



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies & Agro-Ecologie
Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

Étude du stress oxydatif dans la pathologie du globule rouge
" La drépanocytose "

Présenté par : Melle Benhebil Ouïam et Melle Toubdarine Dounia

Devant le Jury

<i>M^{me} Rouaki F</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>M^{me} Kanane A</i>	<i>MCB</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M^{me} Hamel H</i>	<i>MA</i>	<i>CAC Blida</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M^{me} Benazouz F</i>	<i>MAA</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Co-Promotrice</i>

Soutenu le :
18/07/2022

Session 2021 / 20 22

Remerciements



On remercie en premier lieu Dieu tout puissant de nous avoir accordé la puissance et la volonté pour achever ce travail.

*On tient à remercier Pr **Bouchakour** et Pr **Bradai** chef de service d'hématologie d'avoir nous accepter de faire nos recherches à ce service.*

*On adresse nos sincères remerciements à Mme **Hamel H**, maitre assistante en hémobiologie et transfusion sanguine, directrice du mémoire pour son suivi, ses conseils judicieux et ses discussions qui nous ont beaucoup aidé au cours de nos recherches , votre écoute dans les moments pénibles, de votre disponibilité pendant cette période de recherche et de vos connaissances que vous avez généreusement partagées avec nous. Nous retiendrons pour toujours de vos nombreux conseils. Veuillez trouver ici Madame l'expression de nos profondes grâtes.*

*On tient également à présenter nos remerciements à Mme **Benazouz F**, d'avoir accepté d'être co-promotrice et membre de ce jury, veuillez trouver ici le témoignage de notre gratitude et nos sincères remerciements.*

*On tient à remercier avec plus grande gratitude à Mme **Rouaki F**, professeur à l'université de Bida de l'honneur qu'elle nous fait d'avoir acceptée de présider le jury de ce mémoire.*

*On remercie également Mme **Kanane A**, d'avoir accepté de se joindre à ce jury comme examinateur. Veuillez croire en l'expression de notre vive reconnaissance et de notre respectueuse gratitude.*

Enfin, nous remercions tous les enseignants de la faculté SNV et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre1 : Rappel bibliographique	
I. Généralité.....	4
I.1 Les radicaux libres	4
II. Le stress oxydant.....	6
II.1 Définition	6
II.2 Les conséquences du stress oxydant.....	7
II.3 Les antioxydants	8
III. Rappel sur le globule rouge	9
III.1 Définition	9
III.2 Origine des GR (érythropoïèse).....	9
III.3 Erythropoïèse	9
III.4 Morphologie de GR	10
III.5 La membrane érythrocytaire	11
III.6 Composition chimique et organisation moléculaire	12
III.7 Propriété de la membrane érythrocytaire :.....	12
III.8 Métabolisme érythrocytaire	12
III.9 L'hémoglobine.....	13
III.10 Échange gazeux	14
IV. La drépanocytose	14
IV.1 Définition	14
IV.2 Epidémiologie.....	15
IV.3 Structure et génétique de l'hémoglobine S.....	16
IV.4 Les différentes formes de drépanocytose	16
IV.5 Physiopathologie	17
V. Le stress oxydatif au cours de la drépanocytose	19
V.1 Le lien entre la drépanocytose et le stress oxydatif	19
V.2 Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose	20
V.3 Mécanisme de cercle vicieux	21
V.4 Conséquences de la falciformation	22
V.5 Le système de défense antioxydant	26
VI. Traitement	28
VI.1 Traitement préventif	28

VI.2	Le traitement curatif.....	29
VI.3	La thérapie génique.....	30
VI.4	Les antioxydants.....	30
VI.5	Approche naturelle.....	30
VI.6	Voxelotor	31

Chapitre2 : Matériels et méthodes

I.	Matériel.....	37
I.1	Population et échantillon d'enquête.....	37
II.	Méthodes	38
II.1	Recueil des prélèvements.....	38
II.2	Recueil des informations	38
II.3	Traitement des échantillons	38
II.4	Paramètre d'hémolyse	40
II.5	Paramètre de stress oxydatif	41
II.6	Calcul de la turbidité cellulaire.....	42
II.7	Considérations éthiques	42
II.8	La saisie et l'analyse des données	42

Chapitre3 : Résultats

I.	Résultats.....	44
I.1	Description de la population.....	44
II.	Comparaison entre les cas et les témoins.....	47
III.	Comparaison selon la sévérité.....	50
IV.	Comparaison entre les patients sous traitement hydroxyurée et sans traitement.....	53
V.	Répartition selon le frotti sanguin	56

Chapitre4 : Discussion

Discussion.....	61
-----------------	----

Conclusion.....	67
------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES FIGURES

Liste des figures

Figure 1 : La formation des radicaux libres	4
Figure2 : Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés d l'oxygène.....	6
Figure3 : Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.....	7
Figure4 : L'origine et les conséquences biologiques du stress oxydant.....	7
Figure5 : Érythropoïèse.....	11
Figure6 : Aspect en microscopie optique.....	11
Figure7 : Aspect en microscopie électronique à balayage.....	12
Figure8 : Structure schématique de la membrane du globule rouge.....	12
Figure9 : Structure de l'hémoglobine (gauche) et de la molécule d'hème(droite).....	15
Figure10 : Drépanocyte ou sickle cell, hématie falciforme.....	16
Figure11 : Biochimie des protéines BCM514.....	17
Figure12 : Circulation des globules rouges dans les vaisseaux sanguins.....	18
Figure13 : Image prise au microscope électronique d'un falciforme de souris SAD séquestré sans la rate.....	22
Figure14 : Le cercle vicieux de la crise drépanocytaire.....	25
Figure15 : Mécanisme hypothétique des sous-phénotypes cliniques de la drépanocytose.....	29
Figure 16 : Schéma représentant les étapes de la réalisation du frotti sanguin.....	39
Figure17 : Répartition des sujets étudiés selon le sexe.....	44
Figure18 : Répartition de la population totale selon l'âge.....	45
Figure19 : Répartition de la population totale selon la forme génétique.....	45
Figure20 : Répartition de la population malade selon la sévérité.....	46
Figure21 : Frotti sanguin des sujets sains AA réalisé par microscope optique GX100 coloration MGG.....	55
Figure22 : Frotti sanguin des cas drépanocytaires homozygotes SS réalisé par microscope optique GX100, coloration MGG.....	56
Figure23 : Frotti sanguin des cas drépanocytaires hétérozygotes composites SC réalisé par microscope optique GX100, coloration MGG.....	56
Figure24 : Frotti sanguin des cas drépanocytaire hétérozygote S β réalisé par microscope optique GX100, coloration MGG.....	56

LISTE DES TABLEAUX

Liste des tableaux

Tableau 1. Différents types des antioxydants.....	8
Tableau 2. Les signes cliniques.....	19
Tableau 3. Diagnostique positif.....	20
Tableau4. Les conseils afin de prévenir une CVO.....	32
Tableau 5. Formule de numération sanguine.....	38
Tableau 6. Les analyses de biochimie.....	41
Tableau7. Répartition de la population.....	44
Tableau 8. Répartition des sujets étudiés selon le sexe.....	44
Tableau 9. Répartition de la population selon l'âge.....	45
Tableau10. Répartition de la population selon la forme génétique et le sexe.....	46
Tableau 11. Répartition selon les crises vaso-occlusives.....	47
Tableau 12. Répartition selon l'hémogramme.....	47
Tableau 13. Répartition selon les paramètres d'hémolyse.....	48
Tableau 14. Répartition selon les paramètres de stress oxydatif.....	49
Tableau 15. Répartition selon la turbidité cellulaire.....	50
Tableau 16. Répartition selon les paramètres d'hémogramme.....	50
Tableau 17. Répartition selon les paramètres d'hémolyse.....	51
Tableau 18. Répartition selon les paramètres de stress oxydatif.....	52
Tableau 19. Répartition selon la turbidité cellulaire.....	52
Tableau 20. Répartition selon l'hémogramme.....	53
Tableau 21. Répartition selon les paramètres d'hémolyse.....	54
Tableau 22. Répartition selon les paramètres de stress oxydatif.....	55
Tableau 23. Répartition selon la turbidité cellulaire.....	55

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

2,3-DPG : Le 2,3-diphosphoglycérate	GPx : Glutathione peroxydase
ALAT : Transaminases	GR : globules rouges.
ASAT : Aspartate aminotransférase	GRx : Glutathione réductase
BFUE : Brust forming unit erythoid	HB : Hémoglobine
BILD : Bilirubine directe	HB A : Hémoglobine A
BILT : Bilirubine totale	HB B : Hémoglobine B
CAC : Centre anti cancéreux	HB C : Hémoglobine C
CAT : Catalase	HB D : Hémoglobine D
CCMH : Concentration moyenne en hémoglobine	HBE : Hémoglobine E
CFU_GEMM : Colony forming unit granulocyte /erythrocytes _ megacaryocyte macrophage	HBF : Hémoglobine fœtale
CTS : Centre de transfusion sanguine	HBG : Hémoglobine glyqué
CVO : Crise vaso-occlusive	HBO : Hémoglobine O
DAMP : Damage-associated molecular patterns	HBS : Hémoglobine S.
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique	HDJ : Hôpital du jour
EPO : Érythropoïétine	HLA : Human leucocyte antigé
ERO : les espèces réactives de l'oxygène.	HMGB : Hight mobility group box 1
ET_1 : endothéline _A	HTAP : Hyper tonsion artérielle pulmonaire.
FNS : La numération de formule sanguine	HU : Hydroxyurée
GB : Globule blanc	IAP : Integrin asociated proteine
GBT : Laboratoire Global Blood Therapeutics	ICAM : Inter cellular adhesion molecule
GLU : Acide glutamique,	LDH : Lactate désydrégénase .
	LPS : Lypopolysaccharide
	LU / BCAM : Lutheron / basal cell adhesion molecule
	MDA : Malondialdéhyde
	MGG : May Grunwald Giemsa .

LISTE DES ABREVIATIONS

NADH : Hydrure de nicotinamide
adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine
dinucléotide phosphate.

NET: Neutrophil extracellular traps

NKT: Natural killer T

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin
domain containing 3

NO : Monoxyde d'azote.

NOS : Oxyde nitrique synthase.

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONOOH : Acide peroxy nitreux

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PIGF : Facteur de croissance placentaire

PNN : Polynucléaires neutrophiles

PO₂ : Pression partielle d'oxygène

REG : Réticulum endoplasmique
granuleux

ROS : Reactive oxygen species

SDM : Syndrome drépanocytaire majeur

SO: Stress oxydatif

SOD : Superoxyde dismutase .

TBA : Hydroxyde de
tétrabutylammonium

TCA : Acide trichloroacétique

TF : Facteur tissulaire

VAL : Acide aminé valine

VCAM : Vascular cell adhesion
molecule

Résumé

Le stress oxydant est une caractéristique importante de la pathologie drépanocytaire qui est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale S.

L'objectif de notre étude est d'étudier le statut oxydatif chez les sujets drépanocytaires en comparaison avec des témoins pour répondre à notre problématique et prouver si le stress oxydatif est-il un vrai marqueur biologique dans la drépanocytose. À travers une modeste exploration réalisée au niveau du service de CAC Blida, nous avons fait une enquête sur des patients ayant une drépanocytose SS, SC, S β -thalassémique+ et S β -thalassémique0. Parmi les 55 sujets ayant drépanocytose traités, nous avons trouvé 27 cas de forme SS, 3 cas SC et 22 cas de forme S β -thalassémique et 3 patients non identifiés. Ces derniers ont été comparés à 20 témoins. 57.33 % des patients étaient de sexe masculin et 42.67 % de sexe féminin avec une moyenne d'âge de 26 ans chez les cas et de 35 ans chez les témoins. Nous avons également effectué un hémogramme et un frottis sanguin pour chaque sujet ainsi le calcul des paramètres d'hémolyses complété par le dosage des paramètres de stress oxydatif et la turbidité cellulaire. Nous avons aussi comparé les cas selon leur sévérité et selon l'administration du traitement. Nos résultats indiquent la présence d'une anémie hémolytique sévère chez les cas avec une diminution hautement significatif d'hémoglobine et globule rouge ce qui induit à l'augmentation de stress oxydatif principalement l'élévation de taux de méthémoglobine érythrocytaire et plasmatique et le marqueur malondialdéhyde.

A travers ces études que nous avons effectué, et malgré la prise en charge de ces patients à l'âge précoce, le stress oxydatif est devenu un problème d'actualité dans la survie des patients malgré les avancés de recherche.

Mots clés : stress oxydant, drépanocytose, hémoglobine S, héréditaire, individu, méthémoglobine, anémie hémolytique.

ملخص

الإجهاد التأكسدي هو سمة مهمة لمرض فقر الدم المنجلي وهو مرض وراثي جسدي متنحي يتميز بوجود الهيموغلوبين غير الطبيعي S.

الهدف من دراستنا هو دراسة الحالة التاكسدية للأشخاص ذو الخلايا المنجلية مقارنة بأشخاص اصحاء للإجابة على مشكلتنا وإثبات ما إذا كان الإجهاد التأكسدي علامة بيولوجية حقيقية في مرض فقر الدم المنجلي من خلال دراسة تم إجراؤها على مستوى خدمة المخبر المركزي CAC Blida

اجرينا دراسة من ارشيف المرضى اللذين يعانون من مرض فقر الدم المنجلي SS, SC, و S β ثلاثيميا + و S β ثلاثيميا. من بين 55 ملف ل ذو اعتلال الهيموغلوبين , لدينا 27 حالة من شكل SS, و 3 حالات SC و 22 حالة من شكل S β ثلاثيميا و 3 مرضى مجهولين. تمت اضافة 20 شخص سليم . 57.33 % كانوا من الذكور و 42.67 % من الاناث بمتوسط عمر 26 سنة في الحالات و 35 سنة في الاشخاص السليمين. أجرينا فحص الدم الشامل ومسحة دم لكل شخص ، وحسبنا معلمات انحلال الدم المكملة بفحص معايير الإجهاد التأكسدي و العكارة الخلوية . قارنا أيضًا الحالات بحسب الشدة وبحسب الخضوع للعلاج. تشير نتائجنا إلى وجود فقر الدم الانحلالي الشديد في الحالات التي يكون فيها انخفاض كبير للغاية في الهيموغلوبين وخلايا الدم الحمراء مما يؤدي إلى زيادة الإجهاد التأكسدي بشكل أساسي الميثيموغلوبين البلازمية و كريات الدم الحمراء والمؤشر malondialdéhyde.

من خلال هذه الدراسات التي أجريناها، وعلى الرغم من إدارة هؤلاء المرضى في سن مبكرة، أصبح الإجهاد التأكسدي مشكلة موضوعية في بقاء المرضى على الرغم من التقدم في البحث.

الكلمات المفتاحية: الإجهاد التأكسدي, فقر الدم المنجلي, هيموغلوبين S, وراثي, فردي, ميثيموغلوبين, فقر الدم الانحلالي.

INTRODUCTION

Introduction

Le stress oxydatif, qui est défini comme un déséquilibre dans les pro-oxydants et les antioxydants avec perturbation associée des circuits redox et des dommages macromoléculaires (hémoglobine). (**Baudin, 2006**)

La drépanocytose est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive codominance, elle est non liée au sexe et qui touche autant les hommes que les femmes (**Glawdis, 2012**) caractérisée par la présence d'une hémoglobine anormale HbS dans le globule rouge. C'est la maladie génétique la plus fréquente au monde affectant plus de 300 000 nouveau-nés chaque année (**OMS, 2014**). Sachant que le stress oxydant est une caractéristique importante de la pathologie drépanocytaire et joue un grand rôle dans les phénomènes d'hémolyse, de vaso-occlusion et les atteintes des différents organes. (**Nur et al., 2010 ; Nur et al., 2011**).

Cette hémoglobinopathie causée par une mutation ponctuelle du gène β -globine situé sur le chromosome 11 induisant la transversion Adénine→Thymine au niveau du 17^e nucléotide de l'ADNc affectant le 6^{ième} codon de la chaîne β -globine. Elle entraîne donc le remplacement de l'acide glutamique en position 6 par une valine ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$). (**Galacteros et al., 1996**).

Il s'agit des hémoglobines (Hb) S, C, B thalassémie, E, D-Punjab, O-Arab qui doivent être reconnues par les laboratoires. Cette pathologie est très fréquente dans le monde mais surtout dans les populations d'origine Africaine subsaharienne, Amérique, des Antilles, d'Inde, du Moyen-Orient et du bassin méditerranéen (**Sala et al., 2016**). En Algérie certaines régions de pays (l'Est et le Centre) sont plus touchées par cette maladie que d'autre (**Bradai, 2013**).

A partir du défaut premier de la drépanocytose, la polymérisation de l'hémoglobine S (HbS), se développe toute une série de processus anormaux qui contribuent au développement d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydant dus à une hypoxie-reperfusion traumatisante et à l'auto-oxydation de l'HbS.

L'objectif de notre travail consiste à étudier le statut oxydatif chez les patients drépanocytaires homozygote, hétérozygote composite en comparaison avec des sujets sains pour répondre à notre problématique et prouver si le stress oxydatif est-il un biomarqueur

de la drépanocytose, à travers la réalisation de certains tests biologiques visant à étudier les variations d'hémogramme , bilan d'hémolyse et les paramètres de stress oxydatif chez les malades atteints de drépanocytose suivi au niveau de service d'hématologie CAC Blida, pendant une période de 4 mois. Dans la première partie de ce travail, nous présentons un bref rappel sur le stress oxydant et le globule rouge, ainsi que la drépanocytose et son diagnostic et traitement. La seconde partie rapporte les techniques utilisées et les résultats obtenus avec leurs discussions.

Donnés bibliographiques

Chapitre1 : Rappel bibliographique

I. Généralité

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public.

Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, **Gerschman** puis **Hartman** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement.

En 1969, les Américains **Mccord** et **Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la superoxydedismutase (SOD), démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

I.1 Les radicaux libres

I.1.1 Définition

Un radical libre est une espèce chimique « libre », contenant un ou plusieurs électrons non appariés (célibataires) dans son orbitale atomique sur la couche électronique la plus externe. Les électrons sont des corpuscules chargés électriquement et qui par un mouvement de rotation sur eux-mêmes, induisent un champ magnétique appelé « SPIN », cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique (figure1) (**Pillou, 2014**).

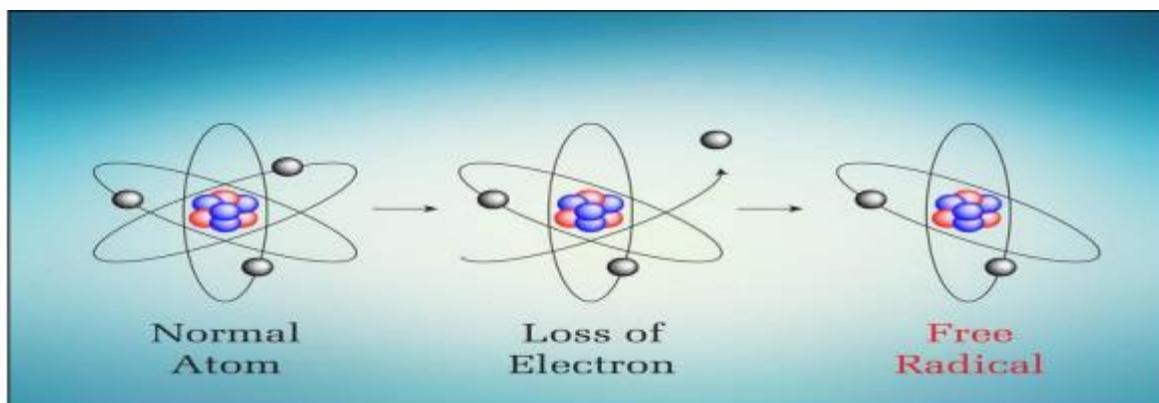
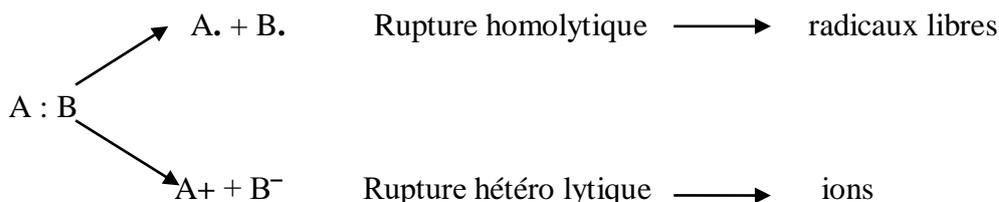


Figure 1 : La formation des radicaux libres. (**Pillou, 2014**)

Chapitre 1 : Rappel bibliographique

Du fait de leurs instabilités énergétiques, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule ce qui induit l'apparition des réactions d'oxydation en chaîne (**Asmus and Bonifacic, 2000**).

Ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente selon le schéma suivant :



Après une rupture homolytique (les deux électrons de la liaison A-B sont répartis équitablement), chacun des deux électrons intervenant dans la liaison entre les atomes A et B gagne l'orbitale externe de ces atomes, qui deviennent alors des radicaux libres (**Bonnefont et al ., 2003**).

I.1.2 L'origine des radicaux libre

Les radicaux libres peuvent avoir des origines externes ou internes à l'organisme :

I.1.2.1 Radicaux libres externes (source exogène)

Il provient de : pollution, tabac, ozone, métaux lourds, polluants alimentaires (engrais, additifs), graisses saturées des aliments, excès de sucres, alcool, drogues, exposition prolongée au soleil et des ultras violet (**Favier, 2003**).

I.1.2.2 Radicaux libre internes (source interne)

Les radicaux libres sont formés le plus souvent à partir de l'oxygène d'où leur appellation : espèces réactives oxygénées (ERO). L'origine endogène des ERO est principalement les chaines respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies (environ 2 % de l'oxygène consommé au niveau mitochondrial sont transformés en ERO particulièrement réactionnelle), le dysfonctionnement du système enzymatique ou par manque d'antioxydants dans l'organisme et la réaction inflammatoire qui est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées, qui sont le siège d'un phénomène appelé « Explosion oxydative » consistant à l'activation du complexe NADPH oxydase (**Puppo and Halliwell , 1988**).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

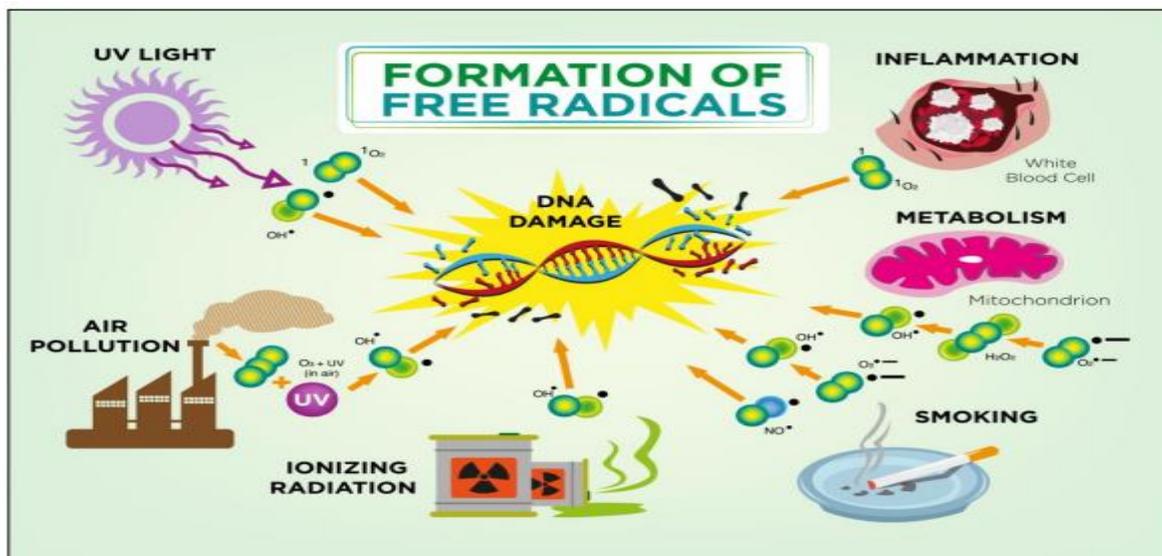


Figure2: Origine extra- et intracellulaire des radicaux libres dérivés d’oxygène (Afonsoet al., 2007).

II. Le stress oxydant

II.1 Définition

Les ERO (Espèces réactives oxygénées) sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l’équilibre entre leur taux de production et leur taux d’élimination par les systèmes antioxydants (Halliwell and Gutteridge, 1989).

Ainsi, à l’état quiescent, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre (figure1).

Cependant cette homéostasie rédox peut être rompue, soit par une production excessive d’ERO (comme dans le vieillissement ou l’athérosclérose), soit par une diminution des capacités antioxydantes (chez les personnes souffrant d’obésité et les fumeurs).

On parle alors de stress oxydant (Migdal and Serres, 2011). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (Bensakhri, 2018), il peut contribuer à l’apparition de diverses pathologies liées au vieillissement (figure 3) comme les cancers ou les maladies cardiovasculaires et le diabète (Haleng et al., 2007).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

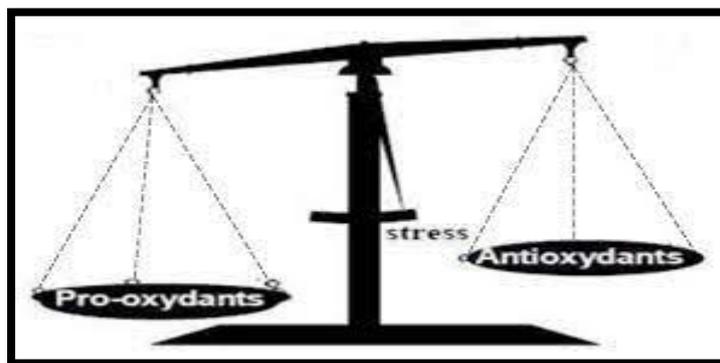


Figure3 : Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Favier, 2006).

II.2 Les conséquences du stress oxydant

Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion, des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront l'oxydation des protéines, l'ADN et les membranes des cellules, une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates.

De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant: mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés, immunosuppression, c'est une des théories actuelles du vieillissement (sénescence) (Favier, 2003).

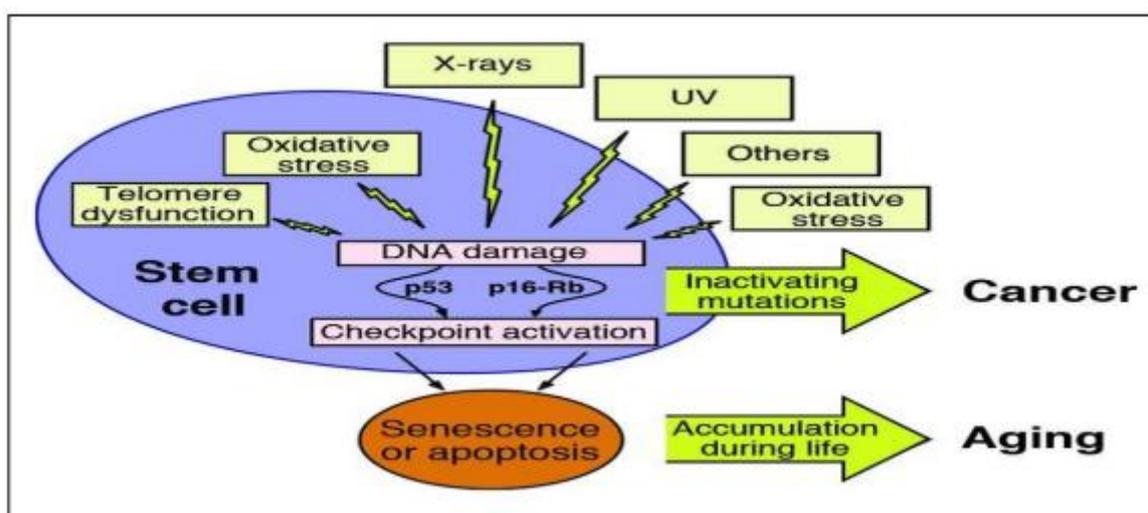


Figure4 : L'origine et les conséquences biologiques du stress oxydant (Jclin, 2004).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

II.3 Les antioxydants

II.3.1 Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est défini comme toute substance ou molécules capables de réduire les effets de l'oxygène, significativement retarde ou empêche l'oxydation (**Defraigne and Pincemail, 2008**).

Les antioxydants sont capables de piéger les radicaux libres en captant l'électron célibataire, en les transformant en molécules ou en ions stables (**Favier, 2003**).

II.3.2 Principaux antioxydants

On distingue deux sources d'antioxydants: l'une est exogène apportée par l'alimentation essentiellement les fruits et les légumes (antioxydants non enzymatiques), et l'autre est endogène représentée par des enzymes fabriqués par l'organisme (antioxydants enzymatiques) (**Haleng et al., 2007**).

Tableau 1. Différents types des antioxydants (**Haleng et al.,2007**).

Les antioxydants endogènes (enzymatiques)	Les antioxydants exogènes (non enzymatiques)
La catalase (CAT)	Vitamine C
Superoxyde dismutase (SOD)	Vitamine E
La glutathione peroxydase (GPx)	Caroténoïdes
La glutathione réductase (GRx)	Composés phénoliques

Chapitre1 : Rappel bibliographique

III. Rappel sur le globule rouge

III.1 Définition

L'hématie ou érythrocyte (du grec érythro : rouge et kutos : cellule), appelé globule rouge, est un élément figuré du sang dont le cytoplasme.

Elle est ainsi appelée à cause de la couleur rouge-rosée qu'elle prend à la coloration de May Grunwald Giemsa (MGG), au microscope optique. Cette coloration est due à son contenu en hémoglobine. L'hémoglobine transporte l'oxygène, capté lors de la respiration alvéolaire, vers les tissus de l'organisme (**Martinez, 2007**).

III.2 Origine des GR (érythropoïèse)

Les érythrocytes sont synthétisés au niveau de la moelle osseuse. Leur formation nécessite un processus complexe, que l'on nomme érythropoïèse. In utero, l'érythropoïèse a lieu tout au début, au niveau du sac vitellin, puis au niveau du foie. Au moment de la naissance, elle se situe déjà au niveau médullaire.

Ce mécanisme nécessite absolument une quantité suffisante de fer qui est indispensable à la synthèse de l'hémoglobine dont il est élément fonctionnellement actif :

- Erythropoïétine.
- Vitamines :
 - La vitamine B12 et acide folique (augmente la production)
 - Vitamines B2, B6, E, PP.
- Autres : métaux, cuivre, cobalt, zinc. (**Binet, 2009 ; Nicard, 2017**).

III.3 Erythropoïèse

III.3.1 Définition

C'est un phénomène adaptatif qui peut, en cas de besoin accru, être multiplié par 7 ou 8. La durée moyenne de ce processus est de 7 jours, mais elle peut être raccourcie par stimulation de l'érythropoïétine.

Chapitre1 : Rappel bibliographique

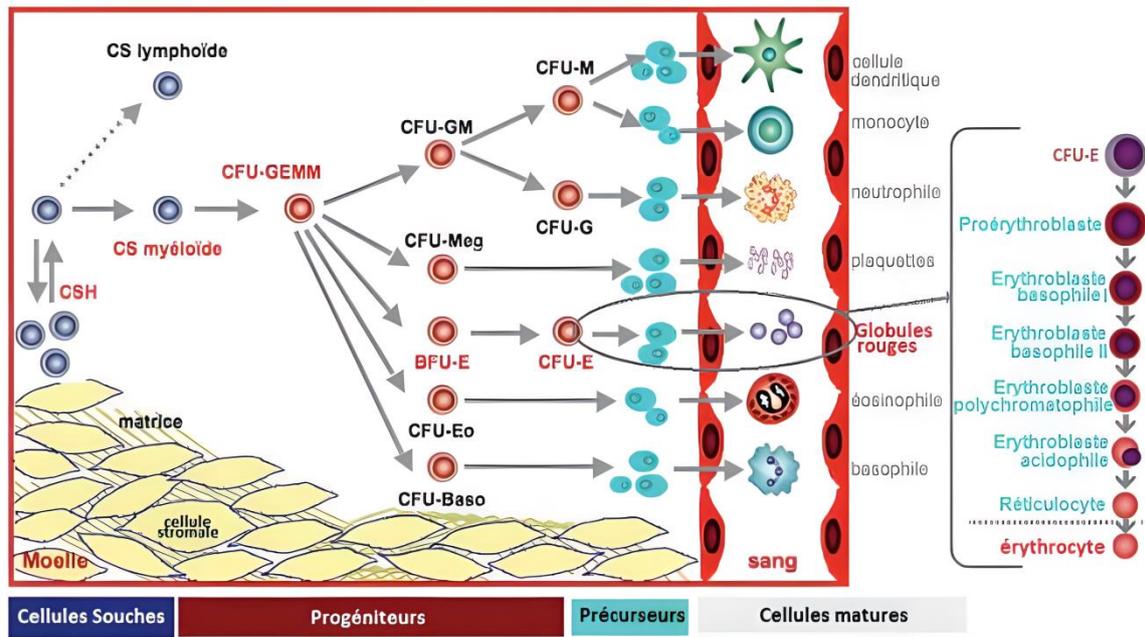


Figure5 : Érythropoïèse (Binet, 2009)

III.4 Morphologie de GR

III.4.1.1 Morphologie au microscope optique

Il s'agit d'une cellule de 5 à 7 μ de diamètre d'aspect homogène, coloré en orangé au MGG. Son épaisseur est de 1,8 μ m, son volume moyen est de 90 femtolitres (μ m³).

Le nombre de globules rouges est d'environ 5 tera/l (millions/mm³), taux un peu plus élevé chez l'homme que chez la femme (5,7 et 4,5 tera/l).

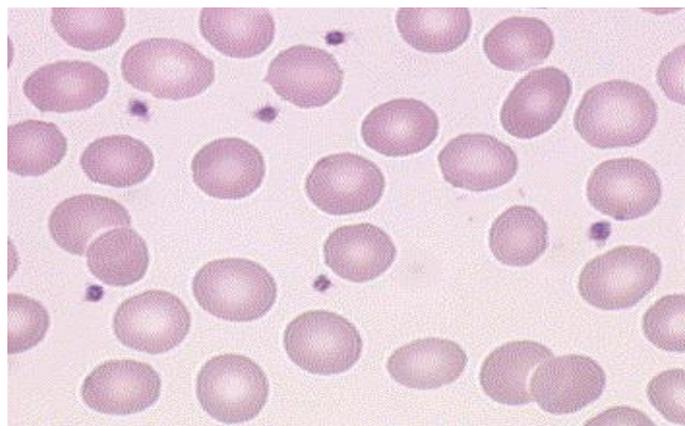


Figure6 : Aspect en microscopie optique (Kohler, 2011)

III.4.1.2 Aspect en microscopie électronique à balayage

Ce sont des cellules biconcaves, aplaties au centre ayant un aspect de disque. Elles ne possèdent ni mitochondrie, ni ribosome, ni REG. La membrane plasmique de l'hématie est

Chapitre1 : Rappel bibliographique

le siège des antigènes qui déterminent les groupes sanguins (Système ABO, système rhésus et autres systèmes érythrocytaires) qui sont des récepteurs portés par les molécules de glycophorine. Ces cellules ont une durée de vie de 120 jours. Leur production est de 200×10^9 nouvelles cellules par jour. (Kohler, 2011)

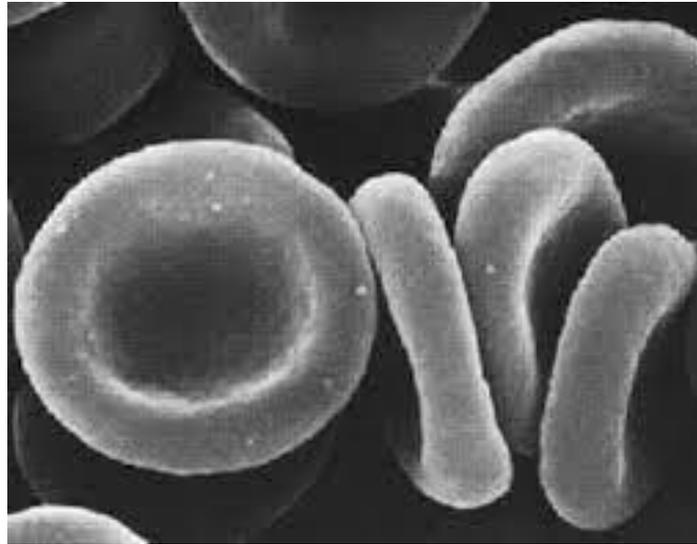


Figure7 : Aspect en microscopie électronique à balayage (Kohler, 2011)

III.5 La membrane érythrocytaire

- La membrane érythrocytaire, à l'image des autres cellules, est constituée d'une bicouche phospholipidique, des protéines périphériques ou transmembranaire et des glucides, qui sont toujours soit associés au lipide ou protéine.
- Elle permet le maintien de l'intégrité du milieu intérieur, par sa composition en protéines transmembranaires ayant soit une activité enzymatique ou impliquées dans des échanges ioniques.

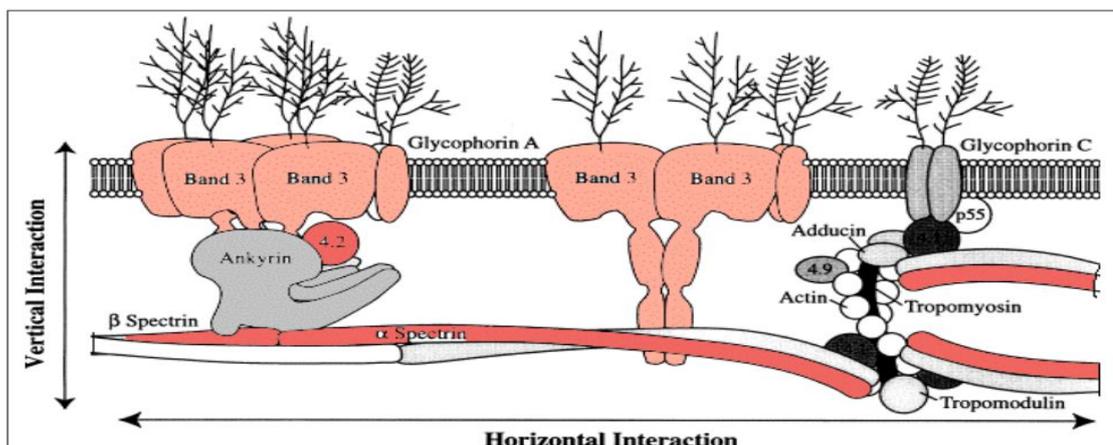


Figure8 : Structure schématique de la membrane du globule rouge (Hélène et al., 2006).

Chapitre 1 : Rappel bibliographique

III.6 Composition chimique et organisation moléculaire

- Les **lipides** représentent 44% du poids sec membranaire, les protéines représentent environ 50% du poids sec membranaire

- Du côté interne

a) Le **cytosquelette** qui confère au globule rouge la forme discoïde et assure sa grande déformabilité.

b) Les **protéines ancrage**: fixation du cytosquelette à la membrane (ankryne).

Du côté externe se situent les **récepteurs** et les **motifs antigéniques** du globule rouge. tel que les Ag Rh, duffy..

c) Les **glucides membranaire**: 93% liés au protéines et 07% lié au lipides . (**Hélène et al., 2006**)

III.7 Propriété de la membrane érythrocytaire :

a) **Déformabilité** : cette propriété essentielle du GR leur permet de passer dans les capillaires des sinus des organes hématopoïétiques. Elle dépend de plusieurs facteurs étroitement liés:

– **La forme du GR**: la forme biconcave correspond à un rapport surface/volume favorable à la déformabilité de la cellule (excès de surface par rapport au volume).

– **La plasticité** de la membrane en relation avec les constituants membranaires.

