perkmann T, Gruenewald J, Exner M, Endler G, Scheichenberger V, et al. Plasma myeloperoxidase level and peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest*. 2012 May;42(5):463-9.
457. Bushueva O, Solodilova M, Ivanov V, Polonikov A. Gender-specific protective effect of the -463G>A polymorphism of myeloperoxidase gene against the risk of essential hypertension in Russians. *J Am Soc Hypertens*. 2015 Nov;9(11):902-6.
458. Ji W, Zhang Y. The association of MPO gene promoter polymorphisms with Alzheimer's disease risk in Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017 Dec 8;8(64):107870-6.
459. Wu D, Chen X, Dong C, Liu Q, Yang Y, He C, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in MPO and COX genes with oral lichen planus. *Int J Immunogenet*. 2015 Jun;42(3):161-7.
460. Banci L, Benedetto M, Bertini I, Del Conte R, Piccioli M, Viezzoli MS. Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry*. 1998 Aug 25;37(34):11780-91.
461. Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS, Richardson DC. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*. 1983 Nov 17-23;306(5940):287-90.
462. Parge HE, Hallewell RA, Tainer JA. Atomic structures of wild-type and thermostable mutant recombinant human Cu,Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Jul 1;89(13):6109-13.

463. Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Gueret M, et al. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1, and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem*. 1999 Jan 1;274(1):503-9.
464. Seo SJ, Kim HT, Cho G, Rho HM, Jung G. Sp1 and C/EBP-related factor regulate the transcription of human Cu/Zn SOD gene. *Gene*. 1996 Oct 31;178(1-2):177-85.
465. Baek BS, Kwon HJ, Lee KH, Yoo MA, Kim KW, Ikeno Y, et al. Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation. *Arch Pharm Res*. 1999 Aug;22(4):361-6.
466. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002 Aug 1;33(3):337-49.
467. Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta*. 1982 Nov 24;126(1):41-51.
468. Grzelak A, Soszynski M, Bartosz G. Inactivation of antioxidant enzymes by peroxynitrite. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000 Jul;60(4):253-8.
469. Hassan HM, Lee FJ. Effect of temperature and htpR on the biosynthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1989 Apr;49(2-3):133-7.
470. Ryan KC, Johnson OE, Cabelli DE, Brunold TC, Maroney MJ. Nickel superoxide dismutase: structural and functional roles of Cys2 and Cys6. *J Biol Inorg Chem*. 2010 Jun;15(5):795-807.
471. Chen J, Hill K, Sha SH. Inhibitors of Histone Deacetylases Attenuate Noise-Induced Hearing Loss. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2016 Aug;17(4):289-302.
472. Church SL, Farmer DR, Nelson DM. Induction of manganese superoxide dismutase in cultured human trophoblast during in vitro differentiation. *Dev Biol*. 1992 Jan;149(1):177-84.
473. Wan XS DM, St Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol* 1994;13(11):1127-36.
474. Oladzad Abbasabadi A, Javanian A, Nikkhah M, Meratan AA, Ghiasi P, Nemat-Gorgani M. Disruption of mitochondrial membrane integrity induced by amyloid aggregates arising from variants of SOD1. *Int J Biol Macromol*. 2013 Oct;61:212-7.
475. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin*. 2015 Nov;33(4):855-76.
476. Moreno-Martet M, Espejo-Porrás F, Fernández-Ruiz J, de Lago E. Changes in endocannabinoid receptors and enzymes in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mice and evaluation of a Sativex((R)) -like combination of phytocannabinoids: interest for future therapies in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurosci Ther*. 2014 Sep;20(9):809-15.
477. Saccon RA, Bunton-Stasyshyn RK, Fisher EM, Fratta P. Is SOD1 loss of function involved in amyotrophic lateral sclerosis? *Brain*. 2013 Aug;136(Pt 8):2342-58.
478. Chia R, Chio A, Traynor BJ. Novel genes associated with amyotrophic lateral sclerosis: diagnostic and clinical implications. *Lancet Neurol*. 2018 Jan;17(1):94-102.
479. Komatsu K, Imamura K, Yamashita H, Julien JP, Takahashi R, Inoue H. Overexpressed wild-type superoxide dismutase 1 exhibits amyotrophic lateral sclerosis-related misfolded conformation in induced pluripotent stem cell-derived spinal motor neurons. *Neuroreport*. 2018 Jan 3;29(1):25-9.
480. Ravera S, Bonifacino T, Bartolucci M, Milanese M, Gallia E, Provenzano F, et al. Characterization of the Mitochondrial Aerobic Metabolism in the Pre- and Perisynaptic Districts of the SOD1(G93A) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2018 Dec;55(12):9220-33.

