

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE MOSTEFA BEN BOULAÏD – BATNA 2
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE DES ORGANISMES



THESE

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en sciences

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie et Physiologie Animale

Présentée par :

ZIDANI Abla

Thème

**Diagnostic Biologique et Moléculaire de
l'Hémophilie B dans une Partie de la Population
Algérienne**

Soutenue le 14/10/2018

Devant le jury

Président: Mr. Senator Abderrahmane	Professeur	Université Batna- 2-
Rapporteur: Mr. Chafaa Smail	MCA	Université Batna-2-
Examinatrice: Mme. Hambaba Leila	Professeur	Université Batna- 2-
Examinatrice: Mme. Zaama Djamila	Professeur	Université Constantine -1-
Examineur: Mr. Zouaghi Youcef	MCA	Université Constantine -1-
Examineur: Mr. Bennoune Omar	MCA	Université Batna -1-

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements.

A Dieu tout puissant qui m'a donné la force et la patience, la santé, le courage d'accomplir ce modeste travail.

A mon directeur de thèse **Monsieur CHAFAA Smail**, MCA à l'Université de Batna2. Veuillez, trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect et mes vifs remerciements.

Aux Maîtres

Président et membres du Jury :

Professeur **Senator Abderrahmane**

Professeur **Hambaba Leila**

Professeur **Zaama Djamil**

Docteur **Zouaghi Youcef**

Docteur **Bennoune Omar**

Vous me faites un grand honneur en acceptant de juger cette thèse.

Au Professeur **OUARHLENT Yamina**, Médecin spécialiste en Hématologie au CHU de Batna pour son amitié, son aide et serviabilité.

Au Professeur **SALHI Naouel**, Médecin spécialiste en Hématologie au CHU de Constantine pour son aide et serviabilité.

Aux professeur **GOUIDER Emna**, docteur **ELMAHMOUDI Hejer** et professeur **KHARRAT Maher**, Unité d'Hémostase et Thrombose à l'hôpital Aziza Othmana de Tunis en Tunisie et au docteur **LANNOY Nathalie**, Centre de génétique humaine de Bruxelles en Belgique pour leur attention, leur disponibilité et leurs qualités humaines.

Dédicaces

Je dédie cette thèse

A la mémoire de mon encadreur

YAHIA MOULOU

J'aurai tant voulu qu'il soit toujours là

A mon père et ma mère qui m'ont toujours entouré de leur affection sereine

A mon mari et mes enfants

A mes très chers sœurs et frères

Pour tout ce qu'ils ont enduré avec moi

Je vous aime tous et je vous remercie pour votre soutien

A chaque patient atteint de l'hémophilie B; ceux que je connais et les centaines de personnes qui sont atteintes en Algérie et à travers le monde Leur immense courage et leur patience infinie m'ont appris comment combattre sans perdre.

ZIDANI Abba

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Partie théorique

Chapitre I: Rappels sur l'hémostase

I.1. Hémostase primaire.....	1
I.2. Hémostase secondaire (Coagulation).....	1
I.2.1. Acteurs en présence.....	2
I.2.2. Physiologie de la coagulation.....	4
I.2.2.1. Initiation de la coagulation.....	5
I.2.2.2. Amplification de la coagulation.....	6
I.2.2.3. Propagation de la coagulation.....	7
I.2.3. Régulation de la coagulation.....	9
I.3. Fibrinolyse.....	9

Chapitre II: FIX de la coagulation

II.1. Gène du FIX (F9).....	11
II.2. Facteur IX (FIX).....	12
II.3. Rôle du FIX dans la coagulation et ses interactions.....	14
II.3.1. Récepteurs au FIX.....	15
II.3.2. Activation du FIX.....	15
II.3.3. Formation du complexe ténase intrinsèque.....	16
II.3.4. Activation du FX.....	16
II.4. Conséquences du déficit en FIX sur l'hémostase.....	16
II.5. Pathologies moléculaires du gène F9.....	17

Chapitre III: Hémophilie B

III.1. Historique.....	19
III.2. Epidémiologie.....	19
III.3. Transmission et hérédité de l'hémophilie.....	20
III.4. Degré de gravité de l'hémophilie.....	20
III.5. Diagnostic.....	21
III.5.1. Circonstances de découverte.....	21
III.5.2. Diagnostic biologique.....	21
III.5.3. Diagnostic différentiel.....	21
III.5.4. Diagnostic moléculaire.....	22
III.6. Signes cliniques de la maladie.....	22
III.7. Complications.....	23

III.7.1. Arthropathie hémophilique.....	23
III.7.2. Infections.....	23
III.7.3. Inhibiteurs anti-facteurs.....	24
III.8. Traitement.....	24

Partie expérimentale

Chapitre I: Matériel et méthodes

I. Diagnostic biologique.....	25
I.1. Numération des plaquettes.....	26
I.2. Dosage de prothrombine.....	26
I.3. Temps de céphaline + activateur (TCA).....	27
I.4. Diagnostic de confirmation.....	28
I.5. Dosage du FVIII et FIX.....	28
I.5.1. Préparation des plasmas utilisés pour le test.....	28
I.5.2. Dosage du FVIII.....	29
I.5.3. Dosage du FIX.....	29
I.6. Recherche des inhibiteurs.....	29
I.7. Analyses statistiques.....	30
II. Diagnostic moléculaire (recherche de mutations).....	30
II.1. Extraction d'ADN.....	30
II.1.1. Réactifs pour extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang de patients.....	30
II.1.2. Méthode d'extraction d'ADN.....	31
II.1.2.1. Lyse des érythrocytes.....	31
II.1.2.2. Lyse des globules blancs.....	32
II.1.2.3. Dénaturation des protéines.....	32
II.1.2.4. Précipitation de l'ADN à l'alcool.....	32
II.1.2.5. Mise en solution de l'ADN.....	32
II.1.2.6. Estimation de la concentration et le degré de pureté de l'ADN.....	33
II.2. Technique de PCR.....	33
II.2.1. Principe.....	33
II.2.2. Choix des amorces.....	35
II.2.3. Protocole expérimental.....	35
II.3. Electrophorèse.....	38
II.3.1. Principe.....	38
II.3.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.....	38
II.3.2.1. Préparation d'un gel de polyacrylamide.....	39
II.3.2.2. Révélation.....	40
II.3.3. Electrophorèse en gel d'agarose.....	41
II.3.3.1. Préparation d'un gel d'agarose.....	42
II.3.3.2. Dépôt d'ADN et révélation.....	42
II.3.4. Analyse du gel.....	43
II.4. Réaction de séquence : Méthode Sanger.....	43
II.4.1. Principe.....	43
II.4.2. Protocole expérimental.....	44
II.5. Purification de la réaction de séquence.....	45
II.5.1. Principe.....	45
II.5.2. Protocole expérimental.....	45

II.6. Electrophorèse capillaire.....	45
II.7. Analyse des séquences.....	45
II.8. Nomenclature des variations de séquence.....	46
III. Etude <i>in silico</i> des effets délétères des nouvelles mutations.....	46
III.1. Prédiction des effets de la nouvelle mutation c.1184T>C sur la fonction de la protéine FIX.....	46
III.2. Prédiction des effets de la nouvelle mutation c.1184T>C sur la stabilité de la protéine FIX.....	47
III.3. Prédiction des effets de la nouvelle mutation c.1184T>C sur la structure et la fonction de la protéine FIX.....	48

Chapitre II: Résultats et discussion

I. Diagnostic biologique.....	50
I.1. Caractères généraux des malades de l'HB.....	50
I.1.1. Répartition des malades de l'HB selon le sexe.....	52
I.1.2. Répartition des malades de l'HB selon l'âge.....	52
I.1.3. Age au diagnostic.....	53
I.1.4. Circonstances de découverte.....	54
I.1.5. Répartition selon le type d'hémophilie et le degré de sévérité.....	54
I.2. Bilan biologique des malades de l'HB.....	56
II. Diagnostic moléculaire.....	57
II.1. Caractérisation des mutations détectées.....	57
II.1.1. Résultats.....	57
II.1.1.1. Mutations préalablement décrites.....	61
II.1.1.2. Nouvelles mutations.....	69
II.1.1.3. Absence d'identification de mutations responsables de l'HB.....	70
II.1.2. Discussion.....	70
II.2. Corrélation entre mutations détectées et complications de l'HB.....	74
II.2.1. Arthropathies.....	76
II.2.2. Infections.....	77
II.2.3. ACC.....	77
III. Prédiction <i>in silico</i> des effets délétères des nouvelles mutations responsables d'HB dans la population Algérienne.....	78
III.1. Résultats.....	78
III.1.1. Analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la fonction de la protéine FIX.....	78
III.1.1.1. Résultat obtenu par le logiciel PON-P2.....	78
III.1.1.2. Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2.....	79
III.1.1.3. Résultat obtenu par le logiciel Align GVG.....	80
III.1.1.4. Résultat obtenu par le logiciel PROVEAN.....	80
III.1.2. Analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la structure de la protéine FIX.....	81
III.1.2.1. Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0.....	81
III.1.2.2. Résultat obtenu par le logiciel ProSMS.....	82
III.1.2.3. Résultat obtenu par le logiciel INPS.....	83
III.1.2.4. Résultat obtenu par le logiciel MUpro.....	84
III.1.2.5. Résultat obtenu par le logiciel iStable.....	84
III.1.3. Analyse de la mutation c.1184T>C par un logiciel prédisant les effets délétères sur la structure et la fonction de la protéine FIX (Project HOPE).....	85

III.2. Discussion.....	87
------------------------	----

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

5'UTR: 5'Untranslated Transcribed Region
ACC : Anticoagulant circulant
ADNc : ADN codant
Align GVGD: Align Grantham Variation Grantham Deviation
Amorce F : forward (sens)
Amorce R : reverse (anti-sens)
AP : activation peptide
APS : Ammonium persulfate
ARE : Androgen response element
AT : Antithrombine
BDT : Big Dye Terminator
BET : Bromure d'éthidium
BSA : Bovine Serum Albumin
CA : Cell analyseur
CCD : Charge Coupled Device ; dispositif à transfert de charge
CDC: Center for Disease Control
CHBMP: CDC Hemophilia B Mutation Project
CHU : Centre Hospitalo-Universitaire
Da : Dalton
DDG: Différence d'énergie libre
ddNTP : didéoxynucléotides
DMSO : Dimethyl sulfoxide
dNTP: Désoxyribonucléotides
DO: Densité optique
dRhodamine : dichlororhodamine
EDTA : Ethylène-diamine-tétra-acétate
EGF : Epidermal growth factor
EJC : Exon junction complex
ELB : Erythrocytes lysing buffer
F9 : Facteur 9 (utilisé pour le gène)
FAH : Facteur antihémophilique
FII: Facteur II
FIX : Facteur IX (utilisé pour la protéine)
FRET : Fluorescence resonance energy-transfer technology
FT : Facteur tissulaire
FV: Facteur V
FVII: Facteur VII
FVIII : Facteur VIII
FVW : Facteur de Von Willebrand

FX: Facteur X
FXI: Facteur XI
FXII: Facteur XII
FXIII: Facteur XIII
GD : Grantham Deviation
GLA : acide γ -carboxyglutamique
GV : Grantham Variation
HA : Hémophilie A
HB : Hémophilie B
HC : heavy chain
HGVS: Human Genome Variation Society
HNF4a : Hepatocyte nuclear factor 4 alpha
INPS : Impact of Non-synonymous mutations on Protein Stability
INR : International Normalised Ratio
IR : indice de Rosner
ISI : International Sensitivity Index
kDa : kilodalton
KHPM : Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LC : light chain
LRP : Lipoprotein receptor-related protein
MEB : Microscope électronique à balayage
NFS : Numération Formule Sanguine
NMD: Nonsense Mediated mRNA Decay
nt : nucléotides
OMS : Organisation mondiale de la santé
pb : paire de bases
PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1
PCR : Polymerase chain reaction
PDB : Protein Data Bank
PIVKA : Protein Induced by Vitamin K Absence
Pk : Prékalllicréine
PNS : Protéines non structurales
PolyPhen-2: Polymorphism Phenotyping-2
pre : prépeptide
pro : propeptide
Project HOPE : [Have yOur Protein Explained](#)
PROVEAN : Protein Variation Effect Analyzer
qsp : quantité suffisante pour
RAS : Rien à signaler
RFC : Réseau France Coag
rpm : Revolution per minute; tour par minute
SDS : Sodium dodecyl sulfate
SE : Sodium-EDTA
SRE: Système réticulo-endothéliale

SVM: Support Vector Machine
TBE : Tris, Borate, EDTA
TCA : Temps de céphaline activé
TE⁻⁴ : Tris-EDTA
TEMED : Tetramethylethylenediamine
TFPI : Tissue factor pathway inhibitor
Tm : Température melting
TP : Taux de prothrombine
t-PA : Tissue plasminogen activator
TQ : Temps de Quick
UCSC: University of California, Santa Cruz
VHC : Virus de l'hépatite C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Liste des tableaux

N ^o	Titre	Page
1	Les facteurs de coagulation	3
2	Les inhibiteurs des facteurs de coagulation	9
3	Positions et tailles des exons et introns du gène du FIX	12
4	Liste des mutations responsable d'HB répertoriées dans FIX variant database	18
5	Degrés de sévérité d'hémophilie en fonction de l'activité coagulante du facteur de coagulation	21
6	Amorces utilisées pour l'amplification des exons, du promoteur et du poly A du gène F9	35
7	Programme d'amplification de la PCR des exons 1 à 8 (sauf exons 2-3)	38
8	Programme d'amplification de la PCR des exons 2-3	38
9	Concentration du support de l'électrophorèse en fonction de la taille des fragments à séparer	39
10	Concentrations de gel d'agarose recommandées en fonction de la taille des molécules d'ADN	42
11	Représentation de quelques caractères généraux des malades de l'HB	50
12	Répartition des malades de l'HB selon le sexe	52
13	Répartition des malades de l'HB selon l'âge	52
14	Répartition selon le type d'hémophilie et le degré de sévérité	54
15	Bilan biologique des malades de l'HB	56
16	Différentes mutations du F9 chez 39 patients Algériens ayant une HB	58
17	Fréquences des mutations ponctuelles du gène F9	60
18	Détermination du statut des mutations détectées	60
19	Représentation de quelques complications chez des malades de l'HB	74
20	Résultats de l'analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la fonction de la protéine FIX	81
21	Résultats de l'analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la structure de la protéine FIX	85

Liste des figures

N ^o	Titre	Page
1	Les deux voies de la coagulation selon la conception classique	4
2	Phase d'initiation de la coagulation	6
3	Phase d'amplification de la coagulation	7
4	Phase de propagation de la coagulation	8
5	Représentation schématique de la fibrinoformation	8
6	Principaux inhibiteurs de la coagulation	9
7	Position du gène F9 sur le chromosome X	11
8	Du gène au FIXa	14
9	Représentation schématique de l'activation de la protéine mature du FIX sérique	15
10	Schémas simplifiés les cascades d'activation des facteurs de coagulation chez une personne non hémophile (à gauche) et chez une personne hémophile B sévère (à droite)	17
11	Le déficit en FIX produit des caillots qui contiennent des fibres de fibrine anormalement épaisses par rapport à la normale. (MEB, échelle 8µm)	17
12	Transmissions possibles de l'hémophilie	20
13	Electrophorèse en gel de polyacrylamide de tous les exons du F9 de 10 patients atteints d'HB	41
14	Electrophorèse en gel d'agarose du promoteur, huit exons et poly A du gène F9	42
15	Répartition des malades de l'HB selon l'âge	53
16	Répartition selon le type d'hémophilie et le degré de sévérité	55
17	Variation du taux de plaquettes chez les malades de l'HB (p=0,8767)	56
18	Variation du TP chez les malades de l'HB (p=0,5603)	56
19	Variation du TCA chez les malades de l'HB (p< 0,0001)	56
20	Variation du taux du FVIII chez les malades de l'HB (p=0,1625)	56
21	Emplacement des amorces encadrant les mutations du gène F9 sur les exons amplifiés	59
22	Chromatogramme de la mutation c.-52C>T au niveau de la région 5'UTR du gène F9.	61
23	Chromatogramme de la mutation c.323G>A au niveau de l'exon 4 du gène F9	62
24	Chromatogramme de la mutation c.373G>A au niveau de l'exon 4 du gène F9	63
25	Chromatogramme de la mutation c.881G>A au niveau de l'exon 8 du gène F9	64
26	Chromatogramme de la mutation c.1010C>T au niveau de l'exon 8 du gène F9	65
27	Chromatogramme de la mutation c.357T>A au niveau de l'exon 4 du gène F9	66
28	Chromatogramme de la mutation c.892C>T au niveau de l'exon 8 du gène F9	67
29	Chromatogramme de la mutation c.1150C>T au niveau de l'exon 8 du gène F9	68
30	Chromatogramme de la nouvelle mutation c.657_660dupATCA au niveau de l'exon 6 du gène F9	69
31	Chromatogramme de la nouvelle mutation c.1184T>C au niveau de l'exon 8 du gène F9	70
32	Résultat obtenu par le logiciel PON-P2	78
33	Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2	79
34	Résultat obtenu par le logiciel Align GVG D	80
35	Résultat obtenu par le logiciel PROVEAN	80
36	Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0	81
37	Résultat sous forme de diagrammes obtenu par le logiciel ProSMS	82

38	Résultat sous forme d'une valeur DDG obtenu par le logiciel ProSMS	82
39	Résultat obtenu par le logiciel INPS	83
40	Résultat obtenu par le logiciel MUpro	84
41	Résultat obtenu par le logiciel iStable	84
42	Les structures schématiques de la phénylalanine et sérine	86
43	Capture superposée des deux structures 3D du FIX sauvage et mutée	87

Introduction

L'hémophilie est une maladie héréditaire récessive liée au chromosome X, donc touchant quasi-essentiellement les garçons. Elle implique une diminution, voire un déficit total en facteur VIII (FVIII) pour l'hémophilie A (HA) ou en facteur IX (FIX) pour l'hémophilie B (HB) ce qui entraîne un trouble de la coagulation.

L'HB (encore appelée maladie de Christmas) qui concerne environ une naissance masculine sur 50000, est moins fréquente que l'HA. Son incidence exacte en Algérie est inconnue en raison d'absence de données épidémiologiques nationales concernant le nombre de malades, leurs lieux de résidence, le suivi et les traitements reçus.

Chez les patients hémophiles B, le syndrome hémorragique est secondaire à un défaut qualitatif ou quantitatif en FIX. Ce facteur participe à une étape essentielle de l'hémostase en permettant l'activation du facteur X (FX). Donc, il a un rôle central dans la voie intrinsèque de la coagulation. L'absence ou le mauvais fonctionnement de ce facteur est à l'origine de la formation d'un caillot de mauvaise qualité et du développement d'un phénotype hémorragique en absence de traitement adéquat. Le défaut en FIX est responsable d'accidents hémorragiques, notamment articulaires et musculaires. En basant sur le taux d'activité biologique plasmatique de ce facteur, trois degrés de sévérité de la maladie ont été établis : mineure, modérée et sévère.

Le diagnostic est une étape fondamentale dans la prise en charge de l'HB. On considère que le diagnostic précoce de cette maladie conditionne l'efficacité de la prise en charge ainsi que le suivi futur. En cas de prise en charge retardée, les hémorragies, selon leur localisation, peuvent engager le pronostic vital du patient ou donner lieu à des séquelles invalidantes avec une détérioration du muscle ou de l'articulation.

Le diagnostic biologique de l'hémophilie repose sur une Numération Formule Sanguine (NFS) et un bilan de coagulation standard. Le bilan de coagulation, lui, comporte deux tests globaux : Temps de Quick (TQ) et Temps de Céphaline avec Activateur (TCA). L'allongement de ce dernier oriente vers le dosage des différents facteurs du TCA (notamment FVIII et FIX).

Le clonage du gène du FIX (F9) et le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis de déterminer des anomalies moléculaires chez une grande majorité des patients. Cela permet de confirmer le diagnostic, prédire certaines complications du traitement et identifier avec certitude les femmes qui transmettront la maladie.

Cette étude, première du genre en Algérie, représente une démarche pour le diagnostic moléculaire de l'HB dans notre pays. Notre travail a pour but d'identifier les mutations qui produisent les différentes formes de l'HB chez des patients Algériens, de caractériser les mutations du gène F9 et de développer nos connaissances sur les bases moléculaires de cette maladie.

Cette thèse est divisée en deux parties; une étude bibliographique où nous présentons des rappels sur l'hémostase, du gène jusqu'au FIX dont les mutations sont responsables à l'HB, pathologies moléculaires du gène F9 et enfin les signes et les complications de la maladie, son diagnostic jusqu'au traitement.

La deuxième partie est une étude pratique qui comprend deux chapitres. Le premier présente les matériaux et les modalités de dosages des paramètres étudiés. Le second chapitre expose les résultats de cette étude avec leur discussion.

Partie théorique

Chapitre I

Rappels sur l'hémostase

I- Rappels sur l'hémostase

La connaissance de la physiopathologie de la pathologie d'hémophilie nécessite la compréhension de la physiologie de l'hémostase. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la coagulation car c'est au cours de cette étape qu'intervient les facteurs antihémophiliques FVIII et FIX qui sont nécessaires à la phase d'amplification de la coagulation qui permet de générer d'une manière explosive des quantités suffisantes de thrombine pour créer le caillot (Schved, 2007), dont les déficits constituent un facteur majeur de risque.

Toute destruction de l'intégrité du circuit vasculaire à l'origine d'un écoulement sanguin, déclenche une succession de processus cellulaires et biochimiques assurant l'obturation de la brèche et le contrôle de l'hémorragie (De Revel and Doghmi, 2004). L'hémostase répond à l'ensemble de ces mécanismes physiologiques et comprend plusieurs étapes intriquées et interdépendantes qu'il convient d'isoler par souci descriptif en :

- L'**hémostase primaire** qui ralentit le flux sanguin par vasoconstriction et met en jeu les plaquettes et le sous-endothélium afin de colmater la brèche vasculaire par un thrombus plaquettaire blanc aussi appelé clou plaquettaire.
- L'**hémostase secondaire ou coagulation** qui permet de consolider le thrombus plaquettaire par un réseau de fibrine insoluble et la formation d'un thrombus rouge.
- La **fibrinolyse** qui permet de dégrader le caillot de fibrine et donc du thrombus au fur et à mesure que la paroi vasculaire se réimperméabilise.

I.1. Hémostase primaire

Il s'agit de la première étape d'urgence du contrôle hémorragique qui vise à obturer primitivement la brèche vasculaire à l'aide d'un clou plaquettaire ou thrombus blanc en 3 à 5 minutes. Elle met en jeu quatre acteurs essentiels : la paroi vasculaire, les plaquettes, le facteur de Von Willebrand (FVW) et le fibrinogène. Elle comprend classiquement deux phases : la phase vasculaire et la phase plaquettaire (De Revel and Doghmi, 2004).

L'hémostase primaire débute lorsqu'une brèche apparaît dans la paroi vasculaire. La lésion provoque la fixation des plaquettes au sous-endothélium vasculaire par une interaction entre leur glycoprotéine Ib et le FVW. Cet ancrage des plaquettes débouche sur leur activation et elles exposent alors à leur surface le récepteur spécifique du fibrinogène : la glycoprotéine IIb/IIIa. Le fibrinogène peut alors se fixer aux plaquettes et conduit au recrutement d'autres plaquettes : le thrombus blanc est formé.

I.2. Hémostase secondaire (Coagulation)

L'hémostase obtenue par le clou plaquettaire est instable et temporaire, et doit être consolidée par la création d'un réseau protéique qui réalise ainsi une hémostase permanente. Il s'agit du processus de coagulation du plasma sanguin qui aboutit à la transformation du fibrinogène plasmatique circulant soluble en fibrine insoluble enserrant le clou plaquettaire par le biais d'une succession de réactions enzymatiques dont le contrôle continu permet une

limitation locale sans diffusion à distance de la zone lésionnelle (De Revel and Doghmi, 2004).

Le processus central de la coagulation est la génération de la molécule de thrombine, enzyme clé de la coagulation, permettant la transformation du fibrinogène en fibrine et assurant la rétroactivation et l'amplification des différentes étapes tant de la coagulation que de l'hémostase primaire (De Revel and Doghmi, 2004).

I.2.1. Acteurs en présence

La coagulation comme l'hémostase primaire met en jeu des cellules et des facteurs plasmatiques.

➤ **Éléments cellulaires**

La coagulation ne peut se dérouler sans l'existence de cellules ou de substances originaires de ces cellules. Les cellules les plus nécessaires dans la coagulation sont les cellules endothéliales, les monocytes, les plaquettes, et les hépatocytes.

- **Les cellules endothéliales** : ces cellules synthétisent le facteur tissulaire (FT).
- **Les plaquettes** jouent également un rôle dans la coagulation. En effet, elles servent de support à la coagulation. Enfin les plaquettes peuvent délivrer dans le milieu plasmatique de petites parties de membrane appelées microvésicules capables d'amplifier le phénomène de coagulation.
- **Les fibroblastes** sont également capables d'exprimer le FT; ils synthétisent tout comme les cellules musculaires des facteurs impliqués dans l'hémostase secondaire.
- **Les hépatocytes** (cellules du foie) sont impliqués dans la coagulation puisqu'ils sont le centre de la synthèse des facteurs de coagulation.

➤ **Facteurs de la coagulation**

Les facteurs de la coagulation sont des protéines plasmatiques qui participent au processus de la coagulation et dont on distingue trois groupes différents : les protéines à activité enzymatique, les protéines dénuées d'activité enzymatique mais servant de cofacteurs et les protéines ayant un rôle de substrat (De Revel and Doghmi, 2004), on les désigne avec des chiffres romains allant de I à XIII (**Tableau 1**). Ces facteurs sont essentiellement synthétisés par les hépatocytes sous forme de pro-enzymes.

Afin que la formation de fibrine puisse s'effectuer dans le sang, les facteurs de la coagulation doivent premièrement être activés les uns après les autres dans le cadre d'une réaction en chaîne. On désigne cette succession de réactions par le terme de cascade de la coagulation. L'ensemble des étapes de la coagulation est simplifié dans la **figure 1**.

La vitamine K intervient au stade terminal de la synthèse de 4 facteurs de la coagulation (facteurs II, VII, IX, X = facteurs vitamine K dépendants) en leur rend capables de se complexer avec le calcium (Ca^{2+}) et les phospholipides. En l'absence de vitamine K, le

foie libère des facteurs de la coagulation anormaux non fonctionnels appelés PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence).

Pour que l'activation enzymatique des facteurs de la coagulation se déroule régulièrement, la présence de phospholipides et de Ca^{2+} est indispensable. Les phospholipides proviennent de deux sources capitales, les plaquettes et les tissus (FT). Le Ca^{2+} est essentiel à la plupart des étapes d'activation enzymatique de la coagulation.

L'hémostase secondaire aboutit, après une cascade de réactions enzymatiques, à la conversion du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. La manifestation de filaments de fibrine à la surface des plaquettes vient consolider le clou hémostatique et conduit à la formation du caillot.

Tableau 1. Les facteurs de coagulation (Arock and Pieroni, 1997).

Facteur	Nom	Fonction	Lieu de synthèse
I	Fibrinogène	Substrat	Foie
II	Prothrombine	Zymogène	Foie
V	Proaccéléline	Cofacteur	Foie-SRE
VII	Proconvertine	Zymogène	Foie
VIII	Facteur antihémophilique A	Cofacteur	Foie
IX	Facteur antihémophilique B	Zymogène	Foie
X	Facteur Stuart	Zymogène	Foie
XI	Facteur Rosenthal	Zymogène	Foie
XII	Facteur Hageman	Zymogène	Foie
XIII	Facteur stabilisant la fibrine	Zymogène	Foie

SRE: système réticulo-endothéliale. **NB:** III : FT; IV: Ca^{2+} ;VI : accéléline ou Va (Ces trois chiffres romains ne sont pas utilisés). La forme activée pour chaque facteur est indiquée par le suffixe "a".

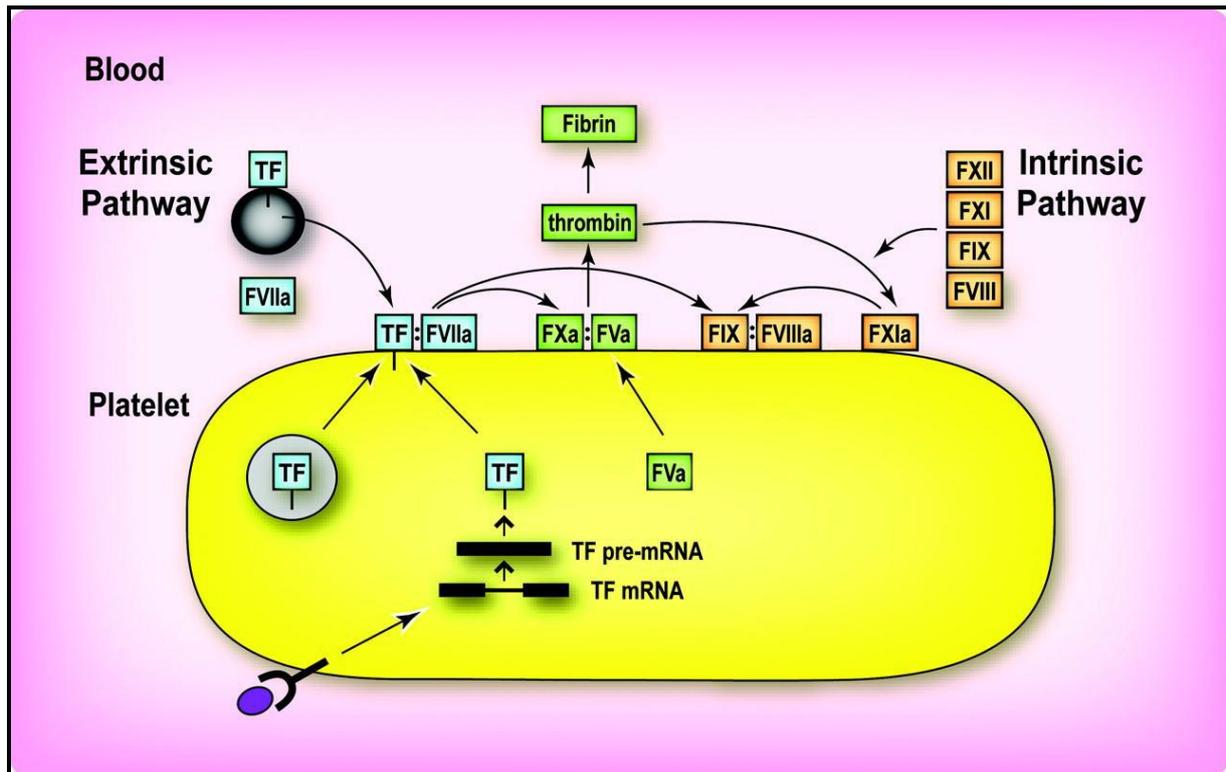


Figure 1. Les deux voies de la coagulation selon la conception classique (Mackman et al, 2007). La voie intrinsèque (activation par contact), la voie extrinsèque (activation initiée par le FT), la voie commune (Initiée par l'activation du FX et aboutit à la formation du caillot de fibrine insoluble), les plaquettes jouent un rôle important dans les deux voies, elles interviennent en fournissant le FT et le FVa stocké.

I.2.2. Physiologie de la coagulation

Initialement, la coagulation était décrite selon deux voies d'activation : la voie intrinsèque (endogène) et la voie extrinsèque (exogène), convergeant en une voie commune, étape finale de la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble (Mosesson, 1992).

La voie endogène faisant intervenir des éléments nécessaires à la coagulation sans qu'il y ait d'apport extérieur au sang. La voie exogène qui pour être activée nécessite la présence d'un seul élément extérieur à la circulation : le FT présent à la surface des fibroblastes. Cette conception duelle de la coagulation correspond aux processus de la coagulation in vitro et sera très utile pour l'exploration de la coagulation (De Revel and Doghmi, 2004). C'est sur ce schéma que se fait le raisonnement diagnostique d'interprétation des tests de la coagulation. Le déroulement de la coagulation in vivo ne respecte pas cette distinction voie intrinsèque-voie extrinsèque.

La nouvelle conception proposée prend en compte les surfaces cellulaires impliquées, elle reflète mieux la coagulation. Cette nouvelle vue de cascade de coagulation présente la formation de fibrine comme la conséquence finale de deux processus complémentaires: la coagulation (représentée par la thrombine) et l'activation plaquettaire. Ce modèle appelé

«cellulaire» peut être schématisé en trois phases (Monroe and Hoffman, 2006) (**Figures 2, 3 et 4**) : une phase d'initiation, qui conduit à la génération de faibles traces de thrombine à la surface de cellules exprimant du FT ; une phase d'amplification, qui conduit à l'accumulation de facteurs activés à la surface des plaquettes ; ensuite une phase de propagation comportant l'assemblage de larges complexes enzymatiques à la surface des plaquettes, la génération « explosive » de hautes concentrations de thrombine induisant la formation d'un caillot stable.

Ce modèle a annulé le concept précédent d'activation indépendante et axé sur le rôle synergique et parallèle entre chaque branche de la coagulation tout en prenant en compte un système vasculaire dynamique. En outre, le modèle a donné une explication plus précise de la localisation de la formation du caillot en incorporant le rôle de la cellule et en mettant l'accent sur l'importance du FT.

I.2.2.1. Initiation de la coagulation

L'élément déclenchant la coagulation est le FT membranaire qui est exprimé à la surface des cellules endothéliales suite à une lésion de la paroi vasculaire. Le FT se lie au FVII pour former un complexe FT-FVII, ce qui permet l'activation du FVII en FVIIa. Le complexe FT-FVIIa exerce préférentiellement son activité sur le FX, il porte donc le nom de complexe tenase extrinsèque. Il active le FX, directement ou indirectement par l'intermédiaire du FIX. Quand le FT est en excès, le complexe FT-FVIIa active directement le FX. Cependant, il peut être rapidement régulé par l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI: Tissue factor pathway inhibitor) ou l'antithrombine (AT) (Golino, 2006). Quand le FT est en faible quantité (ou l'inhibition par le TFPI est prépondérante), le complexe FT-FVIIa exerce son action sur le FIX.

Le FXa va ensuite en présence du FVa (FVa-FXa: complexe prothrombinase) convertir une faible quantité de prothrombine (FII) en thrombine (FIIa), pour générer les premières traces de thrombine (Monroe and Hoffman, 2006). Le FVa provient soit de l'activation du FV circulant par le FXa, soit il est libéré des granules α des plaquettes activées.

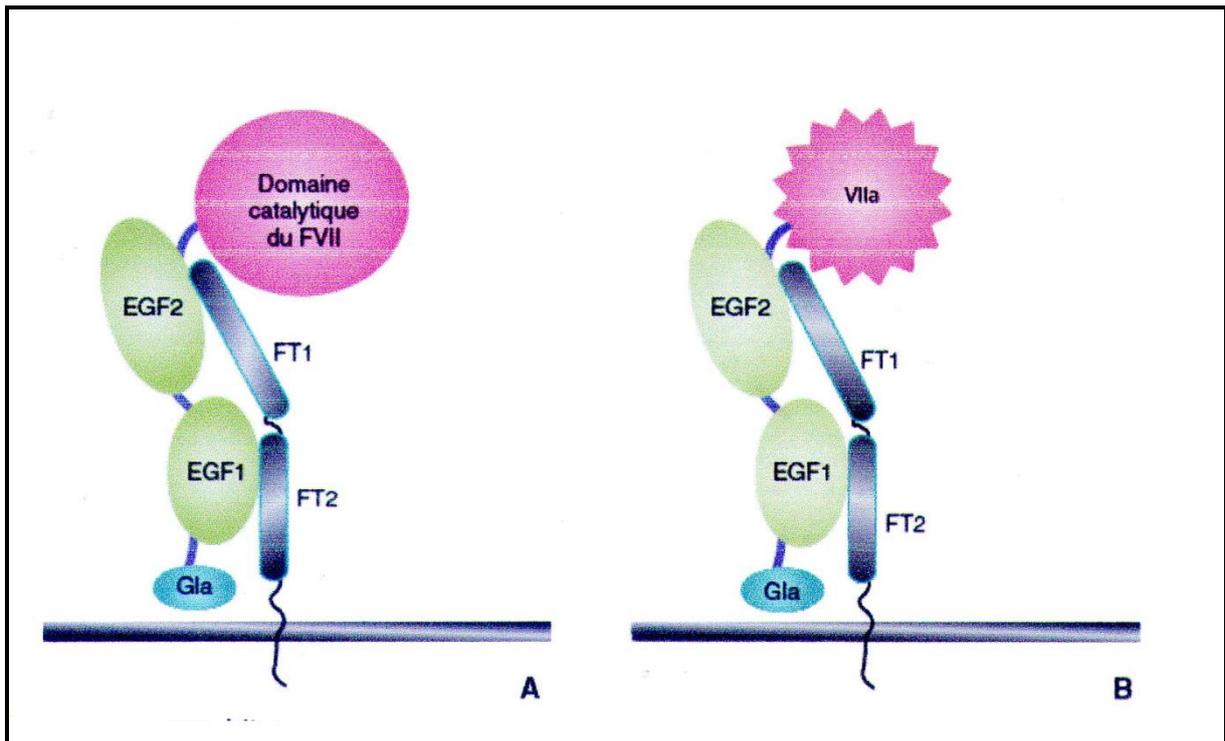


Figure 2. Phase d'initiation de la coagulation (Schved, 2007). **A.** Le FT est une protéine transmembranaire. La partie extracellulaire comporte deux sous-unités FT1 et FT2 qui interagissent avec le FVII de la coagulation. Le FVII est une proenzyme, comprenant un domaine Gla, deux sous-unités epidermal growth factor (EGF)-like (EGF1 et EGF2) puis un domaine catalytique. **B.** L'interaction avec le FT induit une modification conformationnelle du FVII qui démasque son site catalytique. Il en résulte un complexe [FT-FVIIa] qui activera le FX.