– **La viscosité des GR**, liée essentiellement à la concentration et aux qualités de l'Hb.

b) **Asymétrie** : la conservation de la répartition des PL entre les deux feuillettes est un phénomène très important.

c) **Force de répulsion entres les GR** : due à la présence d'Ac sialique (charge négative) qui permet de conserver les GR éloignés les uns des autres. (**Hélène et al., 2006**)

III.8 Métabolisme érythrocytaire

III.8.1 Voie de Embden-Meyerhoff (glycolyse anaérobie)

C'est la voie principale qui permet dans une première phase dite de consommation d'ATP, la dégradation du glucose (C6) en deux trioses phosphates (C3). Une seconde phase de réactions productrices d'ATP aboutit à la formation d'acide pyruvique éliminé sous forme d'acide lactique. (**Hélène et al.,2006**)

Chapitre1 : Rappel bibliographique

III.8.2 Voie des pentoses phosphates

Cette voie accessoire ne dégrade que 10 % du glucose qui est transformé en un triose phosphate par une série de réactions qui font intervenir des sucres en C5 (pentoses). (Hélène et al.,2006) .

III.9 L'hémoglobine

III.9.1 Définition

L'hémoglobine appartient à la famille des pigments respiratoires qui sont des macromolécules protéiques fixant réversiblement l'oxygène et qui se sont développées aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Outre son rôle principal dans le transport de l'oxygène des poumons aux tissus, l'hémoglobine est impliquée dans l'élimination du gaz carbonique et le maintien du pH intra-érythrocytaire (Couprie, 2000)

III.9.2 Structure d'hémoglobine

L'hémoglobine est un tétramère de poids moléculaire 64 500 Da. L'hémoglobine est constituée de l'union d'une portion protéique, la globine et d'un pigment porphyrique contenant du fer, l'hème. La molécule d'hème est plane composée de quatre noyaux pyrrol à sommet azoté réunis par des ponts méthène (-CH-) ; huit chaînes latérales (4 méthyles, 2 vinyles, 2 acides propioniques), un atome de fer central fixé aux quatre atomes d'azote des noyaux pyrrol avec deux valences libres. La globine comporte quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes α avec 141 acides aminés et deux chaînes non α (β , δ , γ) avec 146 acides aminés. Chacune est reliée à un groupement hémique par un atome de fer. La molécule complète d'hémoglobine comporte donc 4 chaînes globiniques, 4 groupements hèmes avec 4 noyaux de fer et peut fixer 4 molécules d'oxygène. (Borel et al., 1997 ; Couprie,2000

Chapitre1 : Rappel bibliographique

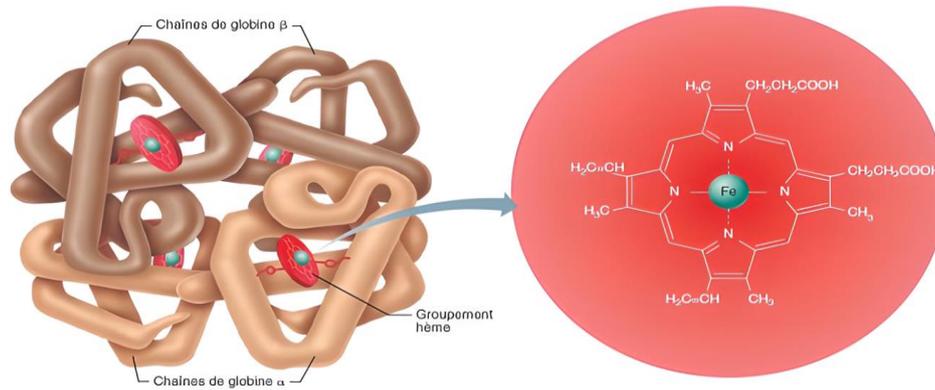


Figure9 : Structure de l'hémoglobine (gauche) et de la molécule d'hème(droite). (**Hélène et al., 2006**)

III.10 Échange gazeux

- Le principal rôle biologique des GR est le transport de l'oxygène (O₂) des poumons vers la périphérie qui est assuré par l'hémoglobine. L'O₂ est relativement insoluble dans le sang, avec seulement 0,3 % présent sous forme d'O₂ dissous, même à des pressions partielles élevées (P_{O2}). En revanche, un gramme d'hémoglobine peut fournir 1,34 ml d'O₂. Cela se traduit par 20 ml d'O₂/dl de sang ou plus de 1000 ml d'O₂/min chez un adulte moyen.

- Les caractéristiques cellulaires uniques des GR facilitent également l'échange et le transport de l'O₂ par sa forme biconcave typique, qui maximise la surface totale de la membrane disponible pour l'échange gazeux, et l'absence de noyau et de d'autres organites cellulaires, ce qui maximise le volume intracellulaire disponible pour l'hémoglobine (**An et al ,2008**) .

IV. La drépanocytose

IV.1 Définition

Le mot « drépanocytose » vient du grec « δρεπανον drepanon » qui signifie faucille et de « κυτος » qui signifie cellule, désignant la déformation que prennent les GR dans certaines circonstances (**Petit E,2013**), plusieurs dénominations y contribuent : HbS (hémoglobinose S), ou sicklémie, ou encore anémie à cellules falciformes et parfois anémie falciforme (**REZO, 2015**).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

La drépanocytose est une hémoglobinopathie constitutionnelle, avec une anémie hémolytique, due à la présence d'une Hb anormale : HbS. Elle est responsable des trois grandes catégories de manifestations : anémie hémolytique chronique, phénomènes vaso-occlusifs et susceptibilité extrême aux infections (**Tiendrebeog ,2013**).

La drépanocytose est une maladie complexe, son évolution est encore peu prévisible malgré la meilleure connaissance des risques et une prise en charge organisée qui fait appel à de multiples compétences cliniques et biologiques dans des centres hospitalisés (**Dembelle, 2008**).

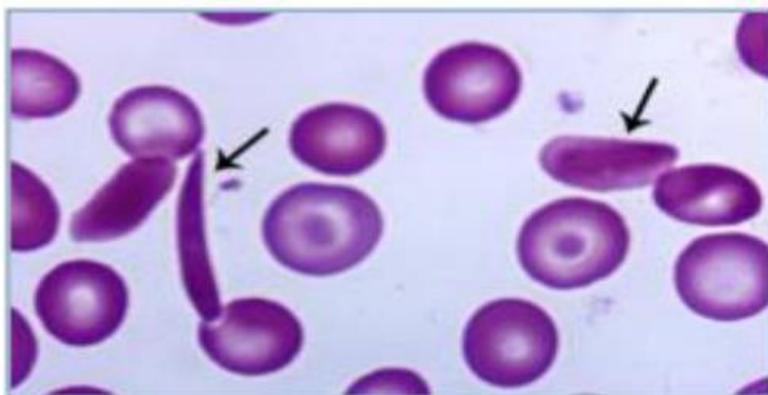


Figure10 : Drépanocyte ou sickle cell, hématie falciforme (**Hoffman et al ., 2012**)

IV.2 Epidémiologie

Hémoglobinoses S est particulièrement fréquente en Afrique, notamment en Afrique noire, et en Amérique (Etats Unis, Antilles, Brésil). Elle est également observée dans les pays du bassin méditerranéen (Les pays de Maghreb, Sicile, Grèce), dans tout le Moyen-Orient jusqu'en Arabie Saoudite et en Inde. En fin, l'incidence de la drépanocytose augmente en Europe de l'Ouest en raison des mouvements des populations issus des régions où la drépanocytose est fréquente (**Garabedian et al ., 2011**).

Hémoglobinoses C est répandue en Afrique occidentale, Hémoglobinoses E est fréquente en Asie du Sud-Est, et pour l'hémoglobinoses D la plus fréquente est l'hémoglobine Punjab, elle se localise dans Inde du Nord-Ouest (**Zittoun et al., 1992**).

En Algérie, la drépanocytose est fréquente notamment à l'Est du pays (Annaba, Skikda et El Tarf) ainsi que Cherchell au centre, où dénombre le plus grand nombre des malades. Comme pour toutes les maladies génétiques à transmission récessive, en raison de la fréquence des mariages consanguins, encore élevé dans notre pays (**Bradai., 2013**).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

IV.3 Structure et génétique de l'hémoglobine S

La mutation ponctuelle du gène drépanocytaire se situe sur le bras court du chromosome 11 (11p 11-5) par remplacement du triplet codon GAG par un triplet GTG.

Ceci va entraîner un remplacement du sixième acide aminé de la chaîne β qui est l'acide 6 glutamique par une valine donnant l'hémoglobine S (HbS, S pour Sicklecelldisease). L'hémoglobine S est alors constituée de 2 chaînes de globine bêta S et de 2 chaînes de globine alpha (**Bordel et al., 1997**)

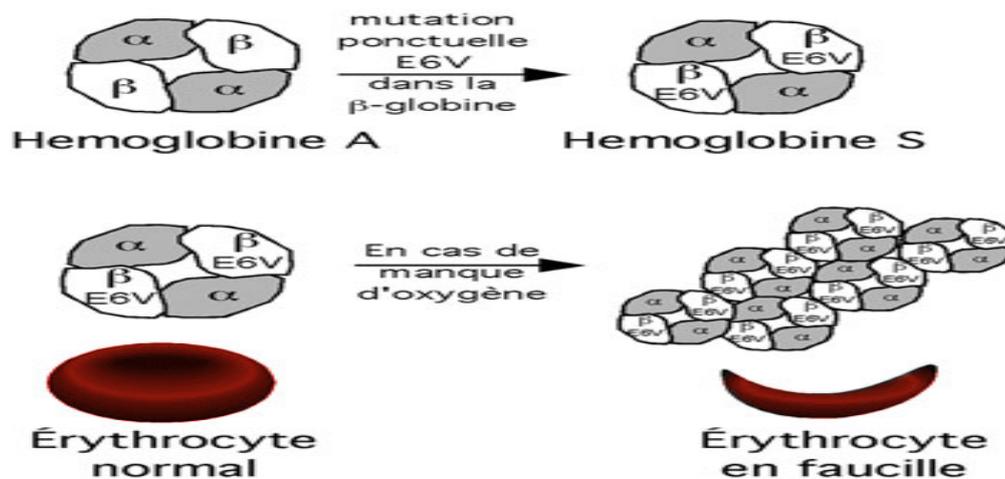


Figure11 : Biochimie des protéines BCM514 (Glawdis, 2012)

IV.3.1 Transmission

La drépanocytose est une maladie génétique qui touche autant les hommes que les femmes avec un sex-ratio de 1. De point de vu des cliniciens, elle se transmet selon le mode autosomique récessif car seuls les homozygotes sont considérés comme symptomatiques, or les hétérozygotes AS sont des porteurs sains asymptomatiques. Par contre, pour les biochimistes, il s'agit d'une affection à transmission codominante, car l'HbS est également observée chez les hétérozygotes. (**Gladwis, 2012**).

IV.4 Les différentes formes de drépanocytose

L'état homozygote est la forme la plus fréquente de cette affection mais d'autres allèles des gènes β de l'Hb peuvent s'associer à l'HbS et induire un syndrome drépanocytaire majeurs. Les SDM comportent les formes suivantes :

- La drépanocytose homozygote S/S (forme la plus fréquence et la plus sévère).
- Les drépanocytoses hétérozygotes composites S/C, S/ β^0 thalassémie et S/ β^+ thalassémie.

Chapitre1 : Rappel bibliographique

- Plus rarement les drépanocytoses hétérozygotes composites SD Punjab, SOArab, SAntillesC, ou les hétérozygoties symptomatiques SAntilles, etc.

En revanche, les sujets hétérozygotes dits AS sont asymptomatiques et ne présentent pas les complications de la maladie. Ils ne relèvent pas de l'ALD 10 et ne doivent pas être désignés comme drépanocytaires. Quelques très rare cas demandent une expertise biologique et clinique en centre de référence ou de compétence.

A l'état homozygote cette anomalie entraîne en cas d'hypoxie une polymérisation de la désoxyhémoglobine S provoquant une déformation des hématies en faucilles (**figure12**).

L'anomalie de la structure de l'hémoglobine est la présence de l'hémoglobine S (**Chiabi et al., 2004**).

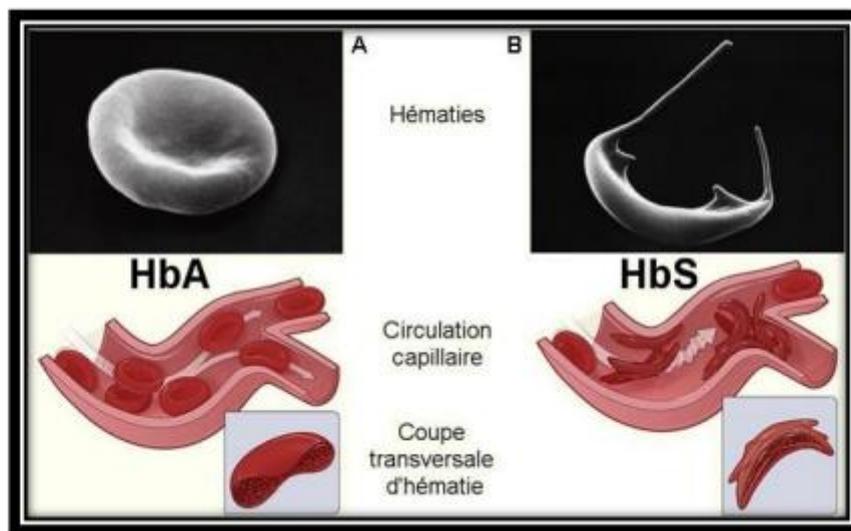


Figure12 : Circulation des globules rouges dans les vaisseaux sanguins (**Nayalex, 2014**).

IV.5 Physiopathologie

IV.5.1 La déshydratation érythrocytaire

La polymérisation de HbS est de réduire sa concentration intracellulaire, souvent anormalement élevée en raison de la déshydratation anormale des érythrocytes drépanocytaires, cette déshydratation est due à des altérations membranaires de la perméabilité des cations monovalents (Na^+ , K^+) ou divalents (Ca^{++} , Mg^{++}), en particulier du potassium et d'eau dont la fuite est provoquée par le canal Gardos. (**Girot et al., 2003**).

Ce canal permet de faire sortir du potassium de la cellule lorsque la concentration intracellulaire en calcium augmente. Le canal muté (mutation de gène codant pour une protéine membranaire importante dans la physiologie du globule rouge) nécessite dix fois

Chapitre1 : Rappel bibliographique

moins de calcium pour s'activer et permet la sortie de potassium en quantité plus importante que le canal sauvage. Ce dysfonctionnement entraîne une déshydratation des globules rouges (**Lacoste et al., 2015**).

IV.5.2 La polymérisation

Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, la molécule d'HbS subit un changement de conformation. Le remplacement de l'acide glutamique hydrophile par une valine hydrophobe fait que cette dernière établit des liaisons hydrophobes avec d'autres résidus hydrophobes sur la chaîne d'une autre molécule de désoxy-HbS.

Les polymères d'HbS se forment et s'allongent en longues fibres qui augmentent la rigidité érythrocytaire et altèrent la membrane cellulaire et déforment les globules rouges en forme de faucille.

La polymérisation de la désoxy-HbS est dans un premier temps réversible en cas de réoxygénation, avec dépolymérisation et restauration de la forme biconcave et souple du globule rouge normal.

Dans un second temps, une dérégulation de l'homéostasie des cations avec une fuite d'eau et de cations se produit, rigidifiant le globule rouge dont la membrane a perdu sa souplesse. Le taux de polymérisation est proportionnel à la concentration intra érythrocytaire d'HbS et inversement proportionnel à la concentration d'hémoglobine fœtale (HbF) qui remplace l'HbS et diminue la polymérisation de l'HbS.

Le drépanocyte devient adhérent à l'endothélium. La formation de ces drépanocytes hyperdenses irréversibles est à l'origine de l'hémolyse intra- et extravasculaire et de l'obstruction vasculaire. (**Sundd et al, 2019**)

IV.5.3 La falciformation

La falciformation des GR est le mécanisme qui conduit à la modification morphologique des GR sous la contrainte des filaments de polymère d'HbS comme on peut le voir sur la photographie prise par Trudel et al. au microscope électronique (**Trudel et al., 1994**) (**figure 13**).

On y distingue clairement la présence de molécules organisées en filaments droits et parallèles (l'HbS polymérisée) qui modifient la forme du GR.

La falciformation est un processus actif et réversible influencé par l'état de poly/dépolymérisation qui évolue selon l'environnement physiologique.

Chapitre1 : Rappel bibliographique

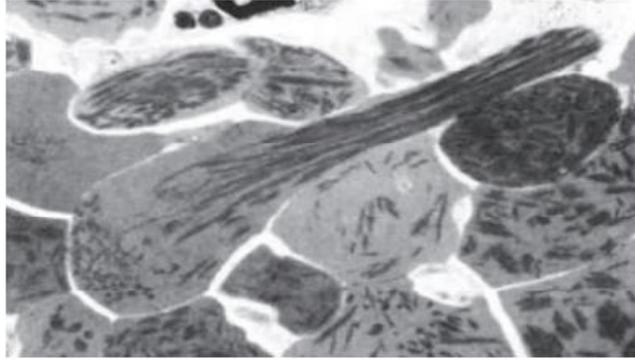


Figure13 : Image prise au microscope électronique(X6000) d'un falciforme de souris SAD séquestré sans la rate. (Trudel et al., 2007).

IV.5.4 Les facteurs favorisant la falciformation

- **Situation d'hypoxie** : séjour en altitude, anesthésie générale (la chirurgie), infection (pneumopathie), insuffisance cardiaque.
- **Situation d'hyperviscosité** : déshydratation, fièvre, acidose, changement brusque de température.(Trudel et al.,2007)

V. Le stress oxydatif au cours de la drépanocytose

V.1 Le lien entre la drépanocytose et le stress oxydatif

Le stress oxydant est une caractéristique importante de la pathologie drépanocytaire et joue un grand rôle dans les phénomènes d'hémolyse, de vaso-occlusion et les atteintes des différents organes (Nur et al., 2010 ;Nur et al., 2011).

Dans des conditions physiologiques, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites en permanence par l'organisme sont contrecarrées par un système de défense antioxydant efficace qui permet de réguler leur production excessive (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Cependant chez les patients drépanocytaires, un affaiblissement de leur système de défense dû à une production diminuée et/ou une consommation excessive d'antioxydants vient rompre cet équilibre.

Chapitre 1 : Rappel bibliographique

V.2 Les sources du stress oxydant dans la drépanocytose

V.2.1 L'auto-oxydation de l'hémoglobine

En présence d'oxygène, l'hémoglobine est capable de s'auto-oxyder, induisant ainsi la formation de méthémoglobine $HbFe^{3+}$ par l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} . Cette auto-oxydation de l'hémoglobine génère des radicaux libres parmi lesquels les anions superoxydes O_2^- .

Bien que ce phénomène soit retrouvé à la fois pour l'Hb A et l'Hb S, des études ont montré que cette dernière avait la capacité de s'auto-oxyder 1,7 fois plus vite que l'Hb A (Hebbel et al., 1988).

En effet, l'Hb A est capable de contrecarrer ces réactions, à l'inverse de l'Hb S qui se retrouve rapidement submergée par la production continue de O_2^- , puis par sa dismutation en H_2O_2 , ce dernier pouvant produire alors de l' OH^- .

Par ailleurs la metHb, en absence de réduction du fer par la méthémoglobine réductase, va se dénaturer en hémichromes. Ces hémichromes, retrouvés à des taux très élevés dans la membrane érythrocytaire des GR drépanocytaires (Asakura et al., 1977), vont favoriser l'oxydation des constituants membranaires des globules rouges.

V.2.2 Les espèces réactives de l'oxygène

L'oxygène présent dans l'organisme, qui a pour rôle majeur celui d'être l'accepteur final des électrons libérés au cours des divers processus cataboliques, est normalement réduit en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale pour apporter aux cellules l'énergie dont elles ont besoin pour assurer leurs fonctions.

Cette réaction de réduction directe est rendue possible grâce à un système complexe de protéines et d'enzymes localisées dans la membrane interne de la mitochondrie.