481. Spisak K, Klimkowicz-Mrowiec A, Pera J, Dziedzic T, Aleksandra G, Slowik A. rs2070424 of the SOD1 gene is associated with risk of Alzheimer's disease. *Neurol Neurochir Pol.* 2014;48(5):342-5.
482. Schupf N, Lee A, Park N, Dang LH, Pang D, Yale A, et al. Candidate genes for Alzheimer's disease are associated with individual differences in plasma levels of beta amyloid peptides in adults with Down syndrome. *Neurobiol Aging.* 2015 Oct;36(10):2907 e1-10.
483. Karch CM, Wen N, Fan CC, Yokoyama JS, Kouri N, Ross OA, et al. Selective Genetic Overlap Between Amyotrophic Lateral Sclerosis and Diseases of the Frontotemporal Dementia Spectrum. *JAMA Neurol.* 2018 Jul 1;75(7):860-75.
484. Wang V, Chen SY, Chuang TC, Shan DE, Soong BW, Kao MC. Val-9Ala and Ile+58Thr polymorphism of MnSOD in Parkinson's disease. *Clin Biochem.* 2010 Aug;43(12):979-82.
485. Kim G, Lee HS, Seok Bang J, Kim B, Ko D, Yang M. A current review for biological monitoring of manganese with exposure, susceptibility, and response biomarkers. *J Environ Sci Health C Environ Carcinol Ecotoxicol Rev.* 2015;33(2):229-54.
486. Farin FM, Hitoş Y, Hallagan SE, Kushleika J, Woods JS, Janssen PS, et al. Genetic polymorphisms of superoxide dismutase in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2001 Jul;16(4):705-7.
487. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem.* 2003 May;14(5):288-94.
488. St Clair DK, Jordan JA, Wan XS, Gairola CG. Protective role of manganese superoxide dismutase against cigarette smoke-induced cytotoxicity. *J Toxicol Environ Health.* 1994 Oct;43(2):239-49.
489. Crawford A, Fassett RG, Geraghty DP, Kunde DA, Ball MJ, Robertson IK, et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene.* 2012 Jun 15;501(2):89-103.
490. Bica CG, da Silva LL, Toscani NV, Zettler CG, Gottlieb MG, Alexandre CO, et al. Polymorphism (ALA16VAL) correlates with regional lymph node status in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Jan 15;196(2):153-8.
491. McAtee BL, Yager JD. Manganese superoxide dismutase: effect of the ala16val polymorphism on protein, activity, and mRNA levels in human breast cancer cell lines and stably transfected mouse embryonic fibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2010 Feb;335(1-2):107-18.
492. Reszka E, Jablonowski Z, Wieczorek E, Jablonska E, Krol MB, Gromadzinska J, et al. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2014 Oct;140(10):1723-31.
493. Su S, He K, Li J, Wu J, Zhang M, Feng C, et al. Genetic polymorphisms in antioxidant enzyme genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese population: a case-control study. *Tumour Biol.* 2015 Jun;36(6):4627-32.
494. Nahon P, Sutton A, Rufat P, Ziol M, Akouche H, Laguillier C, et al. Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms comodule the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis. *Hepatology.* 2009 Nov;50(5):1484-93.
495. Berto MD, Bica CG, de Sa GP, Barbisan F, Azzolin VF, Rogalski F, et al. The effect of superoxide anion and hydrogen peroxide imbalance on prostate cancer: an integrative in vivo and in vitro analysis. *Med Oncol.* 2015 Nov;32(11):251.
496. Cooper ML, Adami HO, Gronberg H, Wiklund F, Green FR, Rayman MP. Interaction between single nucleotide polymorphisms in selenoprotein P and mitochondrial superoxide dismutase determines prostate cancer risk. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10171-7.
497. Zejnilovic J, Akev N, Yilmaz H, Isbir T. Association between manganese superoxide dismutase polymorphism and risk of lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Feb;189(1):1-4.