I.2.2.2. Amplification de la coagulation

La thrombine générée en surface des cellules exprimant le FT permet l'activation des plaquettes et des facteurs FV, FVIII, FXI à la surfaces des plaquettes (Furie and Furie, 2008; Monroe and Hoffman, 2006). Ce qui permet la formation des complexes qui interviennent lors de la phase de propagation.

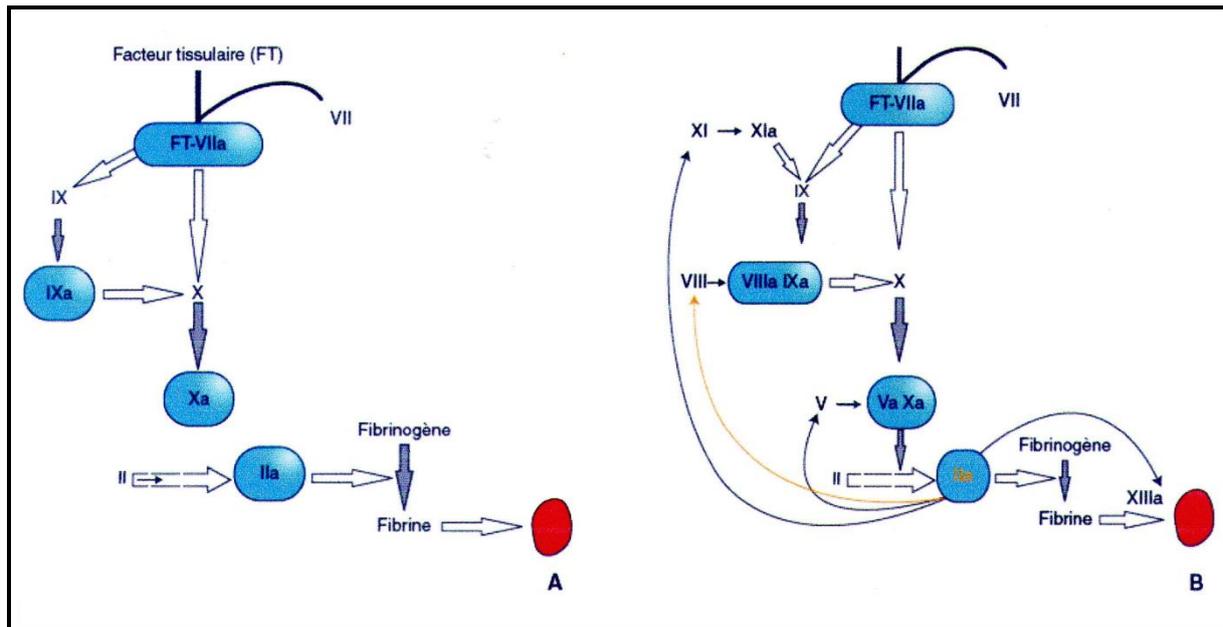


Figure 3. Phase d'amplification de la coagulation (Schved, 2007). **A.** Le complexe [FT-FVIIa] peut activer le FX et le FIX. Le FIXa active lui aussi le FX. Le FXa active la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). La thrombine génère les premières traces de fibrine, trame du caillot. Cette réaction se déroule à la surface des plaquettes. **B.** La thrombine transforme le dimère FVIII en hétérotrimère FVIIIa. Le complexe [FVIIIa-FIXa] ou ténase intrinsèque induit une activation importante du FX. En outre la thrombine active le FV en FVa et le FXI en FXIa. A la fin de cette phase se concentrent à la surface des plaquettes plusieurs facteurs activés dont le FXa, le FIIa, le FIXa, le FVIIIa et le FVa.

I.2.2.3. Propagation de la coagulation

La propagation de la coagulation se déroule à la surface des plaquettes activées. Le FIXa généré lors de la phase d'initiation lie le FVIIIa (FVIIIa généré pendant la phase d'amplification) pour former le complexe ténase intrinsèque, capable d'activer le FX en FXa. Le FXa s'associe avec le FVa pour former le complexe prothrombinase provoquant une génération explosive de thrombine nécessaire à la génération de fibrine (Monroe and Hoffman, 2006).

L'amplification du processus grâce aux mécanismes de rétroaction comporte la thrombine et les plaquettes. L'activation de tous ces éléments permet de générer de grandes quantités de FXa. Le FVIIIa permet d'accélérer la transformation du FX en FXa d'un facteur de 10^5 . La quantité importante de FIXa, permet la transformation en présence de phospholipides, du Ca^{2+} et du FVa d'une quantité importante de prothrombine en thrombine.

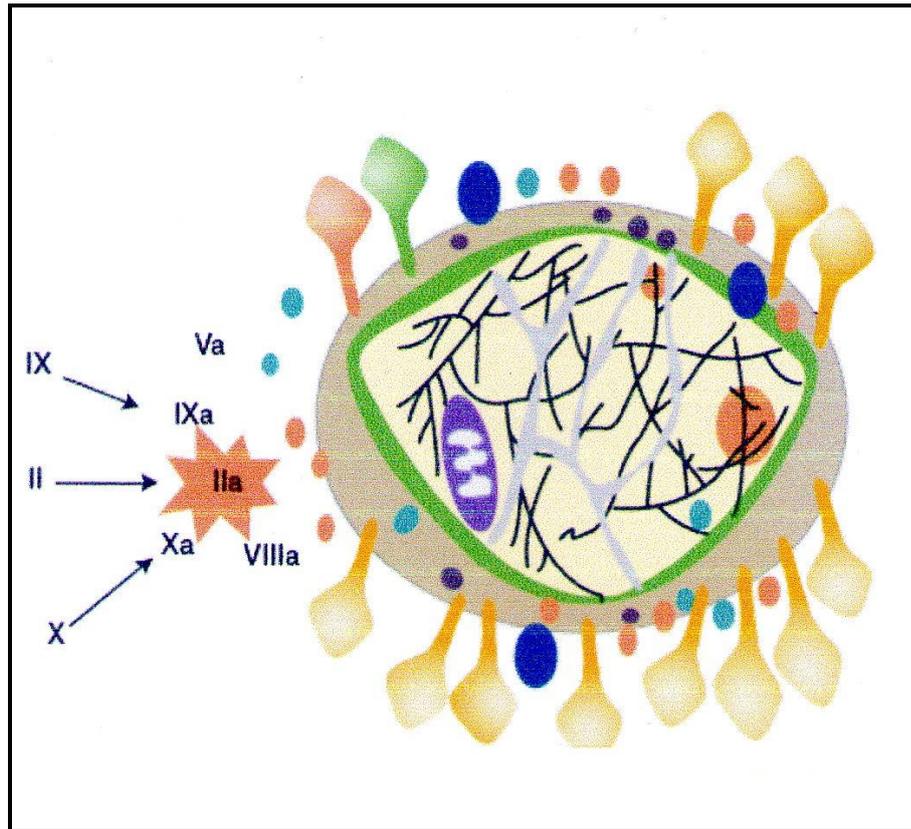


Figure 4. Phase de propagation de la coagulation (Schved, 2007). Le complexe ténase intrinsèque a généré à la surface des plaquettes des quantités importantes de facteurs activés dont surtout le FXa. Ceci déclenche une génération « explosive » de thrombine qui permet la création d'un caillot fibrinocruorique.

La thrombine permet la transformation du fibrinogène soluble en fibrine insoluble. La thrombine, enzyme protéolytique, coupe les molécules de fibrinogène en polypeptides A et B et en monomères de fibrine. Ces derniers polymérisent spontanément pour former un réseau de fibrine. Parallèlement, la thrombine active le FXIII en FXIIIa, donnant ainsi un complexe stable qui est la fibrine insoluble (**Figure 5**) (Perez-Gomez and Bover, 2007).

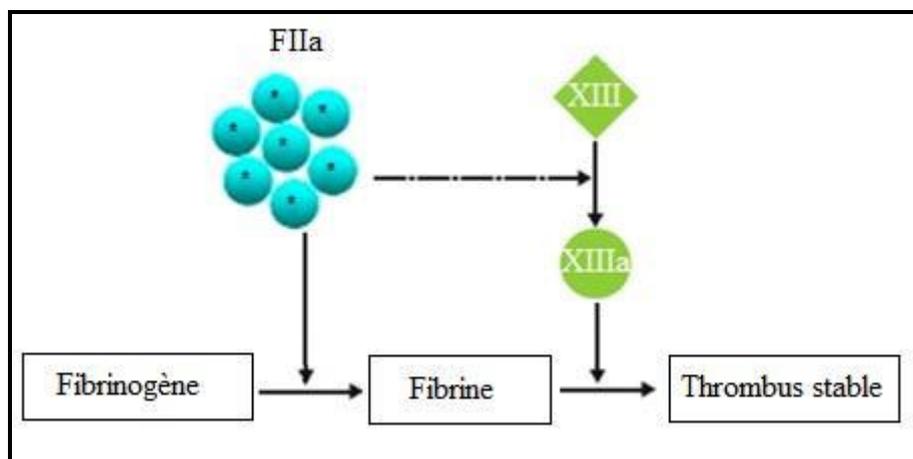


Figure 5. Représentation schématique de la fibrinoformation (Turpie and Esmon, 2011).

I.2.3. Régulation de la coagulation

Le système de la coagulation plasmatique a tendance à s'activer spontanément. Il est très important pour l'organisme que les enzymes formées lors de l'activation de la coagulation (thrombine, FXa) ne circulent pas dans le plasma car ils risqueraient de provoquer une activation répandue de la coagulation et un processus pathologique sévère. Pour éviter ceci et maintenir leur équilibre, chaque facteur activé a son inhibiteur. On connaît trois systèmes inhibiteurs : le système de l'antithrombine, le système Protéine C-Protéine S, et le TFPI (Schved, 2007) (**Tableau 2**) (**Figure 6**).

Tableau 2. Les inhibiteurs des facteurs de coagulation (Moerloose et al, 2002).

Nom	Fonction
Antithrombine	Inhibe le facteur IIa et Xa
Protéine C	Inactive le facteur Va et VIIIa – Elle est Vitamine K dépendante
Protéine S	Cofacteur de la protéine C – Elle est Vitamine K dépendante
Inhibiteur du FT (TFPI)	Inhibe le complexe facteur tissulaire-facteur VIIa et Xa

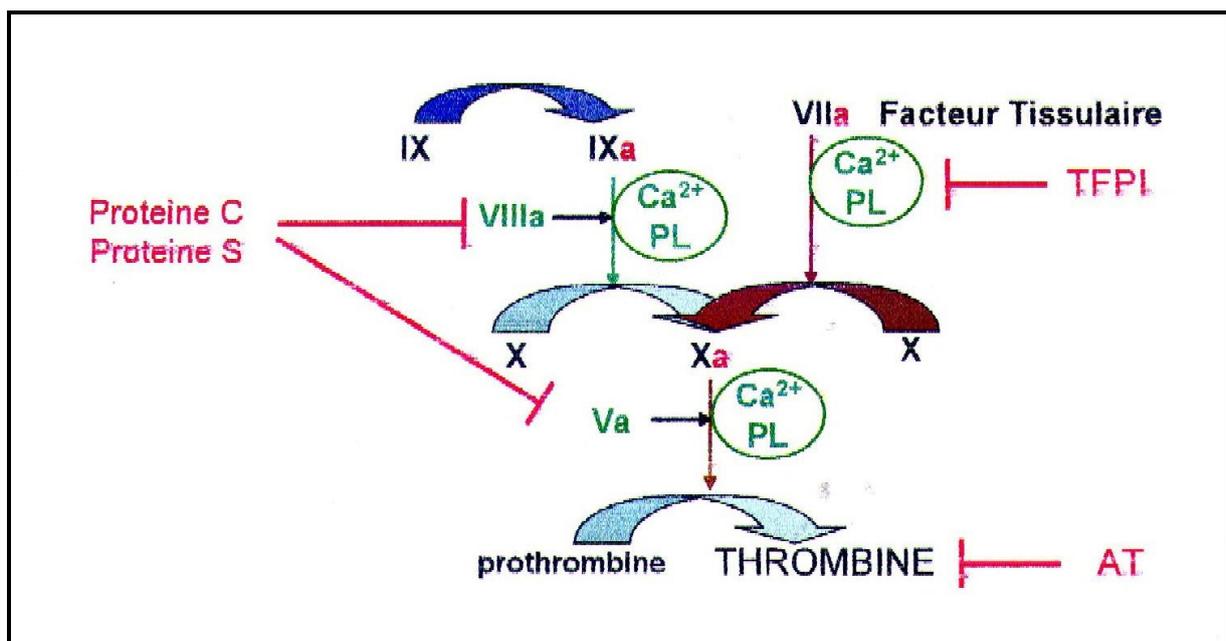


Figure 6. Principaux inhibiteurs de la coagulation (Moerloose et al, 2002). AT: Antithrombine, PL: Plaquettes, TFPI: Tissue factor pathway inhibitor.

I.3. Fibrinolyse

La fibrinolyse, ou ensemble des processus qui conduisent à la dissolution ou lyse de caillot de fibrine, est due à la manifestation dans le sang circulant d'une enzyme protéolytique, la plasmine, formée à partir d'un précurseur inactif, le plasminogène. Cette transformation ou activation du plasminogène résulte de l'action de différents agents ou activateurs. Le mécanisme physiologique comporte deux étapes:

- formation de la plasmine à partir d'un précurseur inactif, le plasminogène en présence de différents activateurs ;
- dégradation par la plasmine ainsi formée de la fibrine insoluble en produits solubles.

Les inhibiteurs de la fibrinolyse sont l'alpha-2-antiplasmine, inhibiteur de la plasmine, et le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène) qui a pour cible le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) (Hermans et al, 2006).

Chapitre II

Facteur IX de la coagulation

II- FIX de la coagulation

II.1. Gène du FIX (F9)

Le gène responsable de la synthèse du FIX, appelé gène F9 (**Figure 8**). Il se situe sur le bras long du chromosome X dans la région Xq27.1 (**Figure 7**) et se compose d'environ 34 000 paires de bases (Azfar et al, 2010), avec huit exons entrecoupés de sept introns (**Tableau 3**) et près de 95% de la longueur du gène est non codante. Le gène code un prépro-FIX qui sera après clivé (Anson et al, 1984 ; Yoshitake et al, 1985). Il code un ARNm de 2.8 kb (Leytus et al, 1986).

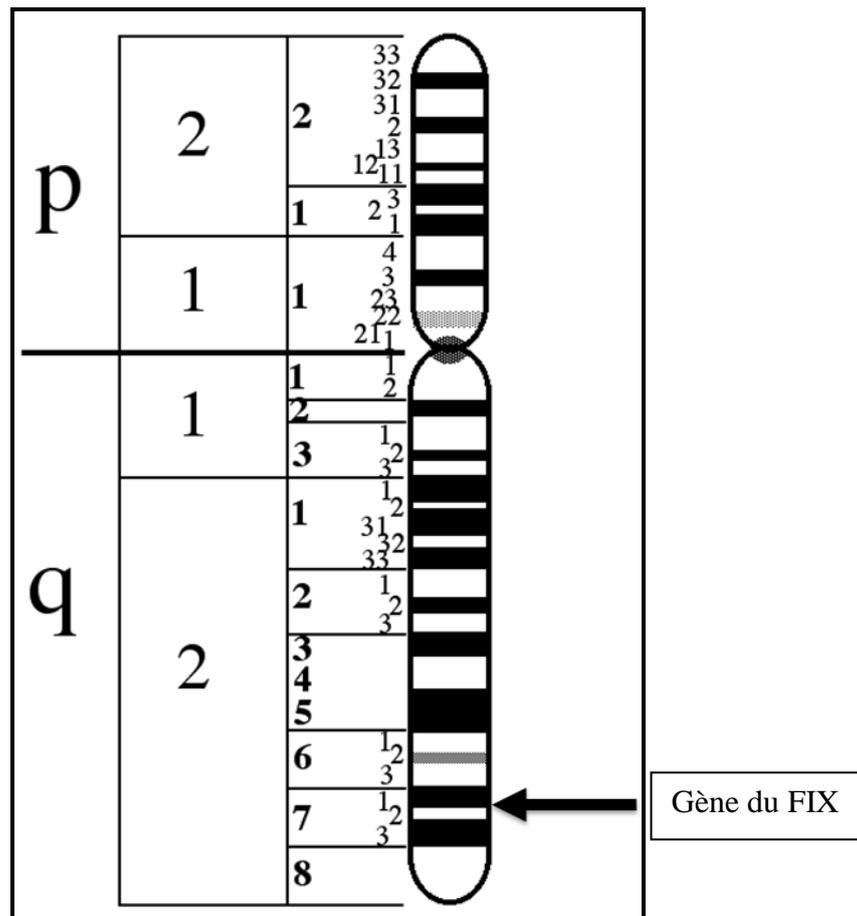


Figure 7. Position du gène F9 sur le chromosome X.

Tableau 3. Positions et tailles des exons et introns du gène du FIX (Yoshitake et al, 1985).

Exon	Intron	Positions des nucléotides*	Longueur (nt)	Acides aminés**
I		1 - 117	117	-46 à -17
	A	118 - 6 325	6206	
II		6 326 - 6 489	164	-17 à 37
	B	6 490 - 6 677	188	
III		6 678 - 6 702	25	38 - 47
	C	6 703 - 10 391	3689	
IV		10 392 - 10 505	114	47 - 85
	D	10 506 - 17 668	7163	
V		17 669 - 17 797	129	85 - 128
	E	17 798 - 20 362	2565	
VI		20 363 - 20 565	203	128 - 195
	F	20 566 - 30 038	9473	
VII		30 039 - 30 153	115	196 - 234
	G	30 154 - 30 821	668	
VIII		30 822 - 32 757	1935	234 - 415

*Sont comptabilisés, aux extrémités du gène, 30 nucléotides (nt) en 5' et 1390 nucléotides en 3' qui ne sont pas traduits.

**Ils représentent les acides aminés issus de la traduction des exons; Les valeurs négatives correspondent à la préproséquence.

II.2. Facteur IX (FIX)

Le FIX est une glycoprotéine monocaténaire de 55 kDa, qui circule dans le sang sous forme de zymogène (proenzyme inactive), avec une concentration d'environ 5mg/L. Le produit primaire de la traduction est plus long de 46 acides aminés (aa). Cette séquence, qui disparaît lors de la maturation hépatique de la protéine, est aussi appelée « prepro-leader » et comprend deux éléments :

- Un **peptide signal** (aa -46 à -19) éliminé lors du transport de la protéine via le réticulum endoplasmique granuleux. Il est codé par l'exon 1 et se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine. Il dirige la sécrétion du FIX.
- Un **propeptide** (aa -18 à -1) utilisé comme site de reconnaissance par une carboxylase vitamine K dépendante pour influencer sur la protéine. Puis il est exclu par une peptidase (**Figure 8**).

Le proenzyme inactif obtenu après élimination de ces 2 séquences N-terminales est long de 415 acides aminés et est divisé en 3 parties :

- une chaîne légère (aa 1 à 145)
- un peptide d'activation (aa 146 à 180)
- une chaîne lourde (aa 181 à 415)

Le FIX est divisé en six domaines :

➤ À l'extrémité N-terminale existe le domaine Gla (résidus 1 à 38) comportant de nombreux résidus d'acide glutamique, qui permet la liaison aux phospholipides électro-négatifs via un ion Ca^{2+} . Ce domaine est se trouve dans tous les facteurs vitamine K dépendant car il exige une gamma carboxylation vitamine K dépendante pour être fonctionnel (Anson et al, 1984), le domaine Gla est dérivé de la traduction des exons 2 et 3 (Tailhefer, 2013). Il est impliqué dans les interactions avec le FVIII et le complexe FT-FVIIa et il interagit avec la surface des plaquettes, les vésicules phospholipidiques et la membrane des cellules endothéliales via le collagène de type IV.

➤ La zone hydrophobe (résidus 39 à 46) est une petite séquence codée par l'exon 3. Elle est confondue au sein du domaine Gla. Avec le domaine EGF1 (epidermal growth factor), elle a une importance dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle du domaine Gla dans la liaison aux cellules endothéliales (Cheung et al, 1991; Mayhew et al, 1994).

➤ Le FIX possède deux domaines de type EGF like (résidus 47 à 145) : EGF1 et EGF2. Ces domaines renferment 12 des 22 résidus cystéines de l'ensemble du FIX d'où l'existence de nombreux ponts disulfure permettant une structure secondaire en feuillets β . On note la présence d'un pont disulfure entre la chaîne légère et la chaîne lourde au niveau des résidus cystéines 132 et 289 (Thompson, 1986). Les exons 4 et 5 codent pour les deux domaines EGF-like (Tailhefer, 2013).

➤ Vers l'extrémité C-terminale, se trouve le domaine d'activation puis le domaine catalytique (Anson et al, 1984). Le clivage du peptide d'activation (résidus 146 à 180) intervient lors de l'activation du FIX en FIXa. Le domaine du peptide d'activation est codé par l'exon 6.

➤ Le domaine catalytique (sérine protéase) (résidus 181 à 415) est responsable de l'activité catalytique enzymatique du FIXa particulièrement à l'aide d'une triade catalytique d'aa (Yoshitake et al, 1985) : histidine (H) 221, acide aspartique (D) 269 et sérine (S) 365. Le FIXa lié aux phospholipides membranaires, au FVIIIa et aux ions Ca^{2+} produira ensuite le complexe «ténase intrinsèque» capable d'activer le FX en FXa (Aurélien and Géraldine, 2012 ; Tailhefer, 2013). Le domaine catalytique est codé par les exons 7 et 8 (Tailhefer, 2013).

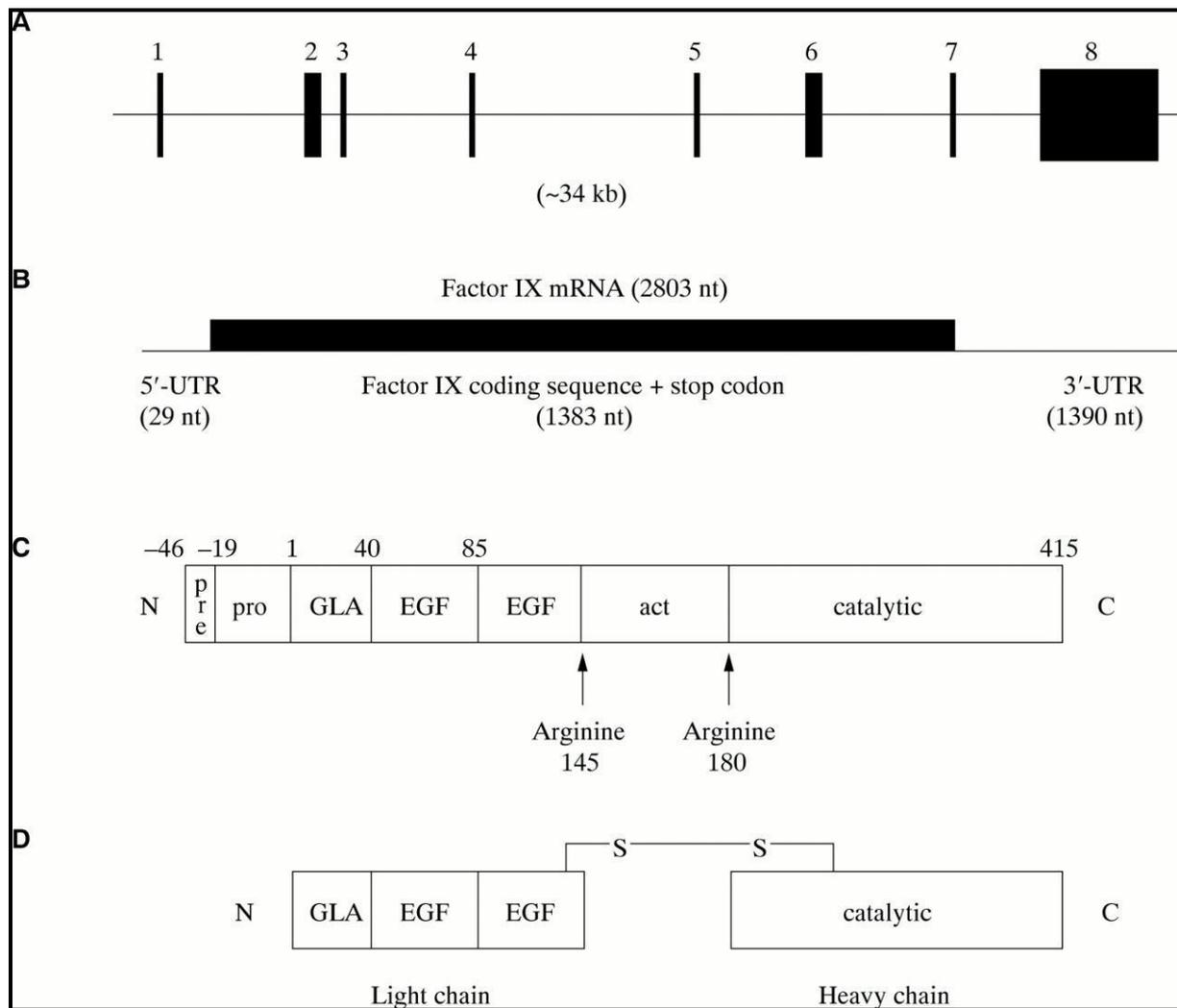


Figure 8. Du gène au FIXa (Bowen, 2002).

A. Schéma de l'organisation génomique du F9 humain et de ses huit exons.

B. ARNm issu de la transcription du gène du FIX et emplacement du cadre de lecture.

C. Protéine du FIX traduite avec la pré-pro-séquence et le peptide mature de 415 aa.

D. FIXa.

pre : prépeptide; **pro** : propeptide; **Gla** : acide γ -carboxyglutamique; **EGF** : epidermal growth factor; **act** : peptide d'activation.

II.3. Rôle du FIX dans la coagulation et ses interactions

L'ensemble des domaines du FIX lui permet d'acquérir la bonne conformation et de présenter les repliements et les séquences nécessaires à son interaction avec ses différents partenaires.

II.3.1. Récepteurs au FIX

Les études de Rawala-Sheikh et al, 1992, Ahmad et al, 1994 et Ahmad et al, 1998 ont montré l'implication des 12 premiers résidus du domaine Gla du FIX dans la liaison aux plaquettes. En 2002, une autre équipe a démontré l'implication des résidus 88 à 109 du domaine EGF2 dans la liaison aux plaquettes (Wilkinson et al, 2002).

Cheung et al, 1991 et Cheung et al, 1992 ont montré l'existence de deux sites de fixation au niveau du FIX pour les cellules endothéliales : les résidus 39 à 46 du domaine EGF1 et les résidus 1 à 12 du domaine Gla.

En 2000, Neels et al. ont découvert un site qui permet uniquement la reconnaissance du FIXa et non du FIX étant le LRP (Lipoprotein receptor-related protein). L'activité du FIXa peut-être contrôlée via la liaison à ce site. La séquence du FIXa composée des résidus 342 à 346 est la région impliquée dans la liaison aux LRP (Rohlena et al, 2003).

II.3.2. Activation du FIX

Lors de l'activation du FIX en FIXa, le peptide d'activation est clivé au niveau des arginines (Arg) 145 et 180. Avec le Ca^{2+} , deux voies sont réalisables in vivo pour cette division: la voie exogène grâce à l'activité catalytique du FVIIa ou la voie endogène à l'aide de celle du facteur XIa. Le double clivage est réalisé en 2 étapes (**Figure 9**). Le premier clivage, entre les résidus Arg145 et Ala146, aboutit à un FIX α inactif. Le deuxième clivage, entre les résidus Arg180 et Val181, conduit à la formation d'un FIX $\alpha\beta$ biologiquement actif, formé d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère reliées par un pont disulfure (Di Scipio et al, 1978 ; Tailhefer, 2013).

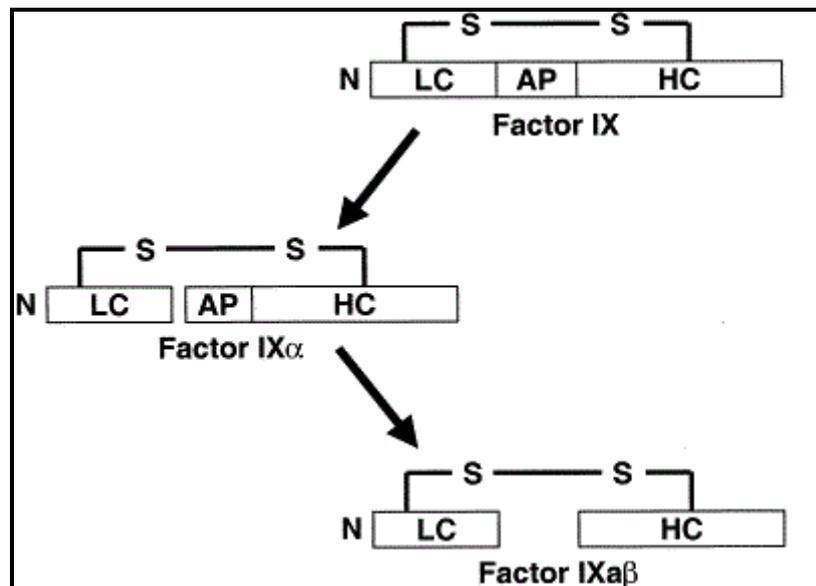


Figure 9. Représentation schématique de l'activation de la protéine mature du FIX sérique (Gailani, 2000). **LC** : light chain, chaîne légère; **HC** : heavy chain, chaîne lourde; **AP** : activation peptide, peptide d'activation.

II.3.3. Formation du complexe ténase intrinsèque

La liaison du FIXa à son cofacteur, le FVIIIa, formant le complexe ténase intrinsèque, permet d'améliorer la vitesse catalytique du FIXa lors de l'activation du FX. Les résidus 3 à 11 du domaine Gla du FIXa (Freedman et al, 1996) et le domaine C2 du FVIIIa (Foster et al, 1990 ; Pratt et al, 1999) se fixent sur les phospholipides membranaires. Le domaine Gla du FIXa et le domaine C2 du FVIIIa interviennent dans l'interaction FIXa/FVIIIa (Soeda et al, 2009). Les interactions entre les domaines EGF1/EGF2 du FIXa et le domaine A3 du FVIIIa jouent un rôle essentiel dans la fixation du complexe. La liaison entre le domaine catalytique du FIXa et le domaine A2 du FVIIIa permet de moduler le site actif du domaine sérine protéase du FIXa (Fay and Koshibu, 1998).

II.3.4. Activation du FX

Le FVIIIa possède un site de réception qui lui permet de présenter le FX au FIXa sur la membrane des plaquettes activées (Ahmad et al, 2003), par l'intervention du domaine catalytique du FX et le domaine A1 du FVIIIa (Lapan and Fay, 1997). L'étude de Takeyama et al, 2012 montre l'existence d'un site de fixation au FX dans le domaine A3 du FVIIIa.

II.4. Conséquences du déficit en FIX sur l'hémostase

Le FIX de coagulation, au même titre que les autres facteurs de la coagulation, est une protéine synthétisée dans le foie qui est ensuite sécrétée dans le sang, lieu de son action. Le FIX est un des facteurs de coagulation dits vitamine K-dépendants parmi lesquels figurent également le FII, le FVII et le FX. Ces facteurs impliqueront une antérieure gamma-carboxylation hépatique par la vitamine K avant de pouvoir être des facteurs activables comme les autres.

Après activation et en présence des ions Ca^{2+} et des surfaces phospholipides, les FVIII et FIX forment un complexe actif qui active à son tour le FX. Les autres étapes de la coagulation se succèdent alors, pour aboutir à la formation de la fibrine. Un déficit ou un dysfonctionnement du FIX inhibe l'activation du FX. En conséquence les autres étapes de la cascade de la coagulation sont aussi interrompues et la formation de la fibrine est inefficace ou absente.

L'absence ou le mauvais fonctionnement du FIX conduira à la formation d'un caillot de mauvaise qualité chez les hémophiles, à l'origine des saignements primaires ou de leurs reprises éventuelles. En effet, chez un hémophile, l'activation de la voie exogène pourra se faire sans problème particulier mais c'est au niveau de l'amplification et donc de la solidité du caillot qu'on constatera les affections à l'origine de la maladie hémorragique (**Figure 10**).

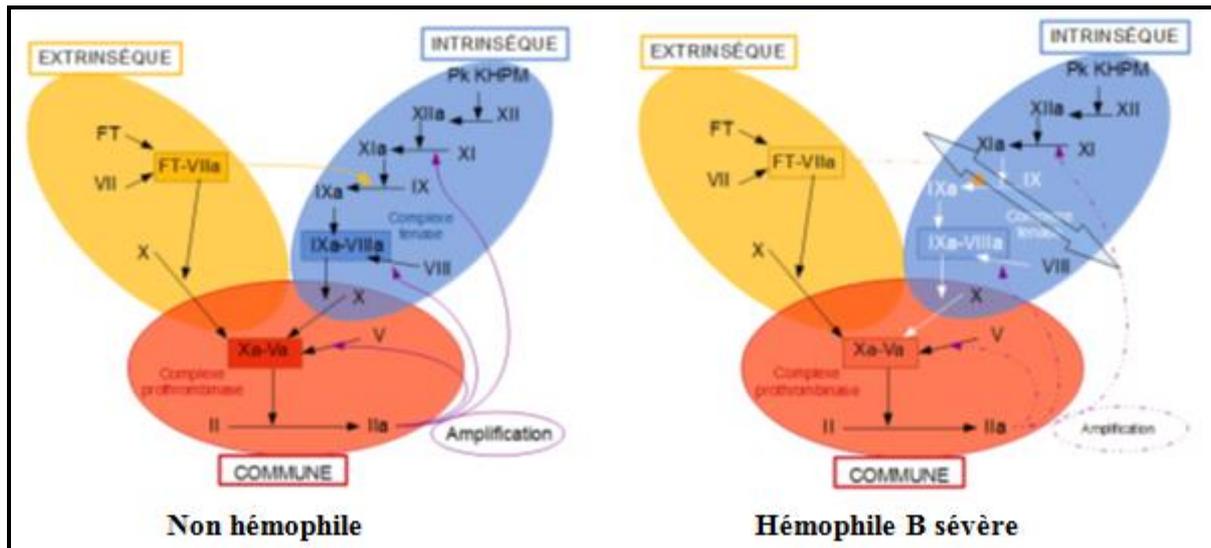


Figure 10. Schémas simplifiés des cascades d'activation des facteurs de coagulation chez une personne non hémophile (à gauche) et chez une personne hémophile B sévère (à droite) (Tailhefer, 2013). **Pk** : Prékallitréine; **KHPM** : Kininogène de Haut Poids Moléculaire.