Cependant, 2 à 5 % de l'oxygène sont transformés en espèces réactives de l'oxygène (Cadenas & Davies, 2000). Parmi ces ROS, figurent l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle $\bullet OH$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou encore le nitroperoxyde (ONOOH).

Les ROS sont également capables de générer d'autres ROS. C'est le cas de l'anion superoxyde O_2^- qui peut se dismuter en hydroxygène peroxyde H_2O_2 et en oxygène O_2 . H_2O_2 peut également former le radical hydroxyl OH^- , qui est le plus nocif, via une cascade de réactions appelées réactions de Fenton et Haber-Weiss (Kohen & Nyska, 2002).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

V.2.3 Xanthine oxydase

La restauration du flux sanguin après un épisode prolongé d'hypoxie contribue largement à la production de radicaux libres et aux dommages tissulaires. Les crises vaso-occlusives douloureuses et les épisodes vaso-occlusifs silencieux cliniquement, qui impliquent de façon transitoire le blocage des micro-vaisseaux par les GR rigides, contribuent à ces processus d'ischémie-reperfusion.

Des lésions liées à ces processus ont été mis en évidence chez les souris drépanocytaires soumises à des épisodes d'hypoxie/réoxygénation. Le bas niveau d'oxygène dû à l'interruption de la circulation sanguine provoque la production d'hypoxanthine et de xanthine oxydase à partir de l'adénosine triphosphate et de la xanthine déshydrogénase respectivement. (**Osarogiagbon et al., 2000**).

Lors de la phase de réoxygénation, la xanthine oxydase va produire l'ion superoxyde en catalysant la conversion de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique, parce que les cellules endothéliales de certains tissus exhibent une faible activité de xanthine oxydase (c'est le cas du cerveau) et d'autres une forte activité de l'enzyme (par exemple les intestins), l'importance de cette enzyme comme source de production de ROS reste probablement tissu-dépendante (**Wood and Granger, 2007**).

V.2.4 NADPH oxydase

Les leucocytes et les cellules endothéliales représentent une importante source de ROS dans la drépanocytose via un mécanisme impliquant la NADPH oxydase (**Wood and Granger, 2007**). En effet, cette enzyme membranaire des cellules phagocytaires catalyse la réduction de l'oxygène en anion superoxyde O_2^- .

V.3 Mécanisme de cercle vicieux

Le cercle vicieux de la drépanocytose débute avec la désoxygénation de l'hémoglobine qui, suite à l'intervention de divers facteurs, s'amplifie avec le temps jusqu'à arriver à un point de non retour aboutissant à la crise vaso-occlusive : le vaisseau sanguin est très fortement obstrué et l'oxygénation des organes en amont se trouve altérée (**Belcher et al., 2000**).

L'élément déclencheur de ce cercle vicieux est souvent le phénomène d'hypoxie, qui va induire la falciformation des GR ainsi que la production de ROS (**Conran and Costa,**

Chapitre1 : Rappel bibliographique

2009 ;Nur et al.,2011). Cette falciformation induit une augmentation de l'hémolyse, elle est aussi impliquée dans la production de ROS (Belcher et al., 2000).

Il s'ensuit alors la mise en place d'une réponse inflammatoire, caractérisée notamment par l'activation de l'endothélium vasculaire qui va alors produire diverses molécules dont des molécules d'adhérence vasculaire (qui lient les GR et globules blancs – GB – à l'endothélium), certains modulateurs du tonus vasculaire tels que l'endothéline-1 (ET-1, puissant vasoconstricteur) ou encore des molécules impliquées dans la cascade de coagulation (TF : facteur tissulaire) (Conran and Costa, 2009).

Cette réponse inflammatoire conduit à la diminution de la lumière des vaisseaux sanguins et donc au blocage des GR denses, trop peu déformables pour traverser ces amas cellulaires (Kaul and Fabry, 2004) ainsi qu'à une augmentation de l'hypoxie locale. Cette hypoxie locale favorise encore plus la falciformation, et toutes les réactions en chaîne précédemment décrites : le cercle vicieux est bouclé et peut conduire à la crise vaso-occlusive (figure 14).

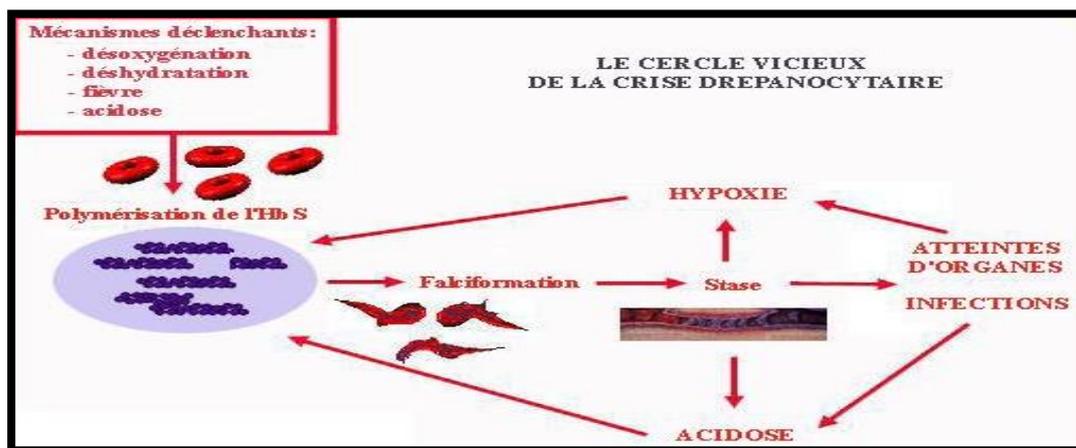


Figure14 : Le cercle vicieux de la crise drépanocytaire

V.4 Conséquences de la falciformation

V.4.1 L'occlusion des petites vaisseaux

A l'état basal, le temps de passage des globules rouges dans la microcirculation est inférieur au temps nécessaire pour la polymérisation de la désoxy-HbS mais plusieurs facteurs favorisent le ralentissement du flux circulatoire et l'obstruction vasculaire

Chapitre1 : Rappel bibliographique

responsable d'ischémie tissulaire à l'origine des douleurs observées au cours de la crise vaso-occlusive.

L'atteinte membranaire des érythrocytes induite par la falciformation entraîne l'exposition de molécules d'adhésions non exprimées normalement sur les érythrocytes comme la phosphatidyl-sérine, (Lu/BCAM), (IAP) et (ICAM-4). (Sundd et al., 2019).

Certaines protéines d'adhérence sont activées par des stimuli extracellulaires : Lu/BCAM par exemple, n'exprime ses propriétés d'adhérence qu'après stimulation de l'érythrocyte par l'adrénaline. Du fait de l'anémie, des réticulocytes de stress sortent prématurément de la moelle osseuse et expriment à leur surface des molécules d'adhésion dont le rôle normal était de les maintenir dans la moelle osseuse. Ces globules rouges jeunes adhèrent à l'endothélium des veinules post-capillaires, ralentissent le flux circulatoire en perturbant ainsi la rhéologie, ce qui favorise la falciformation des érythrocytes et l'occlusion des micros vaisseaux.

Néanmoins, drépanocytes et réticulocytes de stress ne sont pas les seules cellules impliquées dans le phénomène de vaso-occlusion. L'hémolyse libère du fer hémique libre à l'origine du stress oxydatif participant à l'expression endothéliale de (VCAM-1), d'ICAM-1 et d'E-sélectine, protéines impliquées dans l'adhérence des réticulocytes de stress et le recrutement des leucocytes. Dans ce contexte inflammatoire, drépanocytes, cellules endothéliales, plaquettes et leucocytes sont activés et libèrent des microparticules circulantes, participant aussi à l'activation (Sundd et al, 2019).

V.4.2 Hémolyse intravasculaire et dysfonction endothéliale

L'hémolyse intravasculaire réduit la biodisponibilité du NO (Kato et al., 2007 ; Kato, 2015 ; Sundd et al., 2019) Or, le NO est nécessaire à la vasodilatation, et il régule la fonction plaquettaire, l'inflammation et la prolifération des cellules musculaires lisses, le stress oxydatif.

Ainsi la disponibilité réduite du NO entraîne une vasculopathie proliférative. En effet, le NO est produit par la transformation de la L-arginine via le NO synthase.

L'hémolyse intravasculaire des globules rouges relargue de l'Hb libre, l'arginase et la lactate déshydrogénase (LDH) (Kato, 2007)

L'Hb libre inactive le NO, générant de la méthémoglobine et du nitrate inerte. L'arginase plasmique transforme la L-arginine en ornithine, déplaçant ainsi sa disponibilité pour la production de NO.

Chapitre1 : Rappel bibliographique

Le NO est également consommé par ses réactions avec les dérivés réactifs de l'oxygène, notamment (O_2^-), espèces réactives de l'oxygène (ROS) produits par l'activité élevée de la xanthine oxydase et de la (NADPH) oxydase.

Cette réduction de la biodisponibilité du NO dans la drépanocytose est associée à l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), le priapisme, les ulcères cutanés et l'accident vasculaire ischémique.

L'Hb libre et l'hème stimulent l'activité plaquettaire et les voies de la coagulation, contribuant ainsi à la thrombose vasculaire, activent l'inflammation et le stress oxydatif, perturbant la balance redox. L'Hb oxydée relargue de l'hème libre pouvant activer le relargage de facteur de croissance placentaire (PIGF) et l'endothéline-A (ET-1), puissant vasoconstricteur.

Tout cela contribue à la vasculopathie, l'activation plaquettaire et l'HTAP. L'hème aussi stimule le système immunitaire inné avec augmentation des taux des ligands (TLR4) endogènes et exogènes (lipopolysaccharide [LPS]).

Cela active la production de ROS et des pièges extracellulaires des neutrophiles, produisant des cytokines inflammatoires et autres médiateurs promouvant l'expression des récepteurs d'adhésion et de leurs ligands sur les cellules endothéliales et sanguines. L'hémolyse intravasculaire relargue aussi l'adénine et les nucléotides, incluant adénosine triphosphate (ATP) et adénosine diphosphate (ADP), qui contribuent à l'activation plaquettaire.

L'adénosine se lie aux récepteurs érythrocytaires, augmentant le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) et la sphingosine-1-phosphate, associés à une affinité de l'Hb pour l'oxygène plus basse. Les protéines à la surface de l'endothélium activé (P-sélectine, E-sélectine, VCAM-1, ICAM-1) sont responsables de l'adhésion des plaquettes, neutrophiles et drépanocytes, à l'origine de la vaso-occlusion et du syndrome thoracique. L'hémolyse intravasculaire relargue aussi de la diméthylarginine qui inhibe la NO synthétase endothéliale (eNOS). (Soundd et al., 2019)

V.4.3 Inflammation stérile :

La vaso-occlusion contribue au phénomène d'ischémie reperfusion (Eltzschig and Eckle, 2011) et ainsi à l'inflammation stérile. Les quantités d'ATP relarguées dans la circulation du fait de l'hémolyse et dans les tissus suite à l'ischémie sont transformées en adénosine.

Chapitre1 : Rappel bibliographique

Les récepteurs de l'adénosine peuvent stimuler ou inactiver l'adénylate-cyclase (Gladwin , 2011 ; Zhang et al., 2011) . L'activation du récepteur A2A sur les cellules (NKT) les inhibent, entraînant ainsi un effet cytoprotecteur et anti-inflammatoire.

En revanche, l'activation du récepteur A2B par l'adénosine augmente le 2,3-DPG, ce qui aggrave l'hémolyse, la falciformation et la vaso-occlusion, en particulier le risque de priapisme. L'hème et sa forme oxydée relargués par l'oxydation de l'Hb sont des puissants agonistes de TLR4 qui contribuent à l'état proinflammatoire et procoagulant dans la drépanocytose, caractérisé par l'activation des leucocytes, plaquettes, cellules endothéliales, facteur tissulaire, orage cytokinique, déplétion du NO et génération de ROS. Les neutrophiles activés relarguent des *neutrophil extracellular traps* (NET) responsables des lésions tissulaires. Les épisodes répétés de vaso-occlusion et reperfusion contribuent aux lésions d'ischémie-reperfusion via l'hypoxie transitoire, et entraînent la génération de ROS, la dysfonction microvasculaire, la mort cellulaire libérant les *damage-associated molecular patterns* (DAMP). Ceux-ci contribuent à l'inflammation stérile en activant le complexe protéique « inflammasome » impliqué dans l'immunité innée.

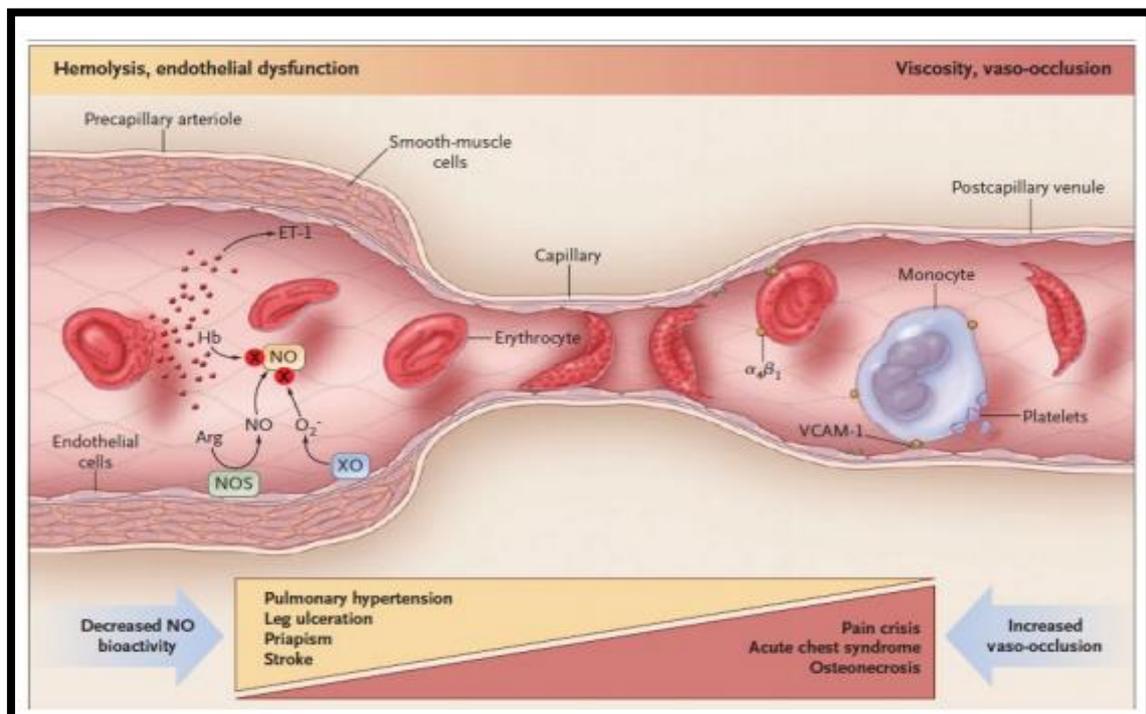


Figure15 : Mécanisme hypothétique des sous-phénotypes cliniques de la drépanocytose (Gladwin and Vichinsky, 2008)

Chapitre1 : Rappel bibliographique

V.5 Le système de défense antioxydant

Pour limiter les dommages engendrés par toutes ces réactions oxydatives, le globule rouge est doté d'un ensemble de systèmes de défense antioxydants. Ces systèmes sont déficients dans la drépanocytose.

V.5.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

V.5.1.1 Les Superoxydes Dismutases (SOD)

Elles sont capables d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène.

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. **Gizi** et collaborateurs démontrent une augmentation du taux de SOD chez les patients drépanocytaires comparés à des sujets sains et proposent que cette augmentation reflète la tentative de défense des globules rouges drépanocytaires contre le stress oxydant (**Gizi et al., 2011**).

V.5.1.2 La catalase

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La catalase est composée de 4 sous-unités protéiques, chacune contenant un groupement hémunique 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 (**Bonnefont et al., 2003**). Les travaux de **Dasgupta** et collaborateurs montrent des taux réduits de catalase chez les patients drépanocytaires (**Dasgupta et al ., 2006**) tandis que ceux de **Das** et **Nair** démontrent des taux de catalase plus élevés chez les patients drépanocytaires comparés aux 65 sujets contrôles (**Das & Nair, 1980**).

L'augmentation de la catalase pourrait être un signal de défense pour capter le maximum d' H_2O_2 tandis que la diminution de la catalase pourrait s'expliquer par la présence écrasante du stress oxydant que le système de défense antioxydant défaillant des patients drépanocytaires n'arrive plus à contrecarrer.

Chapitre 1 : Rappel bibliographique

V.5.1.3 Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases sont capables de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de l'hydroperoxydes avec l'oxydation d'un substrat réducteur comme le glutathion, le cytochrome c (cytochrome c peroxydases), le NADH (NADH peroxydases) (**Théron and Denis, 2005**).

Le glutathion oxydé sera régénéré grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH, H⁺, formé principalement par la voie des pentoses phosphates (**Bonnefont et al., 2003 ; Théron and Denis, 2005**). 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. Les travaux de Gizi et collaborateurs démontrent une augmentation de la glutathion peroxydase chez des patients drépanocytaires comparés aux sujets contrôles (**Gizi et al., 2011**). Ces résultats sont controversés par les travaux de Cho et collaborateurs qui, eux, démontrent une perte d'activité de 33% de la glutathion peroxydase chez les drépanocytaires comparés à des sujets contrôles, perte corrélée à l'hémolyse retrouvée 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 comparés aux patients ne recevant pas d'hydroxyurée (**Cho et al., 2010**).

V.5.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles le glutathion, l'acide urique, les vitamines (A, C, E) ou la bilirubine. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le •NO (**Favier, 2003**). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger des radicaux peroxyles RO₂ et l'oxygène singulet, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires. (**Favier, 2003**).

Les composés, tels que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes, apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables (**Krinsky, 1989**).

Chapitre1 : Rappel bibliographique

Des protéines comme l'haptoglobine, la transferrine et l'hémopexine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^{+} . Gizi et collaborateurs observent une diminution de la concentration plasmatique des vitamines A, C et E chez les patients drépanocytaires comparés aux sujets contrôles. De même, cette étude démontre une diminution du taux de glutathion total ainsi qu'une réduction du glutathion réduit chez ces patients comparés aux sujets sains.

(Gizi et al. 2011).

Cette diminution du glutathion est en accord avec l'étude de Amer et collaborateurs, 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 (Amer et al., 2006)

VI. Traitement

Si le diagnostic de syndrome drépanocytaire majeure est confirmé, une prise en charge précoce doit être entreprise.

VI.1 Traitement préventif

Le traitement passe d'abord par la prévention: éviter les facteurs déclenchant une crise vaso occlusive (CVO) (Tableau 4), administrer de l'acide folique, prévention de l'infection, prévention des carences nutritionnelles, vaccination contre hépatite B, etc (Gulbis et al ., 2005).

Tableau4. Les conseils afin de prévenir une CVO (Leport 2004 ; Gulbis et al ., 2005).

A éviter	A conseiller
----------	--------------

Chapitre1 : Rappel bibliographique

1-les mariages consanguins. 2-La déshydratation. 3-L'hypoxie. 4-Le stress. 5-Les efforts répétitifs. 6-La chaleur. 7-Les problèmes durant le sommeil. 8-Les séjours en altitude. 9-Les voyages en avion. 10-Le tabagisme. 11-L'alcool. 12- Le froid.	1-Information et formation sur la drépanocytose dans le système scolaire. 2-Dépistage génétique avant le mariage. 3-L'apport quotidien de minimum 2,5 l/jour. 4-Une alimentation salée surtout lors de fièvre, de températures élevées ou d'exercices physiques. 5-La prise d'un antipyrétique lors d'épisodes fébriles. 6- Bien se laver le corps et les dents. 7- Surveiller sa température. 8- consultation à médecin. 9 - Il faut veiller à ne jamais manquer d'oxygène. 10-Avoir un bon état dentaire 11- Surveiller la couleur des yeux et des urines. 12-Se donner et respecter une bonne hygiène de vie .
---	--

VI.2 Le traitement curatif

- Hydroxyurée par voie orale (20-40 mg/kg/jour) réduit à la fois la fréquence et la durée des crises d'anémie falciforme. Bien que son mode d'action soit inconnu, augmente la production d'HbF, diminue la concentration intracellulaire de HbS en augmentant le VCM et inhibe les interactions pro thrombotiques entre les cellules falciformes et l'endothélium.