498. Liu G, Zhou W, Wang LI, Park S, Miller DP, Xu LL, et al. MPO and SOD2 polymorphisms, gender, and the risk of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Lett.* 2004 Oct 8;214(1):69-79.
499. Wheatley KE, Williams EA, Smith NC, Dillard A, Park EY, Nunez NP, et al. Low-carbohydrate diet versus caloric restriction: effects on weight loss, hormones, and colon tumor growth in obese mice. *Nutr Cancer.* 2008;60(1):61-8.
500. Trifa AP, Banescu C, Dima D, Bojan AS, Tevet M, Moldovan VG, et al. Among a panel of polymorphisms in genes related to oxidative stress, CAT-262 C>T, GPX1 Pro198Leu and GSTP1 Ile105Val influence the risk of developing BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *Hematology.* 2016 Oct;21(9):520-5.
501. Liwei L, Chunyu L, Ruifa H. Association between manganese superoxide dismutase gene polymorphism and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Urology.* 2009 Oct;74(4):884-8.
502. Choi JY, Neuhouser ML, Barnett M, Hudson M, Kristal AR, Thornquist M, et al. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jun;16(6):1115-20.
503. Mohelnikova-Duchonova B, Marsakova L, Vrana D, Holcatova I, Ryska M, Smerhovsky Z, et al. Superoxide dismutase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: quinone oxidoreductase polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Pancreas.* 2011 Jan;40(1):72-8.
504. Banescu C, Iancu M, Trifa AP, Candea M, Benedek Lazar E, Moldovan VG, et al. From Six Gene Polymorphisms of the Antioxidant System, Only GPX Pro198Leu and GSTP1 Ile105Val Modulate the Risk of Acute Myeloid Leukemia. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2536705.
505. Banescu C, Trifa AP, Voidazan S, Moldovan VG, Macarie I, Benedek Lazar E, et al. CAT, GPX1, MnSOD, GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genetic polymorphisms in chronic myeloid leukemia: a case-control study. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:875861.
506. Eftekhari A, Peivand Z, Saadat I, Saadat M. Association between Genetic Polymorphisms in Superoxide Dismutase Gene Family and Risk of Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2018 Sep 21.
507. Boroumand F, Mahmoudinasab H, Saadat M. Association of the SOD2 (rs2758339 and rs5746136) polymorphisms with the risk of heroin dependency and the SOD2 expression levels. *Gene.* 2018 Apr 5;649:27-31.
508. F. Schardinger ZUN. *Genusmittel* 5 (1902) 1113. 1902.
509. Krenitsky TA, Spector T, Hall WW. Xanthine oxidase from human liver: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys.* 1986 May 15;247(1):108-19.
510. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004 Mar 16;555(Pt 3):589-606.
511. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev.* 2006 Mar;58(1):87-114.
512. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med.* 2002 Sep 15;33(6):774-97.
513. Baghiani A, Harrison R, Benboubetra M. Purification and partial characterisation of camel milk xanthine oxidoreductase. *Arch Physiol Biochem.* 2003 Dec;111(5):407-14.
514. Bray RC, Barber MJ, Dalton H, Lowe DJ, Coughlan MP. Iron-sulphur systems in some isolated multi-component oxidative enzymes. *Biochem Soc Trans.* 1975;3(4):479-82.
515. Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Pai EF. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):10723-8.
516. Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of

- rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem.* 1990 Aug 25;265(24):14170-5.
517. Nishino T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29859-64.
518. Xu P, Huecksteadt TP, Hoidal JR. Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics.* 1996 Jun 1;34(2):173-80.
519. Ichida K, Amaya Y, Noda K, Minoshima S, Hosoya T, Sakai O, et al. Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene.* 1993 Nov 15;133(2):279-84.
520. Terao M, Kurosaki M, Demontis S, Zanotta S, Garattini E. Isolation and characterization of the human aldehyde oxidase gene: conservation of intron/exon boundaries with the xanthine oxidoreductase gene indicates a common origin. *Biochem J.* 1998 Jun 1;332 (Pt 2):383-93.
521. Terao M, Kurosaki M, Zanotta S, Garattini E. The xanthine oxidoreductase gene: structure and regulation. *Biochem Soc Trans.* 1997 Aug;25(3):791-6.
522. Turner NA, Doyle WA, Ventom AM, Bray RC. Properties of rabbit liver aldehyde oxidase and the relationship of the enzyme to xanthine oxidase and dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1995 Sep 1;232(2):646-57.
523. Jarasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW. Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell.* 1981 Jul;25(1):67-82.
524. Moriwaki Y, Yamamoto T, Yamaguchi K, Takahashi S, Higashino K. Immunohistochemical localization of aldehyde and xanthine oxidase in rat tissues using polyclonal antibodies. *Histochem Cell Biol.* 1996 Jan;105(1):71-9.
525. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab Invest.* 1999 Aug;79(8):967-74.
526. Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev.* 2004 May;36(2):363-75.
527. Rouquette M, Page S, Bryant R, Benboubetra M, Stevens CR, Blake DR, et al. Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture. *FEBS Lett.* 1998 Apr 24;426(3):397-401.
528. Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med.* 2010 Feb 15;48(4):493-8.
529. M.A. Suriyajothi RS, R. Venkateswari ACTIVITY OF XANTHINE- OXIDASE IN- DIABETICS: ITS CORRELATION- WITH AGING *Pharmacologyonline.* 2011; 2: 128-133.
530. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000 Nov 10;87(10):840-4.
531. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988 Dec;255(6 Pt 2):H1269-75.
532. Galbusera C, Orth P, Fedida D, Spector T. Superoxide radical production by allopurinol and xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jun 14;71(12):1747-52.
533. Houston M, Estevez A, Chumley P, Aslan M, Marklund S, Parks DA, et al. Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem.* 1999 Feb 19;274(8):4985-94.
534. Rodrigues P, de Marco G, Furriol J, Mansego ML, Pineda-Alonso M, Gonzalez-Neira A, et al. Oxidative stress in susceptibility to breast cancer: study in Spanish population. *BMC Cancer.* 2014 Nov 21;14:861.