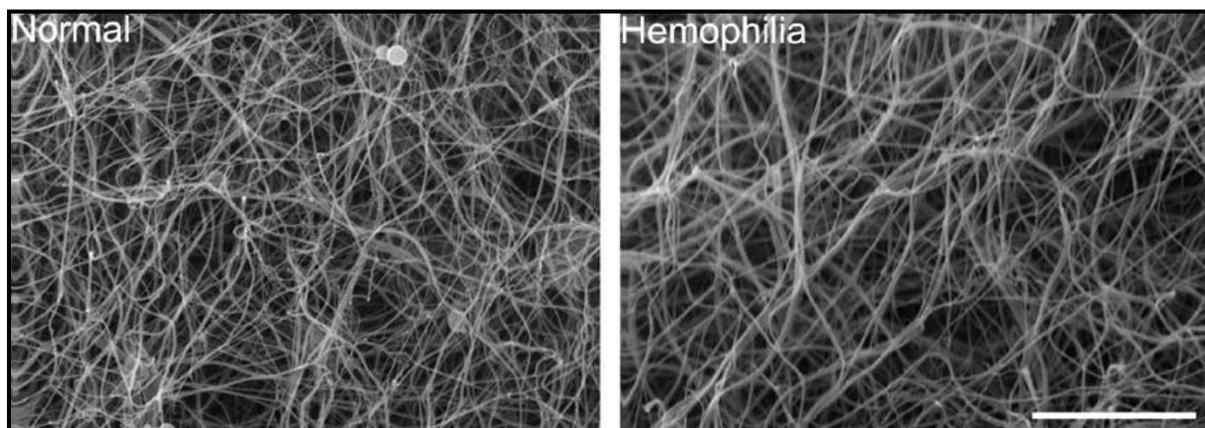


Figure 11. Le déficit en FIX produit des caillots qui contiennent des fibres de fibrine anormalement épaisses par rapport à la normale. (MEB, échelle 8 μ m) (Wolberg Alisa, 2007). **MEB** : Microscope électronique à balayage.

II.5. Pathologies moléculaires du gène F9

Dès le clonage du gène F9 en 1982, son analyse chez différents malades a contribué à identifier de nombreuses anomalies génétiques différentes à l'origine de l'hémophilie. Parmi elles, on distingue des anomalies majeures (grandes délétions, mutations qui conduisent à un codon stop : non-sens) source d'un manque de transcription et donc d'une absence de synthèse du FIX. D'autres mutations peuvent conduire à l'expression d'un FIX non fonctionnel (mutations ponctuelles faux-sens, petites insertions ou délétions à l'origine d'anomalies d'épissage) (Chambost and Meunier, 2006).

Certaines mutations dans la zone du promoteur provoquent un déficit particulier par son profil évolutif : grave dans l'enfance, ce déficit se corrige d'une manière partielle ou totale à la puberté. La forme typique est la mutation Leyden, responsable de l'HB du même nom. Elle provoque un changement des sites de liaison des facteurs de transcription et une réduction de celle-ci. Après la puberté, le manque de transcription est corrigé par les androgènes, qui seraient capables de réactiver le promoteur muté (Schved, 2007).

Tableau 4. Liste des mutations responsable d'HB répertoriées dans la CHBMP database dernière mise à jour Février 2017 <https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>

Type de mutation	Nombre de mutations	Pourcentage %
<u>3'UTR</u>		
Substitution	4	0,4
<u>Mutations de type décalage de cadre de lecture</u>	182	16,1
Délétions	131	11,6
Duplications	9	0,8
insertions	34	3
Délétions/insertions	8	0,7
<u>Grand changement de structure (>50pb)</u>	33	2,9
Délétions	29	2,6
insertions	3	0,3
Délétions/insertions	1	0,1
<u>Faux sens</u>	657	58,1
Délétions/insertions	3	0,3
Substitution	654	57,8
<u>Nonsense</u>		
Substitution	91	8
<u>Au niveau du promoteur</u>	25	2,2
Délétions	2	0,2
Substitution	23	2
<u>Petit changement de structure (<50 pb)</u>	23	2
Délétions	18	1,6
Duplications	2	0,2
insertions	1	0,1
Délétions/insertions	2	0,2
<u>Au niveau des sites d'épissage</u>	106	9,4
Délétions	16	1,4
insertions	2	0,2
Substitution	88	7,8
<u>Mutations synonymes</u>		
Substitution	10	0,9
Totale	1131	100

Chapitre III

Hémophilie B

III- Hémophilie B

L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire, récessive, liée à l'X (Reynaud, 2000). À l'origine de l'hémophilie, des mutations vont conduire à une diminution dans la production de facteur de coagulation fonctionnel. Parmi ces déficits en facteur, on distingue des déficits quantitatifs (défauts de production) et des déficits qualitatifs (défauts de fonctionnalité). Deux types d'hémophilie se trouvent selon le facteur de coagulation déficitaire : HA si le déficit est lié au FVIII, et HB si le déficit est lié au FIX (Guérois, 2009).

III.1. Historique

Le mot hémophilie vient des deux mots grecs : haïma, qui veut dire sang et philia qui signifie affection. Ceci est en fait un raccourci du mot haemorrhaphilia qui veut dire « attirance pour les saignements ».

L'hémophilie est découverte depuis très longtemps mais jusqu'au XIXème siècle son mécanisme de transmission est assez vague :

Au IIème siècle, dans le Talmud (Bauduer, 2005) était décrite l'interdiction d'une circoncision au 3ème fils d'une famille dont les deux premiers garçons étaient décédés d'hémorragie à cause de ce geste chirurgical. Des doutes sur la présence d'une maladie hémorragique existaient déjà, ce qui explique que certaines familles avaient le sang très fluide alors que d'autres avaient le sang très retenu. Peu à peu une idée plus claire du mode de transmission et des conséquences que cette maladie peut avoir, ont été imposés.

En 1944 démarre la période thérapeutique moderne de l'hémophilie lorsque la chercheuse américaine Judith Pool découvre la capacité de traiter les hémophiles avec un cryoprécipité plasmatique (Auzanneau, 2005).

En 1952 Rose Mary Biggs différencia l'HA de l'HB, cette dernière est causée par le déficit du FIX. Elle l'appela « le facteur Christmas » à l'époque qui était le nom d'un de ses patients.

Nouvellement le clonage du gène du FIX a été réalisé par Choo et ses collaborateurs en 1982. Celui du FVIII par Gitschier et ses collaborateurs en 1984.

L'hémophilie est baptisée « la maladie des rois », car elle fut ancrée dans de grandes familles royales d'Europe dont la principale est la famille royale de la reine Victoria (1819-1901). Elle était elle-même porteuse et plus de 20 de ses descendants furent hémophiles.

III.2. Epidémiologie

Selon la définition de l'organisation mondiale de la santé (OMS), l'hémophilie est une maladie rare. En réalité son incidence dans la population générale est inférieure à 0,65 - 1%. Néanmoins elle constitue la plus fréquente des maladies hémorragiques graves (Négrier, 2000 ; Rickard, 2000). Son incidence est 1 /10000 dans l'HA et 1/50000 dans l'HB. il n'y a pas de différence significative entre les différentes races (Mannuci and Tuddeham, 2001). L'HB est cinq fois moins commune que l'HA (Jover-Cerveró et al, 2007).

III.3. Transmission et hérédité de l'hémophilie

L'hémophilie est une maladie génétique qui a un mode de transmission récessif lié au chromosome X. Les femmes sont des conductrices, autrement dit porteuses asymptomatiques, et les hommes sont touchés (atteints). Une femme porteuse a un risque de 50% d'avoir une fille porteuse dans sa descendance directe et un risque de 50% d'avoir un garçon atteint (Srivastava et al, 2013). Par contre un hémophile n'aura aucun garçon hémophile mais toutes ses filles seront porteuses de la pathologie (**Figure 12**).

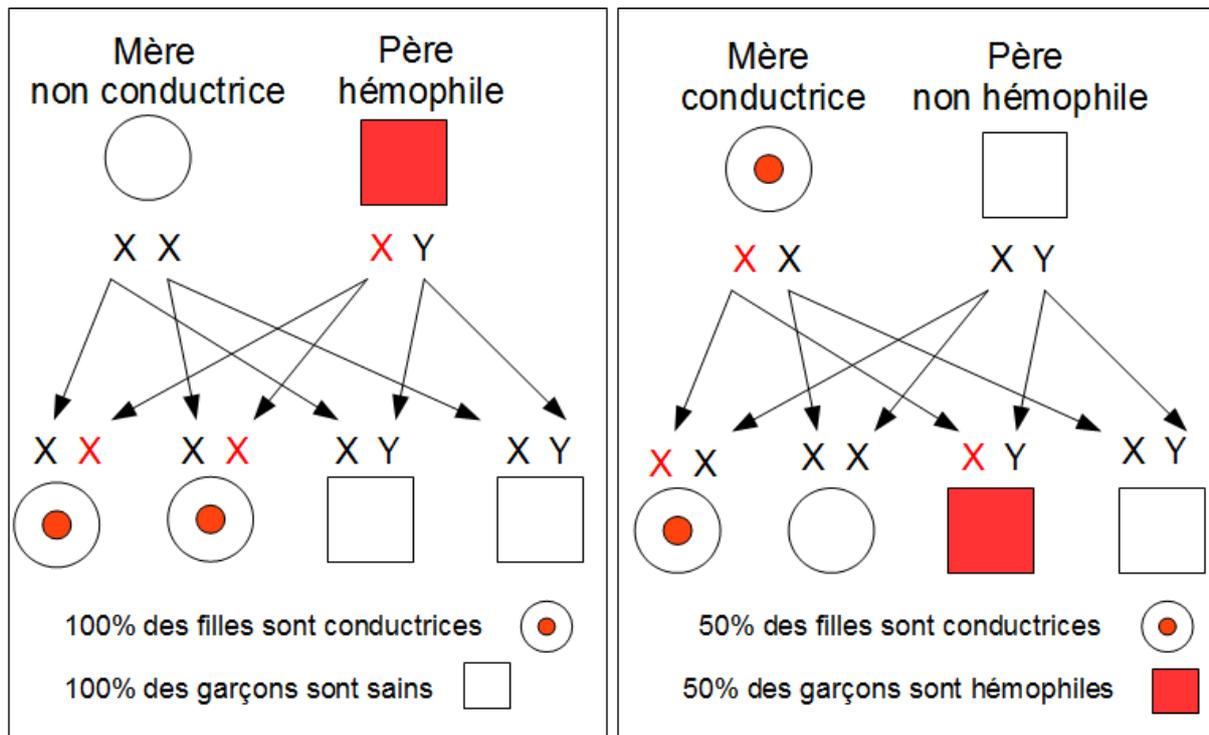


Figure 12. Transmissions possibles de l'hémophilie (Tailhefer, 2013).

III.4. Degré de gravité de l'hémophilie

La gravité de la maladie est directement liée au taux du facteur de coagulation déficitaire. On parle d'hémophilie sévère ou grave si l'activité biologique du facteur de coagulation est <1%, d'hémophilie modérée si elle est comprise entre 1% et 5% et d'hémophilie mineure si elle est >5% et <40% (White et al, 2001).

Ces degrés sont liés à des manifestations hémorragiques particulières dans leur ampleur, leur fréquence et leur localisation (**Tableau 5**).

Tableau 5. Degrés de sévérité d'hémophilie en fonction de l'activité coagulante du facteur de coagulation (White et al, 2001)

Classification	Activité coagulante FIX:C (%)	Manifestations hémorragiques
Sévère	<1 %	Hémorragies fréquentes, parfois spontanées, à localisations principalement articulaires et musculaires
Modérée	1 % - 5 %	Hémorragies occasionnelles, notamment lors de traumatismes ou d'interventions chirurgicales
Mineure	>5 % - <40 %	Hémorragies lors de traumatismes importants ou d'interventions chirurgicales

III.5. Diagnostic

III.5.1. Circonstances de découverte

Le diagnostic de l'hémophilie est investigué après une manifestation hémorragique, en cas d'antécédents familiaux ou de manière fortuite, lors d'un bilan d'hémostase systématique. Les 3/4 des diagnostics sont portés après un saignement ou en existence d'antécédents familiaux chez les malades atteints d'hémophilie grave ou modérée alors que les diagnostics fortuits sont plus fréquents chez les malades atteints d'hémophilie mineure.

III.5.2. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique de l'hémophilie est réalisé devant un tableau clinique de trouble de la coagulation (troubles hémorragiques fréquents) ou avant toute intervention chirurgicale. Le bilan biologique réalisé en 1ère intention est : une Numération Formule Sanguine (NFS) et un bilan d'exploration d'hémostase (le temps de Quick TQ et le temps de céphaline activé TCA).

En cas d'anomalie du bilan de coagulation standard évocateur d'un tableau d'hémophilie, qui se traduit par un allongement isolé du TCA sans allongement du TQ, on ajoutera des dosages spécifiques des différents facteurs impactant sur le TCA (notamment FVIII, FIX et FXI).

Le diagnostic biologique d'hémophilie est posé devant :

- un allongement isolé du TCA sans allongement du TQ, du Temps de Saignement et du Temps de Thrombine.
- une diminution isolée du FVIII (HA) ou du FIX (HB).

III.5.3. Diagnostic différentiel

Il permet d'exclure les autres causes d'allongement du TCA liées à un taux bas de FIX :

➤ Carence en vitamine K

La synthèse du FIX étant vitamine K dépendante, les taux de FIX sont bas en cas de déficit en vitamine K ou de traitement par anti-vitamine K. Sont aussi bas les taux des autres facteurs de la coagulation dépendants de la vitamine K (II, VII, X), de même que des protéines S et C. Le diagnostic différentiel peut être réalisé plus simplement par mesure du TQ qui sera anormalement élevé dans le cas d'une carence en vitamine K à cause du déficit en facteur de coagulation de la voie endogène également.

➤ Hémophilie B acquise

L'HB acquise est liée à l'existence, chez des sujets non atteints hémophilie, d'anticorps dirigés contre le FIX. Cette maladie rare peut survenir principalement chez la femme enceinte, les malades ayant une maladie auto-immune, ou chez des sujets âgés (Tailhefer, 2013). La manifestation clinique la plus fréquente est l'existence d'hématomes importants. Dans cet état, le diagnostic repose sur un test de mélange (Chambost and Meunier, 2006) et particulièrement un dépistage et un titrage des anticorps.

III.5.4. Diagnostic moléculaire

Aujourd'hui, il est recommandé de génotyper tous les malades hémophiles B, et ce quel que soit le degré de gravité de la pathologie.

Le génotypage est nécessaire pour la détection des porteuses d'hémophilie et permet d'établir un diagnostic prénatal dans beaucoup de cas.

Un diagnostic génétique pré implantaire est aussi réalisable, cela permet aux parents à risque de transmettre la maladie dans sa forme grave de savoir quel embryon est affecté ou non.

En outre, le génotypage peut donner des informations pour la prise en charge d'un malade hémophile (il se trouve une corrélation entre l'anomalie génétique et le risque de développer un inhibiteur).

L'utilisation de PCR dans les zones importantes du gène, associée à un séquençage des produits d'amplification peuvent conduire de définir la mutation en cause.

Car il n'existe aucune atteinte familiale et qu'un seul sujet masculin est atteint on peut conclure l'existence d'une néomutation survenue dans la gamétogenèse de la mère. Il convient alors de pouvoir analyser la mutation chez le proposant et de trouver la lésion génétique en cause.

III.6. Signes cliniques de la maladie

Le capital signe est le saignement, les autres manifestations sont des résultats de ce dernier (Jover-Cerveró et al, 2007).

La symptomatologie clinique dépend beaucoup du taux de facteur.

Chez les hémophiles mineurs, les saignements ne sont jamais spontanés et font suite en général à un traumatisme grave ou à une intervention chirurgicale.

Chez les hémophiles modérés, des saignements peuvent se produire après des traumatismes peu importants.

Finalement, chez les patients atteints d'hémophilie grave, les hémorragies sont fréquentes. Donc ces patients sujets à des saignements intra-articulaires (hémarthroses) qui peuvent se produire sans notion de traumatisme évident. Des hématomes intramusculaires peuvent pareillement survenir après des traumatismes minimes. Les premiers saignements surviennent habituellement dans la première année de vie. Les hémarthroses touchent d'une manière préférentielle les articulations des genoux, des coudes et des chevilles. Des hémarthroses répétées sur la même articulation entraînent progressivement une destruction cartilagineuse qui peut conduire à une certaine arthropathie après plusieurs années. Par ailleurs, certains hématomes, de localisation dangereuse (hématomes intracrâniens, péri-laryngés, du plancher buccal, péri-orbitaires, ou comprimant un paquet vasculo-nerveux), peuvent mettre en péril le pronostic fonctionnel ou vital.

III.7. Complications

Les malades hémophiles sont bien entendu exposés à des complications hémorragiques dont la survenue est en grande partie conditionnée par le degré de gravité de la pathologie.

III.7.1. Arthropathie hémophilique

Les hémophiles sévères sont exposés à la progression d'une arthropathie (hémophilique), résultat inéluctable d'hémarthroses répétées. Elle peut conduire à une impotence fonctionnelle et à d'importantes déformations articulaires. La répétition des hémarthroses constitue un réel cercle vicieux où les saignements intra-articulaires itératifs délivrent du fer, conduisant à une destruction cartilagineuse et une inflammation de la membrane synoviale. La membrane synoviale inflammatoire et hyper-vascularisée ressaigne alors plus aisément.

III.7.2. Infections

L'un des risques résultant du traitement substitutif chez un hémophile est infectieux, bien qu'il soit devenu aujourd'hui très faible, mais non nul. Avant 1980, les risques de transmission d'hépatite B et C ainsi que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) étaient élevés. Le risque d'hépatite B peut être aujourd'hui éliminé par la vaccination précoce et systématique des enfants. Quant à l'hépatite C et l'infection par le VIH, le risque est quasiment nul après l'avènement de produits très sécuritaires et l'application de mesures préventives stricts (sélection des donneurs, dépistage du génome viral, inactivation virale, etc).

III.7.3. Inhibiteurs anti-facteurs

Dans le cas de l'hémophilie, les « inhibiteurs » désignent les anticorps IgG qui neutralisent les facteurs de coagulation. Quand les concentrés de facteur de coagulation sont soumis à une inactivation virale appropriée, les inhibiteurs aux FVIII ou IX sont considérés comme la complication du traitement la plus sévère chez les hémophiles. De tels anticorps se développent chez 10 à 30 % des hémophiles A sévères (Iorio et al, 2010) et chez 1 à 3% des hémophiles B sévères (DiMichele, 2007). Malgré que cela soit beaucoup plus rare, mais des inhibiteurs peuvent aussi se montrer chez des hémophiles modérés ou mineurs (Hay et al, 1998).

Les inhibiteurs anti-FVIII et anti-FIX peuvent neutraliser le FVIII ou le FIX par trois grands processus : soit par hydrolyse catalytique (50 % des cas) (Lacroix-Desmazes et al, 1999), soit par encombrement stérique, soit par la formation des complexes immuns qui augmentent la clairance du FVIII ou du FIX (anticorps non neutralisants) (Kazatchkine et al, 1980). Compte tenu du caractère polyclonal des anticorps, les différents mécanismes peuvent être intriqués.

La survenue des anticoagulants circulants est régie par des facteurs de risque propres au malade et d'autres propres à son environnement. Les facteurs qui influencent cette réponse immune indésirable sont multiples : variation de la séquence protéique du facteur, adjonction d'un dérivé glycosylé, dose administrée (Annie, 2012), facteurs propres au patient (origine ethnique (Hay, 2006), mutation responsable de l'hémophilie, l'existence d'antécédents familiaux d'inhibiteurs (Astermark et al, 2001).

III.8. Traitement

Il se trouve un traitement efficace pour limiter le risque de saignement ou pour traiter un saignement, malgré qu'il soit impossible à l'heure actuelle de guérir l'hémophilie. Le traitement consiste à administrer par voie intraveineuse le facteur de la coagulation déficient. Ces substituts peuvent être dérivés du sang humain ou être produits par génie génétique (recombinants). Le FIX dérivé du sang est devenu sûr depuis que des méthodes de suppression des virus transmissibles par le sang ont été systématisées.

Il existe deux types de traitement de l'hémophilie ; le traitement à la demande et la prophylaxie (préventif) (Colvin et al, 2008). Pour le premier cas, il s'agit d'injecter par voie intraveineuse le facteur de coagulation défaillant en cas de saignement, en vue de le cesser. Dans le second cas, le facteur de coagulation est administré à intervalles réguliers (tous les deux ou trois jours). Ce type de prise en charge de la maladie est très pratique pour diminuer la répétition des saignements et restreindre les invalidités qui en découlent.

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

Notre étude a été divisée en deux parties: une étude biologique et une étude moléculaire. Cette étude a été réalisée en 12 mois sur deux périodes allant de Septembre 2014 à Février 2015 et d'Avril 2017 à Septembre 2017.

L'étude biologique a été réalisée sur 39 patients atteints d'HB de sexe masculin et dont l'âge varie de 4 à 84 ans, appartenant à 13 familles non apparentés (9 sévère, 3 modérée et 1 avec la forme mineure). Pour étudier quelques paramètres tels que le degré de sévérité, 94 patients hémophiliques A ont été inclus. Seulement 29 parmi 39 patients hémophiliques B ont été inclus pour le bilan biologique, la réalisation de ce bilan incluant le dosage des plaquettes, TP, TCA et FVIII nécessite l'inclusion des témoins sains ayant des caractéristiques communes avec les patients tels que le sexe, l'âge et le lieu de résidence. Les résultats de cette partie de notre recherche ont été effectués au sein du laboratoire d'hématologie du CHU de BATNA.

Le diagnostic moléculaire a porté sur les 39 hémophiles B. Après recueil du consentement éclairé des cas index et de leurs parents en cas des patients mineurs (Annexe 1), un volume de 5 à 10 ml de sang périphérique a été prélevé pour chaque patient et recueilli dans des tubes contenant une solution d'Éthylène Diamine Tétra Acétique (EDTA). Ces prélèvements sanguins nous ont été fournis par les services d'hématologie des Centres Hospitalo-Universitaires (CHU) de BATNA et de Constantine. Une fiche de renseignements regroupant les différents paramètres cliniques nécessaires pour une enquête biologique de l'HB a été établie pour chaque patient (date et lieu de naissance, date de diagnostic, présence de cas similaires dans la famille, taux en facteurs de la coagulation) (Annexe 2). Des échantillons d'ADN de témoins sains nous ont été fournis par l'unité d'Hémostase et Thrombose: caractérisation phénotypique et moléculaire des pathologies hématologiques à Tunisie (UR14ES11) et par le centre de génétique humaine à Bruxelles où la recherche des mutations a été effectuée.

I. Diagnostic biologique

Le principal objectif de ce volet est d'étudier quelques paramètres biologiques chez des malades atteints d'HB afin de préciser les caractéristiques biologiques chez une partie de notre population.

Le diagnostic d'hémophilie est suspecté sur des arguments cliniques ou sur l'hérédité, mais sa confirmation relève d'un bilan biologique. Le diagnostic biologique repose sur des tests d'orientation et d'autres de confirmation :

Le bilan biologique d'orientation permet de suspecter l'hémophilie devant (Masrar and Benkirane, 2005) :

- Une hémostase primaire, explorée par le Temps de Saignement normal (avec une numération plaquettaire normale). Dans notre étude, seulement la numération plaquettaire a été réalisée.
- Un TQ normal.
- Un TCA allongé.

Il sera affirmé par le dosage des facteurs VIII et IX qui permet de préciser:

- Le type de l'HA (déficit en FVIII) ou B (déficit en FIX).
- Le degré ou la sévérité de l'hémophilie :
 - Hémophilie sévère : FVIII ou FIX < 1 %
 - Hémophilie modérée : FVIII ou FIX compris en 1 et 5 %
 - Hémophilie mineure : FVIII ou FIX > 5 % - < 40 %

I.1. Numération des plaquettes

L'hémogramme; numération et formule sanguine (NFS) qui consiste à étudier quantitativement (numération) et qualitativement (formule) les éléments figurés (des globules rouges, des globules blancs et des **plaquettes**) du sang à la suite d'une prise de sang. Actuellement, grâce aux techniques modernes, l'hémogramme est effectué par des automates au lieu du dénombrement en microscope optique après dilution manuelle (Bain, 2002).

L'appareil que nous avons utilisé pour la numération des plaquettes est le coultér (l'automate médonique CA (cell analyseur : 620). Dans une température ambiante varie de 20 à 22°C, le sang veineux est prélevé dans des tubes EDTA qui sont placés en contact avec l'aiguille du coultér qui va absorber 100 µl de sang, le résultat s'affiche par la suite sur l'écran de l'automate.

I.2. Dosage de prothrombine

Le TQ est le temps de coagulation d'un plasma citraté après addition de thromboplastine calcique. Ce réactif contient du FT, des phospholipides et des ions Ca^{2+} et permet l'activation directe du FVII (Guelfi and Diquelou, 1994). Le TQ explore la voie extrinsèque impliquant les facteurs de coagulation suivants: FI (fibrinogène), FII (prothrombine), FV (proaccéléline), FVII (proconvertine) et FX (Stuart).

La réalisation de ce test se fait sans centrifugation du sang prélevé sur citrate de sodium à 3,8 % (1 volume pour 9 volumes du sang) (Morales et al, 2007). Le principe du TQ consiste à comparer, en présence de thromboplastine calcique (en utilisant le kit STA-Néoplastine® CI), le temps de coagulation d'un plasma à étudier par rapport à un témoin normal et un témoin pathologique servant de référence (ces deux derniers sont préparés préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester puis lyophilisés, auxquels on rajoute 50 µl d'eau distillée pour obtenir un plasma prêt à l'utilisation).

Au 50 µl du plasma à tester sont rajoutés 100 µl de la néoplastine calcique (thromboplastine humaine), le mélange est incubé à 37°C pendant 2 minutes (min), puis, on déclenche le chronomètre.

Il existe trois façons différentes d'exprimer le résultat :

- Le **TQ**, exprimé en secondes (sec) par rapport au temps d'un témoin.

➤ Le **TP**, exprimé en pourcentage par rapport à la normale.

➤ Un troisième mode d'expression est exclusivement réservé à la surveillance des traitements anticoagulants par les antagonistes de la vitamine K : l'**INR** (International Normalised Ratio) correspond au rapport du TQ du patient sur celui du témoin, élevé à la puissance ISI, cet index (International Sensitivity Index) définissant la sensibilité du réactif utilisé.

L'appareil calcule le TQ qui va être convertit en TP grâce à une droite d'étalonnage dite de «Thivolle».

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide de plasma étalon titré à 90%, une dilution se fait avec tampon Owren koller du plasma normal au 1/4, 1/3 et 1/2:

- La dilution au 1/4 correspond à un TP de 23%.
- La dilution au 1/3 correspond à un TP de 30%.
- La dilution au 1/2 correspond à un TP de 45%.
- 50 µl du plasma pure correspond à un TP de 90%.

100 µl de la néoplastine calcique ont été rajoutés aux plasmas dilués et plasma pure. Après une incubation à 37°C pendant 2min. On déclenche le chronomètre, puis on détermine le temps de coagulation de chaque dilution pour établir la courbe d'étalonnage (Quick, 1935). Les résultats de la calibration obtenus sont les suivants :

Pourcentage d'activité (%)	Temps de coagulation (sec)
23%	34,3 sec
30%	27,9 sec
45%	20,8 sec
90%	14,2 sec

I.3. Temps de céphaline + activateur (TCA)

Le TCA correspond au temps de coagulation d'un plasma décalcifié et déplaqueté, en présence de céphaline et d'un activateur (l'activateur peut être particulière «célite, kaolin, silice» ou soluble «acide ellagique») des facteurs de la phase contact et de Ca^{2+} . La céphaline est un substitut des phospholipides plaquettaires dont il existe plusieurs formes commercialisées. Le TCA explore globalement l'ensemble des facteurs de la coagulation de la voie endogène de la coagulation (facteurs XII, XI, IX, VIII, X, V, II et I).

Le TCA est réalisé sur l'automate STA compact en utilisant le kit STA[®] - C.K. prest[®]. Le principe du test repose sur une activation préalable du système contact de coagulation (Larrieu and Weiland, 1957). Le sang est prélevé sur citrate de sodium à 3.8 % (en respectant les proportions d'un volume d'anticoagulant pour neuf volumes de sang), puis centrifugé à 3000 rpm pendant 20 min afin d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes. Au 100 µl de plasma à tester sont rajoutés 200 µl de céphaline + l'activateur, puis, le mélange est incubé à 37°C pendant 2 min. Par la suite, on ajoute 0,025 M de CaCl₂ (chlorure de calcium) tout en

déclenchant le chronomètre et on note le temps de coagulation comparé à un témoin normal et un témoin pathologique servant de référence (ces deux derniers sont préparés préalablement dans les mêmes conditions que celle du plasma à tester puis lyophilisés, auxquels on rajoute 100 µl d'eau distillée pour obtenir un plasma près à l'utilisation). Le résultat est exprimé en secondes par rapport à un témoin (mélange de plasmas de sujets normaux) (White et al, 1994). Il peut également être exprimé sous forme de ratio : TCA patient/TCA témoin.

Le résultat est généralement considéré comme anormal si le TCA du malade sur TCA du témoin dépasse 1.2. Le TCA est par ailleurs plus long chez les enfants, pour lesquels il n'existe pas de valeurs de référence clairement établies ; il se raccourcit avec l'âge.

Le ratio (TCA patient/TCA témoin) varie en fonction de l'âge :

- de 0 à 1 mois : ratio < 1.6.
- de 1 à 3 mois : ratio < 1.5.
- de 3 mois à 16 ans : ratio < 1.3.
- après 16 ans : ratio < 1.2.

I.4. Diagnostic de confirmation

Une fois que le prolongement du TCA est mis en évidence et afin de savoir de quel facteur vient le déficit il est nécessaire de mesurer chacun de ces facteurs (VIII, IX, XI, XII). En pratique seuls les FVIII et FIX sont testés en première intention, les hémophilies A et B étant les troubles les plus fréquents dans cette situation.

I.5. Dosage du FVIII et FIX

Le principe du dosage consiste à déterminer, en présence de céphaline et d'activateur, le temps de coagulation où tous les facteurs sont présents, à l'exception du FVIII ou FIX apporté par le plasma du patient à tester (Soulier and Larrieu, 1953).

I.5.1. Préparation des plasmas utilisés pour le test

➤ Préparation du plasma déficient en FVIII et FIX

Ce plasma est obtenu à partir du prélèvement par ponction veineuse du sang provenant d'un déficit congénital total en FVIII et FIX, recueilli sur citrate de sodium, et centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min. Le plasma réactif est donc congelé et peut être conservé à -20°C pendant une période de 3 mois.

➤ Préparation du plasma à tester

Le plasma à tester est obtenu à partir du sang (9 volumes) recueilli sur citrate de sodium à 3,8% (1 volume) par centrifugation à 2700 rpm pendant 5 min dans les mêmes conditions physiologiques.

I.5.2. Dosage du FVIII

Pour doser le FVIII, l'automate utilisé est l'appareil STA compact. Cette technique repose sur la comparaison du temps de coagulation d'un plasma à tester en comparaison d'un témoin normal et d'un témoin pathologique qui servent de référence (la préparation de ces témoins se fait dans les mêmes conditions que celles du plasma à étudier ensuite lyophilisés, auxquels est rajouté 50 µl d'eau distillée). 50 µl du plasma déficient en FVIII (STA[®] - Deficient VIII) et 50 µl de céphaline + activateur sont rajoutés au 50 µl du plasma à tester (plasma pauvre en plaquettes dont la dilution est fait au 1/10 en tampon Owren koller). L'incubation du mélange se fait à 37 °C pendant 3 min. Et avant de déclencher le chronomètre, 50 µl de CaCl₂ sont rajoutés. Les résultats sont obtenus en pourcentage.

La gamme d'étalonnage comprend une dilution en tampon Owren koller du plasma normal au: 1/2, 1/3, et 1/7. Par définition :

- 1/2 correspond à l'activité 50%.
- 1/3 correspond à l'activité 33%.
- 1/7 correspond à l'activité 13%.
- 50 µl du plasma normal non dilué (pure), correspond à l'activité 100%.

50 µl du plasma déficient en FVIII, et 50 µl de céphaline + activateur ont été rajoutés aux plasmas dilués et plasma pure. Après une incubation à 37 C pendant 3 min. 50 µl de CaCl₂ ont été rajouté pour déclencher le chronomètre, ensuite on détermine les temps de coagulation de ces différentes dilutions pour établir la courbe d'étalonnage.

Pourcentage d'activité (%)	Temps de coagulation (s)
100%	56,2 sec
50%	68,3 sec
33%	65,8 sec
13%	72,4 sec

I.5.3. Dosage du FIX

Le dosage du FIX est identique à celui du FVIII sur tous les plans : le principe, le matériel, le mode opératoire, les résultats et la courbe d'étalonnage sauf pour l'utilisation d'un plasma déficient en FIX (STA[®] - Deficient IX).

Il existe plusieurs complications de l'hémophilie dont l'apparition d'inhibiteurs pendant le traitement. Tous nos patients ont été testés aux inhibiteurs.

I.6. Recherche des inhibiteurs

Le traitement de l'hémophilie fait appel à l'utilisation de concentrés de FVIII pour l'HA et FIX pour l'HB. La complication la plus craintive est la survenue d'anticorps qui freinent l'activité procoagulante du facteur antihémophilique (FAH), principalement au décours de l'HA sévère.

La détection et le titrage d'inhibiteurs anti-FIX ou anti-FVIII semblent généralement être effectuée :

- lors du diagnostic d'une hémophilie, pour distinguer hémophilie congénitale et hémophilie acquise ;
- lors du suivi de l'hémophile, touché de forme congénitale, traité par concentrés de FAH selon un schéma dépendant de la sévérité de l'hémophilie.

La recherche d'un anticoagulant circulant (ACC) par le test dit « du mélange Malade + Témoin » doit être méthodiquement réalisée devant un TCA allongé isolément. Ce test repose sur le mélange du volume à volume le plasma du malade avec celui d'un sujet témoin ou d'un mélange de plasmas normaux. L'incubation pendant 2 heures à 37°C aidera de confirmer ou d'infirmer le diagnostic. On pratique le TCA sur le plasma du patient, le plasma du témoin et le mélange. Le diagnostic repose sur l'épreuve de correction du TCA par du plasma normal. Si l'anomalie est liée à un déficit, l'addition de plasma normal corrige le TCA du malade. Si l'anomalie est liée à l'existence d'un ACC, le TCA du malade n'est pas corrigé par le plasma normal. Le résultat peut être exprimé par l'indice de Rosner (IR):

$$\text{IR (\%)} = \frac{\text{TCA (M+T)} - \text{TCA (T)}}{\text{TCA (M)}} \times 100$$

- < 12% : absence d'ACC
- 12-15% : douteux
- > 15% : présence d'ACC

I.7. Analyses statistiques

Pour étudier quelques paramètres biologiques, les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem. Pour comparer les moyennes des échantillons, nous avons utilisé le test "t" de student, l'effectif "N" (nombre des sujets) est <30 (les calculs ont été effectués à l'aide d'un logiciel Graph Pad Prism 6,00).

II. Diagnostic moléculaire (recherche de mutations)

Le principal objectif de ce volet de thèse était de détecter les mutations responsables de l'HB chez 39 patients appartenant à 13 familles Algériennes non apparentées. Nous avons procédé à l'analyse des 8 exons du gène F9 de nos patients ainsi que les régions introniques en amont et en aval des exons sur au moins 20 pb, suivie dans le cas échéant d'un séquençage du promoteur et de la région poly A.

II.1. Extraction d'ADN

II.1.1. Réactifs pour extraction d'ADN à partir d'échantillons de sang de patients

ELB Erythrocytes lysing buffer, pH 7.4

NH₄Cl : 155 mM : 41.45g
KHCO₃: 10 mM : 5.006g
EDTA : 1 mM : 10 ml d'une solution stock à 0.5M
H₂O qsp : 5 L

SE Sodium-EDTA, pH 8

NaCl : 75mM :45ml d'une solution stock à 5M
EDTA : 24mM :144ml d'une solution stock à 0,5M
H₂O qsp : 3 L

TE⁻⁴ Tris-EDTA

Tris : 10mM : 8ml d'une solution stock à 1M
EDTA : 0.1mM :160 µl d'une solution stock à 0.5M
H₂O qsp : 800 ml

Protéinase K 100mg/16ml

SDS 20% ED **Ethanol** : 70%

NaCl 6M (solution saturée- utiliser le surnageant)

NaCl : 70g
H₂O qsp : 200 ml

II.1.2. Méthode d'extraction d'ADN

Pour confirmer génétiquement le diagnostic et surtout la sévérité de la maladie chez des sujets atteints, cela nécessite l'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN), support de notre information génétique, ceci se fait à partir de sang total en utilisant la technique Salting out (Miller et al, 1988).

II.1.2.1. Lyse des érythrocytes

Les érythrocytes (du grec erythros : rouge et kutos : cellule), ou hématies, plus usuellement appelés globules rouges. Ces cellules font partie des éléments figurés du sang, dépourvues de noyau donc dépourvues d'ADN (dite anucléées chez les mammifères), l'hémoglobine est abondant dans leur cytoplasme mais ce dernier est pauvre en organites. Les globules rouges assurent le transport du dioxygène (O₂). Et car elles ne contiennent pas d'ADN, il faut alors les éliminer par l'emploi d'une solution hypotonique qui a pour but leur éclatement.