-Allogreffe de moelle osseuse est réservée aux formes graves de drépanocytose, elle peut proposée qu'en cas de donneur HLA identique.

-Le placement de prothèses articulaire peut être en cas de nécrose avasculaire (hanches et épaules).

-Traitement chélateur du fer pour les patients souffrant de surcharge en fer provoquée par des transfusions multiples (**Mehta et al ., 2003**).

Chapitre 1 : Rappel bibliographique

VI.3 La thérapie génique

Le but de thérapie prometteuse qui consiste à greffer un gène sain de la bêta-globine dans les cellules souches hématopoïétiques des drépanocytaires. Des essais encourageants ont été réalisés sur des modèles animaux de la maladie.

VI.4 Les antioxydants

En regard du contexte oxydatif bien présent dans la drépanocytose, la question d'un développement thérapeutique basée sur l'administration d'agents réducteurs ou antioxydants s'est naturellement posée. Plusieurs travaux de recherche se sont donc orientés sur cette voie, essentiellement sur des modèles animaux.

Cependant, il n'y a que peu d'essais cliniques disponibles, principalement au stade 3, ce qui limite l'évaluation réelle de ces thérapies antioxydantes dans la maladie drépanocytaire (Silva et al., 2013).

VI.5 Approche naturelle

- **Zinc** : il est connu qu'un apport suffisant en zinc est nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire. On retrouve fréquemment des déficiences en zinc chez les gens atteints d'anémie à hématies falciformes, puisque la maladie augmente les besoins en zinc.
- **Acides gras oméga-3** : certaines données indiquent que la consommation d'acides gras oméga-3 pourrait aider à réduire la fréquence des crises douloureuses typiques de l'anémie à hématies falciformes.
- **Acupuncture** : deux petites études indiquent que l'acupuncture pourrait aider à soulager la douleur en cas de crise douloureuse. Un chercheur mentionne avoir obtenu ainsi des résultats tandis que les moyens habituels avaient échoué. Les résultats ont été si spectaculaires qu'il a utilisé l'acupuncture pour quatre autres cas.
- **Cocktail de vitamine C, vitamine E et ai** : ce traitement pourrait s'avérer efficace en cas d'anémie à hématies falciformes, vu son effet antioxydant. Il réduirait la formation de cellules à densité élevée et à membranes anormales. Or, celles-ci tendent à obstruer la circulation sanguine et donc à provoquer les douleurs typiques associées à ce phénomène. Au cours de cette étude, on a utilisé 6 g d'ail vieilli, de 4 g à 6 g de vitamine C et de 800 UI à 1 200 UI de vitamine E.
- **Homéopathie** : l'homéopathie pourrait aider à soulager certains symptômes, comme la fatigue.

Chapitre1 : Rappel bibliographique

- **Mesures d'aide et de soulagement** : faire partie d'un groupe de soutien peut s'avérer fort profitable. (Approche naturelle. Drépanocytose)

VI.6 Voxelotor

Une des cibles thérapeutique potentielles est d'inhiber directement la polymérisation de l'HBS. Le voxelotor ou GBT440 est une molécule actuellement en développement qui permet d'augmenter l'affinité d'Hémoglobine pour l'oxygène et donc d'inhiber la polymérisation de l'HBS pour des pressions partielles en O₂ plus faibles. L'étude de la phase 3 récemment publiée ne montre pas d'effet significatif sur les crises douloureuses chez les patients mais une augmentation de l'hémoglobine et une diminution des marqueurs de l'hémolyse (**Vichinsky et al., 2019**)

Matériels et méthodes

I. Matériel

I.1 Population et échantillon d'enquête

L'étude a été déroulée au niveau du service de laboratoire central d'analyse médicale CAC de Blida. À travers une modeste exploration, nous avons fait une enquête sur des patients ayant une drépanocytose SS, SC, S β -thalassémique+ et S β -thalassémique⁰ déjà diagnostiqués, 75 sujets au total de la période début mars 2022 jusqu'à juin 2022, au sein de l'hôpital du jour ou viennent les patients drépanocytaires pour leurs suivi quotidien. Ces cas ont été appariés à 20 témoins non drépanocytaires obtenus du centre de transfusion sanguine (donneurs).

I.1.1 A.1 Critères d'inclusions

Ont été inclus dans cette étude, tous les patients quel que soit leurs âges et leurs sexes présentant une drépanocytose de toutes formes génétiques : SS, SC, SB.

I.1.1.1 Drépanocytose homozygote SS :

Il s'agit de la forme la plus fréquente rencontrée parmi les syndromes drépanocytaires majeurs dont sa sévérité et ses complications varient d'un patient à un autre (forme sévère).

I.1.2 Drépanocytose hétérozygote composite SC

L'anémie est absente ou modérée, l'anémie est moins importante que dans la drépanocytose homozygote, voire n'existe pas (forme modérée).

I.1.3 Drépanocytose hétérozygote composite S β -thalassémique

La S β -thalassémie représentée par deux génotypes, qui ont une expression clinique très différentes : la S β^0 et la S β^+

- S β^0 : la sévérité du tableau clinique est considérée comme proche de celle des homozygotes SS (forme sévère).
- S β^+ : la sévérité de l'expression clinique est inversement proportionnelle à la quantité d'HbA présente (forme modérée). (Chiabi *et al.*, 2007)

I.1.4 A.2 Critères non d'inclusions

Nous n'avons pas exclus des malades, appart les non drépanocytaires, nous avons pris des patients de tous âge, tous sexe, femmes et hommes.

Chapitre2 : Matériel et méthode

I.1.5 Prélèvements sanguins

Nous avons travaillé sur des échantillons du sang prélevés sur deux types de tube :

- Un qui contient un anticoagulant EDTA pour les analyses biologique. (**Voir annexe I**)
- Un qui contient un anticoagulant héparine pour les analyses biochimique.

II. Méthodes

II.1 Recueil des prélèvements

Les tubes EDTA déjà prélevés au niveau de service de laboratoire des patients drépanocytaires qui viennent pour un contrôle de suivi thérapeutique sont remportés pour faire l'hémogramme et différentes dosages, ainsi que les tubes héparines sont utilisés pour les analyses biochimiques.

II.2 Recueil des informations

Le recueil des données correspondent à la recherche, le recueil et le rassemblement des informations auprès du patient ou de son entourage.

Les renseignements des patients drépanocytaires ont été prises au niveau de l'hôpital du jour à la salle d'archive selon la fiche de renseignements. (**Voir annexe II**)

II.3 Traitement des échantillons

II.3.1 Réalisation de l'hémogramme.

En premier lieux, une réalisation d'un hémogramme faite sur les tubes EDTA pour obtenir rapidement un ensemble de donnés quantitatives (HBG, GR, GB).

II.3.1.1 Récupération des résultats

Les formules de numérations sanguines FNS de chaque patient sont obtenues à partir de Sysmex ainsi les résultats de la biochimie qui sont obtenues à partir du Cobas. (**Voir annexe V**)

Tableau 5. Formule de numération sanguine

Paramètre	Valeurs normales	Unité
GB	(4.00 -10.00)	[10 ³ /uL]
GR	(4.00 -5.50)	[10 ⁶ /uL]
HBG	(12.0 -16)	[g/dL]
NEUT	(40.0-70.0)	[%]

II.3.2 Réalisation du frottis sanguin

Consiste à étaler une goutte de sang uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche de cellules. Après coloration et fixation au MGG, (**Voir annexe III**). Cette technique permet de nous faire une étude morphologique des cellules du sang, de repérer les anomalies cellulaires et dans le sang dans notre cas sa nous permet de voir des érythrocytes falciforme (drépanocyte) et d'autre anomalies cellulaire.

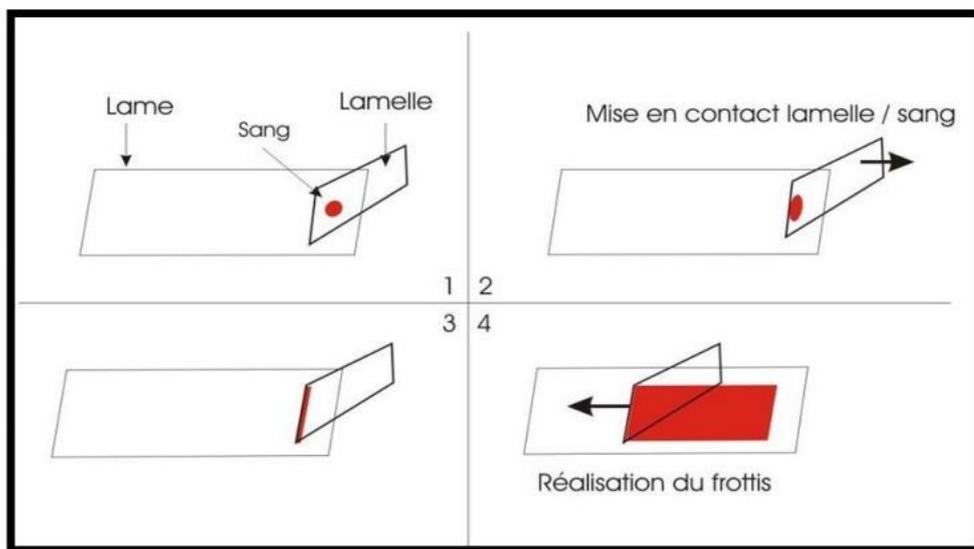


Figure 16 : Schéma représentant les étapes de la réalisation du frotti sanguin.

II.3.3 Identification du frottis sanguin

Le frottis sanguin doit, au moins, porter une double identification, c'est à dire : nom et prénom du patient et numéro d'identification personnalisé. De plus, la date devrait être inscrite sur chaque frottis.

II.3.4 Lecture des lames

Les lames colorées sont ensuite placées au niveau de microscope, en versant une goutte de huile et observés avec un grossissement X100, ensuite capturés par une camera et logiciel spécifique WINJOE0 (**Voir annexe VI**).

Chapitre2 : Matériel et méthode

II.4 Paramètre d'hémolyse

II.4.1 Dosage de l'hémoglobine libre

- Après la réalisation des frottis, les tubes du sang sont ensuite centrifugés pendant 10 min à 3000g.
- L'hémoglobine libre (sérique) est calculée à partir de plasma du sang centrifugé à une longueur d'onde 412nm. (Voir annexe IV)

II.4.2 Bilan d'hémolyse

Il comprend notamment le dosage de la bilirubine libre et conjuguée, et éventuellement la quantification de la LDH, permet de confirmer le caractère hémolytique de l'anémie.

II.4.2.1 Dosage de la bilirubine

C'est un pigment issu de la dégradation des globules rouges, la bilirubine totale est généralement élevée, c'est le signe biologique de l'ictère conjonctival du drépanocytaire. Son taux est variable d'un patient à un autre suivant que le malade présente des complications plus graves, lorsque le patient développe une lithiase du cholédoque des taux extrêmes de 500 mg/l peuvent être observés. (Essonno M.E et al., 2004)

II.4.3 Dosage de LDH

Lactate déshydrogénase est une enzyme intracellulaire contenue dans la plus part des tissus. Un taux élevé de LDH indique que les cellules sont en hémolyse. (Essonno M.E et al., 2004)

II.4.4 Dosage d'ASAT et ALAT

Les transaminases sont des enzymes présentes à l'intérieur des cellules, en particulier au niveau du foie et des muscles. Elles interviennent dans une multitude de réactions biologiques.

Le taux élevé d'ASAT indique soit un phénomène hémolytique ou cytolyse hépatique, alors que le taux élevé d'ALAT confirme une hémolyse cellulaire.(Essonno M.E et al., 2004)

Chapitre2 : Matériel et méthode

Tableau 6. Les analyses de biochimie

Paramètres	Valeurs normales	Unités
Bilirubine Libre	3-10	mg/L
LDH	140-245	U/l
ASAT	10-40	UI/l
ALAT	6-45	UI/l

II.5 Paramètre de stress oxydatif

II.5.1 Dosage de la méthémoglobine

Son principe repose sur la mesure de la densité optique à 630 *nm* et à 700 *nm* d'une dilution sanguine (hémolysât) avant et après la transformation totale d'hémoglobine en méthémoglobine.

Les étapes de cette méthode sont les suivantes :

- Hémolyse puis centrifugation pour éliminer le stroma cellulaire.

- Mesurer les densités optiques à 630 *nm* et à 700 *nm* :

1. Hémolysât : (HbO₂ + Hb + MétHb + impuretés) → **DO1** à 630 *nm*

2. Hémolysât : (HbO₂ + Hb + impuretés) → **DO2** à 700 *nm* (Mét-Hb a une absorbance nulle à 700 *nm*)

DO1 - DO2 = Absorbance de MétHb

- Mesurer les densités optiques de l'hémolysât à 630 *nm* et à 700 *nm* après l'ajout du ferricyanure du potassium :

1. Hémolysât + ferricyanure du potassium : (Mét-Hb + impuretés) → **DO3** à 630 *nm* (le ferricyanure de potassium oxyde l'Hb total en mét-Hb)

2. Hémolysât + ferricyanure du potassium : (impuretés) → **DO4** à 700 *nm* (MétHb a une absorbance nulle à 700 *nm*)

DO3 - DO4 = Absorbance de l'Hb totale

- Rapport :

MétHb % = $\frac{DO1-DO2}{DO3-DO4} \times 100$.

Les valeurs usuelles sont inférieures à 2 % (de l'hémoglobine totale). (**Vendeuvre et al., 2012**), (**Voir annexe IV**).

- Le plasma restant est ensuite verser dans des tubes fermés puis conserver au congélateur pour le réutiliser dans le dosage de la peroxydation lipidique.

Chapitre2 : Matériel et méthode

II.5.2 Evaluation de la peroxydation lipidique

Par le test aux substances réactives à l'acide thiobarbiturique (test à TBARS). Le principe de ce test repose sur l'utilisation d'une solution acide (acide trichloracétique : TCA) pour détacher les lipides membranaires oxydés qui en présence à l'acide thiobarbiturique de l'échantillon, principalement le malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur du stress oxydatif cellulaire. Après l'obtention des lipides oxydés, la solution obtenue par centrifugation à froid (+4°C). Une solution du thiobarbiturique est ajoutée au surnageant récupéré. Ce mélange réactionnel est incubé à 95°C avant mesure de l'absorbance à 534 nm. (Voir annexe IV)

Donc les taux élevés de MDA signent un **stress oxydatif**, portant notamment sur l'oxydation des lipides. Leur valeur normal est <0.0001. (Vendeuvre et al., 2012)

II.6 Calcul de la turbidité cellulaire

- Préparer une solution du sang a 2% dans 1000 µl de tampon phosphate.
- Prendre 100ml de la solution préparée et verser dans 2000 µl de tampon phosphate et faire la lecture à une longueur d'onde 620nm (voir annexe IV)

II.7 Considérations éthiques

Nos données ont été recueillies et traitées dans le strict respect du secret professionnel.

II.8 La saisie et l'analyse des données

Elles ont été effectués sur les logiciels « IBM SPSS statistics 20 et office Excel 2007 ».

II.8.1 L'analyse statistique

Nous avons calculé des pourcentages pour les variables qualitatives et des moyennes avec les écarts types pour les variables quantitatives ; le test T de student a été utilisé pour la comparaison des moyennes. Les résultats étaient considérés comme étant significatifs quand le P était inférieur à 0,05.

Résultats

Chapitre 3 : Résultats

I. Résultats

I.1 Description de la population

Tableau7. Répartition de la population

		N	Total
TYPE	CAS	55	75
	TEMOIN	20	

On a travaillé sur 75 sujets, dont 55 malades ayant consulté en hématologie du CAC de Blida pour syndrome drépanocytaire, ajoutant 20 témoins.

I.1.1 Répartition selon le sexe

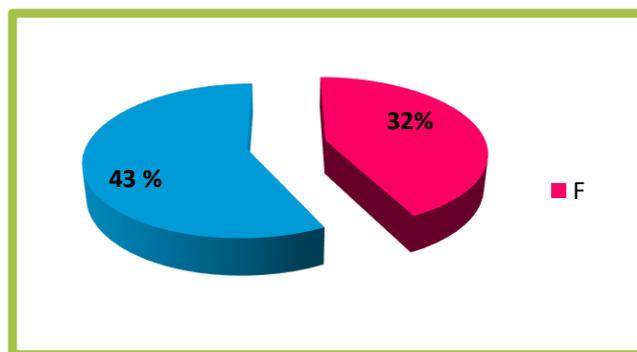


Figure17 : Répartition des sujets étudiés selon le sexe.

Dans la série étudiée, 43 patients étaient de sexe masculin et 32 de sexe féminin, soit respectivement 57.3 % et 42.6 % de l'ensemble des personnes, avec un sex-ratio de 1.3

Tableau 8. Répartition des sujets étudiés selon le sexe.

			N	%	
TYPE	CAS	Sexe	F	30	54.54
			M	25	45.45
	TEMOIN				
		F	2	10	
		M	18	90	

Chapitre 3 : Résultats

I.1.2 Répartition selon l'âge

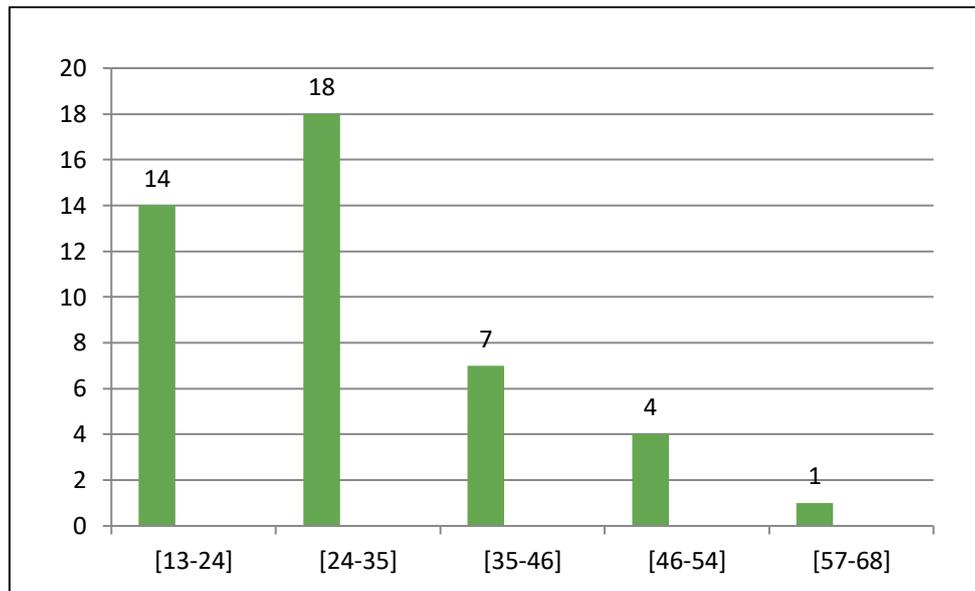


Figure18 : Répartition de la population totale selon l'âge.