535. Rodrigues P, Furriol J, Bermejo B, Chaves FJ, Lluch A, Eroles P. Identification of candidate polymorphisms on stress oxidative and DNA damage repair genes related with clinical outcome in breast cancer patients. *Int J Mol Sci*. 2012 Dec 5;13(12):16500-13.
536. Liu H, Zhu H, Shi W, Lin Y, Ma G, Tao G, et al. Genetic variants in XDH are associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *Gene*. 2018 Jul 15;663:196-202.
537. Wu B, Hao Y, Shi J, Geng N, Li T, Chen Y, et al. Association between xanthine dehydrogenase tag single nucleotide polymorphisms and essential hypertension. *Mol Med Rep*. 2015 Oct;12(4):5685-90.
538. Yang J, Kamide K, Kokubo Y, Takiuchi S, Horio T, Matayoshi T, et al. Associations of hypertension and its complications with variations in the xanthine dehydrogenase gene. *Hypertens Res*. 2008 May;31(5):931-40.
539. Bhatti P, Stewart PA, Hutchinson A, Rothman N, Linet MS, Inskip PD, et al. Lead exposure, polymorphisms in genes related to oxidative stress, and risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jun;18(6):1841-8.
540. Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9926-30.
541. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*. 2012 Jul;32(4):687-726.
542. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinkova-Kostova AT, et al. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic Biol Med*. 2015 Nov;88(Pt B):108-46.
543. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci*. 2014 Apr;39(4):199-218.
544. Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 2002 Sep 15;62(18):5196-203.
545. Morse D, Choi AM. Heme oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 15;172(6):660-70.
546. Iida K, Itoh K, Kumagai Y, Oyasu R, Hattori K, Kawai K, et al. Nrf2 is essential for the chemopreventive efficacy of oltipraz against urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res*. 2004 Sep 15;64(18):6424-31.
547. Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. *Carcinogenesis*. 2003 Mar;24(3):461-7.
548. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res*. 2008 Nov-Dec;58(5-6):262-70.
549. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*. 2012 Jul 10;22(1):66-79.
550. Menegon S, Columbano A, Giordano S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. *Trends Mol Med*. 2016 Jul;22(7):578-93.
551. Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol Cell Biol*. 2002 May;22(9):2883-92.

552. Tjihuis MJ, Visker MH, Aarts JM, Laan W, de Boer SY, Kok FJ, et al. NQO1 and NFE2L2 polymorphisms, fruit and vegetable intake and smoking and the risk of colorectal adenomas in an endoscopy-based population. *Int J Cancer*. 2008 Apr 15;122(8):1842-8.
553. Cho HY, Marzec J, Kleeberger SR. Functional polymorphisms in Nrf2: implications for human disease. *Free Radic Biol Med*. 2015 Nov;88(Pt B):362-72.
554. Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, Aine M, Hoglund M, Kim WY, et al. Genetic Alterations in the Molecular Subtypes of Bladder Cancer: Illustration in the Cancer Genome Atlas Dataset. *Eur Urol*. 2017 Sep;72(3):354-65.
555. Seibold P, Hall P, Schoof N, Nevanlinna H, Heikkinen T, Benner A, et al. Polymorphisms in oxidative stress-related genes and mortality in breast cancer patients--potential differential effects by radiotherapy? *Breast*. 2013 Oct;22(5):817-23.
556. Alam A, Mukhopadhyay ND, Ning Y, Reshko LB, Cardnell RJ, Alam O, et al. A Preliminary Study on Racial Differences in HMOX1, NFE2L2, and TGFbeta1 Gene Polymorphisms and Radiation-Induced Late Normal Tissue Toxicity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2015 Oct 1;93(2):436-43.
557. Mumbrekar KD, Bola Sadashiva SR, Kabekkodu SP, Fernandes DJ, Vadhiraaja BM, Suga T, et al. Genetic Variants in CD44 and MAT1A Confer Susceptibility to Acute Skin Reaction in Breast Cancer Patients Undergoing Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017 Jan 1;97(1):118-27.
558. Goncalves AC, Alves R, Baldeiras I, Cortesao E, Carda JP, Branco CC, et al. Genetic variants involved in oxidative stress, base excision repair, DNA methylation, and folate metabolism pathways influence myeloid neoplasias susceptibility and prognosis. *Mol Carcinog*. 2017 Jan;56(1):130-48.
559. von Otter M, Landgren S, Nilsson S, Celojevic D, Bergstrom P, Hakansson A, et al. Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease. *BMC Med Genet*. 2010 Mar 2;11:36.
560. Xu X, Sun J, Chang X, Wang J, Luo M, Wintergerst KA, et al. Genetic variants of nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 associated with the complications in Han descents with type 2 diabetes mellitus of Northeast China. *J Cell Mol Med*. 2016 Nov;20(11):2078-88.
561. Plenge R, Rioux JD. Identifying susceptibility genes for immunological disorders: patterns, power, and proof. *Immunol Rev*. 2006 Apr;210:40-51.
562. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.
563. Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, et al. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat*. 2007 Feb;28(2):150-8.
564. Martin Krahn DS. Génétique médicale : enseignement thématique. Editeur: Issy-les-Moulineaux : Elsevier-Masson, DL 2016, cop 2016. 2016.
565. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002 Apr;3(4):285-98.
566. de Vooght KM, van Wijk R, van Solinge WW. Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):698-708.
567. Miguel-Escalada I, Pasquali L, Ferrer J. Transcriptional enhancers: functional insights and role in human disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2015 Aug;33:71-6.
568. Kleinjan DJ, van Heyningen V. Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet*. 1998;7(10):1611-8.
569. Kukreti S, Kaur H, Kaushik M, Bansal A, Saxena S, Kaushik S, et al. Structural polymorphism at LCR and its role in beta-globin gene regulation. *Biochimie*. 2010 Sep;92(9):1199-206.