Chaque tube de sang est vidé dans un tube de 50 ml correspondant. A l'aide d'un cylindre gradué, la solution ELB est portée à 40ml. Le statif de tubes ainsi remplis est déposé à 4°C durant 15 min pour optimiser la lyse des érythrocytes. On mélange une ou deux fois les tubes à mi-parcours. A la fin de ces 15 min, les érythrocytes sont lysés et seuls les globules blancs restent entiers en suspension. On centrifuge les tubes 10 min à 1600 rpm afin de former un culot de globules blancs et cela dans la centrifugeuse à 4°C.

II.1.2.2. Lyse des globules blancs

On élimine le surnageant de chaque tube dans l'évier en faisant attention de ne pas perdre les globules blancs. Afin de mettre en solution l'ADN contenu dans les noyaux par la lyse des membranes plasmiques et nucléaires, on ajoute aux culots 5 ml de SE, 250 µl de SDS 20% et 100 µl de protéinase K. Afin de décoller le culot de globules blancs au fond des tubes, on agite ces derniers correctement et on les place sur la plaque agitatrice pour la nuit.

II.1.2.3. Dénaturation des protéines

On dépose 2 ml de NaCl 6M dans chaque tube de 15 ml, puis on transfère le contenu de chaque tube de 50 ml dans le tube correspondant de 15 ml, on les mélange virilement durant au moins 1 min afin que le mélange entre la solution d'ADN et de protéines et la solution sursaturée en NaCl devienne homogène (aspect laiteux). Une centrifugation à 4°C durant 20 min à 3800 rpm permet la précipitation des protéines au fond du tube. On enlève l'éventuelle couche de protéines formée à la surface à l'aide d'une pipette pasteur et on transfère le surnageant dans le second tube de 15 ml contenant déjà 2 ml de NaCl 6M. On mélange délicatement sans faire mousser les tubes durant au moins 1 min. Une deuxième centrifugation à 3800 rpm pendant 20 min à 4°C permet l'élimination totale des protéines au fond du tube, alors que l'ADN est à l'état soluble dans la phase aqueuse.

II.1.2.4. Précipitation de l'ADN à l'alcool

On verse le surnageant limpide dans le tube de 50ml et y ajouter 9ml d'isopropanol. Celui-ci va faire précipiter l'ADN. On mélange délicatement les tubes, l'ADN va apparaître rapidement sous forme d'une masse de fibres visibles appelées la méduse, on la récupère à l'aide d'une pipette pasteur et la transfère dans un tube de 14 ml (tube à méduses). Un rinçage de trois fois de la méduse à l'aide d'éthanol 70% (-20°C), permet d'enlever tous les résidus d'isopropanol de l'ADN qui pourraient nuire aux PCR et permet également de sécher la méduse.

II.1.2.5. Mise en solution de l'ADN

Une fois la méduse séchée, on la réhydrate selon sa taille à l'aide de TE⁻⁴ (entre 100 et 700µl) et on place les tubes sur les rouleaux mélangeurs pendant toute la nuit pour homogénéiser l'ADN.

II.1.2.6. Estimation de la concentration et le degré de pureté de l'ADN

L'ADN étant la matière première de notre étude, sa qualité est essentielle et conditionne la réussite de nos analyses. Avant de procéder à l'étape suivante, la qualité et la quantité d'ADN sont méthodiquement évaluées.

Pour les réactions d'amplification par la technique PCR, il est nécessaire de connaître la concentration en acides nucléiques des échantillons utilisés ainsi que leur pureté. En réalité, une concentration trop haute d'ADN peut empêcher la réaction d'amplification. Pour un échantillon, 1 µl d'ADN dosé à 250 ng/µl suffit.

La concentration et la pureté des échantillons en ADN ont été déterminées grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre (NanoDrop2000). Le spectrophotomètre NanoDrop2000 permet de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant des petits volumes d'échantillons sans cuvettes ni capillaires.

La technique de spectrophotométrie est utilisée pour une quantification exacte de l'ADN. Ainsi, la concentration en ADN est évaluée par mesure de la DO au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm, notant que l'ADN a un spectre d'absorption en UV maximum à 260 nm. Ce spectre d'absorption est proportionnel à la concentration de l'ADN (une unité de densité optique (DO) à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin).

L'estimation de la concentration de l'ADN est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{ADN} = \text{DO } 260\text{nm} \times d \times 50 \quad d \text{ étant le facteur de dilution}$$

La mesure de la DO à 280 nm sert à détecter les éventuels contaminants. La pureté de l'échantillon est testée par le rapport entre la DO à 260 nm et la DO à 280 nm et cela pour détecter toute contamination protéique. Ainsi les protéines absorbent à 280 tandis que l'ADN absorbe à 260nm. Une préparation d'ADN est dite pure si elle présente un rapport de DO 260/DO 280 de 1.8.

Les concentrations des différents prélèvements d'ADN ont ensuite été ajustées par dilution. Pour un stockage à court terme, l'ADN est conservé à 4°C, tandis que pour un stockage à long terme, l'ADN sera conservé à -20°C.

Si la pureté et la concentration d'ADN sont satisfaisantes, on réalise l'amplification par PCR.

II.2. Technique de PCR**II.2.1. Principe**

L'amplification en chaîne par polymérase ou polymerase chain reaction (PCR) est une méthode d'amplification génique in vitro, qui permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard), une séquence d'ADN connue, à partir d'une

faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique (Saiki et al, 1985 ; Mullis and Faloona, 1987).

La réaction PCR, réalisée automatiquement par un automate « thermocycleur », comprend des cycles successifs comportant chacun trois phases : une dénaturation d'ADN, une hybridation des amorces et une élongation des brins à partir des amorces.

Pour amplifier une séquence cible d'ADN, deux amorces ; courtes séquences spécifiques de nucléotides, délimitent cette séquence. Chacune s'hybride sur l'ADN délimitant ainsi la séquence à amplifier, l'amorce F (forward: sens) en amont sur le brin sens et l'amorce R (reverse: anti-sens) en aval sur le brin anti-sens, chacune servant de point de départ à la synthèse d'un nouveau brin complémentaire.

La synthèse de ce nouveau brin est rendue possible par l'action d'une enzyme ADN polymérase thermorésistante, appelée Taq polymérase (Saiki et al, 1988), ainsi que par la présence de désoxyribonucléotides (dNTP), d'un tampon spécifique à l'enzyme et de MgCl₂ (Saiki, 1989). Certaines molécules, telles que la BSA (Bovine Serum Albumin; Albumine de sérum bovin), la spermine ou le DMSO (Dimethyl sulfoxide), peuvent être ajoutées à la PCR afin de favoriser la spécificité et la synthèse des amplicons.

Une PCR est composée d'un cycle de trois étapes successives qui se répètent un certain nombre de fois, permettant ainsi la réplification de la séquence déterminée. A la fin de chaque cycle, le produit d'amplification obtenu sert de matrice pour le cycle suivant. Ce qui explique que l'amplification soit exponentielle.

Avant de démarrer les cycles de PCR, une étape de chauffage (habituellement 10 min à 95 °C) est effectuée. Cette étape conduit à déshybrider les ADN double brin, de détruire les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu de réaction par agitation thermique et d'activer les polymérases de type « Hot start » qui réduisent l'amplification non spécifique. Une deuxième dénaturation (généralement 30 sec à 95 °C) conduit à déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore associées à une matrice et d'homogénéiser le milieu de réaction.

En général une température de 50-65 °C pendant 30 sec permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice par une température qui leur est thermodynamiquement appropriée. Une température de 72 °C permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice. Cette température et pendant 7 min conduit à polymérisation finale. Une fois un cycle terminé, un nouvel amplicon similaire à la séquence cible originale est obtenu. Le cycle qui succède peut alors commencer avec deux fois plus de matrice, ce qui confère son pouvoir d'amplification exponentielle à la PCR. En effet, la séquence cible est doublée à chaque cycle. En théorie cette amplification est sans limites mais, en pratique, on constate l'apparition d'un plateau au bout de 25 à 30 cycles. Cela est dû à un épuisement des constituants du mélange réactionnel ainsi qu'à une compétition entre les amplicons et les amorces en nombre limitées.

II.2.2. Choix des amorces

Une série de dix couples d'amorces ont été utilisées dont 2 pour l'exon 8 afin d'amplifier les 8 exons, le promoteur et le poly A du gène F9 (**Tableau 6**). L'exon 8 était divisé en 2 fragments (Exon 8p et exon 8d) à cause de sa longueur.

La conception des amorces se fait par des méthodes bioinformatiques en utilisant UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>), en basant sur des caractéristiques bien déterminées telles que la longueur de l'amorce et le pourcentage de GC. La température de fusion des amorces T_m (Température melting) est calculée selon la formule suivante :

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2 (A+T) + 4 (G + C).$$

Tableau 6. Amorces utilisées pour l'amplification des exons, du promoteur et du poly A du gène F9.

Région fonctionnelle	Sequence de l'amorce	Nom	Taille du produit (pb)
Promoter	5'-CAAGCTACAGGCTGGAGACA-3' 5'-TCTCCCTCAATGGGCTCTTTG-3'	HEMBp-M13	410
Exon 1	5'-TTCAGACTCAAATCAGCCACA-3' 5'-AAAAGGCAAGCATACTCAATGT-3'	HEMBex1-M13	354
Exons 2-3	5'-CAAAGACTTTCTTAAGAGATGT-3' 5'-GACAAAGTTTAATATATTATCTAT-3'	HEMBex2-3M13	557
Exon 4	5'-ATCCCAATGAGTATCTACAGG-3' 5'-CACCAATATTGCATTTTCCAG-3'	HEMBex4-M13	275
Exon 5	5'-ATACATGAGTCAGTAGTTCCA-3' 5'-AGGAAGCAGATTCAAGTAGG-3'	HEMBex5-M13	309
Exon 6	5'-TCTCAGAAGTGACAAGGATG-3' 5'-ACATCCCAATAGGTCTGTCT-3'	HEMBex6-M13	407
Exon 7	5'-CTATTCCTGTAACCAGCACA-3' 5'-CTTCTGCCTTTAGCCCAATT-3'	HEMBex7-M13	318
Exon 8p	5'-TTGCCAATTAGGTCAGTGGTC-3' 5'-ATGTGGCTCGGTCAACAAGT-3'	HEMBex8p-M13	400
Exon 8d	5'-TTTGCATTGCTGACAAGGAA-3' 5'-GCCCTGTTAATTTCAATTCCA-3'	HEMBex8d-M13	436
Poly A	5'-ACTAGCATACCCCGAAGTG-3' 5'-CGCCGCCGCGACTGATTCACAT-3'	HEMBpA-M13	265

pb : paire de bases

II.2.3. Protocole expérimental

Le risque le plus redouté lors de la PCR est la contamination qui est probablement de trois types :

- La contamination inter-échantillons pré-PCR, qui se définit par la contamination d'un échantillon intact par un échantillon positif avant la PCR (par exemple lors du prélèvement, lors de l'extraction...).
- La contamination des réactifs ou de l'échantillon avec de l'ADN amplifié est possible à partir d'une amplification précédente.

- La contamination inter-échantillons post-PCR, lors de la détection des produits amplifiés.

C'est pourquoi, la PCR exige une séparation physique (dans trois salles différentes) entre la préparation du milieu PCR (salle pré-PCR), le bench ADN pour introduire l'ADN dans le milieu PCR (paysager de l'ADN) et la détection après amplification (salle post-PCR).

En local pré-PCR, avant de commencer, il faut noter que la préparation des mix réactionnels, la mise en plaque et l'ajout de l'ADN s'effectuent toujours sur glace. Ceci pour deux raisons :

- Les enzymes polymérase sont thermosensibles et doivent être conservées à -20°C ou dans la glace pour éviter une diminution de leur activité, pour cette raison on sort tous les constituants nécessaires à la PCR des congélateurs à -20°C, sauf l'enzyme qui peut être sortie à la dernière minute.
- Cela permet d'éviter le démarrage d'une réaction PCR aspécifique entre l'ADN et les amorces à température ambiante.

Exons: 1 à 8 (sauf exons 2-3)

Exon 8 divisé en 8a et 8b

	Vol/Tube	Mix
Eau	19,05µl	781,05 µl
Tampon faststart + MgCl ₂ (ROCHE)	2,5µl	102,5µl
DNTP (10mM) (ROCHE)	0,25µl	10,25µl
Primer F (10µM)	1µl	41µl
Primer R (10µM)	1µl	41µl
Enz faststart (ROCHE)	0,2µl	8,2µl
ADN	1µl	
Total	25µl	

Exons : 2-3

	Vol/Tube	Mix (n+2)
Eau	17,55	719,55µl
Tampon faststart + MgCl ₂	2,5	102,5µl
DNTP (10mM)	0,25	10,25µl
Primer F (10µM)	1	41µl
Primer R (10µM)	1	41µl
Spermidine	1	12µl
BSA	0,5	20,5µl
Enz faststart	0,2	8,2µl
ADN	1	
Total	25	

$$\text{Mix} = \text{vol/tube} \times (n+2)$$

On prépare le mélange réactionnel en multipliant le tableau « mix » par le nombre d'échantillons en y ajoutant un contrôle négatif (blanc) et un échantillon supplémentaire pour tenir compte de la dérive des micropipettes ($39+2=41$). Après l'homogénéisation du mélange réactionnel au vortex 2 à 5 sec et la centrifugation du mélange réactionnel 2 à 5 sec avec la microcentrifugeuse, on répartit le mélange réactionnel dans les puits en fonction du nombre d'échantillons.

Sur le bench ADN, on ajoute 1µl d'ADN dans chaque puits de la plaque, en remplaçant l'ADN par de l'eau dans les puits « contrôle négatif » (volume final par puits : 25µl), les puits de la plaque sont fermés avec les barrettes en plastique de 8 bouchons.

En local post-PCR, on centrifuge la plaque à 2500 rpm pendant 30 sec et on la place dans le thermocycleur (Biometra TProfessional), un contact est établi entre le couvercle et la plaque pour éviter la condensation du mix dans les bouchons ainsi que son évaporation et les réactions en chaîne sont programmées durant 30 cycles à 94°C pendant dix min, à 94°C pendant trente sec, à 60°C pendant 30 sec, à 72°C pendant une mn et enfin à 72°C pendant sept min. Pour la température de 60°C de l'hybridation est remplacée par 65°C pour les exons 2 et 3 et ce, pour éliminer l'aspécificité de la réaction. Au total, la réaction d'amplification dure environ 6 heures (**Tableau 7 et 8**). Les produits PCR peuvent se conserver au frigo à 4°C jusqu'à ce que les résultats soient validés.

Tableau 7. Programme d'amplification de la PCR des exons 1 à 8 (sauf exons 2-3).**Exons : 1 à 8 (sauf exons 2-3)**

Etapes	T °C	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94 °C	10 min	30x
Dénaturation	94 °C	30 sec	30x
Hybridation	60 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Polymérisation finale	72 °C	7 min	1x
Pause	4 °C		

Tableau 8. Programme d'amplification de la PCR des exons 2-3.**Exons : 2-3**

Etapes	T °C	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94 °C	10 min	30x
Dénaturation	94 °C	30 sec	30x
Hybridation	65 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
Polymérisation finale	72 °C	7 min	1x
Pause	4 °C		

Pour déterminer si l'amplification a répondu aux critères attendus (spécificité, rendement et absence de contamination), une électrophorèse sur gel d'acrylamide et une électrophorèse sur gel d'agarose sont réalisées.

II.3. Electrophorèse

II.3.1. Principe

L'électrophorèse est une technique basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique, dont les molécules traversent une couche de gel sous l'impulsion d'un courant électrique. Permettant ainsi de séparer les molécules d'ADN amplifiées en fonction de leur taille dans un champ électrique homogène.

Une fois soumise à un courant électrique, la molécule d'ADN chargée négativement migre vers le pôle positif (anode) plus ou moins vite en fonction de sa taille. Plus les fragments sont petits, plus ils s'avancent rapidement dans le gel.

II.3.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Un gel de polyacrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse. Il est composé d'acrylamide qui est l'unité de base et de l'agent réticulant dont le plus utilisé est

le bisacrylamide (N, N'-méthylène bisacrylamide) qui est l'agent pontant (qui forme des ponts entre les chaînes). Selon des différentes proportions de ces deux substances on obtient des mailles de différentes tailles (tamis moléculaire) et par conséquent différentes densités de gel. La réaction de polymérisation se fait par l'ajout de deux substances réactives : le "Tétraméthyléthylènediamine (TEMED)" et "l'ammonium persulfate (APS)" qui, en réagissant avec la lumière, deviennent des anions hyper réactifs ce qui enclenchent la polymérisation.

II.3.2.1. Préparation d'un gel de polyacrylamide

Le choix de la concentration du gel de polyacrylamide se fait selon de la taille moyenne des fragments à séparer (**Tableau 9**).

Tableau 9. Concentration du support de l'électrophorèse en fonction de la taille des fragments à séparer (Sambrook et al, 1989).

% en polyacrylamide	Taille des fragments d'ADN à séparer (pb)
3.5	1000 – 2000
5	80 – 500
8	60 – 400
12	40 – 200
15	25 – 150
20	6 – 100

Pour préparer notre gel qui est de 8, on prépare les plaques en verre dans leur support pour le coulage du gel. Pour la préparation de 2 gels, on ajoute dans un erlenmeyer de 100ml :

	Vol pour 2 gels	Vol pour 7 gels
Eau stérile pour injection	6,8 ml	23,8 ml
TBE 10x	1 ml	3.5 ml
Acrylamide Bis 29:1	2 ml	7 ml
APS 10%	100µl	350 µl
TEMED	10µl	35 µl

Cette technique a été réalisée pour 10 patients parmi 39, ce qui nécessite la préparation de 7 gels. On coule le gel entre les deux plaques de verre à l'aide d'une pipette pasteur en plastique puis on place le peigne adéquat pour former les puits et on laisse le gel polymériser 15 mn environ. On introduit le gel dans une cellule électrophorétique contenant du tampon TBE 1X (SIGMA), en veillant à ce que le compartiment central soit bien rempli à ras-bord de tampon, et que l'électrode inférieure soit complètement immergée et on retire le peigne.

On mélange sur un morceau de Parafilm 3 µl de bleu de bromophénol et 2µl d'un marqueur de poids moléculaire adapté à la taille des produits d'amplification qui doivent être visualisés. On mélange 3 µl de bleu de bromophénol à 5 µl de chaque amplicon à vérifier permettant de visualiser la migration et on spotte délicatement l'ensemble de ces gouttelettes

dans les puits du gel, en veillant à ce qu'il n'y ait pas de passage (=contamination) d'un puits à l'autre. On place le couvercle adéquat sur la cuve et on branche les électrodes à une source de courant en faisant très attention de ne pas inverser les électrodes. Pour faire migrer le gel on applique une tension de 250Volts pendant environ 30min dès que le bleu de bromphénol est sorti du gel.

II.3.2.2. Révélation

La technique de révélation la plus réalisée est la révélation en utilisant le bromure d'éthidium (BET). Le BET est un intercalant dont le plus utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Comme il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent dont la couleur est rouge-orangée, 20 fois plus intense car il est lié à l'ADN. Cette action serait due à l'augmentation de l'hydrophobie de l'environnement, plutôt qu'à une rigidification du cycle benzénique, celui-ci n'étant pas situé entre les paires de bases.

Ainsi, on libère le gel de son montage, on enlève une des deux plaques en verre et on le plonge dans une solution contenant du TBE1x et du BET pendant quelques min.

Après la migration électrophorétique, le gel est éclairé sous ultraviolet afin d'observer les bandes d'ADN rendues fluorescentes grâce au BET. L'estimation de la taille des fragments est rendue possible grâce à la comparaison avec l'échelle de taille moléculaire (DNA-ladder de taille 100pb) qui a migré en parallèle des amplicons.

Le gel est déposé sur une plaque UV et est photographié avec un appareil photo numérique. Bien que la couleur de l'ADN fluorescent soit rouge-orangée, les photographies sont publiées en noir et blanc (**Figure 13**).

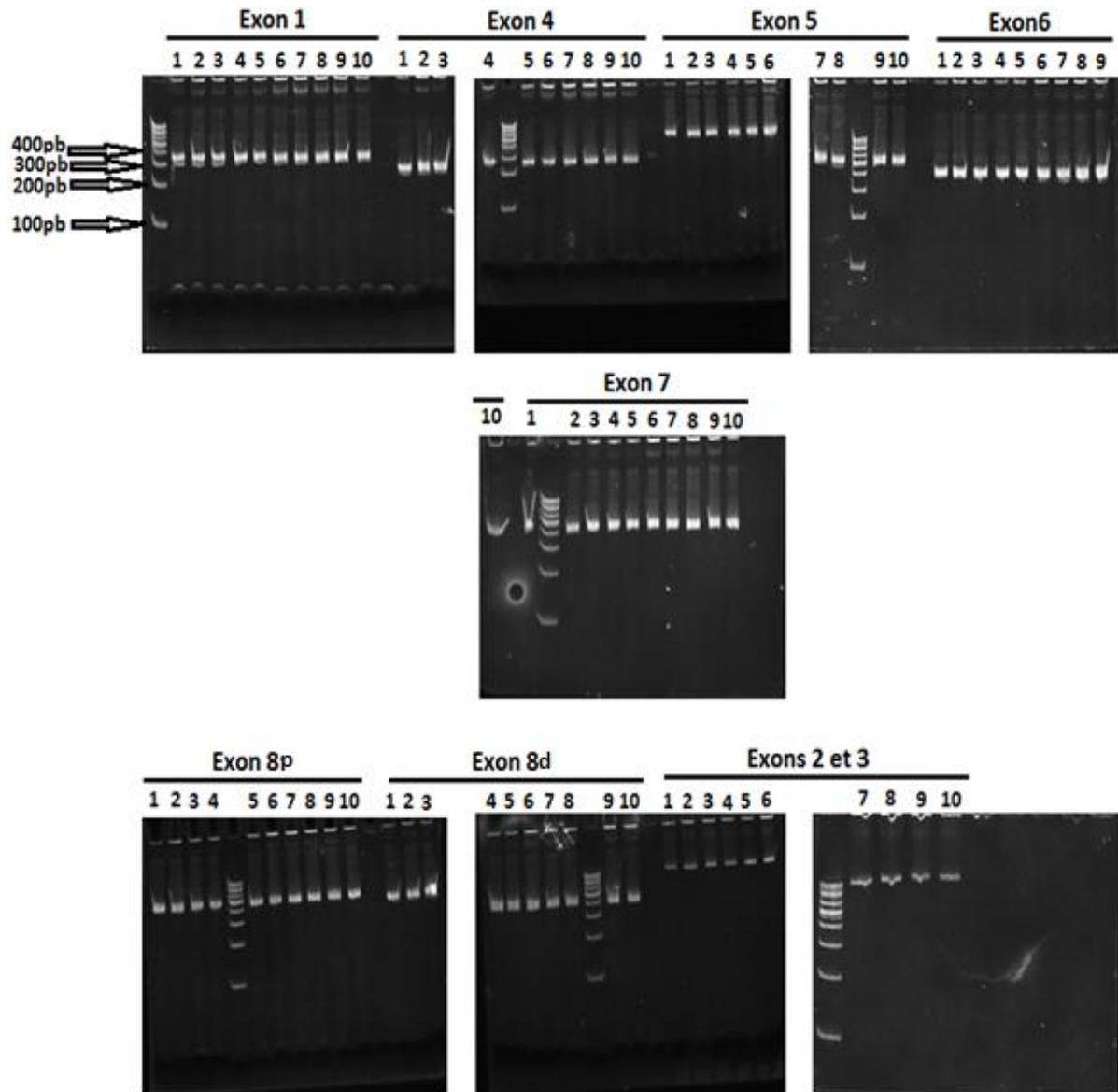


Figure 13. Electrophorèse en gel de polyacrylamide de tous les exons du F9 de 10 patients atteints d'HB.

II.3.3. Electrophorèse en gel d'agarose

L'agarose, un colloïde naturel retiré d'une algue, est un polysaccharide linéaire (masse moléculaire moyenne : ~12 000 Da) constitué de l'unité de répétition fondamentale agarobiose, elle-même constituée alternativement d'unités de galactose et de 3,6-anhydrogalactose.

Le choix de la concentration du gel d'électrophorèse en agarose est fonction de la taille des fragments de l'ADN à analyser (**Tableau 10**).

Tableau 10. Concentrations de gel d'agarose recommandées en fonction de la taille des molécules d'ADN (Somma and Querci, 2005).

% d'agarose	Éventail de tailles d'ADN (pb)
0,75	10 000 – 15 000
1,0	500 – 10 000
1,25	300 – 5 000
1,5	200 – 4 000
2,0	100 – 2 500
2,5	50 – 1 000

II.3.3.1. Préparation d'un gel d'agarose

Pour préparer du gel d'agarose à 1,5%, on dissout 110g d'agarose dans 75ml de tampon TBE concentré 0,5x. Le mélange est porté à ébullition de l'agarose et l'obtention d'une solution liquide transparente. On coule le liquide sur une cuve horizontale munie d'un peigne dont les empreintes formeront des puits au sein du gel.

II.3.3.2. Dépôt d'ADN et révélation

Après refroidissement du liquide à température ambiante jusqu'à formation d'un gel rigide, un mélange contenant 5µl d'ADN de chaque exon amplifié et 1µl du CSL-RUNSAFE est placé dans chaque puits. La migration se fait pendant 45 min à 90 volts en présence d'un marqueur de poids moléculaire.

La révélation se fait en plaçant le gel sur une plaque émettrice de lumière ultraviolette, l'ADN est visualisé sous forme de bandes fluorescentes grâce au CSL-RUNSAFE. La taille des bandes est estimée par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire de 100pb. Une photo du gel est prise par un appareil photo (**Figure 14**).

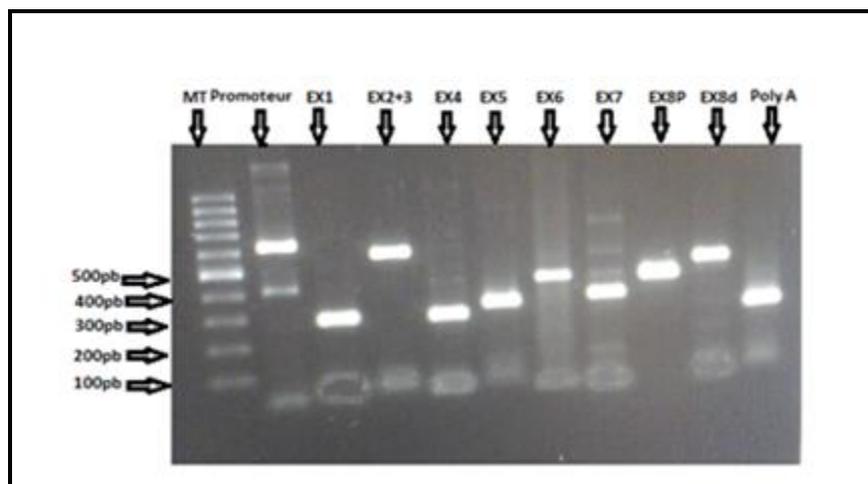


Figure 14. Electrophorèse en gel d'agarose du promoteur, huit exons et poly A du gène F9. EX: exon, MT: marqueur de taille.

II.3.4. Analyse du gel

Une PCR peut être validée uniquement si elle répond aux critères suivants :

- Les puits correspondants aux blancs ne doivent présenter aucune bande supérieure à 50 bp, signe d'une contamination. Des bandes entre 20 et 40 pb peuvent apparaître en raison d'un appariement des amorces (= dimères de primers).
- Les puits correspondants aux amplicons doivent présenter une bande nette. L'absence de bande signifie que la PCR n'a pas fonctionné et doit être recommencée. Une PCR peut également ne pas avoir fonctionné en raison d'une délétion d'un ou plusieurs exons.
- Si un amplicon présente deux bandes ou plus, bien distinctes, cela peut être dû à la présence d'une mutation avec insertion et/ou délétion. Cela sera confirmé lors du séquençage.
- Si un amplicon présente de nombreuses bandes de tailles diverses, c'est le signe d'une aspécificité. La PCR doit être remise au point.

Pour déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour les huit exons du F9 de nos patients, la réaction de séquence est réalisée. En absence de mutations, le promoteur et la région poly A ont été par la suite séquencés.

II.4. Réaction de séquence : Méthode Sanger**II.4.1. Principe**

La réaction de Sanger repose sur le principe d'une réaction de type PCR. Le milieu réactionnel comprend le produit PCR à séquencer (purifié ou non), une enzyme ADN polymérase, du tampon spécifique, des amorces spécifiques, des déoxynucléotides (dNTP) et des didéoxynucléotides (ddNTP). Ces derniers vont jouer un rôle d'interrupteur de la chaîne. Cette amplification se fait en utilisant les mêmes amorces de la PCR.

En effet, l'ADN polymérase permet l'incorporation de dNTP libres présents dans le milieu par formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5' phosphate du dNTP suivant. Les ddNTP ont exactement la même structure que les dNTP, à l'exception de leur extrémité 3'; 3'OH pour les dNTP, 3'H pour les ddNTP. Cette modification structurelle empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'élongation de la chaîne est alors interrompue. Au sein du mélange réactionnel, il y a une compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la Taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

Chaque ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre est caractéristique. Une étude spectrale lors d'une électrophorèse capillaire va différencier les différents fluorochromes, lier les bases correspondantes, et par

conséquent définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. La technologie Big Dye Terminator v3.1 (BDT) (Applied Biosystems) utilisée dans notre recherche repose sur un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes liés sur le même ddNTP et fixés par un linker. Le premier est une fluorescéine appelée « fluorochrome donneur » et commun aux quatre ddNTP. Le deuxième est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui a pour rôle de « fluorochrome accepteur »; celui-ci est différent pour chaque type de ddNTP. Le « fluorochrome donneur » est stimulé par un rayon laser à l'argon qui émet à 488 nm et 514,5 nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520 nm) est captée intégralement par le « fluorochrome accepteur » qui est excité à son tour. Le spectre de fluorescence réémis par le « fluorochrome accepteur » sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. L'intérêt de cette technologie réside dans le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine qui permet une amplification du signal, et donc, une augmentation de la sensibilité de la technique. La fluorescence émise par chaque ddNTP est collectée par une caméra CCD et restituée sous forme de chromatogrammes.

II.4.2. Protocole expérimental

En pré-PCR, on prépare le mix suivant en multipliant le tableau suivant par le nombre d'échantillons en n'oubliant pas d'ajouter le volume mort.

Exons : 1 à 8

	Vol/Tube	Mix M13
Eau	5,75 µl	1799,75 µl
BDT3.1 (Mix ddNTP)	0,5 µl	156,5 µl
Tampon BDT3.1	1,75 µl	547,75 µl
Primer M13F ou M13R	0,5 µl	156,5 µl
Total	8,5 µl	
Template (produit PCR)	1,5 µl	

On distribue 8.5µl de ce mélange dans la plaque et on place celle-ci sur glace.

En post-PCR, 1.5 µl de template sont ajoutés au mix de séquençage. On ferme la plaque à l'aide des barrettes de 8 bouchons, puis on la centrifuge légèrement et l'incube dans un thermocycler programmé durant 25 cycles à 96°C pendant une mn, à 96°C pendant dix sec, à 50°C pendant cinq sec et enfin à 60°C pendant deux min.

L'étape de réaction de séquence est effectuée une fois avec l'amorce universelle sens et une autre fois avec la reverse.

Après la réaction de séquence, il est nécessaire de se débarrasser des ddNTP libres non incorporés encore présents dans le mix réactionnel car ils pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques.

II.5. Purification de la réaction de séquence**II.5.1. Principe**

Il existe plusieurs techniques afin de purifier la réaction de séquence. Nous, on a utilisé la colonne de Sephadex G50 (Sigma-Aldrich). Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion qui conduit au piégeage de particules de bas poids moléculaire sur la colonne de Sephadex G50 formée de billes perforées dont les trous ont un diamètre précis (20 à 50 μm). Les petites particules de diamètre plus bas à ceux-ci entrent et sont piégées. Inversement, les grosses particules vont franchir autour et être éluées très vite. Il en résulte un mix réactionnel exempt de ddNTP et des sels éventuellement encore existant, et prêt à migrer par électrophorèse capillaire.

II.5.2. Protocole expérimental

En post-PCR, à l'aide de la plaque multiscreen loader, on mesure la quantité de poudre Sephadex G50. Après le transfert de celle-ci dans la plaque multiscreen filter, on l'hydrate en ajoutant 300 μl d'eau dans chaque puits où se trouve le Sephadex durant au moins 30mn. Après une centrifugation à 2500 rpm pendant 5min, la plaque contenant le Sephadex hydraté est posée sur une plaque vide pour séquenceur afin d'éliminer l'excès d'eau. A l'aide d'une pipette multicanaux, on ajoute aux amplicons 20 μl d'eau stérile et on transfère tout le contenu de chaque puits sur les colonnes de Sephadex. Après une centrifugation à 1500 rpm pendant 5min, on pose un septum sur la plaque, elle est prête à être mise dans le séquenceur. Si on ne passe pas tout de suite la plaque au séquenceur, elle peut être conservée une semaine à -20°C dans un papier aluminium.

II.6. Electrophorèse capillaire

Les différents échantillons préparés ont été chargés sur les séquenceurs ABI 3100 et 3500 XLDX (Applied Biosystem) pour réaliser l'électrophorèse capillaire. Les fragments d'ADN injectés vont migrer le long du capillaire contenant le POP-7 (Applied Biosystem) à une vitesse qui dépendra de leurs tailles.

II.7. Analyse des séquences

La lecture et la comparaison des séquences analysées, aux séquences consensus, sont réalisées en utilisant le logiciel informatique BioEdit. Une fois les résultats de séquençage obtenus, une analyse des variations génomiques trouvées et une recherche bibliographique dans les différentes bases de données sont réalisées afin de distinguer les mutations rapportées de celles qui sont nouvellement identifiées. Les résultats ont été examinés en utilisant Ensembl genome browser (<https://www.ensembl.org/index.html>).

II.8. Nomenclature des variations de séquence

Une mutation peut être décrite par référence à l'ADNc (ADN codant) ou à la protéine codée par cet ADN. La description commence par le préfixe c. ou p. respectivement selon le référentiel utilisé. Pour l'ADNc, le symbole > signifie substitué en. Au niveau protéique, nous avons utilisé les codes des aa de trois lettres (Annexe 3). Un codon stop est symbolisé par *.

La nomenclature des mutations est attribuée en se référant aux directives de la société des variations génomiques humaine (Human Genome Variation Society «HGVS»; <http://www.hgvs.org>). La numérotation des nucléotides est basée sur l'utilisation de l'adénine (A) du codon d'initiation ATG comme référence +1. Le nucléotide 5' du codon d'initiation de traduction ATG est -1.

III. Etude in silico des effets délétères des nouvelles mutations

Les variations de bases au niveau des gènes sont, le plus souvent, responsables de troubles des protéines concernées menant à l'apparition de plusieurs maladies. La conséquence de toute mutation dépend de son effet fonctionnel et structurel. Plusieurs logiciels ont été développés jusqu'à présent pour prédire les différents effets délétères des mutations.

Dans notre étude, la prédiction des effets délétères de la nouvelle duplication c.657_660dupATCA n'a pas été réalisée. Le décalage de cadre de lecture de cette mutation conduit à un codon stop engendrant un polypeptide tronqué. Donc, sans réaliser une étude in silico pour cette mutation, il est évident qu'elle a un effet délétère sur la protéine.

Dans cette partie de la thèse on a analysé les effets délétères de la nouvelle mutation faux-sens (c.1184T>C) sur la protéine en utilisant des logiciels bioinformatiques qui prédisent l'impact de cette mutation sur la structure et la fonction.

Pour éliminer l'inexactitude des résultats de la prédiction des effets délétères de la mutation, on a utilisé cinq logiciels pour la structure, quatre pour la fonction et un pour la structure et la fonction.

III.1. Prédiction des effets de la nouvelle mutation c.1184T>C sur la fonction de la protéine FIX

Pour prédire les effets délétères de la mutation sur la fonction du FIX, quatre outils ont été utilisés : PON-P2, PolyPhen-2, Align GVGD et PROVEAN.

PON-P2 (<http://structure.bmc.lu.se/PON-P2/>) prédit la pathogénicité (nocivité) des substitutions d'aa. Il s'agit d'une approche qui utilise les caractéristiques des acides aminés, les annotations de l'ontologie génétique, la conservation évolutive et, si possible, les annotations des sites fonctionnels. PON-P2 estime la fiabilité des prédictions et classe les mutations en pathogènes, neutres et inconnus (Riera et al, 2016).