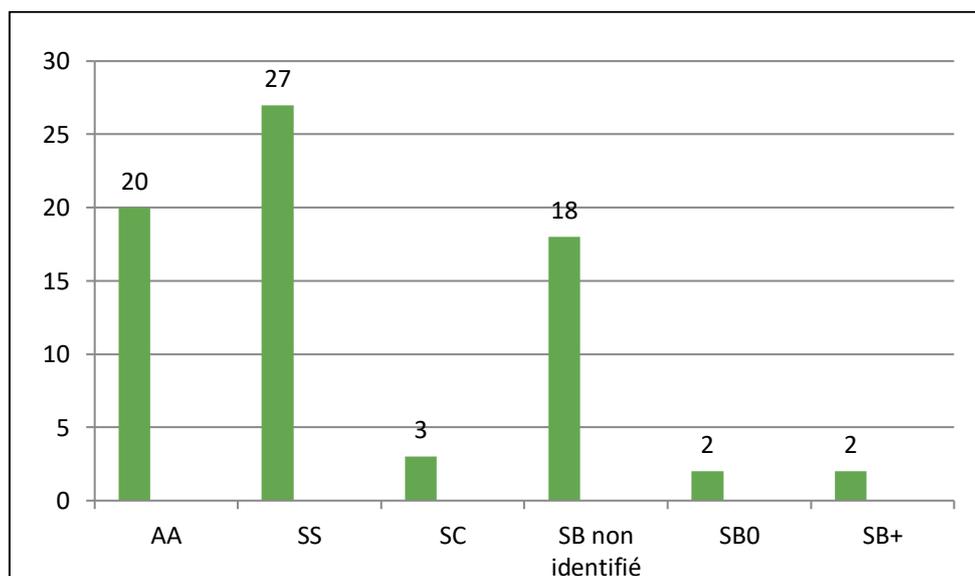
L'âge moyen des personnes inclus dans l'étude était de 64 ± 13 ans.

Tableau 9. Répartition de la population selon l'âge

		Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type
AGE	CAS	26	13	64	12
	TEMOIN	35	20	53	9

Dans notre étude la moyenne d'âge des cas est de 26, et les témoins est 35

I.1.3 Répartition selon la forme génétique



Chapitre 3 : Résultats

Figure19 : Répartition de la population totale selon la forme génétique.

Parmi les malades inclus dans notre étude, 27 patients étaient de type SS, 18 cas S β non identifié, 2 S β 0 et 2 S β + plus 3 cas drépanocytaire SC et 3 cas drépanocytaires non identifiés. Ces cas ont été accordés avec 20 témoins de forme AA.

Tableau10. Répartition de la population selon la forme génétique et le sexe.

Forme génétique		AA	SS	SC	S β (non identifiée)	S β 0	S β +
N total		20	27	3	18	2	2
N	F	2	11	1	14	2	1
	M	18	16	2	4	0	1

Parmi les malades inclus dans notre étude, 27 patients étaient de type SS, 18 cas S β non identifié, 2 S β 0 et 2 S β + plus 3 cas drépanocytaire SC et 3 cas drépanocytaires non identifiés. Ces cas ont été accordés avec 20 témoins de forme AA.

I.1.4 Répartition selon la sévérité

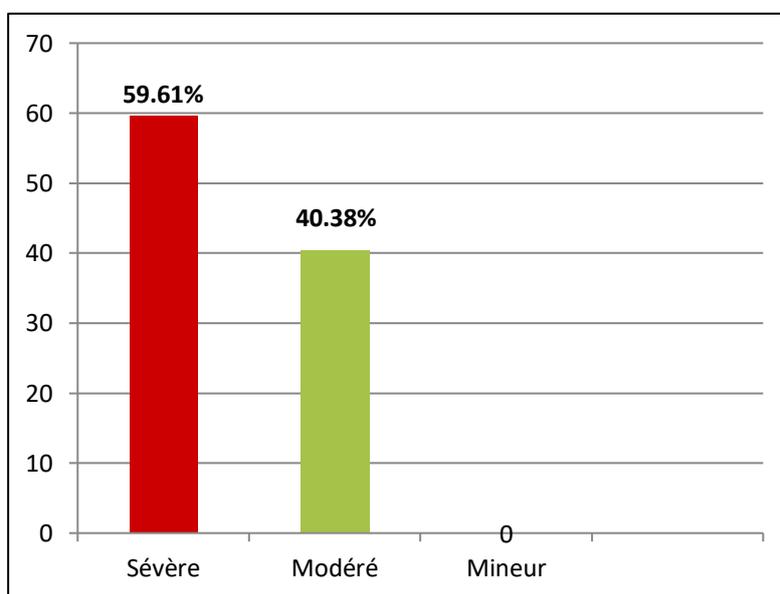


Figure20 : Répartition de la population malade selon la sévérité

Dans notre étude, le nombre des malades de forme sévère était 31 cas (59.61%)

Le nombre de cas modéré était 21 (40.38%).

Chapitre 3 : Résultats

I.1.5 Répartition selon les crises vaso-occlusives

Tableau 11. Répartition selon les crises vaso-occlusives

Crise vaso-occlusive	
Sévère	0
Modéré	0

Dans notre population d'étude, nous avons constaté une absence des crises vaso-occlusives ceci est due au traitement.

II. Comparaison entre les cas et les témoins

II.1 Répartition selon l'hémogramme

Le tableau reflète les formules de numérotation sanguine chez les cas et les patients.

Tableau 12. Répartition selon l'hémogramme.

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC	
HBG	TYPE	CAS	8.11	5.60	11.70	3.22	0.000 (2.18/7.66)	
		TEMOIN	16.11	13.30	22.90	2.63		
GB								0.000 (-9.30/-6.08)
		CAS	12.88	1.00	39.54	5.90		
		TEMOIN	7.95	3.30	12.97	2.59		
GR								0.000 (-2.56/-1.44)
	CAS	3.45	1.93	8.40	1.15			
	TEMOIN	5.46	3.99	7.67	0.82			

Nous avons remarqué une diminution hautement significative $p < 0.05$ de taux d'**Hb** chez les sujets malades varie de **5.6 à 11.70 g/dl** qui est faible par rapport au témoin (**13.30 à 22.90 g/dl**) et aux valeurs physiologiques [(**12.00-16.00**)] (Tableau 5).

Les valeurs indiquent une augmentation de nombre de **GB** chez les sujets malades, variant de **1 à 39.54** 10^6 /ul alors que chez le témoin le nombre est de **3.30 à 12.97** 10^6 /ul et les valeurs physiologiques sont de [(**4.00 -10.00**) 10^6 /ul] (Tableau 5).

Chapitre 3 : Résultats

Nous avons constaté une diminution significatif du nombre de **GR** chez les sujets malades d'une moyenne de 3.45 avec une moyenne de **4,4** $10^9/l$ par rapport au témoin **5.46** $10^9/l$ et aux valeurs physiologiques [(**4.00-5.51**) $10^9/l$] (**Tableau 5**).

II.2 Répartition selon les paramètres d'hémolyse

Tableau 13. Répartition selon les paramètres d'hémolyse

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
Hb sérique	Type	CAS	0.2181	0.0114	1.0926	0.1712	0.10 (- 11295/1105)
		TEMOIN	0.7275	0.0406	10.5632	2.3175	
Bilirubine Libre		CAS	24.88	4.18	95.83	24.11	
Bilirubine Conjugué		CAS	10.87	3.15	95.74	21.97	
Bilirubine Total		CAS	44.10	8.28	254.78	54.22	
LDH		CAS	624.50	389	860	333.05	
ASAT		CAS	35	17	56	11	
ALAT		CAS	18	3	86	18	

L'analyse statistique des nos résultats permettent de constater que les valeurs de l'hémoglobine sérique sont non significatives ($p > 0,05$) chez les malades drépanocytaires a cause d'un problème des conditions de prélèvement chez les donneur sains par rapport au cas. Le prélèvement se fait à partir de la poche mais pas de la veine.

La bilirubine libre elle est d'une moyenne de **24,88 mg/l**, en comparaison avec les témoins **10.87mg/l**.

Nous avons trouvé dans notre série une moyenne de **860±389** U/L de l'enzyme LDH chez les sujets drépanocytaires en comparaison avec les valeurs normal (140-2541 U/L) (**tableau6**)

Chapitre 3 : Résultats

Les résultats statistiques indiquent une augmentation des enzymes transaminase par rapport à les valeurs normaux (**tableau 6**)

II.3 Répartition selon les paramètres de stress oxydatif

Le tableau reflète paramètres de stress oxydatif qui sont la méthémoglobine et MDA

Tableau 14. Répartition selon les paramètres de stress oxydatif.

		Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
MetHb GR	CAS	13.67	0.25	88.08	16.04	0.000 (-1.21/19.24)
	TEMOIN	4.66	0.25	9.82	2.80	
MetHb Plasmatique	CAS	44.51	0.25	158.62	42.07	0.004 (3.67/43.53)
	TEMOIN	20.90	0.25	83.67	24.00	
MDA	CAS	0.0582	-1.1330	0.4260	0.1234	0.02 (0.249/1.15)
	TEMOIN	-0.0084	-0.0830	0.0490	0.0425	

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative ($p < 0.05$) de taux de la méthémoglobine dans les globules rouges chez les sujets drépanocytaires d'une valeur de **88.08 ± 0.25%** par rapport aux témoins **9.82 ± 0.25%**, ainsi pour la méthémoglobine plasmatique qui était élevé chez les cas **158.62 ± 0.25%**.

Après avoir calculé l'évaluation de la peroxydation lipidique, nos résultats montre une augmentation hautement significative principalement le malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur du stress oxydatif cellulaire ($p < 0.05$) chez les sujets drépanocytaires **0.4260 ± -1.1330** en comparaison avec les témoins **0.0490 ± -0.0830**.

II.4 Répartition selon la turbidité cellulaire

Tableau 15. Répartition selon la turbidité cellulaire.

Chapitre 3 : Résultats

		Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
Turbidité cellulaire	CAS	2.1467	0.2191	34.1441	5.3784	0.3 (-1.34/ 3.46)
	TEMOIN	1.0863	0.6161	1.7446	0.3333	

Nous avons trouvé des valeurs non significatives de la turbidité cellulaire chez les patients atteints de drépanocytose par rapport aux témoins, nous avons constaté par la suite que y'avait un problème de prélèvement, car les conditions d'échantillonnage ne sont pas mise en oeuvre de la même manière.

III. Comparaison selon la sévérité

III.1 Répartition selon l'hémogramme

Tableau 16. Répartition selon les paramètres d'hémogramme

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
HBG	TYPE	Sévère	8.60	5.70	10.60	3.99	0.13 (-0.08 /0.6)
		Modéré	8.33	5.60	11.70	1.47	
Neut %							0.000 (-30.66/-22.43)
		Sévère	37.36	25.5	47.4	8.74	
GR		Modéré	64.91	47	70	10.91	0.000 (-3.53/ -2.15)
Sévère	8.60	1.93	8.40	1.42			
Modéré	8.33	2.39	4.66	0.58			

Les résultats montrent une moyenne d'**HB** chez les cas sévère proche que celle des cas modérés, soit respectivement **8.60g/dl**, **8.33g/dl**, avec un $p > 0.05$, grâce au traitement.

Chapitre 3 : Résultats

Nous avons observé une augmentation hautement significatif $p < 0.05$ de taux des neutrophile chez les cas modérés d'une moyenne de 64.91 en comparaison avec les cas modérés 37.36.

Les résultats indiquent une moyenne des **GR $8.40 \pm 1.93 10^9/l$** chez les cas sévères en comparaison avec les cas modérés **$4.66 \pm 2.39 10^9/l$** .

III.2 Répartition selon les paramètres d'hémolyse

Tableau 17. Répartition selon les paramètres d'hémolyse

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
Hb Sérique	Sévérité	Sévère	2499	213	6762	1453	0.000
		Modéré	1517	435	2512	634	(851.09/ 1113.42)
BIL INDI		Sévère	29.07	4.18	95.83	26.80	0.02 (0.7/12.34)
		Modéré	22.54	14.38	27.58	5.11	
BIL D		Sévère	23.18	4.10	95.74	36.19	0.000 (8.04/ 23.7)
		Modéré	7.3	3.15	12.62	4.17	
BIL T		Sévère	47.83	8.28	100.12	31.29	0.000 (14.30/26.06)
		Modéré	27.68	17.53	34.7	7.18	
ASAT		Sévère	33	17	56	10.46	0.000 (-6.60/-2.41)
		Modéré	38	31	48	6.21	
ALAT	Sévère	19	9	86	21.97	0.000 (-0.8/7.58)	
	Modéré	15	3	27	9.06		

Les valeurs de l'hémoglobine sérique sont hautement significatives chez les cas sévères qui varient entre **6762 ± 213 g/dl** en comparaison avec les cas modérés **2512 ± 435 g/dl**.

Les valeurs de la bilirubine libre et conjugué sont hautement significatives chez les cas sévères que les cas modérés, ainsi que les taux d'ASAT et ALAT sont hautement significatifs dans la forme sévère, en comparaison à la forme modérée.

Chapitre 3 : Résultats

III.3 Répartition selon les paramètres de stress oxydatif

Tableau 18. Répartition selon les paramètres de stress oxydatif.

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
Methb GR	FORME	Sévère	17.18	0.25	88.08	20.86	0.000 (5.16/ 8.82)
		Modéré	10.19	2.10	33.59	6.82	
Methb P		Sévère	30.32	0.25	105.56	35.12	0.000 (-40.81/ - 32.46)
		Modéré	66.96	0.25	158.62	37.64	
MDA		Sévère	0.1275	-0.0320	0.4260	0.1491	0.000 (0.09/0.13)
		Modéré	0.0147	-0.1330	0.2800	0.1125	

La Met-Hb chez les deux formes est supérieur à la valeur de référence (< 2%) avec des moyennes qui s'accroissent en fonction de la sévérité de la maladie. Ainsi que la totalité des malades de la forme sévère/critique avec une bonne évolution maximum **88.08%**, et les formes modérés qui ne dépasse pas 33%.

III.4 Répartition selon la turbidité cellulaire

Tableau 19. Répartition selon la turbidité cellulaire.

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
Turbidi té cellulai re	Sév érité	Sévèr e	2.7128	0.2573	34.1441	6.6547	0.000 (1.09/2.2 1)
		Modé ré	1.0562	0.3543	4.0484	0.6396	

D'après nos résultats les valeurs de la turbidité cellulaire était plus élevé chez les cas sévères **34.14±0.25** que les cas modérés **4.04±0.35**. Cette discordance peut être expliquée par rapport au traitement.

Chapitre 3 : Résultats

IV. Comparaison entre les patients sous traitement hydroxyurée et sans traitement

IV.1.1 Répartition selon l'hémogramme

Tableau 20. Répartition selon l'hémogramme.

			Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart-type	P IC
HBG	TRT	SANS HU	8.06	5.60	11.70	1.50	0.09 (-0.3/0.02)
		SOUS HU	8.21	6.40	10.70	1.37	
NEUT		SANS HU	52.5	36.2	70	14.95	0.000 (12.37/24.21)
		SOUS HU	34.2	25.5	47.6	10.96	
GR		SANS HU	3.13	1.93	5.19	0.82	0.000 (-0.88/ -0.63)
		SOUS HU	3.90	2.19	8.40	1.38	

L'analyse des paramètres érythrocytaire montre des valeurs non significante de taux de d'hémoglobine chez les patients sans et sous traitement, avec une moyenne soit respectivement **8.06** g/dl et **8.21** g/dl, ainsi que le nombre des globules rouges était élevé chez les cas sous traitement **8.40±2.19** 10⁹/l par rapport aux sujets sans traitement **5.19±1.93** 10⁹/l.

Concernant les paramètres leucocytaires, nos résultats indiquent diminution significative des neutrophiles chez les cas sous traitement d'une moyenne de 34.2% par rapport aux sujets sans traitement d'une moyenne de 52.2%.

IV.1.2 Répartition selon les paramètres d'hémolyse

Tableau 21. Répartition selon les paramètres d'hémolyse.

Chapitre 3 : Résultats

			Moyenn e	Minimu m	Maximu m	Ecart- type	P IC
Hb Sériqu e	TRT	SANS HU	2373	435	6762	1398	0.000 (721.73/ 999.9)
		SOUS HU	1512	213	2883	685	
BIL IND		SANS HU	23	11.15	54.43	16.41	0.006 (-12.12/-2.01)
		SOUS HU	30.07	4.18	95.83	26.78	
BILD		SANS HU	47.44	5.43	95.74	43.59	0.000 (37.03/47.98)
		SOUS HU	4.93	3.15	7.56	1.21	
BIL T		SANS HU	53.23	18.01	84.59	26.78	0.000 (12.82/ 23.57)
		SOUS HU	35.02	8.28	100.12	26.99	
ASAT		SANS HU	41	33	56	9	0.000 (7.03/ 11.02)
		SOUS HU	32	17	49	9	
ALAT	SANS HU	12	3	27	9	0.000 (-12.39/ - 3.82)	
	SOUS HU	20	9	86	21		

Les résultats qui concerne les paramètres d'hémolyse étaient significantes ($p < 0.05$).

IV.1.3 Répartition selon les paramètres se stress oxydatif

Tableau 22. Répartition selon les paramètres de stress oxydatif.

Chapitre 3 : Résultats

			Moyenn e	Minimu m	Maximu m	Ecart -type	P IC
MetHb plasmati que	TRT	SANS HU	46.25	0.25	119.27	39.78	0.2 (-7.64/ 1.96)
		SOU SHU	49.09	0.25	158.62	42.00	
MetHb GR		SANS HU	15.62	0.25	88.08	18.49	0.000 (2.39/ 6.23)
		SOU SHU	11.31	1.52	60.81	11.89	
MDA		SANS HU	0.0554	-0.1330	0.2800	0.1288	0.09 (-0.044/ 0.003)
		SOU SHU	0.0763	-0.0320	0.4260	0.1542	

La MetHb chez les deux formes est supérieur à la valeur de référence (< 2%). Mais elle était plus élevé chez les sujets sans traitement par rapport les sujets sous traitement.

Les valeurs de MDA sont presque les mêmes chez les sujets sans et sous traitement avec des moyennes de 0,005 et 0,007 respectivement, alors les résultats étaient non significantes, ce qui est logique car le stress oxydatif est une caractéristique de cette maladie, chez les sujets drépanocytaires en général (aucun impact sur le stress oxydatif).

IV.1.4 Répartition selon la turbidité cellulaire

Tableau 23. Répartition selon la turbidité cellulaire.

			Moyen ne	Minim um	Maximu m	Ecart-type	P IC
Turbidité cellulaire	TR T	SANS HU	0.9896	0.2573	4.0484	0.6940	0.000 (-3.26/ -2.12)
		SOUS HU	3.6876	0.3543	34.1441	8.0106	

Le traitement hydroxyurée améliore la turbidité et la stabilité de la cellule, ce qui est cohérent à nos résultats qui montre une augmentation hautement significative chez les sujets sous traitement **34.14±0.35**

Chapitre 3 : Résultats

V. Répartition selon le frottis sanguin

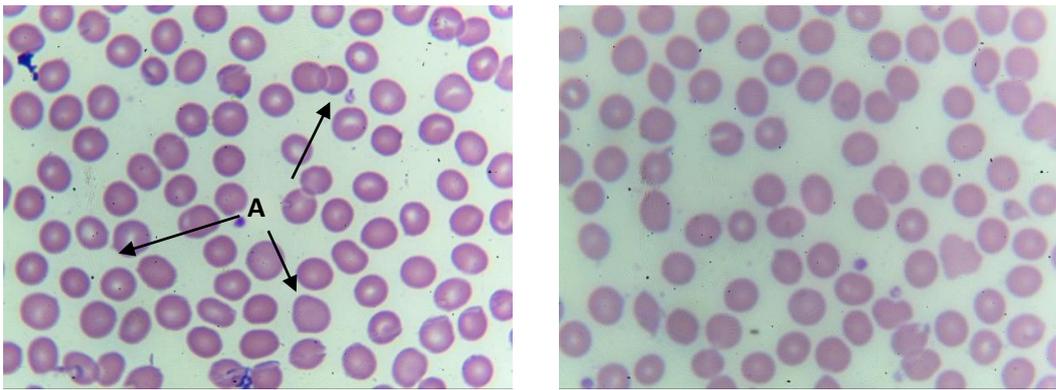


Figure21 : Frotti sanguin des sujets sains AA réalisé par microscope optique GX100 coloration MGG.