570. Li Y, Tergaonkar V. Telomerase reactivation in cancers: Mechanisms that govern transcriptional activation of the wild-type vs. mutant TERT promoters. *Transcription*. 2016 Mar 14;7(2):44-9.
571. Costa RN, Conran N, Albuquerque DM, Soares PH, Saad ST, Costa FF. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in sickle cell anemia. *Haematologica*. 2005 Jul;90(7):977-9.
572. Barbosa LC, Miranda-Vilela AL, Hiragi Cde O, Ribeiro IF, Daldegan MB, Grisolia CK, et al. Haptoglobin and myeloperoxidase (- G463A) gene polymorphisms in Brazilian sickle cell patients with and without secondary iron overload. *Blood Cells Mol Dis*. 2014 Feb-Mar;52(2-3):95-107.
573. Yahouedehou S, Carvalho MOS, Oliveira RM, Santiago RP, da Guarda CC, Carvalho SP, et al. Sickle Cell Anemia Patients in Use of Hydroxyurea: Association between Polymorphisms in Genes Encoding Metabolizing Drug Enzymes and Laboratory Parameters. *Dis Markers*. 2018;2018:6105691.
574. Farias ICC, Mendonca-Belmont TF, da Silva AS, do OK, Ferreira F, Medeiros FS, et al. Association of the SOD2 Polymorphism (Val16Ala) and SOD Activity with Vaso-occlusive Crisis and Acute Splenic Sequestration in Children with Sickle Cell Anemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2018;10(1):e2018012.
575. Song P, Li K, Liu L, Wang X, Jian Z, Zhang W, et al. Genetic polymorphism of the Nrf2 promoter region is associated with vitiligo risk in Han Chinese populations. *J Cell Mol Med*. 2016 Oct;20(10):1840-50.
576. Weinberg W. On the demonstration of heredity in man. In: Boyer SH, eds (1963) *Papers on human genetics*. Prentice Hall, Englewood Cliffs NJ. 1908.
577. Gonzalez JR, Carrasco JL, Dudbridge F, Armengol L, Estivill X, Moreno V. Maximizing association statistics over genetic models. *Genet Epidemiol*. 2008 Apr;32(3):246-54.
578. Flanagan JM, Sheehan V, Linder H, Howard TA, Wang YD, Hoppe CC, et al. Genetic mapping and exome sequencing identify 2 mutations associated with stroke protection in pediatric patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2013 Apr 18;121(16):3237-45.
579. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alpha-thalassemia. *Blood*. 2000 Jan 1;95(1):360-2.
580. Joly P, Lacan P, Garcia C, Delasaux A, Francina A. Rapid and reliable beta-globin gene cluster haplotyping of sickle cell disease patients by FRET Light Cycler and HRM assays. *Clin Chim Acta*. 2011 Jun 11;412(13-14):1257-61.
581. Witko-Sarsat V, Nguyen Khoa T, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1998;28:321-41.
582. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.
583. Michel F, Bonnefont-Rousselot D, Mas E, Drai J, Therond P. [Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2008 Nov-Dec;66(6):605-20.
584. Beauvieux MC, Tissier P, Couzigou P, Gin H, Canioni P, Gallis JL. Ethanol perfusion increases the yield of oxidative phosphorylation in isolated liver of fed rats. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Mar 15;1570(2):135-40.
585. Rayssiguier Y, Gueux E, Bussiere L, Mazur A. Copper deficiency increases the susceptibility of lipoproteins and tissues to peroxidation in rats. *J Nutr*. 1993 Aug;123(8):1343-8.
586. Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem*. 1988 Oct;174(1):331-6.
587. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967 Jul;70(1):158-69.

588. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 1971 Nov;44(1):276-87.
589. Oberley LW, Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* 1984;105:457-64.
590. Monget D. [Ortho-tolidine: a more sensitive detector of peroxidase in the ELISA immunoenzyme method]. *Ann Biol Clin (Paris).* 1978;36(6):527.
591. Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2727-35.
592. Renoux C, Connes P, Nader E, Skinner S, Faes C, Petras M, et al. Alpha-thalassaemia promotes frequent vaso-occlusive crises in children with sickle cell anaemia through haemorheological changes. *Pediatr Blood Cancer.* 2017 Aug;64(8).
593. Hellani A, Al-Akoum S, Abu-Amero KK. G6PD Mediterranean S188F codon mutation is common among Saudi sickle cell patients and increases the risk of stroke. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009 Aug;13(4):449-52.
594. Joly P, Garnier N, Kebaili K, Renoux C, Dony A, Cheikh N, et al. G6PD deficiency and absence of alpha-thalassaemia increase the risk for cerebral vasculopathy in children with sickle cell anemia. *Eur J Haematol.* 2015 Apr;96(4):404-8.
595. Steinberg MH, Adewoye AH. Modifier genes and sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol.* 2006 May;13(3):131-6.
596. Friedrich JR, Sheehan V, Flanagan JM, Baldan A, Summarell CC, Bittar CM, et al. The role of BCL11A and HMIP-2 polymorphisms on endogenous and hydroxyurea induced levels of fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients from southern Brazil. *Blood Cells Mol Dis.* 2016 Nov;62:32-7.
597. Hu J, Gao J, Li J. Sex and age discrepancy of HbA1c and fetal hemoglobin determined by HPLC in a large Chinese Han population. *J Diabetes.* 2018 Jun;10(6):458-66.
598. Kaul DK, Liu XD, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Hebbel RP. Anti-inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Jul;287(1):H293-301.
599. Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med.* 2006 Dec 15;41(12):1771-80.
600. Pfeffer PE, Lu H, Mann EH, Chen YH, Ho TR, Cousins DJ, et al. Effects of vitamin D on inflammatory and oxidative stress responses of human bronchial epithelial cells exposed to particulate matter. *PLoS One.* 2018;13(8):e0200040.
601. Pramanik S, Ganguly U, Khemka VK, Banerjee A. Decreased glucose-6-phosphate dehydrogenase activity along with oxidative stress affects visual contrast sensitivity in alcoholics. *Alcohol.* 2018 Dec;73:17-24.
602. Bhagat S, Patra PK, Thakur AS. Association of Inflammatory Biomarker C-Reactive Protein, Lipid Peroxidation and Antioxidant Capacity Marker with HbF Level in Sickle Cell Disease Patients from Chattisgarh. *Indian J Clin Biochem.* 2012 Oct;27(4):394-9.
603. Jana S, Strader MB, Meng F, Hicks W, Kassa T, Tarandovskiy I, et al. Hemoglobin oxidation-dependent reactions promote interactions with band 3 and oxidative changes in sickle cell-derived microparticles. *JCI Insight.* 2018 Nov 2;3(21).
604. Nader E, Grau M, Fort R, Collins B, Cannas G, Gauthier A, et al. Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. *Nitric Oxide.* 2018 Dec 1;81:28-35.
605. Prakash S, Hundekar ANS, Aarti C, Karnik, Rajesh Valvi, Rahul A. Ghone, Sonali S. Bhagat. The