Polymorphism Phenotyping-2 (**PolyPhen-2**) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) prédit l'impact possible des substitutions d'aa sur la fonction des protéines en se basant sur trois types d'informations issues des banques de données et de calcul (Sunyaev et al, 2000): des informations pour les substitutions connues à une position donnée, contenant les annotations de séquences, l'alignement multiple et des informations structurales provenant de banque de données de structure. Les substitutions sont classées en 4 niveaux : erreur, bénignes, potentiellement délétères et probablement délétères.

Align Grantham Variation Grantham Deviation (**Align GVGD**) (<http://agvgd.iarc.fr/>) est un logiciel qui combine l'alignement multiple de séquence protéique ainsi que les caractéristiques biophysiques des aa afin de prédire l'effet d'une substitution sur la fonction protéique (Tavtigian et al, 2008). Ce logiciel consiste à mesurer les deux scores prédictifs : Grantham Variation (GV) et Grantham Deviation (GD). La variation biochimique à chaque position d'alignement entre différentes espèces est convertie en un score appelé GV. Alors que la différence de propriétés physicochimiques entre l'aa sauvage et muté est représentée par un indice de différence appelé GD. Les résultats sont établis à partir de ces deux scores et sont classés en sept classes : C0, C15, C25, C35, C45, C55, C65. Les classes (C0 à C25) désignent que la substitution n'affecte pas la fonction, elle est dite « less likely to affect the function ». Cependant que les classes (C45 à C65) indiquent que la mutation affecte la fonction, elle est dite « more likely to affect the function ».

PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) (<http://provean.jcvi.org/index.php>) est un logiciel qui prédit si une substitution d'aa a un impact sur la fonction biologique d'une protéine. Cet outil supporte trois fonctions:

- PROVEAN Protein pour tous les organismes,
- PROVEAN Protein Batch (humain et souris) et
- PROVEAN Genome Variants (humain et souris).

Les variants avec un score $\leq -2,5$ sont considérés comme «délétères» par contre les variants avec un score $\geq -2,5$ sont considérées comme «neutres» (Choi and Chan, 2015).

III.2. Prédiction des effets de la nouvelle mutation c.1184T>C sur la stabilité de la protéine FIX

Les effets délétères de la nouvelle mutation exonique identifiée (c.1184T>C) sur la stabilité de la protéine FIX ont été prédits en utilisant cinq logiciels bioinformatiques I-Mutant 2.0, ProSMS, INPS, MUpro et iStable.

I-Mutant 2.0 (<http://folding.biofold.org/cgi-bin/i-mutant2.0.cgi>) est un outil basé sur une approche de type Support Vector Machine (SVM) qui évalue la différence d'énergie libre (DDG) entre la protéine sauvage et mutée (Capriotti et al, 2005), pour la prédiction automatique des effets des mutations ponctuelles sur les changements de stabilité des protéines. Les prédictions du logiciel sont effectuées à partir de la structure de la protéine ou à partir de la séquence protéique. Une valeur positive (DDG>0) signifie une augmentation de la stabilité des protéines, alors qu'une valeur négative (DDG<0) propose une mutation déstabilisante.

ProSMS (<http://babel.ucmp.umu.se/prosms/>) est un serveur pour la prédiction des changements de stabilité des protéines dus à des mutations d'un seul aa. La prédiction par ProSMS peut être réalisée de deux façons: en utilisant la séquence protéique seule et en utilisant l'information sur la structure protéique lorsque la structure protéique est connue. Pour la classification, considérant la tolérance des protéines vis-à-vis des mutations et des erreurs expérimentales, le serveur ProSMS dépasse la classification binaire traditionnelle des changements de stabilité comme déstabilisant ($DDG < 0$) et stabilisant ($DDG > 0$), et introduit une troisième classe, mutations neutres ($-1 \text{ kcal/mol} \leq DDG \leq 1 \text{ kcal/mol}$) pour améliorer l'utilisabilité du logiciel (Huang et al, 2007). Par conséquent, le serveur ProSMS est basé sur une classification en trois étapes:

- Mutations déstabilisantes ($DDG < 1,0 \text{ kcal/mol}$).
- Mutations neutres ($-1,0 \text{ kcal/mol} \leq DDG \leq 1,0 \text{ kcal/mol}$).
- Mutations stabilisantes ($DDG > 1,0 \text{ kcal/mol}$).

De plus, le serveur ProSMS peut également être utilisé pour prédire directement les valeurs des changements d'énergie libres.

INPS (Impact of Non-synonymous mutations on Protein Stability) (<https://inpsmd.biocomp.unibo.it/inpsSuite/default/index2>) est un outil approprié pour calculer l'effet des mutations non-synonymes sur la stabilité de la protéine lorsque la structure de la protéine n'est pas disponible. En utilisant le signe DDG , les prédictions INPS peuvent être interprétées pour identifier les variations stabilisantes et déstabilisantes (Fariselli et al, 2015).

MUpro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>) est un outil basé sur une approche de type SVM et sur un réseau neuronal pour prédire les changements de stabilité des protéines pour des mutations d'un seul acide aa en utilisant à la fois des informations sur la séquence et sur la structure. Un score proche de 0 signifie une stabilité inchangée, un score près de -1 signifie une stabilité diminuée. Score près de +1 signifie une stabilité accrue (Cheng et al, 2006).

iStable (<http://predictor.nchu.edu.tw/iStable/about.php>) est un prédicteur intégré qui utilise une approche de type SVM pour prédire les changements de stabilité des protéines à cause des mutations d'un seul d'aa. L'intégration de prédicteurs permet de combiner les résultats de différents prédicteurs et d'utiliser la puissance des méta-prédictions pour obtenir de meilleurs résultats qu'une seule méthode. Le score est entre 0 et 1, plus le score est grand, plus la prédiction est sûre (Chen et al, 2013).

III.3. Prédiction des effets de la nouvelle mutation c.1184T>C sur la structure et la fonction de la protéine FIX

Pour prédire les effets délétères de la mutation c.1184T>C, un logiciel qui analyse l'impact des mutations ponctuelles sur la structure et la fonction a été utilisé.

Project HOPE (Have yOur Protein Explained) (<http://www.cmbi.ru.nl/hope/>) est un serveur Web facile à utiliser qui analyse les effets structurels et fonctionnels d'une mutation ponctuelle dans une séquence protéique. Après l'entrée de la séquence protéique et la mutation, HOPE va recueillir et combiner les informations disponibles à partir d'une série de services Web et de bases de données et produira un rapport, avec des résultats, des chiffres et des animations (Hanka et al, 2010). En utilisant le logiciel Project HOPE, les informations de la structure 3D ont été obtenues en utilisant les services Web WHAT IF, la base de données UniProt et le logiciel Reprof. L'information structurale a été obtenue à partir de l'analyse de PDB en utilisant le code 3LC3.

Chapitre II

Résultats et discussion

La partie résultats de cette thèse est présentée en trois parties. La première partie correspond aux résultats issus du diagnostic biologique de l'HB d'une partie de la population Algérienne.

La deuxième partie s'intéresse aux mutations du gène F9, elle est divisée en deux sous parties : la première correspond aux résultats issus de la caractérisation génétique des anomalies moléculaires responsables de l'HB chez des malades Algériens, la deuxième est une étude de corrélation entre les mutations détectées et les complications de l'HB. Les résultats de cette partie sont publiés dans un article original paru en 2018 dans le journal «Biodiversitas».

Enfin, la troisième partie est intitulée prédiction *in silico* des effets délétères des nouvelles mutations responsables de l'HB dans la population Algérienne.

I. Diagnostic biologique

Dans cet axe de notre étude, nous précisons les caractéristiques biologiques de l'HB de notre cohorte à partir de l'analyse des caractères généraux et du bilan biologique des malades hémophiliques B.

I.1. Caractères généraux des malades de l'HB

Les caractères généraux des hémophiles B de cette étude sont résumés dans le **tableau 11**.

Tableau 11. Représentation de quelques caractères généraux des malades de l'HB.

Patient	Origine	Age (an)	Sexe	Age au diagnostic	Circonstances de découverte	Taux du FIX
F1/P1	Constantine	44	M	2 ans	Hémarthroses	<1%
F1/P2	Constantine	26	M	2 ans	Hémarthroses	<1%
F1/P3	Constantine	18	M	6 mois	Ecchymoses multiples	<1%
F1/P4	Constantine	13	M	1 an	Enquête familiale	<1%
F1/P5	Constantine	9	M	8 mois	Enquête familiale	<1%
F1/P6	Constantine	4	M	8 mois	Enquête familiale	<1%
F2/P1	Ain Touta	16	M	3 mois	Ecchymose	<1%
F2/P2	Ain Touta	19	M	3 mois	Ecchymose	<1%
F2/P3	Ain Touta	9	M	3 mois	Ecchymose	<1%
F2/P4	Ain Touta	27	M	3 mois	Ecchymose	<1%
F2/P5	BATNA	29	M	3 ans	Accident hémorragique (chute)	<1%
F2/P6	BATNA	15	M	néonatal	Enquête familiale	<1%

F2/P7	BATNA	26	M	néonatal	Enquête familiale	<1%
F3/P1	Ain Mlila	7	M	6 mois	Hématome	<1%
F3/P2	Ain Mlila	6	M	9 mois	Enquête familiale	<1%
F4/P1	Tebessa	54	M	3 ans	Hémorragie	1%
F4/P2	Tebessa	25	M	3 mois	Enquête familiale	1%
F4/P3	Tebessa	20	M	6 mois	Enquête familiale	1%
F4/P4	Tebessa	16	M	5 mois	Enquête familiale	1%
F5/P1	Jijel	50	M	2 ans	Hémarthroses	<1%
F6/P1	Skikda	84	M	15 ans	Extraction dentaire	3%
F6/P2	Skikda	32	M	12 ans	Extraction dentaire	3%
F6/P3	Skikda	11	M	6 ans	Circoncision	3%
F7/P1	BATNA	45	M	8 ans	Circoncision	<1%
F7/P2	BATNA	50	M	12ans	Extraction dentaire	<1%
F8/P1	Oum El Bouaghi	7	M	10 mois	Hématome	<1%
F9/P1	Mila	18	M	3 ans	Enquête familiale	7%
F9/P2	Mila	17	M	4 ans	Enquête familiale	7%
F9/P3	Mila	15	M	8 ans	Extraction dentaire	7%
F9/P4	Mila	7	M	1 an	Enquête familiale	7%
F10/P1	Ain Beida	36	M	6 mois	Hématome	<1%
F10/P2	Ain Beida	16	M	18 mois	Ecchymose	<1%
F10/P3	Ain Beida	/	M	1 an	Enquête familiale	<1%
F11/P1	Constantine	11	M	18 mois	Ecchymose	<1%
F12/P1	Biskra	60	M	18 ans	/	<1%
F12/P2	Biskra	25	M	3 ans	Circoncision	<1%
F12/P3	Biskra	21	M	2 ans	Circoncision	<1%
F13/P1	BATNA	13	M	18 mois	Circoncision	2%
F13/P2	BATNA	13	M	18 mois	Circoncision	2%

I.1.1. Répartition des malades de l'HB selon le sexe

Tableau 12. Répartition des malades de l'HB selon le sexe.

Sexe	Fréquence	Pourcentage %
M	39	100
F	0	0
Total	39	100

F: Féminin, M: Masculin

Nos résultats (**Tableau 12**) montrent une prédominance de l'HB chez le sexe masculin. Et cela est expliqué par le mode de transmission de la maladie.

La transmission de l'hémophilie se fait d'une manière héréditaire suivant un mode récessif, par le chromosome X. Si un garçon accueille de sa mère un chromosome X qui comprend un gène défectueux, le garçon sera hémophile. Si la copie du gène défectueux qu'une fille accueille de son père ou de sa mère, on dit qu'elle « porte » le gène de l'hémophilie. Elle est alors « porteuse » de la maladie.

Pour la femme, l'anomalie du gène qui se situe sur l'un des chromosomes X est généralement compensée entièrement ou en partie par l'autre chromosome X sain. De ce fait, les femmes sont rarement touchées par cette pathologie. Seuls quelques exemples de femmes atteintes d'HB ont été signalés (Ingerslev et al, 1989 ; Wollina et al, 1993 ; Lillicrap, 1998). Certaines femmes seront atteintes d'hémophilie dans des circonstances rares ; parce que le père est atteint et la mère porteuse et lorsque la femme présente un phénomène de lyonisation ou inactivation de l'X (elle a un chromosome X anormal et le deuxième est normal mais inactif).

Pour l'homme, l'anomalie génétique du chromosome X n'est pas capable d'être équilibrer, puisque le chromosome X est seul. Il est donc systématiquement atteint de la pathologie.

I.1.2. Répartition des malades de l'HB selon l'âge

Tableau 13. Répartition des malades de l'HB selon l'âge.

Age	Fréquence	Pourcentage %
0 à 10	7	18,42
11 à 20	15	39,48
21 à 30	7	18,42
31 à 40	2	5,26
41 à 50	5	13,16
51 et plus	2	5,26
Total	38	100

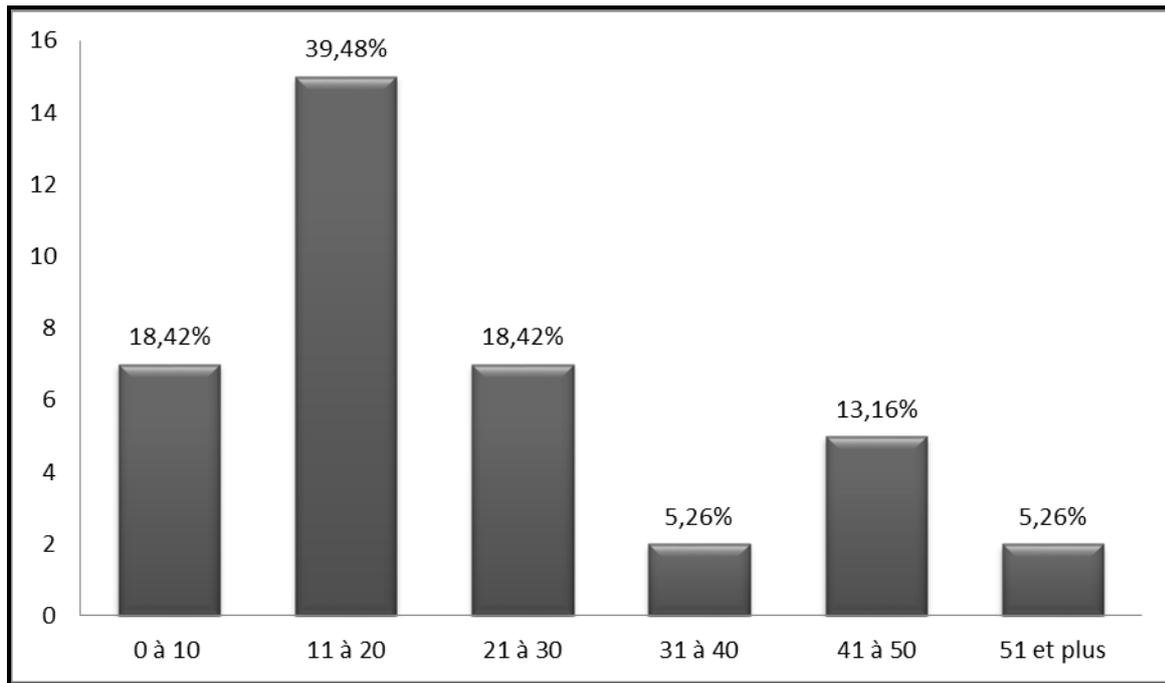


Figure 15. Répartition des malades de l'HB selon l'âge.

Les patients étaient âgés de 4 à 84 ans avec une moyenne d'âge de 24 ans. Plus de 75% des patients de notre série (76,32%) étaient jeunes et âgés de moins de 31 ans.

Il s'agit d'une hémopathie dont les symptômes peuvent se manifester à tout âge. La plupart des hémophiles B de cette étude sont suivis depuis l'enfance, présentement, la plupart sont des adolescents et des adultes jeunes.

A cause d'une déficience en vitamine K et du retard de maturation physiologique du foie chez le nouveau-né, la synthèse du FIX par le foie est déficitaire. Ceci donne des résultats interprétés d'une façon difficile, du moins à discuter avec attention selon les normes associées à l'âge (Chambost and Meunier, 2006).

I.1.3. Age au diagnostic

D'après les résultats du **tableau 11**, le diagnostic de l'HB grave a lieu dans la plupart des cas très précocement. Une étude note une valeur d'âge médian de découverte de 5,8 mois (Caritoux, 2007). Des données épidémiologiques rapportés par le RFC (Réseau France Coag) en 2005 montrent que, presque 80% des hémophiles des deux types d'HA et HB sévères et près de 56% des malades modérés sont diagnostiqués avant l'âge d'un an, et que les hémophiles mineurs sont diagnostiqués vers une médiane d'environ 7 ans. Par contre, Guissou a trouvé que le diagnostic de l'hémophilie chez les patients qui présentaient des formes sévères s'était fait vers l'âge de 5 ans et ceux qui présentaient des formes modérées vers l'âge de 4 ans. Quant à la forme mineure le diagnostic s'était fait à un âge plus tardif, après 7 ans (Guissou, 2006). Pour notre échantillon, l'âge médian du diagnostic de la forme sévère, modérée et mineure est respectivement de 18,9 mois, 4 ans et 4,5 ans.

Une étude marocaine en 2009 a constaté que l'hémophilie sévère était prédominante pour toutes les tranches d'âge, et particulièrement pour les patients ayant un âge compris entre 1 et 2 ans où le pourcentage atteint 88,88% (Tlamçani et al, 2009), cela peut être expliqué par la précocité de l'apparition des symptômes de cette maladie et par conséquent la précocité de son diagnostic.

I.1.4. Circonstances de découverte

Le diagnostic de l'hémophilie est enquêté suite à une manifestation hémorragique, en cas d'antécédents familiaux ou de manière fortuite, lors d'un bilan d'hémostase systématique. D'après les données épidémiologiques rapportées par le RFC en 2005, les 3/4 des diagnostics sont déterminés après un saignement ou l'existence d'antécédents familiaux chez les malades atteints d'hémophilie sévère ou modérée mais les diagnostics fortuits sont plus répandus chez les malades atteints d'hémophilie mineure. Et d'après les études de Chambost et Meunier, les circonstances de diagnostic étaient les suivantes : syndrome hémorragique (67,8% des cas), dépistage orienté par l'existence d'une histoire familiale (27,5% des cas) et bilan d'hémostase fortuit, par exemple préopératoire (4,8% des cas). Le pourcentage des diagnostics fortuits, il est faible mais non négligeable. Pour cela une prudence spéciale est portée aux bilans de coagulation préopératoires de tout malade (Chambost and Meunier, 2006). Caritoux a trouvé que, dans les formes diagnostiquées à partir d'enquête familiale, le diagnostic est plus précoce atteignant 0,4 mois en médiane car il y a existence d'un frère hémophile (Caritoux, 2007). Dans l'étude de Belhani, le diagnostic est fait précocement : plus de 50% des malades sont diagnostiqués avant 2 ans; les circonstances du diagnostic sont premièrement les hématomes et les ecchymoses ; 10% des cas sont diagnostiqués après la circoncision (Belhani, 2009). Pour les circonstances de découverte de l'HB chez nos patients, l'enquête familiale est en premier suivie par les ecchymoses, les accidents hémorragiques (extraction dentaire par exemple) et la circoncision et enfin les hémarthroses et les hématomes.

I.1.5. Répartition selon le type d'hémophilie et le degré de sévérité

Tableau 14. Répartition selon le type d'hémophilie et le degré de sévérité.

	H. Sévère	H. modérée	H. Mineure	Total
HA	64	23	7	94 (70.68%)
HB	26	9	4	39 (29.32%)
Total	90 (67.67%)	32 (24.06%)	11 (8.27%)	133

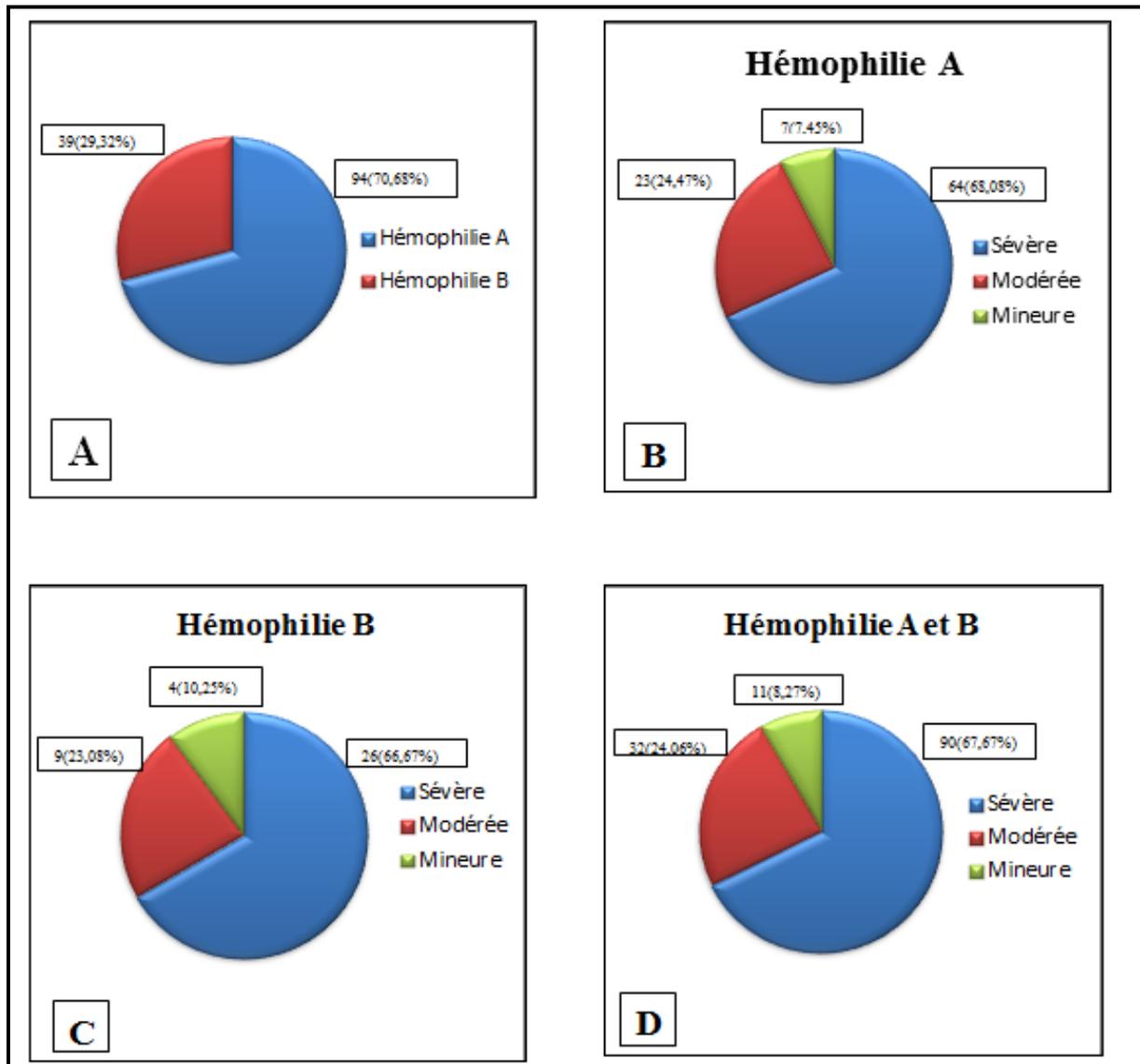


Figure 16. Répartition selon le type d'hémophilie et le degré de sévérité.

- A. Répartition des malades selon le type d'hémophilie.
- B. Répartition des degrés de sévérité en fonction de l'HA.
- C. Répartition des degrés de sévérité en fonction de l'HB.
- D. Répartition des degrés de sévérité en fonction de l'hémophilie (HA et HB).

Selon le **tableau 14**, l'HA (70.68%) est plus fréquente que l'HB (29.32%). Ces résultats sont compatibles avec ceux de la littérature qui précisent que l'HA est quatre fois plus fréquente que l'HB (Friedman and Rodgers, 2004) ou six fois d'après (Ghandil et al, 2003). Par ailleurs, Langar et al montraient que 87,1% des patients sont atteints d'HA et 12,9 % d'HB (Langar et al, 2005). En 2006, le nombre d'hémophiles retrouvé en Algérie est de 1128 soit une prévalence de 3.76/100 000 habitants ; 82.81% sont de type A et 16.82% sont de type B (Belhani, 2009).

Aussi, notre étude a montré que les formes sévères, modérées et mineures (hémophilies A et B confondues) représentaient respectivement 67.67%, 24.06% et 8.27%. Langar et al ont montré que 61,5% des patients présentaient une hémophilie sévère et 31,4%

une hémophilie modérée (Langar et al, 2005). D'après Belhani, la proportion relative des trois formes de sévérité de l'hémophilie ; sévère, modérée et mineure en 2006 en Algérie est 50.44%, 27.48% et 16.40% (Belhani, 2009).

I.2. Bilan biologique des malades de l'HB

29 hémophiles B parmi les 39 patients de notre échantillon ont été inclus dans cette partie de recherche à cause de non disponibilité de 10 patients dans la période de cette étude.

Tableau 15. Bilan biologique des malades de l'HB

Etat/Test biologique	Témoins	Malades	p	Valeur normale
Taux de plaquettes ($10^3/\text{mm}^3$)	288,5 ± 29,26	281,5 ± 33,48	0,8767	150–500($10^3/\text{mm}^3$)
Taux de prothrombine (TP) (%)	87,50 ± 2,782	90,10 ± 3,384	0,5603	70 – 100 (%)
Temps de céphaline + activateur TCA (sec)	28,61 ± 0,3071	60,85 ± 1,871	< 0,0001	24 – 36 (sec)
F VIII (%)	105,7 ± 1,938	110,6 ± 2,750	0,1625	60 – 150 (%)

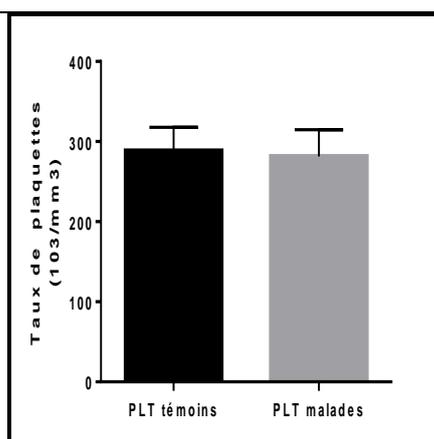


Figure 17. Variation du taux de plaquettes chez les malades de l'HB ($p=0,8767$).

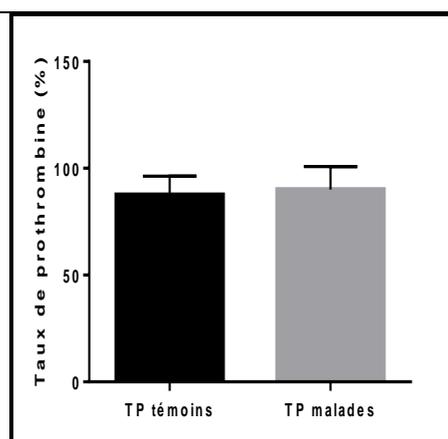


Figure 18. Variation du TP chez les malades de l'HB ($p=0,5603$).

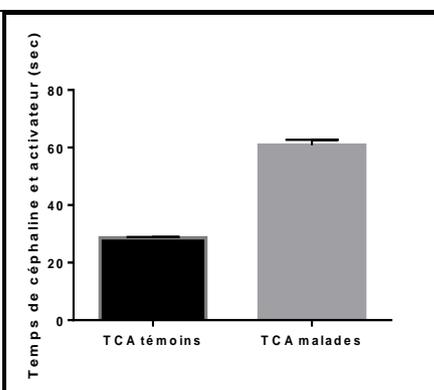


Figure 19. Variation du TCA chez les malades de l'HB ($p < 0,0001$).

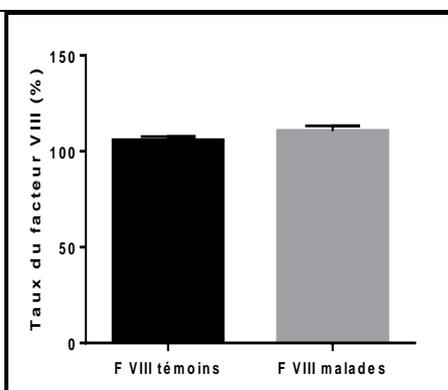


Figure 20. Variation du taux du FVIII chez les malades de l'HB ($p=0,1625$).

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative du taux de plaquettes ($p=0,8767$, $>0,05$) chez ces malades ($281,5 \pm 33,48$) par rapport aux témoins ($288,5 \pm 29,26$). Selon Fressinaud et Meyer, la numération des plaquettes doit être réalisée systématiquement chez tout patient ayant un syndrome hémorragique (Fressinaud and Meyer, 2001). La numération des plaquettes chez les hémophiles est normale car l'hémostase primaire de l'hémophilie est normale. Le rôle des plaquettes dans l'hémostase primaire est capital. Il consiste à former un bouchon qui obstrue provisoirement l'orifice du vaisseau sanguin. Comme les plaquettes sont dépourvues de noyau elles vieillissent rapidement et dégèrent en 8 à 10 jours environ si elles ne fonctionnent pas.

D'après le **tableau 15**, on n'enregistre aucune différence significative ($p=0,5603$) du TP entre les témoins ($87,50 \pm 2,782$) et les malades ($90,10 \pm 3,384$). Le TP explore la voie extrinsèque de la coagulation et la voie commune : facteurs VII, X, V, II et I. Le TP n'est pas modifié ce qui montre que la voie extrinsèque ou la voie commune de la coagulation ne sont pas touchées.

Le TP est normal, car cette maladie est une conséquence d'un déficit en FIX qui joue un rôle important dans l'hémostase secondaire, alors que le TP n'explore que les facteurs de l'hémostase primaire.

L'examen de nos résultats permet de mettre en évidence un allongement très hautement significatif ($p<0,0001$) du taux de TCA chez nos patients ($60,85 \pm 1,871$) par rapport aux témoins ($28,61 \pm 0,3071$). Le TCA est prolongé lors du déficit en FIX, car ce dernier intervient dans la voie intrinsèque de la coagulation et son activité réduite affaiblit la formation du caillot. Le TCA explore la voie intrinsèque de coagulation et la voie commune : kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), prékallicroïne (Pk), facteurs XII, XI, IX, VIII, X, V, II et I.

Sur le plan biologique, le TCA est allongé mais il peut être normal dans les formes mineures. Le diagnostic final consiste à la recherche du déficit quantitatif en FVIII ou FIX (Cockenpot et al, 2013).

Nos résultats ne révèlent aucune différence significative ($p=0,1625$) du taux du FVIII chez les malades de l'HB ($110,6 \pm 2,750$) et les témoins ($105,7 \pm 1,938$).

En 1947, un médecin argentin, observe in vitro que le sang d'un malade hémophile compense le défaut de coagulation d'un autre malade hémophile. Il remarque sans le savoir qu'il y a deux types d'hémophilies. Il faudra attendre 1952 pour que les chercheurs arrivent d'affirmer l'existence de deux types d'hémophilies (A et B) associées respectivement à un déficit en FVIII et à un déficit en FIX (Tailhefer, 2013). On conclut que le sang d'un tel hémophile B corrige le défaut existant chez un hémophile A, ce qui affirme que le taux du FVIII est normal chez les patients de l'HB.

II. Diagnostic moléculaire

Dans cet axe de recherche, nous décrivons les différentes mutations responsables de l'HB dans notre échantillon tout en recherchant les particularités de notre population.

II.1. Caractérisation des mutations détectées

II.1.1. Résultats

Tableau 16. Différentes mutations du F9 chez 39 patients Algériens ayant une HB.

F	Nombre de patients	Activité du facteur IX (%)	Sévérité	Forme	Changement du nucléotide	Substitution de l'acide aminé	Type	Mécanisme	Région	Domaine	CpG	Nouvelle / Rapportée
1	6	<1%	sevère	Familiale	c.-52C>T	/	Promoteur	Substitution	5'UTR	/	/	Rapportée
2	7	<1%	sevère	Familiale	c.323G>A	p.Cys108Tyr	Faux-sens	Substitution	Exon 4	EGF1	non	Rapportée
3	2	<1%	sevère	Familiale	c.357T>A	p.Cys119*	Non-sens	Substitution	Exon 4	EGF1	non	Rapportée
4	4	1%	modérée	Familiale	c.373G>A	p.Gly125Arg	Faux-sens	Substitution	Exon 4	EGF1	non	Rapportée
5	1	<1%	sevère	Sporadique	c.657_660 dupATCA	p.Asp223*	Frameshift	Duplication	Exon 6	Peptide d'activation	non	Nouvelle
6	3	3%	modérée	Familiale	c.881G>A	p.Arg294Gln	Faux-sens	Substitution	Exon 8	Sérine protéase	oui	Rapportée
7	2	<1%	sevère	Familiale	c.881G>A	p.Arg294Gln	Faux-sens	Substitution	Exon 8	Sérine protéase	oui	Rapportée
8	1	<1%	sevère	Sporadique	c.892C>T	p.Arg298*	Non-sens	Substitution	Exon 8	Sérine protéase	oui	Rapportée
9	4	7%	mineure	Familiale	c.1010C>T	p.Ala337Val	Faux-sens	Substitution	Exon 8	Sérine protéase	non	Rapportée
10	3	<1%	sevère	Familiale	c.1150C>T	p.Arg384*	Non-sens	Substitution	Exon 8	Sérine protéase	oui	Rapportée
11	1	<1%	sevère	Sporadique	c.1184T>C	p.Phe395Ser	Faux-sens	Substitution	Exon 8	Sérine protéase	non	Nouvelle
12	3	<1%	sevère	Familiale	/	/	/	/	/	/	/	/
13	2	2%	modérée	Familiale	/	/	/	/	/	/	/	/

F: Famille.



Figure 21. Emplacement des amorces encadrant les mutations du gène F9 sur les exons amplifiés.

- La taille de chaque amplicon en pb est indiquée entre parenthèse
- Les positions des mutations identifiées sont colorées en rose
- Les amorces sont colorées en rouge
- Les exons sont colorés en noir
- Les introns sont colorés en bleu
- Les régions non codantes 5' sont colorées en vert

- Les régions non codantes 3' sont colorées en violet

Le séquençage des 8 exons du gène F9 a permis la détection de 10 mutations. Une description de ces mutations identifiées est rapportée dans le **tableau 16**. Ces mutations regroupent 3 mutations non-sens (c.357T>A, c.892C>T, c.1150C>T), 5 mutations faux-sens (c.323G>A, c.373G>A, c.881G>A, c.1010C>T, c.1184T>C), 1 mutation au niveau du promoteur (c.-52C>T), et 1 duplication (c.657_660dupATCA). L'emplacement de ces mutations dans la séquence nucléotidique est présenté dans la **figure 21**.

8 mutations ont été préalablement décrites dans les différentes bases de données. Il s'agit des mutations : c.-52C>T, c.323G>A, c.357T>A, c.373G>A, c.881G>A, c.892C>T, c.1010C>T et c.1150C>T. Parmi ces mutations, c.892C>T présente une forme sporadique de l'HB.

Tandis que les deux mutations (c.657_660dupATCA et c.1184T>C) n'ont jamais été mentionnées dans les bases de données ou citées dans des articles. Ces deux mutations présentent une forme sporadique de l'HB. Ce sont des nouvelles mutations identifiées dans la population Algérienne et qui semblent être spécifiques à cette population.

Tableau 17. Fréquences des mutations ponctuelles du gène F9.

Type de mutations	Famille affectée	Fréquence%
Ponctuelle	9/10	90%
Faux-sens	5/9	55,56%
Non-sens	3/9	33,33%
Promoteur	1/9	11,11%

Tableau 18. Détermination du statut des mutations détectées.

Mutations identifiées	Nombre de publications	Statut des mutations
Promoteur: c.-52C>T	1	Rare
Faux-sens: c.323G>A	3	Rare
c.373G>A	1	Rare
c.881G>A	97	Récurrente
c.1010C>T	2	Rare
c.1184T>C	–	Nouvelle
Non-sens: c.357T>A	1	Rare
c.892C>T	63	Récurrente
c.1150C>T	5	Rare
Frameshift: c.657_660dupATCA	–	Nouvelle

II.1.1.1. Mutations préalablement décrites

➤ Mutations du promoteur

- **c.-52C>T**

Dans cette recherche, une mutation localisée dans la région proximale du promoteur a été identifiée. Cette mutation à la position -52 provoquée par la substitution de C par T, trouvée chez la **famille1**. C'est une rare mutation, elle a été précédemment décrite chez un seul cas modéré (Ketterling et al, 1995). Cependant, chez les patients de la famille 1, cette mutation était associée à une maladie grave. Le chromatogramme de cette mutation est montré dans la **figure 22**.