A : globules rouges normaux

V.1.1 La forme homozygote SS

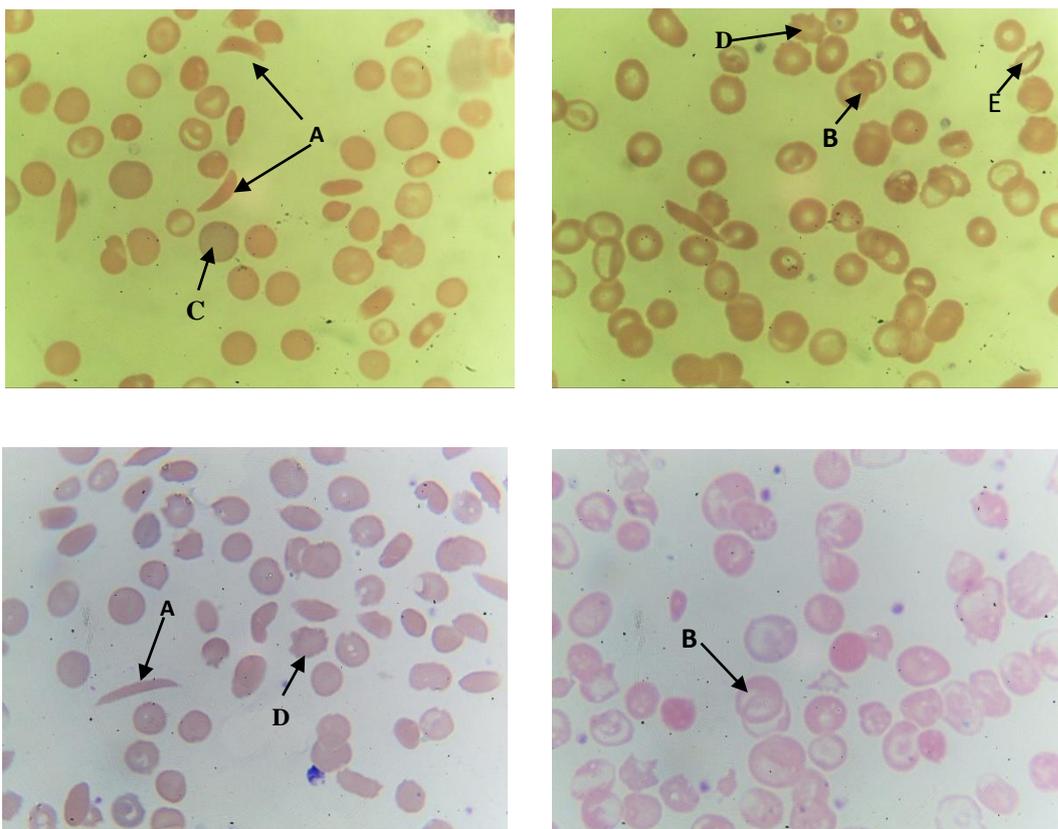


Figure22 : Frotti sanguin des cas drépanocytaires homozygotes SS réalisé par microscope optique GX100, coloration MGG.

L'examen du frottis sanguin montre une présence de plusieurs malformations :

Chapitre 3 : Résultats

A : drépanocyte (hématie falciforme). B : rouleaux d'hématies.

C : microsphérocyte.

D : Echinocyte.

E : Stomatocyte

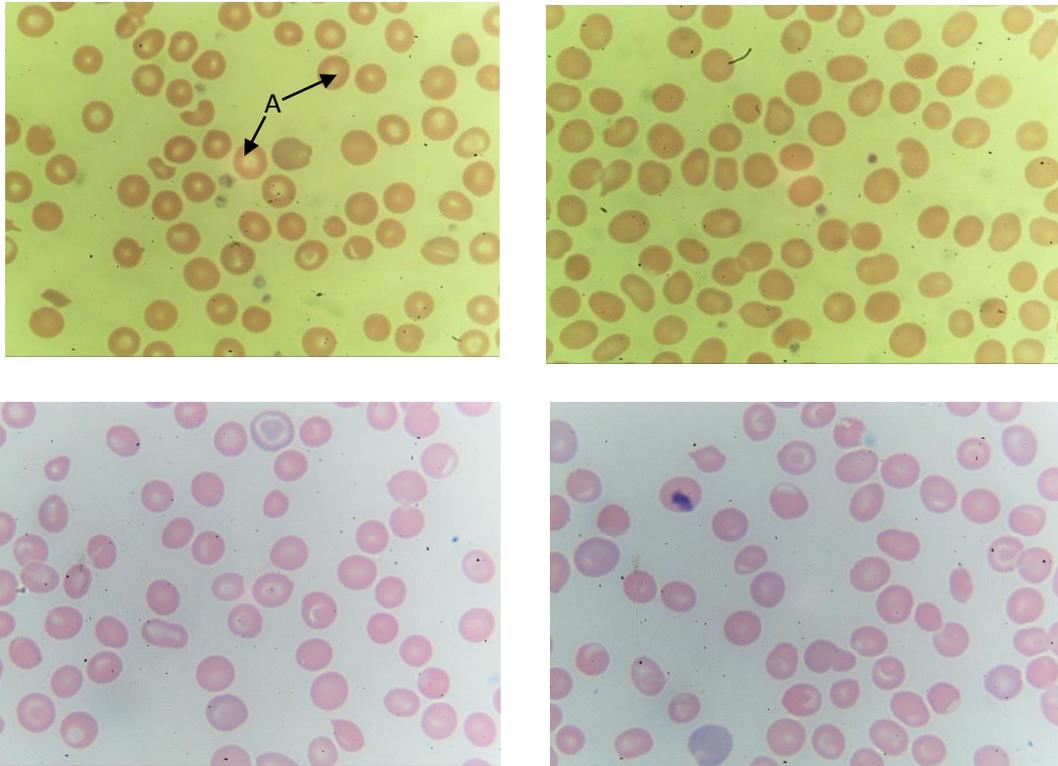


Figure23 : Frotti sanguin des cas drépanocytaires hétérozygotes composites SC réalisé par microscope optique GX100, coloration MGG.

A : cellule cible

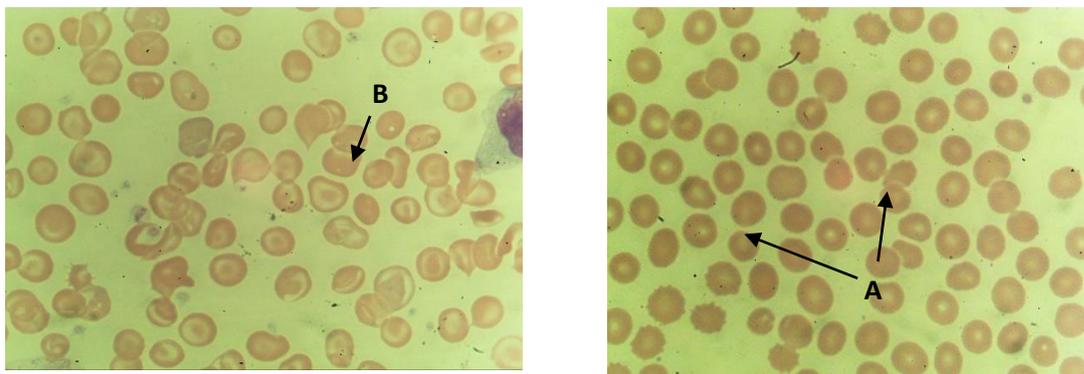


Figure24 : Frotti sanguin des cas drépanocytaires hétérozygotes S β réalisé par microscope optique GX100, coloration MGG.

A : cellule cible

B : rouleau d'hématie

Discussions

Chapitre 4 : Discussion

Discussion

Il s'agit d'une étude de type série de cas, réalisée au niveau du laboratoire central CAC Blida durant une période de 4 mois allant de Mars 2022 au Juillet 2021.

Nous avons travaillé sur une population malade composé de population malade drépanocytaire homozygote (SS) et composite (SC, S β) qui ont été réparti sur la sévérité de la maladie, forme sévère de et forme modérée, soit respectivement 59.61% , 40.38%et nous avons pas pris en considération les formes mineurs c'est par rapport au centre spécialisé qui prend en charge les malades qui ont une gravité importante par rapport au forme légère .

Nous avons comparé les données de cette population par rapport à la population témoins, qui sont des sujets normaux (AA) non drépanocytaire et non β -thalassémique donc qui ne présentent aucune hémoglobinopathie.

Au cours de l'évaluation de nos résultats, nous avons trouvé le nombre de la forme homozygote SS était le plus nombreux (27 sujets) suivis des hétérozygotes composites S β (22 cas) et 3 sujets SC, ce qui signifie que la forme homozygote est la forme la plus fréquente de cette affection, mais d'autre allèle des gènes S β de l'Hb peuvent s'associe à l'HbS et induire un SDM selon (**Chiabi, 2014**).

La drépanocytose est une maladie génétique non liée au sexe et qui touche autant les hommes que les femmes avec un sex-ratio (H/F) proche du 1 (**Glawdis, 2012**). Ce qui suppose qu'il n'existe pas de prédominance d'un sexe par rapport à un autre. Dans notre étude, il y avait ne légère prédominance masculine avec un pourcentage de 57.3%, et un sex-ratio au allons tours de 01(1.3). Cette hémoglobinopathie causée par une mutation ponctuelle du gène β -globine situé sur le chromosome 11. Cette mutation unique résulte de la transversion Adénine→Thymine au niveau du 17e nucléotide de l'ADNc affectant le 6ième codon de la chaine β -globine. Elle entraîne le remplacement de l'acide glutamique en position 6 par une valine (β 6Glu→Val). (**Galacteros et al., 1996**).

L'âge moyen de nos patients était de **26 ans**, ce qui signifie que l'évolution est fatale avant l'âge adulte. Les signes cliniques de la maladie font leur apparition dans les premiers mois ou les premières années de vie, quand l'hémoglobine drépanocytaire a progressivement remplacé l'hémoglobine fœtale selon (**Alexandre et al ., 1997**)

Chapitre 4 : Discussion

Notre étude avait pour but d'identifier les perturbations hémobiologiques et les anomalies morphologiques des GR et les paramètres d'hémolyse ainsi d'évaluer le taux de méthémoglobine et le statut du stress oxydatif ainsi la turbidité cellulaire chez les patients atteints de drépanocytose en comparaison avec des témoins d'une part, et une comparaison aux seins de la population malades des selon la sévérité et selon l'administration de traitement hydroxyurée HU.

Nous avons trouvé une anémie très sévère chez la population malade par rapport aux témoins. Nous avons confirmé une diminution de taux d'hémoglobine, des GR et chez les cas $p < 0.05$ et une élévation de GB chez les drépanocytaire en comparaison avec les témoins, les hématies falciformes, rigides car rétractées, sont rapidement phagocytées par les cellules réticulées, d'où une hyperhémolyse, c'est ce qui explique l'augmentation du nombre de GB (**Chiabi and Beyeme, 2004**).

Nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par **Nacoulma et al, (2006)** montrent un taux d'Hb moyen de **7,8 g/dl** chez les homozygote SS. Selon **Kafando et al (2008)**, le mécanisme moléculaire est le remplacement par une valine de l'acide glutamique en position 6 de la chaîne de la globine entraînant la production anormale de l'hémoglobine S, cause de la déshydratation des globules rouges et d'un défaut de leur déformabilité (drépanocytes) liées à la polymérisation des molécules d'HbS en milieu pauvre en oxygène, ce qui explique la diminution du taux d'Hb A.

Au cour de l'analyse statistique de bilan d'hémolyse, nos résultats permettent de constater que les valeurs de l'hémoglobine sérique qui sont non significatives ($p > 0,05$) chez les malades drépanocytaires par rapport à la population témoin ceci pourrai être expliquer aux conditions des prélèvements des donneur sains par rapport au cas. Le prélèvement se fait à partir de la poche non pas de la veine.

Par contre la bilirubine libre elle est d'une moyenne de **24,88 mg/l**, en comparaison avec les témoins **10.87mg/l**, ce qui se rapproche de résultat de l'étude réalisée par **M. Nagara et al 2009**, en France, qui a trouvé que la valeur de la bilirubine libre chez le patient homozygote était élevée à **12,82 mg/l**.

Nous avons trouvé dans notre série une moyenne de **860±389 U/L** de l'enzyme LDH chez les sujets drépanocytaires en comparaison avec les valeurs normal, le

Chapitre 4 : Discussion

taux élevé de LDH peut être observé lorsqu'un grand nombre de globules rouges sont en anémie hémolytique généralement tissulaire (au niveau de la rate) selon **Katto ,2007**

Les résultats statistiques indiquent une augmentation des enzymes transaminase par rapport à les valeurs normaux indique soit un phénomène hémolyse tissulaire que cytolysse hépatique. (**Essono M.E et al., 2004**)

Les résultats de cette étude montrent également la présence d'un stress oxydant chez les sujets drépanocytaires. En présence d'oxygène, l'hémoglobine est capable de s'auto-oxyder, induisant ainsi la formation de méthémoglobine HbFe³⁺ par l'oxydation de Fe²⁺ en Fe³⁺. Cette auto-oxydation de l'hémoglobine génère des radicaux libres selon **Hebbel et al.,1989**, ceci correspond à nos résultats qui montrent une augmentation hautement significative ($p < 0.05$) de taux de la méthémoglobine dans les globules rouges chez les sujets drépanocytaires d'une valeur de **88.08 ± 0.25%** par rapport aux témoins **9.82 ± 0.25%**, ainsi pour la méthémoglobine plasmatique qui était élevé chez les cas **158.62 ± 0.25%**.

Après avoir calculé l'évaluation de la peroxydation lipidique, nous avons confirmé la présence d'un stress oxydatif a partir de nos résultats qui montre une augmentation hautement significative principalement le malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur du stress oxydatif cellulaire ($p < 0.05$) chez les sujets drépanocytaires **0.4260 ± 1.1330** en comparaison avec les témoins **0.0490 ± 0.0830**.

Donc MDA est un aldéhyde réactif majeur résultant de la peroxydation des membranes biologiques a un taux élevés signent un stress oxydatif **selon Siddique et al 2012**.

En fin nous avons confirmé la présence d'un stress oxydant chez les sujets drépanocytaires à l'état de base qui joue un grand rôle dans les phénomènes d'hémolyse, de vaso-occlusion et les atteintes des différents organes selon **Nur et al 2011**.

Alors que la comparaison des valeurs de l'hémogramme, d'hémolyse et du stress oxydatif ainsi la turbidité cellulaire selon la sévérité ainsi que l'administration de traitement HU ou pas ont montré l'absence de crise vaso-occlusive chez les formes sévères et modérés ainsi que le taux d'Hb n'étaient pas significatifs entre les formes sévères d'une moyenne de **8.60g/dl** et modéré d'une moyenne de **8.33g/dl** alors que les signes de l'hémolyse et de stress oxydatif étaient nettement plus significatif chez les formes sévères d'une moyenne **2499** que les formes modérés **1517** , ceci est expliqué par le cycle de polymérisation-

Chapitre 4 : Discussion

dépolymérisation et donc de falciformation-défalciformation qui en fragilisant la membrane érythrocytaire et par conséquent une lyse intravasculaire accrue (**Goodmen, 2004**).

Cette lyse de GR libère le contenu intracellulaire qui va promouvoir l'inflammation, le stress oxydatif et la diminution de la biodisponibilité du NO (**Orf and Cunningham 2015**). Les patients drépanocytaires présentent une multitude d'altération qui va aboutir à une dysfonction vasculaire chronique. Leur plasma contient une quantité importante de cytokine pro-inflammatoire qui activent l'endothélium et aboutissent à stimuler l'inflammasome via la voie NF KB, notamment qui conduit à l'expression de NLRP3n, menant *in fine* à des dysfonctionnements endothéliaux. (**Li et al., 2013**)

La réalisation du frottis sanguin sous le microscope optique d'un patient drépanocyttaire nous a permis d'observer la présence des hématies falciformes et d'autres malformations des hématies. Nous avons comparé ces observations avec celles d'un témoin (hématies normales) nous avons trouvé qu'elles étaient différentes et en forme de faucille. Sous forme désoxygénée, cette hémoglobine S est moins soluble que l'hémoglobine A. Elle va alors se polymériser selon un processus coopératif, permettant la rigidification, l'agglutination et la falciformation des globules rouges (**Vanbourdolle et al., 2007**).

De ce fait l'utilisation a montré des effets thérapeutiques importantes de l'HU dans le traitement de la drépanocytose, en effet l'HU induit :

- Augmentation de l'HBF ce qui va limiter la polymérisation de l'HBS en diminuant sa concentration intracellulaire.

- HU en tant qu'agent cytotoxique va aboutir à une neutropénie où nous avons trouvé des valeurs significatives de taux de neutrophile chez les cas sous HU d'une moyenne de **34.2%** et une augmentation chez les cas sans traitement avec une moyenne de **52.5%**. Ceci va aboutir à une réduction drastique de l'inflammation et des interactions intracellulaires et donc le phénomène d'adhérence vasculaire (**Pule et al., 2015**). Ceci va diminuer le stress oxydatif chez les malades qui sont sous HU, ceci a été observé dans nos résultats où nous avons trouvé une moyenne de **11.31** de méthémoglobine érythrocytaire chez les patients sous traitement, contrairement aux cas sans HU, avec une moyenne de **15.62**

- HU améliore le profil rhéologique du patient ceci justifie la diminution de la déformabilité des globules rouges et augmentation de l'agrégation des globules rouges/ la

Chapitre 4 : Discussion

force des agrégats affecte le flux sanguin et peut participer à la survenue de l'anémie falciforme chez les patients atteints de SDM. Nos résultats suggèrent que le remplacement faucille par du plasma sain pourrait améliorer la rhéologie des globules rouges car de la normalisation de plusieurs paramètres plasmatiques tels que les molécules proagrégantes ou le stress oxydatif (**Lamar et al., 2012**) , ceci va être constaté facilement dans par la diminution de l'Hb sérique , la bilirubine totale et conjugué chez les malades traités ainsi que la turbidité cellulaire qui est significativement plus élevée chez les malades traités, meilleur déformabilité cellulaire.

Conclusion

Conclusion

La drépanocytose est une maladie génétique non liée au sexe et qui touche autant les hommes que les femmes avec un sex-ratio (H/F) proche du 1.

Au cours de l'évaluation de nos résultats, nous avons trouvé le nombre de la forme homozygote SS était le plus nombreux, ce qui signifie que la forme homozygote est la forme la plus fréquente de cette affection. Ainsi l'âge moyen de nos patients était de 26 ans, ce qui signifie que l'évolution est fatale avant l'âge adulte.

Nous avons trouvé une anémie très sévère chez la population malade par rapport aux témoins, les résultats de cette étude montrent également la présence d'un stress oxydant chez les sujets drépanocytaires.

Après avoir calculé l'évaluation de la peroxydation lipidique, nous avons confirmé la présence d'un stress oxydatif à partir de nos résultats qui montre une augmentation hautement significative principalement le malondialdéhyde (MDA) qui est un marqueur du stress oxydatif cellulaire ($p < 0.05$) chez les sujets drépanocytaires

Alors que la comparaison des valeurs de nos tests biologique, selon la sévérité ainsi que l'administration de traitement HU ou pas ont montré l'absence de crise vaso-occlusive chez les formes sévères et modérés.

Les signes de l'hémolyse et de stress oxydatif étaient nettement plus significatif chez les formes sévères que les formes modérées, ceci est expliqué par le cycle de polymérisation-dépolymérisation et donc de falciformation-défalciformation qui en fragilisant la membrane érythrocytaire et par conséquence une lyse intravasculaire accrue

Si l'implication du stress oxydant est déjà bien établie dans la drépanocytose, il n'y a en revanche que très peu de données relatives à l'analyse de corrélations entre l'expression des marqueurs pro- ou antioxydants et les complications, notamment les crises vaso-occlusives. Ces corrélations permettraient de préciser d'éventuelles cibles du stress oxydant. De telles études, qui nécessitent l'inclusion de grandes cohortes de patients drépanocytaires suivies longitudinalement, restent à être menées.

En effet, nos résultats concordent avec les études menées par **Ware et al., 2019**, que le traitement HU n'exerce pas d'effet cytotoxique dans l'anémie falciforme des patients drépanocytaires par les analyses étudiées ici. HU a été montré être capable de moduler les

Conclusion

effets oxydatifs et inflammatoires, et peut même favoriser un effet protecteur sur ces cellules.