- Effect of Antioxidant Supplementation on the Oxidant and Antioxidant Status in Sickle Cell Anaemia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2011;5(7): 1339-1342.
606. Al-Naama LM, Hassan MK, Mehdi JK. Association of erythrocytes antioxidant enzymes and their cofactors with markers of oxidative stress in patients with sickle cell anemia. *Qatar Med J*. 2015;2015(2):14.
607. Carrell RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA. Activated oxygen and haemolysis. *Br J Haematol*. 1975 Jul;30(3):259-64.
608. Lu N, Chen W, Peng YY. Effects of glutathione, Trolox and desferrioxamine on hemoglobin-induced protein oxidative damage: anti-oxidant or pro-oxidant? *Eur J Pharmacol*. 2011 Jun 1;659(2-3):95-101.
609. Ayodele Adelakun OA, Temitope Ogunleye, Elizabeth Disu, Ayokulehin Kosoko and Ganiyu Arinola. Respiratory Burst Enzymes and Oxidantantioxidant Status in Nigerian Children with Sickle Cell Disease. *British Biotechnology Journal*. 2014;4(3): 270-278.
610. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KL, Wojtkiewicz G, et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One*. 2013;8(7):e67976.
611. Swirski FK, Wildgruber M, Ueno T, Figueiredo JL, Panizzi P, Iwamoto Y, et al. Myeloperoxidase-rich Ly-6C⁺ myeloid cells infiltrate allografts and contribute to an imaging signature of organ rejection in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jul;120(7):2627-34.
612. Ormrod DJ, Harrison GL, Miller TE. Inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity by selected tissues. *J Pharmacol Methods*. 1987 Sep;18(2):137-42.
613. Xia Y, Zweier JL. Measurement of myeloperoxidase in leukocyte-containing tissues. *Anal Biochem*. 1997 Feb 1;245(1):93-6.
614. Durdi Qujeq TR. Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Diabetes & Metabolism*. 2007; 15: 22-24.
615. Harkness DR. Sickle cell trait revisited. *Am J Med*. 1989 Sep;87(3N):30N-4N.
616. Shongo MY, Mukuku O, Lubala TK, Mutombo AM, Kanteng GW, Umumbu WS, et al. [Sickle cell disease in stationary phase in 6-59 months children in Lubumbashi: epidemiology and clinical features]. *Pan Afr Med J*. 2014;19:71.
617. Gueye Tall F, Martin C, Malick Ndour EH, Deme Ly I, Renoux C, Chillotti L, et al. Genetic Background of the Sickle Cell Disease Pediatric Population of Dakar, Senegal, and Characterization of a Novel Frameshift beta-Thalassemia Mutation [HBB: c.265_266del; p.Leu89Glufs*2]. *Hemoglobin*. 2017 Mar;41(2):89-95.
618. Vulliamy TJ, Othman A, Town M, Nathwani A, Falusi AG, Mason PJ, et al. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 1;88(19):8568-71.
619. Bouanga JC, Mouele R, Prehu C, Wajcman H, Feingold J, Galacteros F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Congo. *Hum Hered*. 1998 Jul-Aug;48(4):192-7.
620. Maiga B, Dolo A, Campino S, Sepulveda N, Corran P, Rockett KA, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase polymorphisms and susceptibility to mild malaria in Dogon and Fulani, Mali. *Malar J*. 2014 Jul 11;13:270.
621. Ouattara AK, Yameogo P, Diarra B, Obiri-Yeboah D, Yonli A, Compaore TR, et al. Molecular Heterogeneity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Burkina Faso: G-6-PD Betica Selma and Santamaria in People with Symptomatic Malaria in Ouagadougou. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2016;8(1):e2016029.

622. De Araujo C, Migot-Nabias F, Guitard J, Pelleau S, Vulliamy T, Ducrocq R. The role of the G6PD A_{Eth376G/968C} allele in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the seerer population of Senegal. *Haematologica*. 2006 Feb;91(2):262-3.
623. Das I, Mishra H, Khodiar PK, Patra PK. Identification of therapeutic targets for inflammation in sickle cell disease (SCD) among Indian patients using gene expression data analysis. *Bioinformatics*. 2018;14(7):408-13.
624. Ramanathan G, Elumalai R, Periyasamy S, Lakkakula B. Role of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and hypertension-induced end-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Iran J Kidney Dis*. 2014 Jul;8(4):265-77.

Titre : Drépanocytose et polymorphismes génétiques : épidémiologie, prédiction de gravité et stress oxydant

Résumé: Le premier objectif de cette thèse était de déterminer les effets isolés et combinés de l'alpha-thalassémie, des polymorphismes inducteurs (QTLs) de l'HbF et du génotype G6PD dans un contexte d'évolution naturelle de la drépanocytose (Etudes 1 et 2). L'étude 1 a permis d'évaluer pour la première fois les fréquences alléliques de ces gènes modificateurs chez 301 enfants sénégalais SS. Contrairement aux autres populations africaines, le Variant Betica de la G6PD était majoritaire par rapport au variant A(-). De plus, 12% de notre cohorte avait un déficit en G6PD combiné à une absence d'alpha-thalassémie. Ces patients-là seront à privilégier pour la réalisation d'un Doppler transcrânien. Les résultats obtenus dans l'étude 2 nous ont permis de conclure que l'alpha-thalassémie et les QTLs de l'HbF sont interdépendants et ne doivent pas être étudiés séparément pour une prédiction clinique précise. En effet, une combinaison d'alpha-thalassémie avec au moins 2 QTLs de l'HbF est nécessaire pour retarder de manière significative la première complication de la maladie. Cependant, une alpha-thalassémie homozygote, même associée à 3 à 6 QTLs de l'HbF, augmente la fréquence des CVO pendant l'enfance. Par conséquent, une alpha-thalassémie hétérozygote avec au moins deux QTL HbF constituerait le génotype le plus favorable relativement à la survenue des CVO.