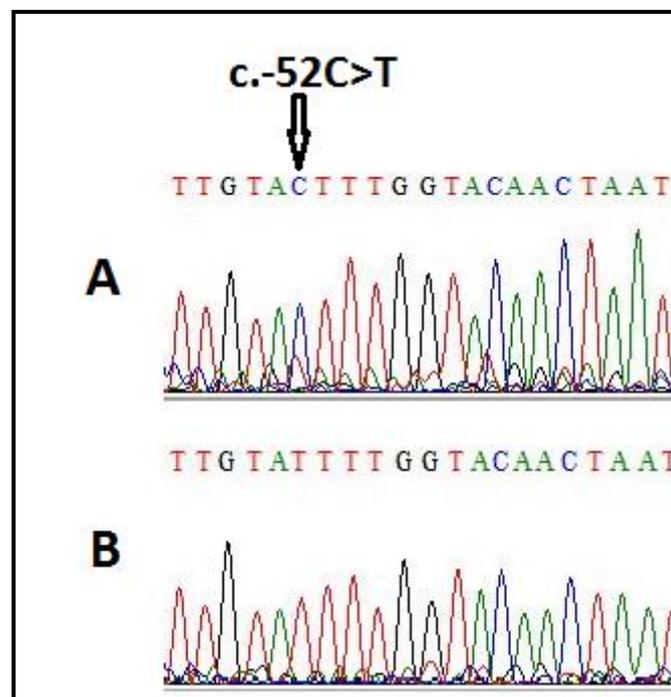


Figure 22. Chromatogramme de la mutation c.-52C>T au niveau de la région 5'UTR du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

➤ Mutations faux-sens

• c.323G>A

Le séquençage de l'exon 4 du gène F9 a permis d'identifier chez la **famille 2** une mutation faux-sens, dont les patients de cette famille sont touchés par la forme sévère de la maladie. Elle a été signalée dans trois publications chez des cas du Royaume-Uni, d'Allemagne et des États-Unis dont le dernier était sous la forme modérée (Rallapalli et al, 2013). Cette mutation est due à une substitution de type transition G>A à la position 323 de l'exon 4 (c.323G>A). Ceci a pour conséquence un changement de la seconde base du codon TGT en TAT responsable de la substitution d'une cystéine par une tyrosine en position 108 (p.Cys108Tyr). Cette mutation se situe sur l'exon 4 qui code le domaine EGF1. Le chromatogramme de cette mutation est montré dans la **figure 23**.

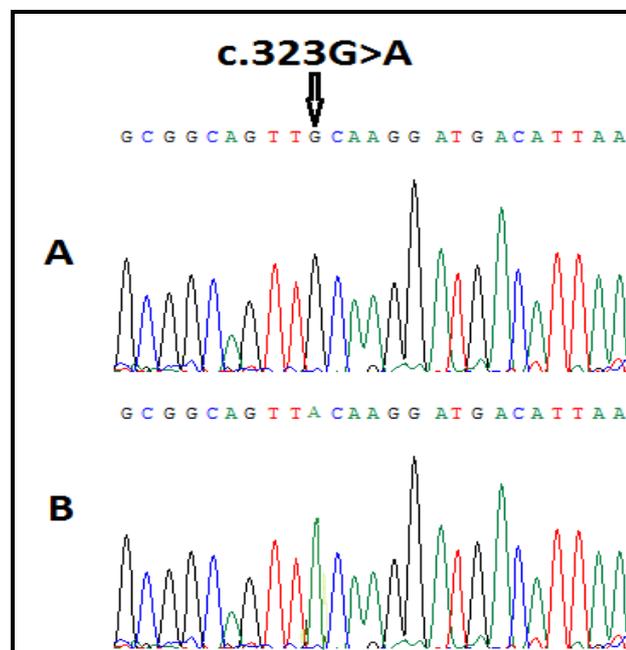


Figure 23. Chromatogramme de la mutation c.323G>A au niveau de l'exon 4 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

- c.373G>A

Pour la **famille 4** avec un niveau d'activité de FIX de 1% exprimant la forme modérée, le séquençage de l'exon 4 du gène F9 a permis d'identifier une mutation faux-sens qui est due à une substitution de type transition G>A à la position 373 de l'exon 4 (c.373G>A). Cette transition est montrée par la **figure 24**. Ceci a pour conséquence un changement de la première base du codon GGA en AGA responsable de la substitution d'une glycine par une arginine en position 125 (p.Gly125Arg). En 2003, Espinós et al ont publié un article présentant cette mutation chez une famille avec la forme sévère de l'HB. Cet article était la seule publication qui a mentionné cette mutation mais sans étudier leurs effets sur le FIX.

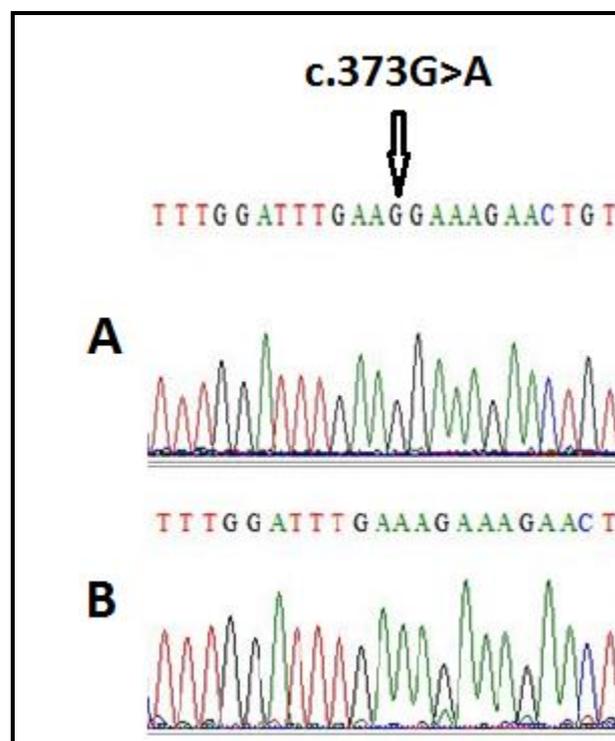


Figure 24. Chromatogramme de la mutation c.373G>A au niveau de l'exon 4 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

- **c.881G>A**

Le séquençage de l'exon 8 du gène F9 a permis d'identifier chez 2 familles non apparentées (**Familles 6 et 7**) une substitution de type transition G>A à la position 881 de l'exon 8 (c.881G>A). Cette mutation entraîne un changement de la seconde base du codon CGA en CAA responsable de la substitution d'une arginine par une glutamine en position 294 (p.Arg294Gln). Le chromatogramme de cette substitution est présenté dans la **figure 25**. Cette mutation se situe sur l'exon 8 qui code le domaine catalytique. Des formes sévère et modérée de l'HB résultant de cette mutation, correspondant respectivement à la famille 6 et à la famille 7, ont été observées dans notre étude. Cette mutation est récurrente, elle a été publiée dans plus de 97 articles pour des différents patients présentant la forme mineure, modérée et sévère de la maladie. Le dernier article a été publié en 2017 (Johnsen et al, 2017).

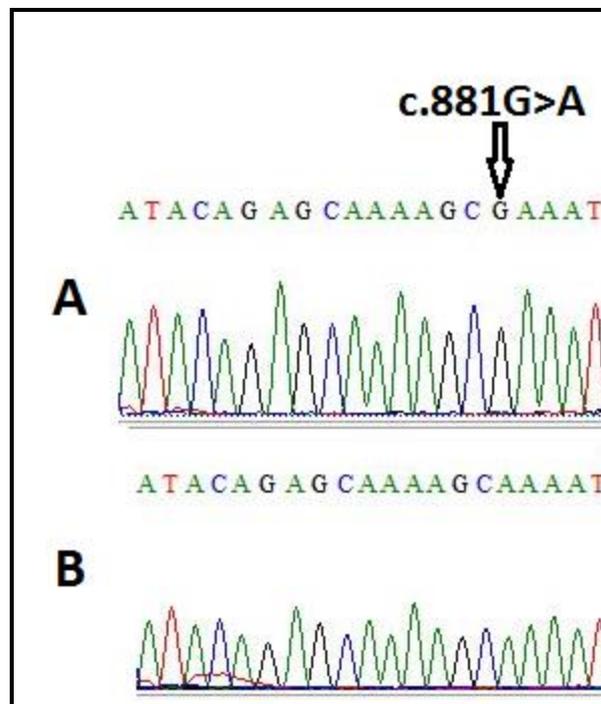


Figure 25. Chromatogramme de la mutation c.881G>A au niveau de l'exon 8 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

- **c.1010C>T**

Chez la **famille 9**; la seule famille de notre échantillon touchée par la forme mineure de la maladie, le séquençage de l'exon 8 du gène F9 a permis d'identifier chez cette famille une substitution de type transition C>T à la position 1010 (c.1010C>T). Ceci a pour conséquence un changement de la seconde base du codon GCT en GTT responsable de la substitution d'une alanine par une valine en position 337 (p.Ala337Val). Cette mutation a été détectée précédemment par Weinmann et al en 1998 chez un patient présentant la forme mineure de la maladie. D'après les différentes bases de données, cette mutation a été décrite 2 fois chez des patients avec la forme mineure, donc elle est rare. La **figure 26** présente le chromatogramme de cette mutation.

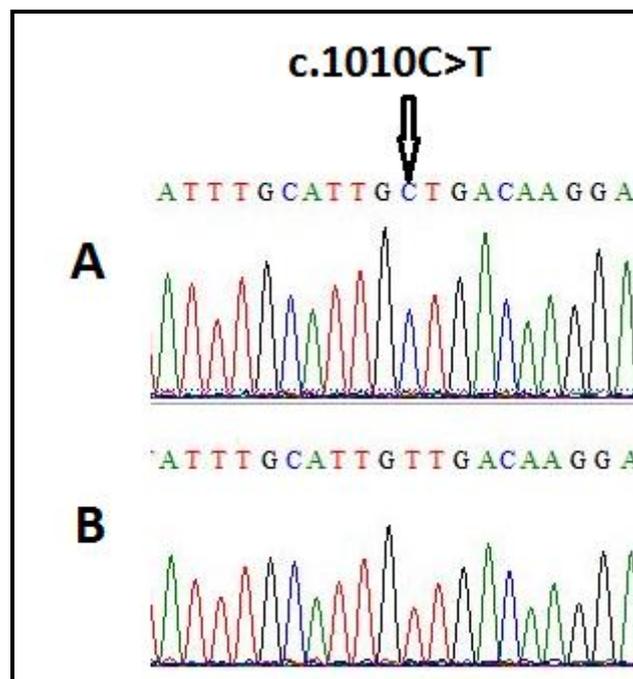


Figure 26. Chromatogramme de la mutation c.1010C>T au niveau de l'exon 8 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

➤ Mutations non-sens

• c.357T>A

Pour la **famille 3**, le séquençage de l'exon 4 du gène F9 a permis de mettre en évidence une mutation ponctuelle (non-sens) de type transversion T>A à la position 357 (c.357T>A) présentée sous forme d'un chromatogramme dans la **figure 27**. Elle est considérée comme une rare mutation car elle a été publiée une seule fois en 1993 par Ghanem et al. Les deux patients de notre étude présentent la forme sévère de l'HB, c'était la même forme des patients de l'étude de Ghanem et al. Cette mutation touche le codon 119 provoquant ainsi le remplacement de l'aa cystéine par un codon stop (p.Cys119*).

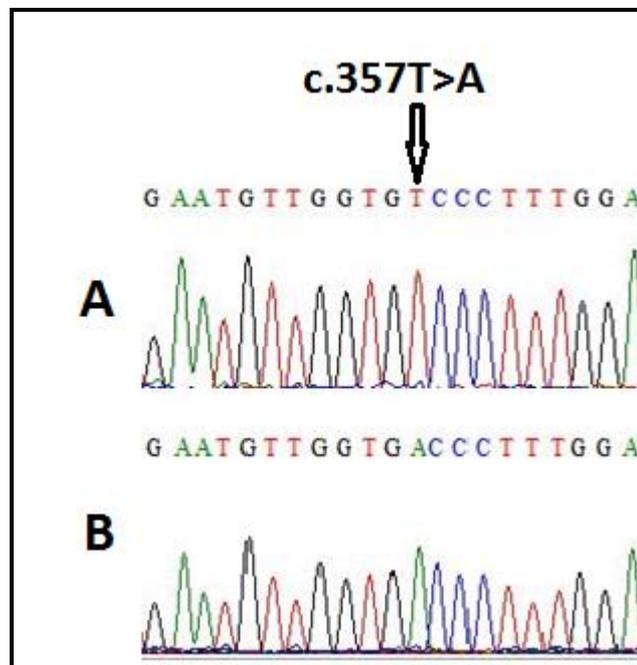


Figure 27. Chromatogramme de la mutation c.357T>A au niveau de l'exon 4 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

- c.892C>T

Le séquençage de l'exon 8 du gène F9 a permis de mettre en évidence une mutation ponctuelle (non-sens) de type transition C>T à la position 892 (c.892C>T) chez la **famille 8**. Cette mutation touche le codon 298 provoquant ainsi le remplacement de l'arginine par un codon stop (p.Arg298*). Cette récurrente mutation provoque la forme sévère chez les hémophiles B de la famille 8. Elle a été décrite 63 fois dont la forme prédominante était la forme sévère. La dernière publication sur cette mutation était en 2017 (Meireles et al, 2017). La transition C>T de cette mutation est montrée dans le chromatogramme de la **figure 28**.

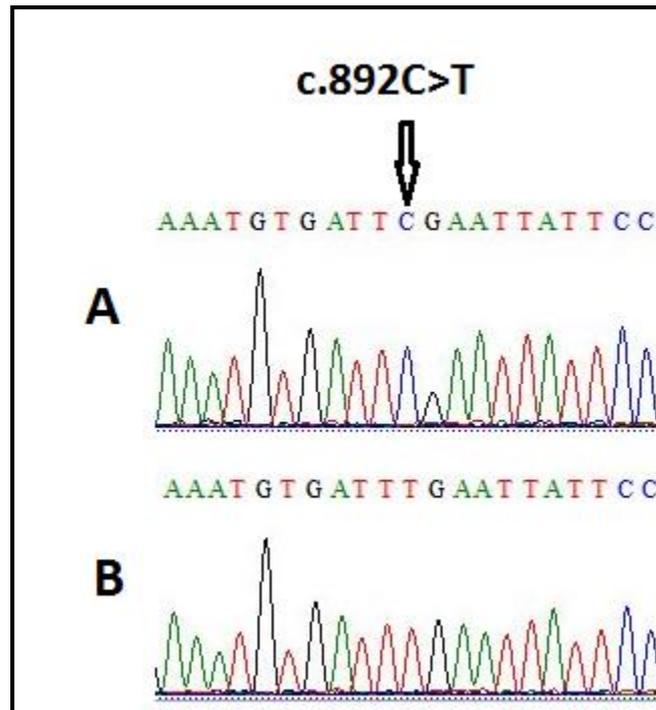


Figure 28. Chromatogramme de la mutation c.892C>T au niveau de l'exon 8 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

- c.1150C>T

La troisième mutation de type non-sens de notre échantillon a été identifiée chez la **famille 10** présentant la forme sévère, dont le séquençage de l'ADN a permis de mettre en évidence une mutation ponctuelle de type transition C>T à la position 1150 dans l'exon 8 du gène F9 (c.1150C>T). Son chromatogramme est présenté dans la **figure 29**. Cette mutation a déjà été décrite 5 fois chez des patients porteurs d'une HB modérée et sévère (Poon et al, 1993; Belvini et al, 2005; Miller et al, 2012; Yu et al, 2012; Meireles et al, 2017). Au niveau protéique, cette mutation touche le codon 384 provoquant ainsi le remplacement de l'arginine par un codon stop (p.Arg384*).

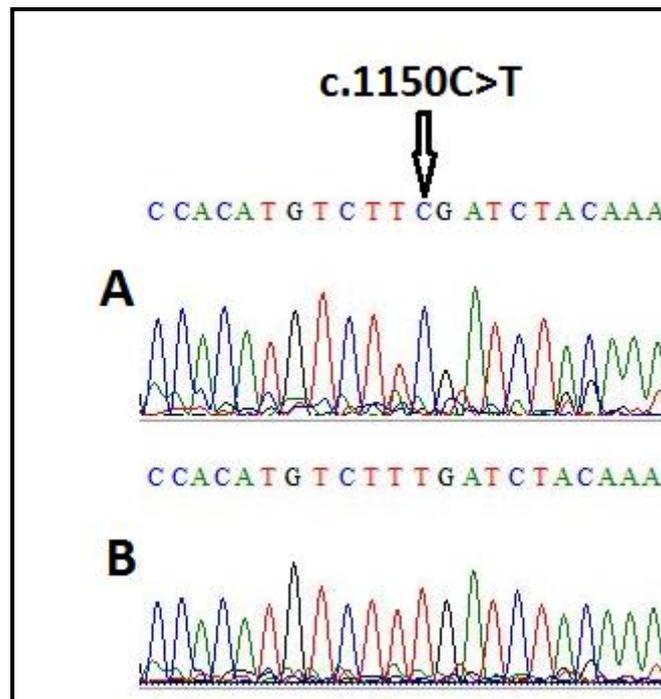


Figure 29. Chromatogramme de la mutation c.1150C>T au niveau de l'exon 8 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

II.1.1.2. Nouvelles mutations

➤ c.657_660dupATCA

Une nouvelle mutation a été identifiée chez un patient atteint de la forme sévère (**Famille 5**), c'est une mutation de type frameshift (décalage du cadre de lecture), elle a été causée par la nouvelle duplication c.657_660dupATCA due à l'insertion de quatre nucléotides (ATCA) dans le domaine du peptide d'activation codé par l'exon 6, conduisant à un codon stop à la position 223 (p.Asp223*). Le chromatogramme de cette mutation est montré à la **figure 30**.

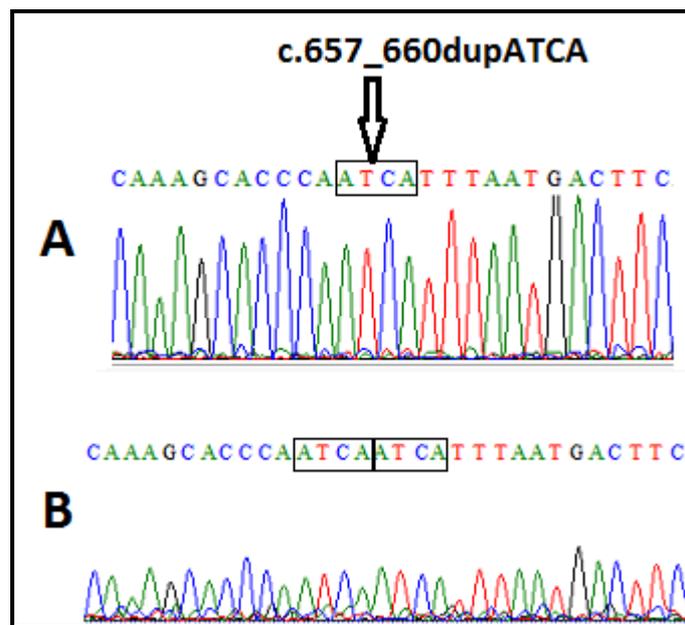


Figure 30. Chromatogramme de la nouvelle mutation c.657_660dupATCA au niveau de l'exon 6 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

➤ c.1184T>C

Une deuxième nouvelle mutation a été détectée chez un patient atteint de la forme sévère (**Famille 11**), à partir du séquençage de l'exon 8 du gène F9 de ce patient. Ce qui nous a conduit à identifier une substitution de type transition T>C à la position 1184 (c.1184T>C). Ceci a abouti au changement de la deuxième base du codon TTC en TCC responsable de la substitution d'une phénylalanine par une sérine en position 395 (p.Phe395Ser). La substitution du T en C est présentée dans la **figure 31**.

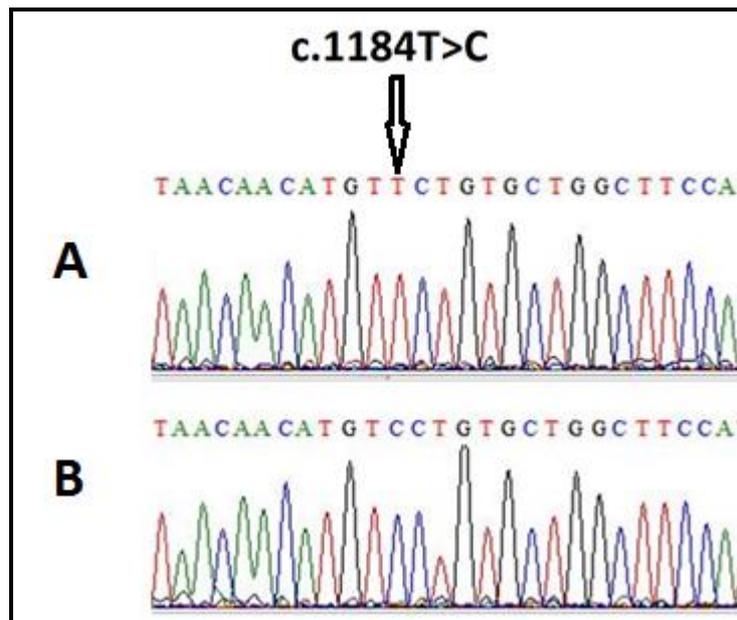


Figure 31. Chromatogramme de la nouvelle mutation c.1184T>C au niveau de l'exon 8 du gène F9. (A) séquence d'ADN d'un témoin sain. (B) séquence d'ADN du patient.

II.1.1.3. Absence d'identification de mutations responsables de l'HB

Pour les patients des **familles 12 et 13** présentant les critères diagnostiques de l'HB: 3 cas avec la forme sévère et deux cas avec la forme modérée, la recherche d'une mutation au niveau du gène F9 est restée négative. En effet, le séquençage de la région codante, du promoteur et de la région polyA du gène F9 a permis de confirmer l'absence de mutations ponctuelles au niveau de ces régions.

II.1.2. Discussion

D'après certaines études (Rallapalli et al, 2013 ; Surin et al, 2016 ; Morteza et al, 2007 ; Nazia et al, 2008 ; Pei-Chin et al, 2014 ; Bowen, 2002 ; Morteza et al, 2009 ; Tengguo et al, 2014), les mutations ponctuelles sont les plus courantes dans l'HB, et se présentent chez presque 90% des patients, dont la plus importante proportion de patients atteints d'HB ont des mutations faux-sens. Ce qui est en concordance avec nos résultats, on a identifié 9 mutations ponctuelles parmi 10, ce qui représente une fréquence égale à 90% dans notre échantillon (**Tableau 17**). Parmi ces 9 mutations ponctuelles, 5 sont des mutations faux-sens (55,56%) (**Tableau 17**).

La plupart des mutations ponctuelles sont identifiées dans l'exon 8 qui est l'exon le plus grand du gène F9 (Anson et al, 1984). 56% des mutations du gène F9 sont localisés au niveau de l'exon 8 (Rallapalli et al, 2013). Ceci est aussi le cas pour nos malades puisque 5 mutations identifiées parmi les 10 mutations sont localisées dans cet exon (50%).

Dans notre échantillon, 3 cas présentent la forme sporadique dont elle est entraînée par les 2 nouvelles mutations (c.657_660dupATCA et c.1184T>C) et une mutation non-sens préalablement décrite (c.892C>T). Ce qui représente une fréquence de cette forme égale à 27,27%. Cette fréquence est dans l'intervalle indiqué par plusieurs études (25-35%) (Goodeve, 2015; Kasper and Lin, 2007). Parmi les 63 publications de la mutation c.892C>T, 2 publications ont présenté cette mutation sous la forme sporadique (Jayandharan et al, 2005; Radic et al, 2013). Toutefois, c'est la détermination du statut conductrice de la mère qui permet de savoir l'origine de ces mutations.

Les deux mutations les plus récurrentes sont c.881G>A (97 publications) et c.892C>T (63 publications) suivies par la mutation c.1150C>T (5 publications). Ces 3 mutations se localisent dans les sites CG, ce qui représente une fréquence de 33,33% (3/9 mutations ponctuelles) d'où cette fréquence est incluse dans l'intervalle mentionné dans d'autres études (30-50%) (Chen et al, 1991; Mukherjee et al, 2003; Bottema et al, 1993). Les mutations récurrentes dans l'HA et HB sont principalement trouvées dans les sites CG.

Le cadre de lecture ouvert du F9 présente 20 sites CG dont 6 résident dans les codons CGA. La transition C en T détruit particulièrement le codon arginine de type CGA et le transforme en codon stop TGA, ce qui est associé avec une HB sévère (Youssoufian et al, 1988 ; Koeberl et al, 1990). C'est le cas des deux mutations c.892C>T et c.1150C>T détectées dans cette recherche. Le mécanisme de ce phénomène est dû à la désamination spontanée de la 5'-méthylcytosine en thymidine (T) (Belvini et al, 2005).

L'effet délétère des mutations faux-sens revient essentiellement aux différences entre les propriétés physico-chimiques des deux aa. La gravité de l'HB résultant de mutations ponctuelles faux-sens dépend beaucoup de la nature de la substitution d'aa et son emplacement (Bowen, 2002).

La substitution semi conservative des aa (le nouvel aa est similaire au normal avec conservation de la charge, hydrophobicité, polarité, ou forme) pourrait être associée à la forme la moins sévère de la maladie sauf si elle se produit dans des régions structurales ou fonctionnelles importantes. C'est le cas de la mutation (c.1010C>T; p.Ala337Val) détectée dans notre recherche, présentant la forme mineure de l'HB.

Par contre la substitution non-conservative des aa (le nouvel aa est différent de l'aa normal) serait associée à la forme modérée ou sévère sans tenir compte de la position de l'aa. La possibilité de la perturbation structurale est plus grande pour les substitutions des aa non-conservatives (Kao et al, 2011).

L'effet délétère de la nouvelle mutation faux-sens (c.1184T>C) a été prédit *in silico* et il sera discuté dans la troisième partie de ce chapitre.

Parmi les 5 mutations faux-sens détectées dans notre étude, une mutation qui touche l'un des ponts disulfure du FIX a été identifiée. C'est la mutation (c.323G>A; p.Cys108Tyr). Cys108 est un résidu enfoui, il se trouve dans la région de feuille bêta du FIXa. La substitution d'un résidu cystéine impliqué dans la formation d'un pont disulfure Cys97-Cys108 conduit à la rupture de ce pont qui peut avoir des effets graves sur la stabilité du domaine EGF1 (Rallapalli et al, 2013). Seules les cystéines sont impliquées dans la formation de cette liaison. En effet, un pont disulfure (S-S) est une liaison covalente forte qui, par oxydation, réunit les fonctions thiol de deux cystéines dans une protéine. Le remplacement d'une cystéine par un autre aa abolit cette liaison.

3 mutations faux-sens au niveau du domaine catalytique du FIX ont été identifiées chez nos patients, dont 2 sont rapportées précédemment et la troisième est nouvelle (c.881G>A, c.1010C>T, c.1184T>C). La portion catalytique du FIX est une sérine-protéase qui est responsable du clivage du FX en FXa. Des mutations touchant ce domaine conduisent à une expression phénotypique sévère de l'HB (Nazia et al, 2008).

Dans cette recherche, deux formes différentes sévère et modérée causées par la mutation faux-sens (c.881G>A) ont été observées chez deux familles non apparentées. Ainsi qu'une différence entre les formes provoquées par la plus part des mutations de cette études et celles causées par les mêmes mutations des études préalables, a été observée. Ces observations concordent avec les résultats de l'étude de Belvini et al en 2005; la mutation c.881G>A et d'autres ont été observées chez plus d'un patient présentant des différents degrés de sévérité de la maladie. L'écart peut s'expliquer par l'intervention d'autres facteurs hémostatiques qui peuvent modifier la gravité clinique de l'hémophilie (Elmahmoudi et al, 2012).

3 mutations non-sens (c.357T>A, c.892C>T, c.1150C>T) préalablement identifiées ont été détectées chez nos patients.

La première mutation non-sens (c.357T>A; p.Cys119*) se traduit au niveau protéique par l'apparition d'un codon stop en position 119 correspond à une protéine dépourvue des trois domaines EGF2, peptide d'activation et sérine protéase.

Pour la deuxième mutation non-sens (c.892C>T; p.Arg298*), l'existence d'un codon stop à la position 892 du gène du FIX génèrerait une chaîne polypeptidique légèrement supérieure à la moitié de sa longueur normale (297/461) et éliminerait une grande partie du domaine catalytique de la protéine FIX mature (Chen et al, 1989).

Concernant la troisième mutation non-sens (c.1150C>T; p.Arg384*), l'étude de Kolkman et al en 1999 a montré que les résidus 379-385 de l'hélice α sont impliqués dans la liaison au domaine A2 du FVIII. Une mutation de type non-sens au niveau du codon 384 produirait une protéine FIX tronquée dépourvue d'un tiers du domaine catalytique (383/461) nécessaire pour la liaison au substrat, y compris la troisième sérine du site actif au niveau du codon 411 (Driscoll et al, 1989).

La seule et la nouvelle duplication de notre étude (c.657_660dupATCA) entraîne un codon stop à la position 223 du FIX engendrerait un polypeptide tronqué et éliminerait une partie du domaine peptidique d'activation et tout le domaine catalytique de la protéine FIX mature.

Les 3 mutations non-sens de notre échantillon et la nouvelle duplication entraînent l'arrêt prématuré de la traduction produisant des protéines dépourvues des domaines importants pour la structure du FIX ce qui donne des protéines courtes altérées fonctionnellement. Et grâce à l'implication du système Nonsense Mediated mRNA Decay (NMD) (dégradation des ARNm non-sens), ces protéines incomplètes ne peuvent ni synthétisées ni sécrétées dans la circulation (Byers, 2002; Khajavi et al, 2006).

En effet, le NMD est un mécanisme permettant de dégrader d'une manière sélective les ARNm présentant un codon stop prématuré, empêchant ainsi la traduction d'une protéine tronquée potentiellement délétère (Baker and Parker, 2004). Ce système exige la reconnaissance des codons de terminaison prématurée par le complexe de jonction des exons (EJC). L'EJC se met en place au cours de l'étape d'épissage des introns à 22 nucléotides en amont de la jonction entre deux exons. Pendant la traduction et lorsque le ribosome rencontre un codon stop en amont d'un des complexes (EJC), il recrute des facteurs de fin de la traduction (Conti and Izaurralde, 2005; Wen and Brogna, 2008). Ces facteurs liés au complexe EJC vont provoquer la dégradation de l'ARNm par l'exosome.

Une seule mutation au niveau du promoteur du F9 a été identifiée par nous (c.-52C>T). Selon l'étude de Lannoy N et al en 2017, cette position c.-52 est située sur un segment de 6 nucléotides (TGTA CT) (-56 à -51) qui est commun au site ARE (-65 à -51) et HNF4 α (-56 à -48) élément. Les mutations dans cette position perturbent le récepteur des androgènes (AR) et le facteur nucléaire hépatique 4a (HNF4a). L'élément de réponse aux androgènes (ARE); séquence qui se lie à la testostérone de la puberté et active la transcription du FIX, HNF4 α est un site de liaison auquel la protéine facilite la transcription de F9.

Nous avons rapporté l'absence d'identification de mutations causales chez cinq cas appartenant à deux familles non apparentées et présentant les critères diagnostiques de l'HB (15,38%). L'absence de mutations peut être due à une variation intronique ou aux larges réarrangements du gène F9 de type délétion ou duplication, donc d'autres études sont nécessaires. Selon l'étude de Nguyen, la technique de séquençage direct peut identifier avec précision la mutation responsable de l'hémophilie grave chez la plupart des patients et des familles, dont les mutations sont détectées dans 96% des cas d'HA et HB sévère et dans 80% des cas d'HA et HB modérée et mineure (Nguyen, 2010). Ce qui est similaire à notre résultat; les mutations ont été détectées chez 11 parmi 13 familles (84,62%) par le séquençage direct.

II.2. Corrélation entre mutations détectées et complications de l'HB

Tableau 19. Représentation de quelques complications chez des malades de l'HB.

Patient	Age (an)	Taux du FIX	Sévérité	Mutation	Complications	Infections	ACC
F1/P1	44	<1%	Sévère	c.-52C>T	RAS	Non	Non
F1/P2	26	<1%	Sévère	c.-52C>T	Arthropathie	Non	Non
F1/P3	18	<1%	Sévère	c.-52C>T	Arthropathie	Non	Non
F1/P4	13	<1%	Sévère	c.-52C>T	RAS	Non	Non
F1/P5	9	<1%	Sévère	c.-52C>T	RAS	Non	Non
F1/P6	4	<1%	Sévère	c.-52C>T	RAS	Non	Non
F2/P1	16	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	Arthropathie	Non	Non
F2/P2	19	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	Arthropathie	Non	Non
F2/P3	9	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	Arthropathie	Non	Non
F2/P4	27	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	Arthropathie	Non	Non
F2/P5	29	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	Arthropathie	Non	Non
F2/P6	15	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	RAS	Non	Non
F2/P7	26	<1%	Sévère	c.323G>A (p.Cys108Tyr)	Arthropathie	Non	Non
F3/P1	7	<1%	Sévère	c.357T>A (p.Cys119*)	RAS	Non	Non
F3/P2	6	<1%	Sévère	c.357T>A (p.Cys119*)	RAS	Non	Non
F4/P1	54	1%	Modérée	c.373G>A (p.Gly125Arg)	RAS	VHC	Non
F4/P2	25	1%	Modérée	c.373G>A (p.Gly125Arg)	RAS	Non	Non
F4/P3	20	1%	Modérée	c.373G>A (p.Gly125Arg)	RAS	Non	Non
F4/P4	16	1%	Modérée	c.373G>A	RAS	Non	Non

				(p.Gly125Arg)			
F5/P1	50	<1%	Sévère	c.657_660dupATCA (p.Asp223*)	Arthropathies, hématomes du psoas bilatéraux	Non	Non
F6/P1	84	3%	Modérée	c.881G>A (p.Arg294Gln)	RAS	Non	Non
F6/P2	32	3%	Modérée	c.881G>A (p.Arg294Gln)	RAS	Non	Non
F6/P3	11	3%	Modérée	c.881G>A (p.Arg294Gln)	RAS	Non	Non
F7/P1	45	<1%	Sévère	c.881G>A (p.Arg294Gln)	RAS	VHC	Non
F7/P2	50	<1%	Sévère	c.881G>A (p.Arg294Gln)	RAS	VHC	Non
F8/P1	7	<1%	Sévère	c.892C>T (p.Arg298*)	RAS	Non	Non
F9/P1	18	7%	Mineure	c.1010C>T (p.Ala337Val)	RAS	Non	Non
F9/P2	17	7%	Mineure	c.1010C>T (p.Ala337Val)	RAS	Non	Non
F9/P3	15	7%	Mineure	c.1010C>T (p.Ala337Val)	RAS	Non	Non
F9/P4	7	7%	Mineure	c.1010C>T (p.Ala337Val)	RAS	Non	Non
F10/P1	36	<1%	Sévère	c.1150C>T (p.Arg384*)	RAS	VHC	Non
F10/P2	16	<1%	Sévère	c.1150C>T (p.Arg384*)	Arthropathies	Non	Non
F10/P3	/	<1%	Sévère	c.1150C>T (p.Arg384*)	Arthropathies	Non	Non
F11/P1	11	<1%	Sévère	c.1184T>C (p.Phe395Ser)	RAS	Non	Non
F12/P1	60	<1%	Sévère	/	Arthropathies	VHC	Non
F12/P2	25	<1%	Sévère	/	RAS	Non	Non
F12/P3	21	<1%	Sévère	/	RAS	Non	Non
F13/P1	13	2%	Modérée	/	RAS	Non	Non
F13/P2	13	2%	Modérée	/	RAS	Non	Non

ACC: Anticoagulant circulant; **F**: Famille; **P** : Patient; **RAS** : Rien à signaler; **VHC** : Virus de l'hépatite C.

II.2.1. Arthropathies

Dans notre série, les arthropathies sont rencontrées chez 12 patients présentant la forme sévère de la maladie, donc 46,15% (12/26). Et aucun cas n'a été observé dans les formes modérées et mineures (0%).