Ce travail peut constituer une base pour de futurs travaux. Dans un perspective avenir, il est préférable de :

- Améliorer les études sur le stress oxydatif.
- Utilisation des antioxydants : Voxelotor, qui est une des cibles thérapeutique potentielles est d'inhiber directement la polymérisation de l'HBS. Cette thérapie offre une nouvelle option de traitement aux patients atteints de cette maladie grave et constituant un danger de mort.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Afonso, V et al. (2007).** « Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydesdismutases : Rôle dans les maladies rhumatismales», *Revue du Rhumatisme*, n°74, p. 636-643.
- **Alexandre. L, Keclard. L, Romana. M, Saint-Martin. C, Lavocat-Bernard. E, Midonet .N, et al. (1997).** Efficiency of prenatal counselling for sickle cell disease in Guadeloupe ., *Genet Couns*; vol. 8, p 25-32.
- **Amer, J., Ghoti, H., Rachmilewitz, E., Koren, A., Levin, C., & Fibach, E. (2006).** Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology*,132(1), 108–13. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05834.x>
- **An, X., Mohandas, N. (2008).** Disorders of red cell membrane. *Br. J. Haematol.* 141, 367–375.
- **Asakura, T., Minakata, K., Adachi, K., Russell, M. O., & Schwartz, E. (1977).** Denatured hemoglobin in sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, 59(4), 633–40.
- **Asmus, K.D , Bonifacic, M. (2000).** « Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise», *Free radicchemIn*, p. 3-53.
- **Atricia Aguilar-Martinez. (2007).** ÉR;YTHROCYTES, Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes, Erslev AJ. Erythropoietin. *N Engl J Med* 1991;324: 1339-44.
- **Binet C, 2009.** «Erythropoïèse : Cellules souches, morphologie, compartiments, régulation,» Tours, France
- **Bonnefont-Rousselot, D., Thérond, P., Delattre, J. (2003).** Radicaux libres et anti-oxydants. *Biochimie Pathologique: Aspects Moléculaires et Cellulaires*.
- **Borel JP, Maquart FX, Peuch C. (1997) .** *Biochimie dynamique*. Paris : De Broeck et Larcier .
- **Bradai. Mohamed. (2013).** Il faut identifier les porteurs sains de la drépanocytose., *Santé MAG*, n°19.
- **Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000).** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 29(3-4), 222–30.

Références bibliographiques

- **Chantal KOHLER. (2010-2011)** .Les cellules sanguines, collège universitaire et hospitalier des histologistes, embryologistes, cytologistes et cytogénéticiens (CHEC) . 1:2:3:4:5:6:7:9-18.
- **Chiabi. A Beyeme Owono. M. (2004)**. Epidémiologie de la drépanocytose. Clinics in Mother and Child Health; vol.1, n°1 .
- **Couprrie, 2000**. Les hémoglobinopathies. FC Hémoglobinopathie.
- **Das, S. K., & Nair, R. C. (1980)**. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. British Journal of Haematology, 44(1), 87–92.
- **Dasgupta, T., Hebbel, R. P., & Kaul, D. K. (2006)**. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. Free Radical Biology & Medicine, 41(12), 1771–80. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed>.
- **Defraigne, J.O et Pincemail, J. (2008)**.« Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités», Rev Med Liège, n°6, p. 10-19.
- **Dembelle A., 2010**. PRISE EN CHARGE DE LA CRISE DOULOUREUSE DREPANOCYTAIRE SELON LES CRITERES DE L'OMS EN MILIEU PEDIATRIQUE [Thèse]. Bamako : Université de Bamako.
- **Favier A., (2003)**. Le stress oxydant. L'actualité chimique, 108p
- **Favier A., (2006)**. Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- **Galacteros F., Bardakdjian-Michau J., Briard ML. (1996)**. Détection néonatale de la drépanocytose en France métropolitaine, ArchPédiatr ; 3. 1026-31.
- **Garabedian. M, Linglart. A, Mallet. E et al. (2011)**. Métabolisme phosphocalcique et osseux del'enfant., Médecine-Sciences Publications, Lavoisier, p 172-174 .
- **Giroto R, Bégué P, Galacteros F. Drépanocytose. (2003)**. Paris: John Libbey Eurotext;;p.1- 324.
- **Gizi, A., Papassotiriou, I., Apostolakou, F., Lazaropoulou, C., Papastamataki, M., Kanavaki, I., ... Kanavakis, E. (2011)**. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant–antioxidant status. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 46(3), 220–225.
- **Gladwin, M. T., & Vichinsky, E. (2008)**. Pulmonary complications of sickle cell disease. The New England Journal of Medicine, 359(21), 2254–65.

Références bibliographiques

- **Glawdis D. LA DREPANOCYTOSE A L'OFFICINE. (2012).** DISPENSATION DU SIKLOS® ET EDUCATION THERAPEUTIQUE [Thèse]. Lorraine : université de Lorraine.
- **Gulbis. B, Ferster. A. (2005).** Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* ; 294 : 81-90
- **Haleng Guizouarn, Sonia Martial, and Franck Borgese. (2006).** Propriétés inattendues de l'échangeur anionique du globule rouge : la leçon des poissons. *médecine/sciences*, 22(10) :824–825.
- **Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1984).** Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, 1(8391), 1396–7.
- **HAS (2010).** Haut autorité de santé. Service des Maladies chroniques et dispositifs d'accompagnement des malade, 43.
- **Hebbel R P , Eaton J W , Balasingam M, Steinberg M H. (1982)** .Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest*, 70: 1253-9 .
- **Hebbel, R. P., Morgan, W. T., Eaton, J. W., & Hedlund, B. E. (1988).** Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1), 237–41.
- **Hélène Guizouarn, Sonia Martial, and Franck Borgese. (2006).** Propriétés inattendues de l'échangeur anionique du globule rouge : la leçon des poissons. *m médecine/sciences*, 22(10) :824–825.
- **Hoffman, R; Benz, EJ; Silberstein, LE; Heslop, H; Weitz J; Anastasi, J. (2012).** *Hematology: Basic Principles and Practice* (6th ed.). Elsevier. ISBN 978-1-4377-2928-3.
- **Jclin I, (2004).** « Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence», vol.13, p.4-7.
- **Kafando E, Savadogo LG et Ayéroué , (2008).** Les syndromes drépanocytaires majeurs : une enquête anonyme au près du corps médical au Burkina-Faso. *Med. Trop.* 68. 241 -246.
- **Kafando E, Savadogo LGB, Ayéroué J, et al. (2008).** Les syndromes drépanocytaires majeurs : une enquête anonyme auprès du corps médical au Burkina-Faso. *Med Trop (Mars)*. ;68(3):241–6.

Références bibliographiques

- **Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. (2007)** Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* ;21:37–47.
- **Kato GJ., (2015).** Defective nitric oxide metabolism in sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*;62:373–4.
- **Kaul D K, Fabry M E. (2004).** In vivo studies of sickle red blood cells. *Microcirculation*, 11:153-65.
- **Kohen, R., & Nyska, A. (2002).** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–50.
- **Krinsky, N I., (1989).** Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 7(6), 617–35.
- **Lacoste. C, Picard. V, Guitton. C, Raphael Rapetti-Mauss et al. (2015).** A mutation in the Gardos channel is associated with hereditary Xerocytosis.
- **Lamarre , Y., Romana, M., Waltz , X., et al., (2012).** Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vasoocclusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica*,97, 1641-1647.
- **Lamarre Y, Romana M, Waltz X, et al., (2012).** Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. *Haematologica* ;97:1641–1647.
- **Laouali Soheib. , (2016)** - Etude épidémiologique de la drépanocytose dans la région de Constantine, mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine, p ;55.
- **Leport Dominique., (2004).** La drépanocytose dossier complet sur la maladie ., espace pédagogique ., centre de drépanocytose au lycée de Pointe Noire ., science de la vie et de la terre.
- **Li, J., Yin, Q. and WU, H., (2013).** Structural basis of signal transduction in the TNF Receptor superfamily . *Adv Immunol*, 119,135-135.
- **Mehta. AB, Hoffbrand. AV ., (2003)** .Hématologie., De Boeck Supérieur , p 82-83.

Références bibliographiques

- **Migdal C, Serres M, (2011).** Medecine Sciences, Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant, 27(4):405-412
- **Nagara M, Alba-Sauviat C, Simeon D, Gaudeau-Toussaint M.-F, Fontvielle F, Faucher G, 2009.** L'hémoglobinoase C homozygote : à propos d'un cas de découverte fortuite. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, vol. 24, no 4, p. 210-216
- **Nayalex ., (2014) .** Sensibilisation au Dépistage néo-natal de la Drépanocytose en France.
- **Nur E , Biemond B J , Otten H M, Brandjes D P , Schong J J (2011).** Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management . Am J Hematol, 86 :484-9 .
- **Nur, E., Brandjes, D. P., Schnog, J.-J. B., Otten, H.-M., Fijnvandraat, K., Schalkwijk, C. G., & Biemond, B. J. (2010).** Plasma levels of advanced glycation end products are associated with haemolysis-related organ complications in sickle cell patients. British Journal of Haematology, 151(1), 62–9.
- **Orf, K., and Cunnington , Aj. (2015).** Infection-related hemolysis and susceptibility to Gram. negatif bacterial co-infection. Front microbiol, 6,666.
- **Osarogiagbon, U. R., Choong, S., Belcher, J. D., Vercellotti, G. M., Paller, M. S., & Hebbel, R. P. (2000).** Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. Blood, 96(1), 314–20.
- **Petit E, (2013).** PROBLÈMES POSÉS PAR LA SURVENUE D'UNE GROSSESSE CHEZ UNE PATIENTE PORTEUSE D'UN SYNDROME DRÉPANOCYTAIRE MAJEUR [Thèse]. Lille : Université du droit et de la santé-Lille 2, 95(1), 295-209.
- **Pillou, F (2014).** « Radicaux libres – Définition», Journal des Femmes.+
- **Puppo, A et Halliwell, B (1988).** «Formation for hydroxyl radicals from hydrogen peroxide inthe presence of iron. Is haemoglobin a biological fentonreagent? »,J Biochemistry, n°249, 185-90.
- **REZO DREPANO/SS.** La drépanocytose [En ligne]. Congo [consulté Avril 2022]. Disponible sur : <http://www.rezodrepano.org/>
- **Rust M B, Alper S L , Rudhard Y , Shmukler B E, Vicente R , Brugnara C, Trudel M, - Jentesch T J, Hunber C A (2007).** Disruption of erythroid K-Cl

Références bibliographiques

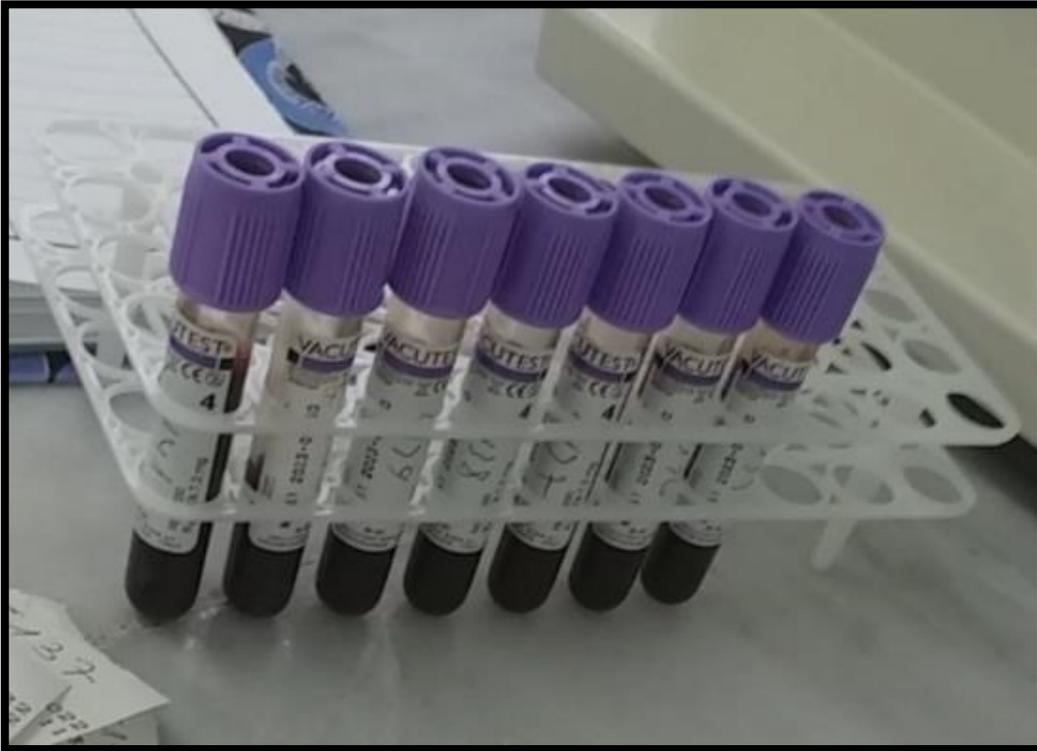
- cotransporters alter erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *J Clin Invest*, 11.
- **Siddique, Y.H., Ara, G., Afzal, M. (2012).** Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. *Dose-Response* 10, 1–10
 - **Silva, D. G. H., Belini Junior, E., de Almeida, E. A., & Bonini-Domingos, C. R. (2013).** Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radical Biology & Medicine*, 65, 1101–9.+
 - **Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM (2019).** Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol*;14:263–92.
 - **Sundd P, Gladwin MT, Novelli EM., (2019).** Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Pathol*;14:263–92.
 - **Théron, P., Denis, B. (2005).** Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote: effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. *15* :198-99.
 - **Tiendrebeogo TJ., (2013).** PRISE EN CHARGE DES SYNDROMES DREPANOCYTAIRES MAJEURS CHEZ LES ENFANTS DE 0 A 15 ANS AU CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE PEDIATRIQUE CHARLES DE GAULLE ET AU CENTRE MEDICAL SAINT CAMILLE DE OUAGADOUGOU : MARQUEURS GENETIQUES, CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET COÛT MEDICAL DIRECT DE LA PRISE EN CHARGE. [Thèse]. Ouagadougou : Université de Ouagadougou, 66(2), 362-209.
 - **Tripette, J., Alexy, T., Hardy-Dessources, M.-D., Mouguel, D., Beltan, E., Chalabi, T., ... Connes, P. (2009).** 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*, 94(8), 1060–5.
 - **Trudel M, De Paepe, M E, Chretien N, Saadane N , Jacmmain J, Sorette M, Hoang T, Beuzard Y (1994).** Sickle cell disease of transgenic SAD mice. *Blood*, 84:3189-97 .
 - **Vanbourdolle M. et collaborateurs, (2007).** Biochimie hématologie, P 6-16.
 - **Vendeuvre J, L Nassy G, Jeuge S, Crlie M (2012).** L'oxydation des produits carnés : Méthodes de mesure et moyens de maîtrise. *IFIP Institut du porc*.

Références bibliographiques

- **Vichinsky, E., Hoppe, C.C., Ataga, K.I., Ware, R.E, Nduba, V., El-Beshlawy, A., Hassab, H., Achebe, M.M. (2019)** A Phase 3 Randomized Trial of Voxelotor in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*, 381, 509-519.
- **Ware RE, McGann PT, Quinn CT (2019)**. Hydroxyurea for children with sickle cell anemia: prescribe it early and often. *Pediatr Blood Cancer*, 66(8):e27778
- **Wood, K. C., & Granger, D. N. (2007)**. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 34(9), 926–32.
- **Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002)**. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–49.
- **Zittoun. R, Marie. P. J. A, Samama. M., (1992)**. Manuel hématologie., DOIN Editeurs.

Annexe I

Prélèvement du sang sur des tubes EDTA :



Annexe II

Fiche de renseignements

Fiche de renseignements		
Nom :	Prénom :	Age :
Forme génétique :		
Date de diagnostic :		
Drépanocytaire :	Majeur <input type="checkbox"/>	Modéré <input type="checkbox"/> Sévère <input type="checkbox"/>
Complications :		
- Crise vaso-occlusive :		
- Agglutinine irrégulière		
- Foyer infectieux		
Transfusion :	Date :	
Traitement :	Date :	

Annexe III

Frotti sanguin coloré par coloration MGG :



Annexe IV

Réactifs utilisés pour les analyses chimiques :

- **Coloration des frottis sanguins :** coloration au MGG (Colorants de May Grunwald Giemsa).
- Alcool 70%.
 - **Dosage l'hémoglobine libre :** tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_2 \text{HPO}_4$).
 - **Dosage de la méthémoglobine :** ferricyanure de potassium $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$
- Tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_2 \text{HPO}_4$).
- Tampon phosphate salin PBS.
- Eau physiologique NaCl.
 - **Test des Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique (test à TBARS) :**
- **TCA :** Acide trichloroacétique
- **TBA :** Acide thiobarbiturique
- **NaOH :** Hydroxyde de sodium
- **EDTA :** Acide éthylène diaminetétraacétique
- **TCA à 30%, NaOH à 0.05M, TBA à 1%, EDTA à 0.1mol/l.**
- **Protocole :**
 - Nous avons ramené un prélèvement témoin du CTS d'une personne saine de groupe sanguin O+.

- Après centrifugation à 3000g pendant 10min, le culot est ensuite lavé 3 fois à l'eau physiologique.
 - Préparation de l'hématocrite à 20%.
 - Réaliser un contrôle négatif, témoin négatif.
 - Le test est réalisé sur les plasmas des patients drépanocytaire conservés.
 - Le plasma de chaque patient est séparé sur deux tubes secs :
 - Le 1^{er} contient : un volume de plasma + un volume d'hématocrite
 - Le 2^{ème} contient : un volume de plasma + un volume d'eau physiologique, puis incubés pendant 24h à 37 °c.
 - Ajouter la solution de TCA préparé sur les tubes et incubé pendant 2h à 0°C.
 - Réchauffer les tubes au bain marie puis centrifuger à 3000 r pm pendant 10 min à 4°.
 - Récupération des surnagent sur deux tubes sec pour chaque patient, un de globule rouge, et l'autre celui de plasma.
 - Ajouter dans chaque tube un volume de TBA, un volume de EDTA et chauffé à 95°C pendant 15 min.
 - Refroidir les tubes et faire la lecture au spectrophotomètre à 534nm.
- **Dosage de la turbidité cellulaire** : tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{NH}_2 \text{HPO}_4$).
- **Eau physiologique**
 - **Eau distillée**

Annexe V

Appareillage :

Spectrophotomètre Mindray BA-88A

UN spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Dans la pratique, l'appareil réalise une mesure de l'intensité de la lumière après son passage au travers d'une cuve contenant la solution à étudier.



Centrifugeuse Thermo Scientific

Une centrifugeuse est un appareil destiné à imprimer une force centrifuge, grâce à un mouvement de rotation, à un mélange généralement liquide/solide.



Coulter Sysmex XT4000i

Cet automate permet la numération des éléments figurés du sang,, le calcul de l'hématocrite, le dosage de l'hémoglobine et éventuellement l'établissement de la formule leucocytaire.



Automate de coloration Sysmex

Cet automate permet la réalisation des frottis sanguins et les colorer automatiquement, idéal pour l'analyse morphologique numérique.



Cobas Integra e400 plus

Il a été développé pour des dosages in vitro quantitatifs et qualitatifs pour une large gamme d'applications (notamment les marqueurs de l'anémie, osseux, cardiaque, tumoraux... etc.)



Microscope optique LEICA DM 1000

Microscope dans sa forme la plus réduite est constitué d'un simple objectif et d'un oculaire, c'est-à-dire de deux lentilles convergentes. Ces deux lentilles forment une image très agrandie de l'objet et permettent d'observer des détails fins dans l'échantillon.



Annexe VI

Les logiciels utilisés :

Logiciel	Principe
Logiciel caméra Future WinJoe	Future Winnoc est le programme logiciel fournit avec le microscope numérique (appareil photo) et le télescope numérique qui offre une large gamme de commandes de caméra, de traitement d'image et de gestion de fichiers, image. Fonction puissante de contrôle.
SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)	Son objectif est d'offrir un logiciel permettant de réaliser la totalité des analyses statistiques.