Le deuxième objectif de cette thèse était d'étudier les interrelations entre le stress oxydant (phénotype et génotype) et la sévérité clinique de la maladie (Etudes 3 à 4). La drépanocytose est caractérisée par un stress oxydatif élevé pouvant expliquer une partie des manifestations cliniques. Nos résultats ont montré que l'alpha-thalassémie homozygote semble diminuer le stress oxydatif, ce qui contribuerait à son effet protecteur sur certaines complications du sous-phénotype hémolytique. En outre, les patients qui ont le moins d'hospitalisations et de CVO semblent présenter une meilleure défense antioxydante (activités catalase et GPx augmentées). Dans l'étude 4 nous avons étudié 4 SNPs de gènes du stress oxydant (rs4880 du gène *SOD2*, rs207454 du gène *XO*, rs233322 du gène *MPO* et rs35652124 du gène *NFE2L2*). Le SNP rs4880 aurait un effet favorable au niveau biologique (réticulocytose moindre, activité GPx augmentée) mais sans traduction clinique associée. Il en est de même pour rs233322 qui serait associé à une hémolyse et à un stress oxydatif (AOPP) plus importants. En revanche, une tendance à un effet protecteur de rs207454 vis-à-vis de certaines complications (hospitalisations, ostéonécrose, sepsis, STA) a été observée. Notre travail contribue à la compréhension de l'impact des gènes modificateurs dans la drépanocytose. Il pourrait donc permettre, via une sélection positive des patients à risque, d'améliorer la prise en charge de la maladie dans les pays où les traitements de fond (hydroxyurée, doppler transcrânien, échanges transfusionnels) ne peuvent être proposés à tous.

Mots-clés: drépanocytose, alpha-thalassémie, QTLs de l'HbF, gènes du stress oxydant, sévérité clinique

Title: Sickle cell disease and genetic polymorphisms: epidemiology, prediction of severity and oxidative stress.

Abstract: The primary objective of this thesis was to determine the isolated and combined effects of alpha-thalassemia, inductors polymorphisms (QTLs) of HbF and genotype G6PD in a context of natural progression of sickle cell disease (Studies 1 and 2). Study 1 was undertaken to evaluate for the first time the allelic frequencies of these modifiers genes in 301 Senegalese SS children. Unlike other African populations, the G6PD Betica Variant was predominant over the A (-) variant. In addition, 12% of our cohort had G6PD deficiency combined with no alpha-thalassemia. These patients will be favoured for the realization of a transcranial doppler. The results obtained in Study 2 allowed us to conclude that alpha thalassemia and QTLs of HbF are interdependent and should not be studied separately for accurate clinical prediction. Indeed, a combination of alpha thalassemia with at least 2 QTLs of HbF is required to significantly delay the first complication of the disease. However, a homozygous alpha thalassemia, even associated with 3 to 6 QTLs of HbF, increases the frequency of CVOs during childhood. Therefore, a heterozygous alpha-thalassemia with at least two QTL HbFs would be the most favourable genotype for the occurrence of CVOs.

The second objective of this thesis was to study the interrelationships between oxidative stress and the clinical severity of the disease (Studies 3 to 4). Sickle cell disease is characterized by high oxidative stress that may explain some of the clinical manifestations. Our results showed that homozygous alpha-thalassemia appears to reduce oxidative stress, which would contribute to its protective effect on certain complications of the hemolytic sub-phenotype. In addition, patients with the least hospitalization and CVO appear to have better antioxidant defense (catalase and GPx activities increased). In Study 4 we studied 4 SNPs of oxidative stress genes (rs4880 of the *SOD2* gene, rs207454 of the *XO* gene, rs233322 of the *MPO* gene and rs35652124 of the *NFE2L2* gene). The rs4880 SNP would have a favourable effect on the biological level (less reticulocytosis, increased GPx activity) but without associated clinical translation. The same is true for rs233322, which is associated with greater haemolysis and oxidative stress (AOPP). On the other hand, a tendency to a protective effect of rs207454 for some complications (hospitalizations, osteonecrosis, sepsis, STA) was observed. Our work contributes to the understanding of the impact of modifiers genes in sickle cell disease. It could therefore, through a positive selection of at-risk patients, improve the management of the disease in countries where the basic treatments (hydroxyurea, transcranial doppler, blood transfusion) cannot be offered to all.

Key words: sickle cell disease, alpha-thalassemia, QTLs of HbF, oxidative stress genes, clinical severity.