30 patients de l'étude de Belhani, présentent des arthropathies dont 23/35 (66%) hémophilies sévères et 7/20 (35%) hémophilies modérées, une ou plusieurs articulations sont touchées chez un même hémophile (Belhani, 2009). Selon la littérature, les arthropathies sont répandues, elles apparaissent à partir de 8-13 ans et leur taux augmente avec l'âge (Bae et al, 2005 ; Michaut et al, 2007).

(2/6) des patients présentant la mutation c.-52C>T, (6/7) pour la mutation c.323G>A, (1/1) pour la mutation c.657_660dupATCA, (2/3) pour la mutation c.1150C>T et (1/3) dont la mutation n'a été pas détectée chez ces 3 patients, sont touchés par les arthropathies. Des études sur les arthropathies n'ont pas été mentionnées dans les articles qui décrivent ces mutations. L'arthropathie hémophilique apparait après des hémarthroses fréquentes qui touchent une articulation de l'hémophile. Les mécanismes inclus dans l'apparition de l'arthropathie hémophilique sont encore insuffisamment connus, mais ils sont peut-être de facteurs multiples. Ils font inclure des éléments inflammatoires et dégénératifs (Acharya, 2008; Cockenpot et al, 2013). Ce qui explique la présence des arthropathies chez des patients et non chez d'autres présentant la même mutation.

Certains auteurs affirment qu'une corrélation entre génotype et phénotype est rare et, dans la majorité des cas, une corrélation claire n'a pas été démontrée, à l'exception de très rares cas (Bowen, 2002). En raison de la difficulté à présenter une corrélation claire, en 2001, le comité international de normalisation de thrombose et hémostasie a établi la classification de la gravité clinique selon le niveau du facteur de coagulation dans le plasma et non à des manifestations cliniques. Une relation directe entre le défaut génétique et l'activité de la protéine est prévu (White et al, 2001). Cependant, L'analyse moléculaire du gène F9 dans une cohorte de patients d'origine iranienne atteints d'HB a confirmé une corrélation entre le génotype et la gravité de la maladie (Morteza et al, 2009). D'autres études ont confirmé cette corrélation (Lillicrap, 1998 ; Ana Rebeca et al, 2012 ; Tengguo et al, 2014). Chez nos patients présentant la forme modérée et mineure de l'HB ne sont pas touchés par les arthropathies. Dans notre série, les arthropathies sont rencontrées chez 6 patients présentant la même mutation (c.323G>A) à l'exception d'un seul malade dont le taux du FIX <1% traduisant la forme sévère. La même observation pour les autres mutations entraînant la forme sévère, les arthropathies sont présentes chez des patients et non pas chez d'autres touchés par la même mutation. La mutation c.881G>A est responsable de l'apparition de l'HB chez deux familles non apparentées présentant la forme modérée pour la famille 6 et la forme sévère pour la famille 7. Les patients de ces deux familles ne sont pas touchés par les arthropathies, malgré la sévérité de l'HB chez la famille 7. La discussion de l'existence d'une corrélation reste difficile à cause de la présence de plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur cette corrélation.

II.2.2. Infections

D'après les données du **tableau 19**, 5 patients parmi 39 sont infectés par le VHC (12,82%) dont leur âge est de 36, 45, 50, 54 et 60 ans. La recherche de Yee et al en 2000 a montré que la plupart des malades qui sont traités par des facteurs antihémophiliques d'origine plasmatique avant la fin des années quatre-vingt ont été infectés par le VHC. Après l'identification du VHC en 1989, les études de Lee et Tedder et al ont montré que les premiers tests sérologiques présentent une séropositivité de plus de 90% des hémophiles transfusés avec des produits non inactivés (Lee, 1995; Tedder et al, 1991).

II.2.3. ACC

La survenue d'un anticorps inhibiteur par allo-immunisation reste pour les malades hémophiles la complication majeure du traitement de remplacement. Cette complication présente 35% des cas d'HA sévère et 5% des cas d'HB sévère selon les dernières études (Kessler et al, 2015 ; Gouw et al, 2013 ; Srivastava et al, 2013).

Les ACC de FIX n'ont pas été observés chez nos patients. Les ACC sont moins fréquents chez les malades atteints de l'HB que chez ceux atteints d'HA. Le type de mutation dans le gène F9 est lié à une prédisposition génétique à l'apparition d'ACC. La plupart surviennent chez des patients présentant de grandes délétions ou des mutations non-sens (Goodeve, 2015). En 2012, Pinotti et al ont révélé que les patients présentant des mutations non-sens présentent un risque plus faible d'ACC que les patients ayant des délétions. Les études de Thorland et al en 1999 et Warriar and Lusher en 1998 ont montré que les patients présentant des délétions du gène F9 sont à haut risque de développer des ACC. Dans notre cohorte aucune mutation de type délétion n'a été identifiée. Dans deux études rapportant l'hémophilie d'Iran, aucun des patients atteints d'HB n'a développé d'ACC (Morteza et al, 2007; Mehdizadeh et al, 2009) similaire à notre étude, les ACC du FIX n'ont pas été observés chez nos patients. Cela était probablement dû à l'absence de délétions du gène F9 dans notre cohorte ou à la petite taille de l'échantillon. Afin de confirmer ces résultats, nous devons augmenter le nombre de patients HB étudiés dans notre étude.

III. Prédiction *in silico* des effets délétères des nouvelles mutations responsables d'HB dans la population Algérienne

Les effets délétères de la nouvelle mutation identifiée (c.1184T>C) sur la protéine FIX ont été prédits en utilisant dix logiciels bioinformatiques, cinq pour la structure, quatre pour la fonction et un logiciel pour la structure et la fonction.

III.1. Résultats

III.1.1. Analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la fonction de la protéine FIX

III.1.1.1. Résultat obtenu par le logiciel PON-P2

Après l'utilisation du logiciel PON-P2, le résultat de la prédiction de l'effet de la mutation c.1184T>C sur la protéine FIX est présenté sur la **figure 32**.

Submission	Probability for pathogenicity	Standard error	Prediction
p00740_F395S	0.910	0.048	Pathogenic

Figure 32. Résultat obtenu par le logiciel PON-P2.

D'après le résultat obtenu par le logiciel PON-P2, la probabilité prédite de pathogénicité de la mutation c.1184T>C est de 91%.

III.1.1.2. Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2

La prédiction de l'impact de la mutation c.1184T>C sur la protéine FIX par le logiciel PolyPhen-2 nous a permis d'avoir les résultats présentés sur la **figure 33**.

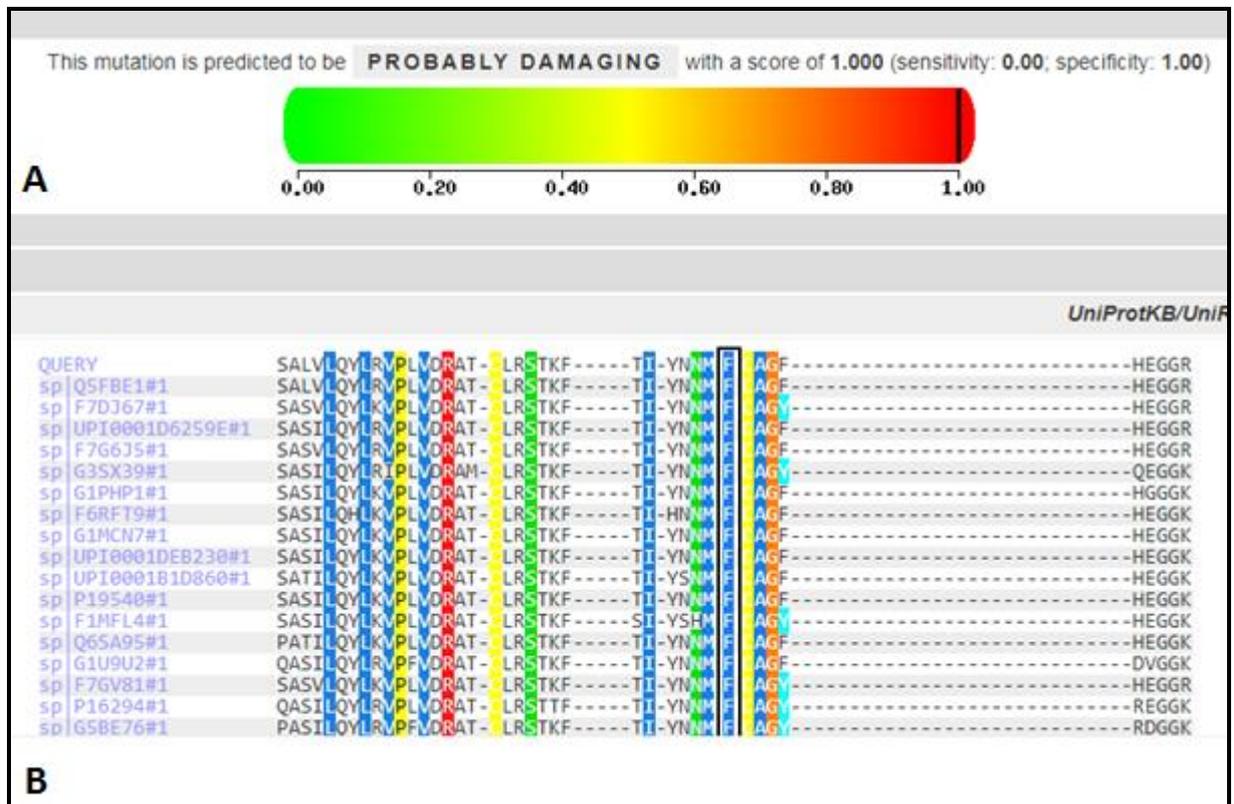


Figure 33. Résultat obtenu par le logiciel PolyPhen-2.

A. Prédiction de l'impact de la mutation c.1184T>C sur la protéine FIXI par le logiciel PolyPhen-2.

B. Alignement de séquences, produit par PolyPhen-2, montre la conservation de l'aa phénylalanine (F) à la position 395 du FIX.

En utilisant le logiciel PolyPhen-2, la mutation c.1184T>C a été prédite comme étant probablement délétères à la protéine (Probably damaging) (**Tableau 20**). PolyPhen-2 a permis d'obtenir le résultat d'alignement multiple par comparaison avec toutes les espèces enregistrées sur UniProKB, ce qui nous a permis de confirmer que cette nouvelle mutation a lieu au niveau d'une région très conservée entre plusieurs espèces (**Figure 33.B**) et il est fort probable qu'elle induit une déstabilisation du FIX.

III.1.1.3. Résultat obtenu par le logiciel Align GVGD

L'utilisation du logiciel Align GVGD a permis de prédire les effets délétères de la mutation c.1184T>C. Le résultat obtenu par ce logiciel est présenté sur la **figure 34**.

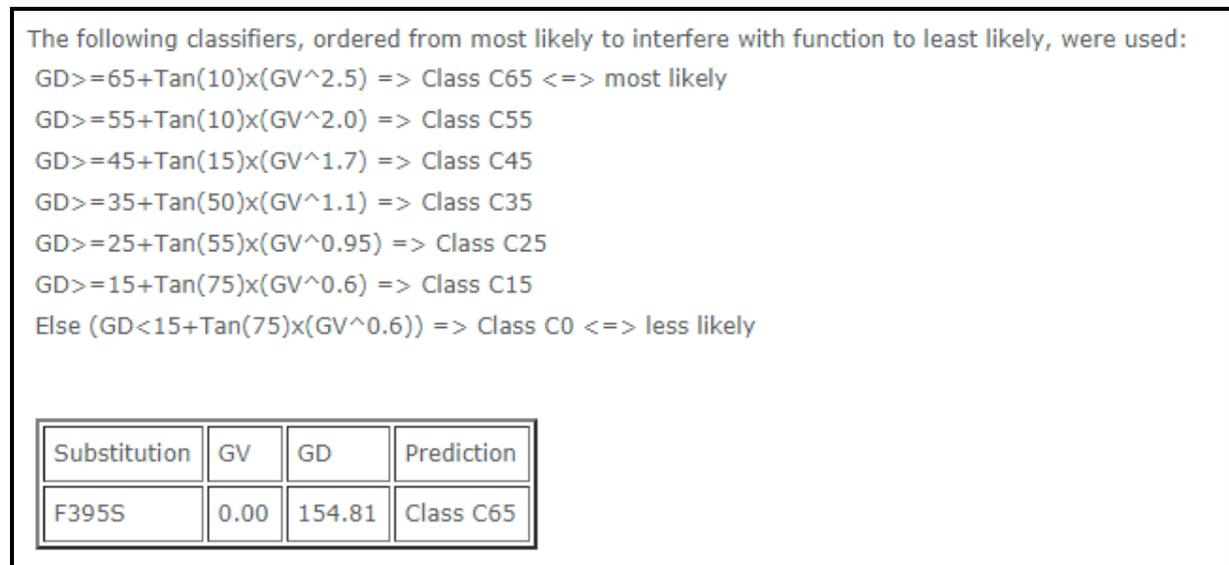


Figure 34. Résultat obtenu par le logiciel Align GVGD.

L'analyse de la mutation c.1184T>C par Align GVGD a permis de calculer les valeurs GV et GD pour cette mutation. La valeur de GV est égale à 0,00 ce qui signifie que la substitution siège au niveau d'une région fortement conservée entre les espèces analysées. D'autre part, ce même logiciel nous a permis de calculer le GD entre l'aa sauvage et muté. La valeur GD pour cette mutation est égale à 154,81 ce qui signifie que le remplacement d'une phénylalanine par une sérine est prédit comme changement radical.

Le résultat de l'analyse de cette mutation par ce logiciel a permis de prédire que cette dernière correspond à la classe C65 : cette mutation est prédite comme interférente avec la fonction du FIX.

III.1.1.4. Résultat obtenu par le logiciel PROVEAN

Le logiciel PROVEAN utilisé pour analyser la mutation c.1184T>C, nous a conduit à obtenir le résultat illustré sur la **figure 35**.

Variant	PROVEAN score	Prediction (cutoff= -2.5)
F395S	-7.954	Deleterious

Figure 35. Résultat obtenu par le logiciel PROVEAN.

Le résultat est établi sous forme d'un score de -7,954 qui est $\leq -2,5$ ce qui traduit que la mutation ayant un effet délétère sur la protéine FIX.

Les résultats de l'analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la fonction de la protéine FIX sont résumés dans le **tableau 20**.

Tableau 20. Résultats de l'analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la fonction de la protéine FIX.

Logiciel	Résultats de prédiction	Score / Indice de fiabilité / Classe	
PON-P2	Pathogène	0,910	Indice de fiabilité
PolyPhen-2	Probablement délétère	1	Score
Align GVGD	Affecte la fonction	65	Classe
PROVEAN	délétère	-7,954	Score

III.1.2. Analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la structure de la protéine FIX

III.1.2.1. Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0

L'analyse des effets de la mutation c.1184T>C sur la stabilité de la protéine FIX a été prédite par le logiciel I-Mutant 2.0. Le résultat obtenu par ce logiciel est représenté sur la **figure 36**.

```

*****
**                                     **
**               I-Mutant v2.0               **
**   Predictor of Protein Stability Changes upon Mutations   **
**                                     **
*****
SEQ File: fileseq.txt

Position WT NEW  DDG  pH  T
      395  F  S   -2.89  7.0  25

WT: Aminoacid in Wild-Type Protein
NEW: New Aminoacid after Mutation
DDG: DG(NewProtein)-DG(WildType) in Kcal/mol
      DDG<0: Decrease Stability
      DDG>0: Increase Stability
T: Temperature in Celsius degrees
pH: -log[H+]
*****

```

Figure 36. Résultat obtenu par le logiciel I-Mutant 2.0.

I-Mutant 2.0 a permis de calculer la DDG entre la protéine normale et mutée. La valeur DDG calculée pour la mutation c.1184T>C est égale à -2,89. Etant donné que cette valeur est négative, la mutation testée a été considérée comme déstabilisante pour la structure du FIX.

III.1.2.2. Résultat obtenu par le logiciel ProSMS

Le logiciel ProSMS a présenté le résultat de l'analyse de la mutation c.1184T>C sous deux formes représentées sur les **figures 37 et 38**.

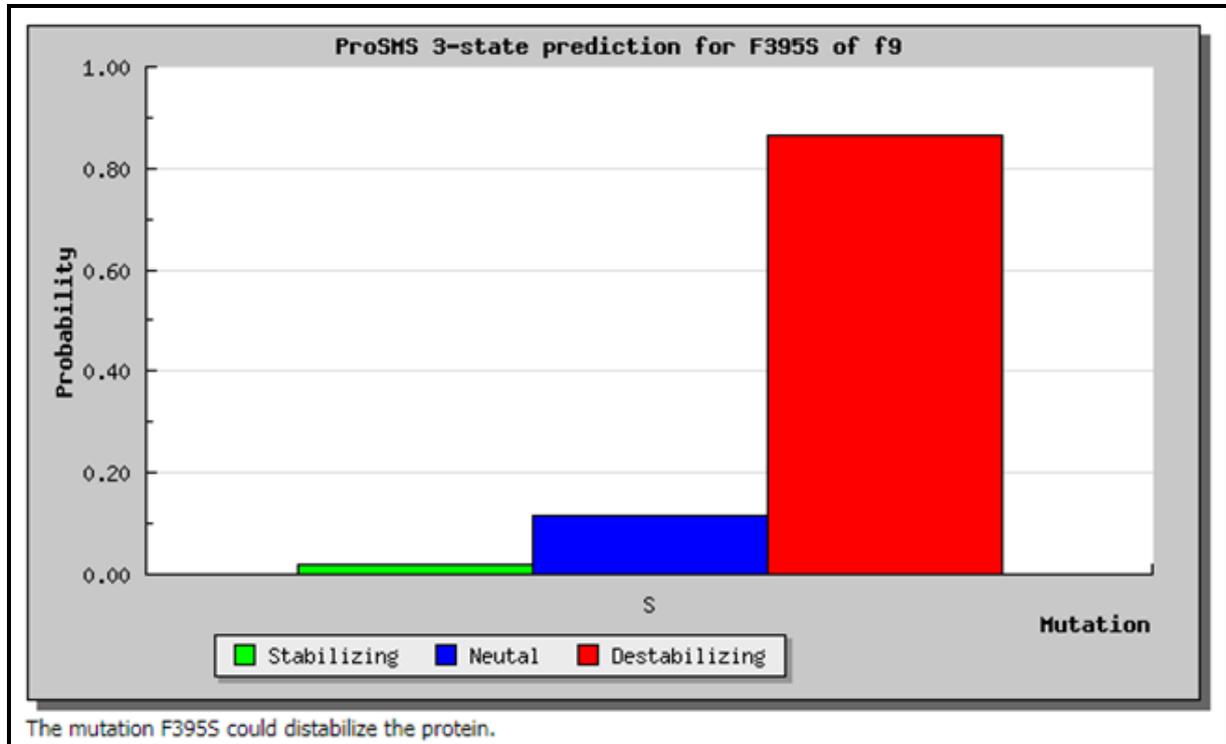


Figure 37. Résultat sous forme de diagrammes obtenu par le logiciel ProSMS.

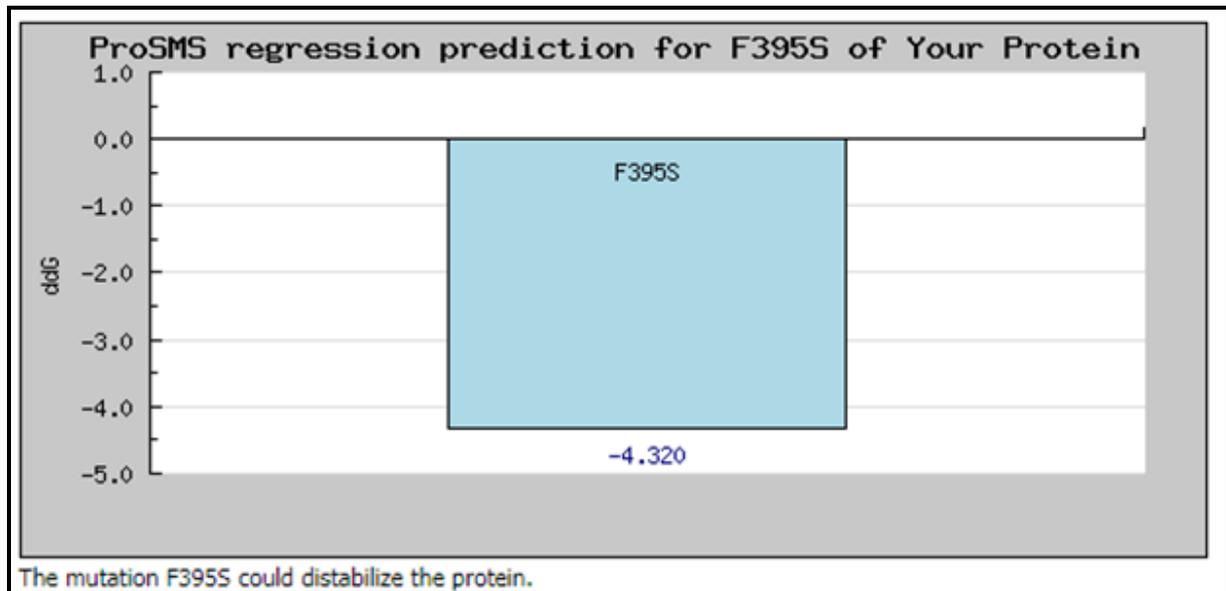


Figure 38. Résultat sous forme d'une valeur DDG obtenu par le logiciel ProSMS.

En analysant la mutation c.1184T>C, la valeur DDG obtenue par le logiciel ProSMS est égale à une valeur négative de -4,320. En basant sur cette valeur, cette mutation a été considérée comme déstabilisante pour la structure du FIX.

III.1.2.3. Résultat obtenu par le logiciel INPS

La prédiction de l'effet de la mutation c.1184T>C sur la protéine FIX par le logiciel INPS nous a permis d'obtenir le résultat présenté sur la **figure 39**.

```
inps prediction results
Copyright (C) 2015 Castrense Savojardo
Department of Biological, Geological and Environmental Sciences (BiGeA)
Bologna Biocomputing Group
University of Bologna, Italy.
savojard@biocomp.unibo.it

Protein info
-----

Protein id: sp_P00740_FA9_HUMAN
Protein length: 461

Mutation          DDG
-----
F395S             -2.73671
```

Figure 39. Résultat obtenu par le logiciel INPS.

La valeur DDG négative (-2,73) nous a permis de prédire un impact déstabilisant de la mutation c.1184T>C sur la protéine FIX, en utilisant le logiciel INPS.

III.1.2.4. Résultat obtenu par le logiciel MUpro

Le résultat de la prédiction de l'effet de la mutation c.1184T>C sur la structure de la protéine FIX est présenté sur la **figure 40**.

Mutation Request:
Name: unknown
Sequence:

```

MQRVNIIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNL
ERECHEEKCSFEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCP
FGFEGKNCLELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCPEAVPFCGR
VSVSQTSLTRAETVFPDQVDVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVGGEDAKPGQFPW
QVVLNGKVDAFCGGSIIVNEKIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIETEHEQKRNIVIRII
PHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAQKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVF
HKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVE
GTSFLTGIISWGEECAMKGYIYTKVSRVYVNIKEKTKLT

```

Position: 395
Original Amino Acid: F
Substitute Amino Acid: S

Prediction Results:

1. Predicted both value and sign of energy change using SVM and sequence information only (Recommended)
detaI delta G = (INCREASE stability)
2. Prediction of the sign (direction) of energy change using SVM and neural network with a smaller sequence window

Method 1: Support Vector Machine, use sequence information only.
Effect: DECREASE the stability of protein structure.
Confidence Score: -1

Method 2: Neural Network, use sequence information only.
Effect: DECREASE the stability of protein structure.
Confidence Score: -0.99230372579082

Figure 40. Résultat obtenu par le logiciel MUpro.

Après l'utilisation du logiciel MUpro pour analyser la mutation c.1184T>C, un score de -1 a été obtenu ce qui signifie que cette mutation diminue la stabilité de la structure protéique du FIX.

III.1.2.5. Résultat obtenu par le logiciel iStable

L'utilisation du logiciel iStable a permis de prédire les effets délétères de la mutation c.1184T>C sur la structure de la protéine FIX. Le résultat obtenu par ce logiciel est présenté sur la **figure 41**.

	Reference		Reference		Meta Result	
Predictor	i-Mutant2.0 SEQ	DDG	MUpro	Conf. Score	iStable	Conf. Score
Result	Decrease	-2.07	Decrease	-1	Decrease	0.778174

Figure 41. Résultat obtenu par le logiciel iStable.

Le score obtenu par le logiciel iStable est près de 1, ce qui signifie que la mutation c.1184T>C a été considérée comme déstabilisante pour la structure du FIX.

Les résultats de l'analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la structure de la protéine FIX sont résumés dans le **tableau 21**.

Tableau 21. Résultats de l'analyse de la mutation c.1184T>C par des logiciels prédisant les effets délétères sur la structure de la protéine FIX.

Logiciel	Résultats de prédiction	Score / DDG	
I-Mutant 2.0	Déstabilisante	-2,89	DDG
ProSMS	Déstabilisante	-4,32	DDG
INPS	Déstabilisante	-2,73	DDG
MUpro	Déstabilisante	-1	Score
iStable	Déstabilisante	0,77	Score

III.1.3. Analyse de la mutation c.1184T>C par un logiciel prédisant les effets délétères sur la structure et la fonction de la protéine FIX (Project HOPE)

L'utilisation du logiciel Project HOPE nous a permis d'analyser des paramètres pour la prédiction des effets délétères de la mutation faux-sens c.1184T>C (p.Phe395Ser).

➤ Localisation du résidu substitué au niveau du FIX

La phénylalanine en position 395 se trouve au niveau du domaine catalytique (Sérine protéase). Cet aa est présent dans une boucle disulfure formée par Cys382 et Cys396.

➤ Comparaison des changements structuraux de la protéine FIX

Le remplacement d'une phénylalanine par une sérine provoque un changement structural très important au sein de la protéine FIX qui se traduit par l'affaiblissement des contacts hydrophobes du Phe395 avec Leu376, ce qui pourrait déstabiliser l'hélice (376-384) et entraîner une affinité réduite pour le FVIIIa.

➤ Comparaison des propriétés physicochimiques entre le résidu normal et muté

La différence de propriétés d'aa peut expliquer l'impact des mutations sur la structure et la fonction du FIX. Donc, une comparaison des propriétés physicochimiques entre le résidu normal (Phénylalanine) et muté (Sérine) a été effectuée. Les structures de ces deux aa sont représentées dans la **figure 42**. Cette figure montre les structures schématiques de l'aa sauvage la phénylalanine (à gauche) et l'aa muté la sérine (à droite). La partie commune (squelette) entre les deux aa est de couleur rouge. La chaîne latérale qui est unique pour chaque résidu est de couleur noire. Ces deux aa présentent des propriétés chimiques particulières en raison de la nature de leurs chaînes latérales.

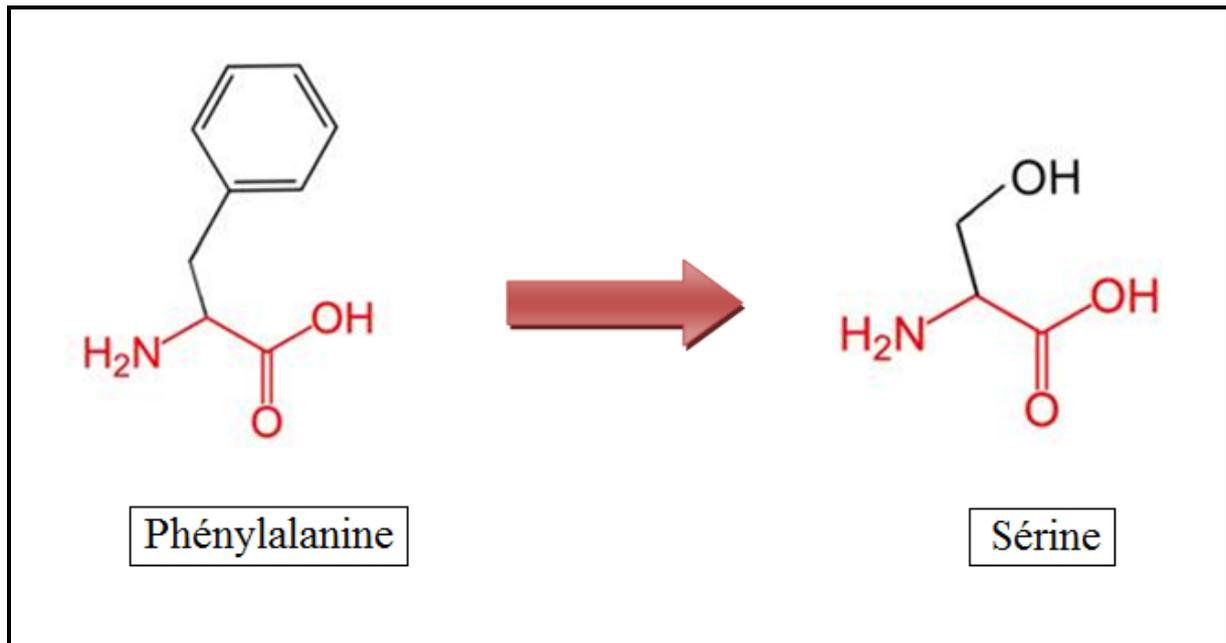


Figure 42. Les structures schématiques de la phénylalanine et sérine.

Les différences de propriétés physico-chimiques entre les deux aa résident au niveau de la taille et l'hydrophobicité (Annexes 3 et 4). La sérine (105 Da) est plus petite que la phénylalanine (165 Da). Tandis que la phénylalanine est plus hydrophobe que la sérine. De plus, la présence de chaîne latérale aromatique de l'aa phénylalanine représente la principale différence. Toutes ces différences pourraient causer un changement structural important à la protéine FIX.

➤ **Comparaison de taille et orientation de chaîne latérale du résidu normal et muté**

Pour la mutation c.1184T>C (p.Phe395Ser), les deux structures 3D du FIX sauvage et muté ont été superposées afin de déterminer toutes différences de taille et d'orientation des chaînes latérales (**Figure 43**).

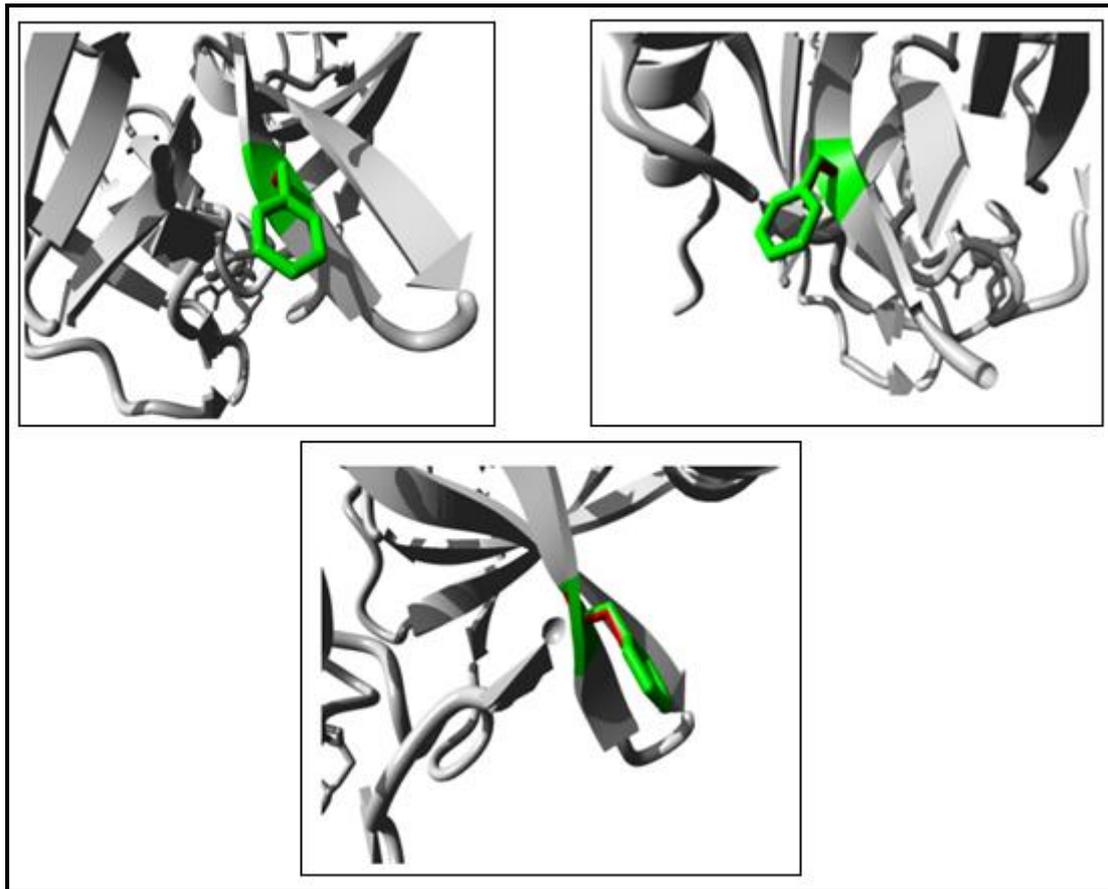


Figure 43. Capture superposée des deux structures 3D du FIX sauvage et mutée (vue sur trois ongles différents). La protéine FIX est représentée sous forme ribbon de couleur grise. La chaîne latérale de l'aa phénylalanine est représentée en vert tandis que celle de l'aa sérine est représentée en rouge.

La comparaison de la chaîne latérale de la phénylalanine représentée en vert avec celle de la sérine représentée en rouge montre clairement la différence de taille entre les deux chaînes. La chaîne latérale de la sérine est plus courte que celle de la phénylalanine. Cette différence pourrait empêcher ou créer de nouvelles interactions moléculaires au sein de la structure du FIX.

III.2. Discussion

La nature de la mutation est fondamentale pour évaluer son caractère pathogène. Dans notre étude, deux nouvelles mutations ont été détectées: une duplication (c.657_660dupATCA) et une mutation faux-sens (c.1184T>C; p.Phe395Ser).

La duplication identifiée est une mutation qui entraîne un décalage du cadre de lecture responsable de l'apparition d'un codon stop prématuré à la position 223 (p.Asp223*). La présence de ce codon stop prématuré empêche toute synthèse d'une protéine tronquée par la dégradation de l'ARNm *via* le mécanisme NMD. Le caractère délétère de cette mutation est donc admis. En revanche, les effets délétères des mutations faux-sens sont sujets à discussion essentiellement si ces mutations sont responsables de forme sévère de la pathologie. C'est la

raison pour laquelle les effets délétères de la nouvelle mutation faux-sens (c.1184T>C) rapportée dans cette étude ont été prédits par différents logiciels bioinformatiques.

Les effets délétères de la nouvelle mutation faux-sens (c.1184T>C) sur la stabilité ont été évalués par cinq logiciels différents (I-Mutant 2.0, ProSMS, INPS, MUpro et iStable). Tandis que les effets de cette mutation sur la fonction protéique ont été prédits par quatre logiciels différents (PON-P2, PolyPhen-2, Align GVGD et PROVEAN).

La stabilité de la protéine FIX a été évaluée par le calcul d'énergie; plus le champ de force de l'aa est grand, moins la protéine est stable. Les logiciels de prédiction des effets de la mutation sur la fonction du FIX se basent sur les principes suivants: calcul du score de Grantham, les différences des propriétés physicochimiques des résidus et l'analyse de l'état de conservation du résidu étudié entre des espèces. Les résultats obtenus par les logiciels prédisant les effets délétères sur la stabilité de la protéine FIX (I-Mutant 2.0, ProSMS, INPS, MUpro et iStable) sont en faveur d'un effet déstabilisant de la mutation c.1184T>C sur la protéine FIX. De même, les logiciels (PON-P2, PolyPhen-2, Align GVGD et PROVEAN) ont prédit des effets délétères de cette mutation sur la fonction du FIX.

Pour confirmer ces différents résultats, le logiciel Project HOPE ; qui analyse l'impact des mutations ponctuelles sur la structure et la fonction protéique en utilisant la structure 3D, a été utilisé.

Les résultats obtenus ont montré que l'effet délétère de la nouvelle mutation c.1184T>C réside aux changements des propriétés physico-chimiques des deux aa normal (Phénylalanine) et muté (Sérine). Ces changements sont responsables de perte des interactions moléculaires ayant des effets déstabilisants au niveau de la structure de la protéine FIX. Le remplacement d'un aa non polaire (phénylalanine) par un aa polaire (sérine) peut affecter la fonction, la sécrétion ou la stabilité de la protéine FIX.

Conclusion générale

La démarche diagnostique des maladies hémorragiques constitutionnelles de l'hémostase doit être rationnelle combinant à la fois les données cliniques et biologiques. Nous nous sommes intéressés à l'HB, pouvant être une maladie handicapante si sa prise en charge n'est pas précoce. L'HB, maladie de la coagulation rare, est très redoutée. En effet, en plus des risques encourus du fait des accidents aigus hémorragiques, il s'agit d'une pathologie génératrice de séquelles orthopédiques (ostéo-articulaires, musculaires et nerveuses) dans son évolution et qui pose le problème de leur prise en charge pluridisciplinaire. La prévalence réelle de l'HB en Algérie n'est pas connue d'où l'intérêt d'un registre national.

Le diagnostic biologique de la maladie de l'HB qui a été effectué chez une partie de la population Algérienne, nous a permis de démontrer que cette maladie est moins fréquente que d'autres syndromes hémorragiques comme l'HA et que la forme sévère est la plus fréquente pour l'HB ainsi que pour l'HA (67,67%). Cette pathologie se caractérise par la normalité des tests d'exploration de l'hémostase primaire en raison d'une formation initiale normale du caillot plaquettaire. Cependant, l'HB se traduit par une anomalie de l'hémostase secondaire à cause du déficit du FIX, ce qui explique l'allongement du TCA.

39 patients atteints d'HB appartenant à 13 familles Algériennes non apparentées ont été inclus dans l'étude moléculaire. Tous les patients étaient des hommes. L'ADN a été extrait par la méthode de salting out. Comme la plupart des exons du gène F9 sont relativement courts, le séquençage direct d'un exon complet est possible une fois qu'il a été amplifié à partir de l'ADN génomique par la technique de la PCR. Donc, tous les exons, le promoteur et la région polyA du gène F9 ont été amplifiés par PCR. Les mutations de l'HB ont été identifiées par analyse de séquence automatisée en utilisant la méthode d'électrophorèse capillaire.

Cette analyse moléculaire permet de produire les premiers résultats à l'échelle nationale concernant la population porteuse d'HB.

Les anomalies moléculaires responsables de l'HB dans l'échantillon constitué de 34 patients hémophiles appartenant à 11 familles ont pu être caractérisées. Ces mutations regroupent 9 mutations ponctuelles et une duplication. Deux nouvelles mutations ont été détectées dans cette étude. Ces mutations n'ont jamais été décrites auparavant et semblent être spécifiques à la population Algérienne.

De façon générale, la plupart des mutations identifiées sont spécifiques à chaque famille à l'exception de la mutation c.881G>A qui a été identifiée chez deux familles non apparentées. C'est probablement la raison pour laquelle, de nouvelles mutations de l'HB sont encore dépistées malgré le séquençage extensif du gène F9 par de nombreuses équipes depuis plus de 30 ans.

Cependant, la stratégie d'identification des mutations utilisée a permis la mise en évidence des mutations responsables de l'HB chez uniquement 84,62% de l'échantillon étudié. L'absence de mutations pour les cas restant peut être due à une variation intronique ou aux larges réarrangements du gène F9 de type délétion ou duplication.

Conclusion générale

Les résultats obtenus dans la deuxième partie d'étude confirment l'existence de sites privilégiés de mutations au niveau du gène F9. 50% des mutations sont localisées au niveau de l'exon 8 et les mutations les plus récurrentes sont trouvées dans les sites CG.

Notre recherche nous a permis de confirmer qu'une même mutation peut présenter différents degrés de sévérité, c'était le cas de la mutation c.881G>A.

Nous avons confirmé la difficulté d'établir une corrélation entre phénotype et type de mutation, ceci est à cause de la présence de plusieurs facteurs qui peuvent influencer sur cette corrélation.

Les effets délétères de la nouvelle mutation faux-sens c.1184T>C détectée dans cet échantillon ont été prédit en utilisant des logiciels évaluant son impact sur la structure et la fonction de la protéine FIX. Par conséquent, cette étude a permis de démontrer l'efficacité de la combinaison de plusieurs outils prédictifs pour évaluer les effets délétères des nouvelles mutations.

Du fait de l'absence de mutations identifiées chez deux familles, nos travaux de recherches futures vont s'orienter vers l'identification des anomalies moléculaires responsables de l'HB chez les patients de ces familles et l'inclusion des nouveaux cas afin de permettre un diagnostic accessible à toutes les familles.

Compte-tenu de l'absence d'ACC chez les patients de cette étude et dans le but de mieux élucider les facteurs de risque de ces inhibiteurs (génétiques ou éventuellement liés au traitement) et les modalités de traitement liés à l'HB, nous envisageons de compléter l'étude sur un plus large échantillon afin d'inclure des patients présentant des ACC.

La connaissance des mécanismes moléculaires associés aux différents dysfonctionnements de la protéine FIX est importante au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dont le développement d'une thérapie génique et la recherche des molécules thérapeutiques du FIX plus stables.

3 cas dans cette recherche présentent la forme sporadique entraînée par les mutations c.657_660dupATCA, c.892C>T et c.1184T>C ce qui nous conduira de proposer aux mères un test de détection du statut conductrice. Ce test sera proposé au futur à toutes les femmes appartenant aux familles à risque, ce qui pourra confirmer le statut des femmes non porteuses et d'assurer une meilleure prise en charge de la mère conductrice et de son enfant lors de l'accouchement

Références bibliographiques

A

Acharya SS (2008) Hemophilic joint disease – current perspective and potential future strategies. *Transfusion and Apheresis Science* 38:49-55

Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Cheung WF, Jameson BA, Stafford DW, Walsh PN (1994) High-affinity, specific factor IXa binding to platelets is mediated in part by residues 3-11. *Biochemistry* 33:12048-12055

Ahmad SS, Wong MY, Rawala R, Jameson BA, Walsh PN (1998) Coagulation factor IX residues G4-Q11 mediate its interaction with a shared factor IX/IXa binding site on activated platelets but not the assembly of the functional factor X activating complex. *Biochemistry* 37:1671-1679

Ahmad SS, London FS, Walsh PN (2003) Binding studies of the enzyme (factor IXa) with the cofactor (factor VIIIa) in the assembly of factor-X activating complex on the activated platelet surface. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1:2348-2355

Ana Rebeca JC, Claudia Patricia BM, Isaura Araceli GR, José de Jesús LJ, Hilda LZ, Johanna Milena MC, Jessica Noemi MA, Mayra Judith VG (2012) Genotype-Phenotype Interaction Analyses in Hemophilia. *Hemophilia Dr Angelika Batorova* 15-32

Annie H (2012) Modèles d'évaluation de l'immunogénicité et de l'efficacité des nouvelles thérapeutiques dans le traitement de l'hémophilie. *Hémophilie* 200:43-45

Anson DS, Choo KH, Rees DJ, Giannelli F, Gould K, Huddleston JA, Brownlee GG (1984) The gene structure of human anti-haemophilic factor IX. *Journal of the European Molecular Biology Organization* 3:1053-1060

Arock M, Pieroni L (1997) L'hémostase. *Biologiste et Praticien* 109:1-74

Astermark J, Berntorp E, White GC, Kroner BI, MIBS Study Group (2001) The Malmo International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development in hemophilia patients. *Haemophilia* 7:267-272

Aurélien L, Géraldine L (2012) Les anticorps anti-FVIII et anti-FIX. *Hémostase* 443:55-62

Auzanneau M (2005) Histoire de l'hémophilie et de ses traitements. *Hémophilie maladie Willebrand* 1-171

Azfar S, Shahul H, Ebrahim, Soucie J, Parker S, Atrash H (2010) Burden of disease resulting from hemophilia in the US. *American Journal of Preventive Medicine* 38:482-488

B

Bae DK, Yoon KH, Kim HS, Song SJ (2005) Total knee arthroplasty in hemophilic arthropathy of the knee. *Journal of Arthroplasty* 20:664-668

Bain BJ (2002) Detecting erroneous blood counts. *Oxford: Blackwell Science* 3:155-175

Baker KE, Parker R (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current opinion in cell biology* 16:293-299

Bauduer F (2005) L'hémophilie et l'histoire du judaïsme au travers de la circoncision. Histoire de l'hémophilie.... L'hémophilie dans l'Histoire. *Puteaux : Bayer HealthCare Biological Products* 15-17

Belhani M (2009) Epidémiologie de l'hémophilie en Algérie. *Revue Algérienne d'Hématologie* 1:32-35

Belvini D, Salviato R, Radossi P, Pierobon F, Mori P, Castaldo G, Tagariello G; AICE HB Study Group (2005) Molecular genotyping of the Italian cohort of patients with hemophilia B. *Haematologica* 90:635-642

Bottema CD, Ketterling RP, Vielhaber E, Yoon HS, Gostout B, Jacobson DP, Shapiro A, Sommer SS (1993) The pattern of spontaneous germ-line mutation: relative rates of mutation at or near CpG dinucleotides in the factor IX gene. *Human Genetics* 91:496-503

Bowen DJ (2002) Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights. *Molecular pathology*. 55:127-144

Byers PH (2002) Killing the messenger: new insights into nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of clinical investigation* 109:3-6.

C

Capriotti E, Fariselli P, Casadio R (2005) I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic acids research* 33:306-310

Caritoux L (2007) L'hémophilie. *Cahiers de la puéricultrice* 207:13-22

Chambost A, Meunier S (2006) Enjeux d'une prise en charge pédiatrique précoce de l'hémophilie sévère. *Archives de pédiatrie* 13:1423-1430

Chen CW, Lin J, Chu YW (2013) iStable: off-the-shelf predictor integration for predicting protein stability changes. *BMC Bioinformatics*. S2: 1-14

Chen SH, Scott CR, Schoof J, Lovrien EW, Kurachi K (1989) Factor IX Portland: a nonsense mutation (CGA to TGA) resulting in hemophilia B. *American Journal of Human Genetics* 44:567-569

Chen SH, Zhang M, Lovrien EW, Scott CR, Thompson AR (1991) CG dinucleotide transitions in the factor IX gene account for about half of the point mutations in hemophilia B patients: a Seattle series. *Human Genetics* 87:177-182

Cheng J, Randall A, Baldi P (2006) Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins* 62:1125-1132

Cheung WF, Straight DL, Smith KJ, Lin SW, Roberts HR, Stafford DW (1991) The role of the epidermal growth factor-1 and hydrophobic stack domains of human factor IX in binding to endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 266:8797-8800

Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW (1992) The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. *Journal of Biological Chemistry* 267:20529-20531

Choi Y, Chan AP (2015) PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31:2745-2747

Choo KH, Gould KD, Rees DJG, Brownlee GG (1982) Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature* 299:178-180

Cockenpot E, Boutry N, Cotten A (2013) Imagerie musculosquelettique-Pathologies générales. *Hémophilie* 8:259-268

Colvin BT, Astermark J, Fischer K, Gringeri A, Lassila R, Schramm W, Thomas A, Ingerslev J, Inter Disciplinary Working Group (2008) European principles of haemophilia care. *Haemophilia* 14:361-374

Conti E, Izaurralde E (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current opinion in cell biology* 17:316-325

D

De Revel T, Doghmi K (2004) Physiologie de l'hémostase. *EMC-Dentisterie* 1:71-81

DiMichele D (2007) Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention. *British Journal of Haematology* 138:305-315

Di Scipio RG, Kurachi K, Davie EW (1978) Activation of human factor IX (Christmas factor). *Journal of Clinical Investigation* 61:1528-1538

Driscoll MC, Bouhassira E, Aledort LM (1989) A codon 338 nonsense mutation in the factor IX gene in unrelated hemophilia B patients: factor IX338 New York. *Blood* 74:737-742

E

Elmahmoudi H, Khodjet-el-khil H, Wigren E, Jlizi A, Zahra K, Pellechia D, Vinciguerra C, Meddeb B, Elggaied ABA, Gouider E (2012) First report of molecular diagnosis of Tunisian hemophiliacs A: Identification of 8 novel causative mutations. *Diagnostic Pathology* 93:1-7

Espinós C, Casaña P, Haya S, Cid AR, Aznar JA (2003) Molecular analyses in hemophilia B families: identification of six new mutations in the factor IX gene. *Haematologica* 88:235-236

F

Fariselli P, Martelli PL, Savojardo C, Casadio R (2015) INPS: predicting the impact of non-synonymous variations on protein stability from sequence. *Bioinformatics* 31:2816-2821

Fay PJ, Koshibu K (1998) The A2 subunit of factor VIIIa modulates the active site of factor IXa. *Journal of Biological Chemistry* 273:19049-19054

Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS (1990) Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* 75:1999-2004

Freedman SJ, Blostein MD, Baleja JD, Jacobs M, Furie BC, Furie B (1996) Identification of the phospholipid binding site in the vitamin K-dependent blood coagulation protein factor IX. *Journal of Biological Chemistry* 271:16227-16236

Fressinaud E, Meyer D (2001) Maladie de Willebrand. *Hématologie* 1-13

Friedman KD, Rodgers GM (2004) Inherited coagulation disorders. *In Wintrob's Clinical of Hematology* 1619-1667

Furie B, Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. *The New England journal of medicine* 359: 938-949

G

Gailani D (2000) Activation of factor IX by factor XIa. *Trends in cardiovascular medicine* 10:198-204

Ghandil P, Farhud DD, Zeinali S, Ghadiri A (2003) Diagnosis of Hemophilia B Carriers, Using Taq I and Xmn I Polymorphisms of the Factor IX Gene in Iranian Individuals. *Iranian Journal of Public Health* 32:1-6

Ghanem N, Costes B, Martin J, Vidaud M, Rothschild C, Foyer-Gazengel C, Goossens M (1993) Twenty-four novel hemophilia B mutations revealed by rapid scanning of the whole factor IX gene in a French population sample. *European Journal of Human Genetics* 1:144-155

Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EY, Eaton DH, Vehar GA, Capon DJ, Lawn RM (1984) Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312:326-330

Golino P (2006) The inhibitors of the tissue factor: factor VII pathway. *Thrombosis Research* 106:257-265

Goodeve AC (2015) Hemophilia B: molecular pathogenesis and mutation analysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13:1184-1195

Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, PedNet and RODIN Study Group (2013) Factor VIII products and inhibitor development in severe hemophilia A. *The New England Journal of Medicine* 368:231-239

Guelfi JF, Diquelou A (1994) L'exploration biologique de l'hémostase chez le chien. *Point Veterinary* 26:755-759

Guérois C (2009) L'hémophilie aujourd'hui. *Kinésithérapie Revue* 9:32-36

H

Hanka V, Tim AB, Remko KK, Maarten LH, Gert V (2010) Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 11:1-10

Hay CR (2006) The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia* 12:23-29

Hay CR, Ludlam CA, Colvin BT, Hill FG, Preston FE, Wasseem N, Bagnall R, Peake IR, Berntorp E, Mauser Bunschoten EP, Fijnvandraat K, Kasper CK, White G, Santagostino E (1998) Factor VIII inhibitors in mild and moderate-severity haemophilia A. UK Haemophilia Centre Directors Organisation. *Thrombosis and Haemostasis* 79:762-766

Hermans C, Dessomme B, Lambert C, Deneys V (2006) Venous malformations and coagulopathy. *Annales de chirurgie Plastique Esthétique* 51:388-393

Huang LT, Gromiha MM, Ho SY (2007) iPTREE-STAB: interpretable decision tree based method for predicting protein stability changes upon mutations. *Bioinformatics* 23:1292-1293

I

Ingerslev J, Schwartz M, Lamm LU, Kruse TA, Bukh A, Stenbjerg S (1989) Female haemophilia A in a family with seeming extreme bidirectional lyonization tendency: abnormal premature X-chromosome inactivation?. *Clinical Genetics* 35:41-48

Iorio A, Halimeh S, Holzhauer S, Goldenberg N, Marchesini E, Marcucci M, Young G, Bidlingmaier C, Brandao LR, Ettingshausen CE, Gringeri A, Kenet G, Knöfler R, Kreuz W, Kurnik K, Manner D, Santagostino E, Mannucci PM, Nowak-Göttl U (2010) Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-

derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8:1256-1265

J

Jayandharan GR, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M, Srivastava A (2005) Molecular characterization of factor IX gene mutations in 53 patients with haemophilia B in India. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 94:883-886

Johnsen JM, Fletcher SN, Huston H, Roberge S, Martin BK, Kircher M, Josephson NC, Shendure J, Ruuska S, Koerper MA, Morales J, Pierce GF, Aschman DJ, Konkle BA (2017) Novel approach to genetic analysis and results in 3000 hemophilia patients enrolled in the My Life, Our Future initiative. *Blood Advances* 1:824-834

Jover-Cerveró A, Poveda RR., Bagan J, Jimenez SY (2007) Dental treatment of patients with coagulation factor alterations: An update. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal* 12:380-387

K

Kao CY, Lin CN, Yang YL, Hamaguchi N, Yang SJ, Shen MC, Kao JT, Lin SW (2011) Characterisation of factor IX with a glycine-to-valine missense mutation at residue 190 in a patient with severe haemophilia B. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 105:616-626

Kasper CK, Lin JC (2007) Prevalence of sporadic and familial haemophilia. *Haemophilia* 13:90-92

Kazatchkine MD, Sultan Y, Burton-Kee EJ, Mowbray JF (1980) Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A. *Clinical and Experimental Immunology* 39:315-320

Kessler C, Oldenburg J, Escuriola Ettingshausen C, Tiede A, Khair K, Egrier CN, Klamroth R (2015) Spotlight on the human factor: building a foundation for the future of haemophiliaA management .Report from a symposium on human recombinant FVIII at the World Federation of Hemophilia World Congress, Melbourne, Australia. *Haemophilia* 21:1-12

Ketterling RP, Liu JZ, Liao D, Kasper CK, Ambriz R, Paredes R, Sommer SS (1995) Two novel factor IX promoter mutations: incremental progress towards saturation in vivo mutagenesis of a human promoter region. *Human Molecular Genetics* 4:769-770

Khajavi M, Inoue K, Lupski JR (2006) Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European Journal of Human Genetics* 14:1074-1081

Koeberl DD, Bottema CD, Sarkar G, Ketterling RP, Chen SH, Sommer SS (1990) Recurrent nonsense mutations at arginine residues cause severe hemophilia B in unrelated hemophiliacs. *Human Genetics* 84:387-390

Kolkman JA, Lenting PJ, Mertens K (1999) Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation factor IX are factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. *Biochemical Journal* 339:217-221

L

Lacroix-Desmazes S, Moreau A, Sooryanarayana, Bonnemain C, Stieltjes N, Pashov A, Sultan Y, Hoebeke J, Kazatchkine MD, Kaveri SV (1999) Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nature Medicine* 5:1044-1047

Langar H, Triki H, Gouider E, Bahri O, Djebbi A, Sadraoui A, Hafsia A, Hafsia R (2005) Infections par des virus transmissibles par le sang chez des hémophiles en Tunisie. *Transfusion Clinique et Biologique* 12:301-305

Lannoy N, Lambert C, Farrugia A, Van Damme A, Hermans C (2017) Usual and unusual mutations in a cohort of Belgian patients with hemophilia B. *Thrombosis Research* 149:25-28

Lapan KA, Fay PJ (1997) Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *The Journal of biological chemistry* 272:2082-2088

Larrieu MJ, Weilland C (1957) Utilisation de la «céphaline» dans les tests de la coagulation. *Revue D'Hematologie* 12:199-210

Lee CA (1995) Hepatitis C virus and haemophilia: the natural history of HCV in haemophilic patients. *Haemophilia* 1:8-12

Leytus SP, Foster DC, Kurachi K, Davie EW (1986) Gene for human factor X: a blood coagulation factor whose gene organization is essentially identical with that of factor IX and protein C. *Biochemistry* 25:5098-5102

Lillicrap D (1998) The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia* 4:350-357

M

Mackman N, Rachel ET, Nigel SK (2007) Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27:1687-1693

Mannuci PM, Tuddeham EGD (2001) The hemophilias from royal genes to genes therapy. *The New England Journal of Medicine* 344:1773-1779

Masrar A, Benkirane AN (2005) Aspects biologiques et moléculaires de l'hémophilie A. *Maroc Médical* 3:192-196

Mayhew M, Handford P, Brownlee GG (1994) The binding of natural variants of human factor IX to endothelial cells. *FEBS Letters* 341:74-78

- Mehdizadeh M, Kardoost M, Zamani G, Baghaeepour MR, Sadeghian K, Pourhoseingholi MA (2009) Occurrence of haemophilia in Iran. *Haemophilia* 15:348-351
- Meireles MR, Pantoja AG, Ornaghi APM, Vieira GF, Salzano FM, Bandinelli E (2017) Molecular characterization of haemophilia B patients in southern Brazil. *Haemophilia* 23:457-461
- Michaut M, Galaud B, Burdin G, Lebel B, Gahdoun JL, Vielpeau C (2007) Arthroplastie totale de genou chez l'hémophile. Etude des mobilités. A propos de 21 cas = Total knee arthroplasty in haemophilic patient. Study of the motion in 21 cases. *Annales orthopédiques de l'Ouest* 39:123-126
- Miller CH, Benson J, Ellingsen D, Driggers J, Payne A, Kelly FM, Soucie JM, Craig Hooper W (2012) F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia* 18:375-382
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16:12-15.
- Moerloose P, Reber G, Pugin J (2002) Activation et inhibition de la coagulation : que se passe-t-il en cas de coagulopathie intravasculaire disséminée ?. *Réanimation* 11:584-590
- Monroe DM, Hoffman M (2006) What does it take to make the perfect clot?. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26:41-48
- Morales F, Couto CG, Iazbik MC (2007) Effects of 2 concentrations of sodium citrate on coagulation test results, von Willebrand factor concentration, and platelet function in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:472-475
- Morteza K, Sirous Z, Nafiseh N, Edward GD, Tuddenham, Manijeh L, Reza S (2007) Identification of factor IX mutations in Iranian haemophilia B patients by SSCP and sequencing. *Thrombosis Research* 120:135-139
- Morteza K, Sirous Z, Edward G, Tuddenham, Nafiseh N, Manijeh L, Peter G (2009) Molecular Characterization of the Factor IX Gene in 28 Iranian Hemophilia B Patients. *International Journal of Bifurcation and Chaos* 1: 43-47
- Mosesson MW (1992) The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Seminars in hematology* 29:177-188
- Mukherjee S, Mukhopadhyay A, Chaudhuri K, Ray K (2003) Analysis of haemophilia B database and strategies for identification of common point mutations in the factor IX gene. *Haemophilia* 9:187-192
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335-350

N

Nazia N, Rashid H, Khalid M, Gulzar N (2008) Molecular Basis of Hemophilia B in Pakistan: Identification of Two Novel Mutations. *World Journal of Medical Sciences* 3:50-53

Neels JG, van Den Berg BM, Mertens K, ter Maat H, Pannekoek H, van Zonneveld AJ, Lenting PJ (2000) Activation of factor IX zymogen results in exposure of a binding site for low-density lipoprotein receptor-related protein. *Blood*. 96:3459-3465

Négrier P (2000) Les bases thérapeutiques actuelles de l'hémophilie. *Transfusion Clinique et Biologique* 7:257-258

P

Pei-Chin L, Yi-Ning S, Yu-Mei L, Tai-Tsung C, Shih-Pien T, Hsiu-Lan S, Shyh-Shin C (2014) Efficient detection of factor IX mutations by denaturing high-performance liquid chromatography in Taiwanese hemophilia B patients, and the identification of two novel mutations. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 30:187-193

Perez-Gomez F, Bover R (2007) [The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage]. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Revista Española de Cardiología* 60:1217-1219

Pinotti M, Caruso P, Canella A, Campioni M, Tagariello G, Castaman G, Giacomelli S, Belvini D, Bernardi F (2012) Ribosome Readthrough Accounts for Secreted Full-Length Factor IX in Hemophilia B Patients with Nonsense Mutations. *Human Mutation* 33:1373-1376

Poon MC, Anand S, Fraser BM, Hoar DI, Sinclair GD (1993) Hemophilia B carrier determination based on family-specific mutation detection by DNA single-strand conformation analysis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 122:55-63

Pratt KP, Shen BW, Takeshima K, Davie EW, Fujikawa K, Stoddard BL (1999) Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* 402:439-442

Q

Quick AJ (1935) The prothrombin in hemophilia and in obstructive jaundice. *Journal of Biological Chemistry* 109:73-74

R

Radic CP, Rossetti LC, Abelleiro MM, Candela M, Pérez Bianco R, de Tezanos Pinto M, Larripa IB, Goodeve A, De Brasi C (2013) Assessment of the F9 genotype-specific FIX inhibitor risks and characterisation of 10 novel severe F9 defects in the first molecular series of Argentinian patients with haemophilia B. *Thrombosis and Haemostasis*. 109:24-33

Rallapalli PM, Kemball-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ (2013) An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11:1329-1340

Rawala-Sheikh R, Ahmad SS, Monroe DM, Roberts HR, Walsh PN (1992) Role of gamma-carboxyglutamic acid residues in the binding of factor IXa to platelets and in factor-X activation. *Blood* 79:398-405

Reynaud J (2000) Le diagnostic de l'hémophilie. Des questions de biologie, de génétique et de psychologie. *Hémophilie maladie Willebrand* 156:6-7

Rickard KA (2000) The international hemophilia training Center of the world federation of hemophilia: a 30-years review. *Haemophilia* 6:471-473

Riera C, Padilla N, Cruz X (2016) The Complementarity Between Protein-Specific and General Pathogenicity Predictors for Amino Acid Substitutions. *Human Mutation* 37:1013-1024

Rohlena J, Kolkman JA, Boertjes RC, Mertens K, Lenting PJ (2003) Residues Phe342-Asn346 of activated coagulation factor IX contribute to the interaction with low density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry* 278:9394-9401

S

Saiki RK (1989) The design and optimization of the PCR. In Erlich HA, editor. PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. *New York: Stockton Press* 7-16.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor. New York.

Schved JF (2007) Physiologie de l'hémostase. *Hématologie* 1-6

Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, Yoshioka A, Shima M (2009) The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *The Journal of biological chemistry* 284:3379-3388

Somma M, Querci M (2005) Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés. Module 5 : Électrophorèse sur gel d'agarose. *European commission*. 1-12.

Soulier JP, Larrieu MJ (1953) Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophile; dosage des facteurs antihémophiliques A et B. *Sang*. 24:205-215

Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, Ludlam CA, Mahlangu JN, Mulder K, Poon MC, Street A (2013) Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*. 9:1-47

Sunyaev S, Ramensky V, Bork P (2000) Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends in genetics* 16:198-200

Surin VL, Demidova EY, Selivanova DS, Luchinina YA, Salomashkina VV, Pshenichnikova OS, Likhacheva EA (2016) Mutational Analysis of Hemophilia B in Russia: Molecular_Genetic Study. *Russian Journal of Genetics* 52:466-473

T

Tailhefer H (2013) Hémophilie B : Actualités et perspectives thérapeutiques. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon 1. 1-199.

Takeyama M, Wakabayashi H, Fay PJ (2012) Factor VIII light chain contains a binding site for factor X that contributes to the catalytic efficiency of factor Xase. *Biochemistry* 51: 820-828

Tavtigian SV, Byrnes GB, Goldgar DE, Thomas A (2008) Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic-and molecular-epidemiology applications. *Human mutation* 29:1342-1354

Tedder RS, Briggs M, Ring C, Tuke PW, Jones P, Savidge GF, Rodgers B, Garson JA (1991) Hepatitis C antibody profile and viraemia prevalence in adults with severe haemophilia. *British Journal of Haematology* 79:512-515

Tengguo L, Miller CH, Jennifer D, Payne AB, Dorothy E, Hooper EW (2014) Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *American Journal of Hematology* 89:375-379

Thompson AR (1986) Structure, function, and molecular defects of factor IX. *Blood* 67:565-572

Thorland EC, Drost JB, Lusher JM, Warriar I, Shapiro A, Koerper MA, Dimichele D, Westman J, Key NS, Sommer SS (1999) Anaphylactic response to factor IX replacement therapy in haemophilia B patients: complete gene deletions confer the highest risk. *Haemophilia* 5:101-105

Tlamçani Z, Biougnach H, Elaj M, Elmouali A, Kabbaj L, Marzak N, Nouredine R, Ouahmane H, Seddik R, Zeghli H, Elkhorassani M, Kili A, Benkirane S, Masrar A (2009) Diagnostic biologique de l'hémophilie. *Maroc Médical* 31:250-253

Turpie AG, Esmon C (2011) Venous and arterial thrombosis--pathogenesis and the rationale for anticoagulation. *Thrombosis and haemostasis* 105:586-596

W

Warrier I, Lusher JM (1998) Development of anaphylactic shock in haemophilia B patients with inhibitors. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* S9:125-128

Weinmann AF, Murphy ME, Thompson AR (1998) Consequences of factor IX mutations in 26 families with haemophilia B. *British Journal of Haematology* 100:58-61

Wen J, Brogna S (2008) Nonsense-mediated mRNA decay. *Biochemical Society transactions* 36:514-516

White GC, Marder VJ, Colman RW, Hirsh J, Salzman EW (1994) Approach to the bleeding patient. *Hemostasis and Thrombosis* 1134-1147

White GC, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J, Factor VIII and Factor IX Subcommittee (2001) Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thrombosis and Haemostasis* 85:560

Wilkinson FH, Ahmad SS, Walsh PN (2002) The factor IXa second epidermal growth factor (EGF2) domain mediates platelet binding and assembly of the factor X activating complex. *Journal of Biological Chemistry* 277:5734-5741

Wolberg Alisa S (2007) Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews* 21:131-142

Wollina K, Bowen DJ, Syrbe G, Zintl F (1993) Female twins with severe Christmas disease (hemophilia B). *Thrombosis and Haemostasis* 70:774-776

Y

Yee TT, Griffioen A, Sabin CA, Dusheiko G, Lee CA (2000) The natural history of HCV in a cohort of haemophilic patients infected between 1961 and 1985. *Gut* 47:845-851

Yoshitake S, Schach BG, Foster DC, Davie EW, Kurachi K (1985) Nucleotide sequence of the gene for human factor IX (antihemophilic factor B). *Biochemistry* 24:3736-3750

Youssoufian H, Antonarakis SE, Bell W, Griffin AM, Kazazian HH (1988) Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides. *American Journal of Human Genetics* 42:718-725

Yu T, Dai J, Liu H, Ding Q, Lu Y, Wang H, Wang X, Fu Q (2012) Spectrum of F9 mutations in Chinese haemophilia B patients: identification of 20 novel mutations. *Pathology* 44:342-347

Annexes

ANNEXE 1

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ POUR ÉTUDE GÉNÉTIQUE

Service: Hématologie, CHU de BATNA,
Algérie

Téléphone :

Fax :

Laboratoire de biotechnologie des
molécules bioactives et de la
physiopathologie cellulaire, université de
Batna 2, Algérie

Identification du patient

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Sexe :

Adresse :

Identité du titulaire de l'autorité parentale si mineur

Nom:

Prénom :

Je soussigné(e), sus nommé(e), reconnais avoir été informé(e) par le sur les examens des caractéristiques génétiques qui seront réalisés, dans un but diagnostique et/ou de recherche, à partir :

Du prélèvement qui m'a été effectué

Du prélèvement qui a été effectué sur mon enfant mineur

Pour la recherche des mutations de l'hémophilie B chez une partie de la population Algérienne.

Je donne mon consentement pour ce prélèvement.

J'ai compris que cette étude peut entrer dans le cadre d'une étude familiale.

J'accepte que sur ce prélèvement puissent être fait d'autres tests, ultérieurement et en fonction du progrès des connaissances sur les causes génétiques de ma maladie familiale ou de ma susceptibilité vis-à-vis de mon traitement médicamenteux.

J'autorise le recueil, la saisie et le traitement informatique des données médicales nécessaires à cet examen.

Fait àle Signature du patient.....

Je certifie avoir informé le (ou la) patient(e) sus nommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée ou sur les facteurs génétiques de susceptibilité au(x) médicament(s) étudié(s), les moyens de la détecter, du degré de fiabilité des analyses, des possibilités de prévention et de traitement, des modalités de transmission génétique de la maladie recherchée et de leurs possibles conséquences chez d'autres membres de sa famille.

Signature et cachet du médecin prescripteur

ANNEXE 2

Fiche de renseignements

Diagnostic biologique et moléculaire de l'hémophilie B

Identification du patient

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Adresse (ville) :

Prélèvement

Nature du prélèvement : sang sur EDTA

Date du prélèvement :

Lieu du prélèvement : Service d'hématologie CHU de BATNA

Renseignements cliniques

Cas

Sporadique

Familial

ACC

Age au diagnostic

Circonstances du diagnostic

Taux du FIX

Signature du médecin

ANNEXE 3

Tableau résumant les codes et les masses moléculaires des aa

(<http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/1a.html>)

Acide aminé	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre	Poids (en g/mol)
alanine	Ala	A	89,1
arginine	Arg	R	174,2
asparagine	Asn	N	132,1
aspartate	Asp	D	133,1
cystéine	Cys	C	121,2
glutamate	Glu	E	147,1
glutamine	Gln	Q	146,2
glycine	Gly	G	75,1
histidine	His	H	155,2
isoleucine	Ile	I	131,2
leucine	Leu	L	131,2
lysine	Lys	K	146,2
méthionine	Met	M	149,2
phénylalanine	Phe	F	165,2
proline	Pro	P	115,1
sérine	Ser	S	105,1
thréonine	Thr	T	119,1
tryptophane	Trp	W	204,2
tyrosine	Tyr	Y	181,2
valine	Val	V	117,1

ANNEXE 4

Tableau résumant les caractères hydrophobes des aa

(<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/learning-center/amino-acid-reference-chart.html>).

At pH 2 ^a		At pH 7 ^a	
Very Hydrophobic			
Leu	100	Phe	100
Ile	100	Ile	99
Phe	92	Trp	97
Trp	84	Leu	97
Val	79	Val	76
Met	74	Met	74
Hydrophobic			
Cys	52	Tyr	63
Tyr	49	Cys	49
Ala	47	Ala	41
Neutral			
Thr	13	Thr	13
Glu	8	His	8
Gly	0	Gly	0
Ser	-7	Ser	-5
Gln	-18	Gln	-10
Asp	-18		
Hydrophilic			
Arg	-26	Arg	-14
Lys	-37	Lys	-23
Asn	-41	Asn	-28
His	-42	Glu	-31
Pro	-46	Pro	-46 (used pH 2)
		Asp	-55

Résumé

L'hémophilie B est une forme d'hémophilie caractérisée par un déficit en FIX entraînant des hémorragies spontanées ou prolongées. Il s'agit d'une pathologie héréditaire récessive liée à l'X qui touche presque exclusivement les hommes. Selon la nature de la mutation génétique qui est l'origine de la maladie, le facteur de coagulation affecté peut être totalement absent de l'organisme du patient, ou présent mais sous une forme dysfonctionnelle. Différents degrés de sévérité de l'hémophilie ont été établis : mineure, modérée, sévère, sur la base du taux d'activité biologique plasmatique de facteur anti-hémophilique (FAH). Généralement, ce taux de FAH circulant est corrélé aux manifestations cliniques observées.

Cette thèse représente une contribution à l'étude biologique et moléculaire de l'hémophilie B dans la population Algérienne. Nous avons eu comme premier objectif de mettre en évidence les caractéristiques biologiques de cette maladie dans un échantillon constitué de 39 patients appartenant à 13 familles par un diagnostic biologique basé d'une part sur l'analyse des caractères généraux tels que sexe, âge, âge au diagnostic, circonstances de découverte et degré de sévérité et d'autre part sur des tests d'exploration de l'hémostase. Pour ces derniers tests, seulement 29 patients parmi 39 hémophiliques B ont été inclus. Les résultats obtenus ont montré : un déficit en FIX, allongement du TCA, avec un taux plaquettaire, un TP et un taux de FVIII normaux. Cette maladie est moins fréquente que l'hémophilie A, dont la forme sévère est la forme la plus fréquente pour les deux types d'hémophilie.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à caractériser les anomalies moléculaires du gène F9 responsables l'hémophilie B dans un échantillon constitué de 39 patients appartenant à 13 familles par l'utilisation du séquençage basé sur l'électrophorèse capillaire. L'analyse moléculaire du gène F9 a permis l'identification des anomalies moléculaires responsables de l'hémophilie B chez 11 familles. Ces mutations sont de quatre types : trois mutations non-sens (c.357T>A, c.892C>T, c.1150C>T), cinq mutations faux-sens (c.323G>A, c.373G>A, c.881G>A, c.1010C>T, c.1184T>C), une mutation au niveau du promoteur (c.-52C>T), et une duplication (c.657_660dupATCA). A l'exception de la mutation c.881G>A qui a été identifiée chez deux familles non apparentées, les autres mutations sont spécifiques à chaque famille. Deux nouvelles mutations (c.1184T>C, c.657_660dupATCA) ont été rapportées dans cette étude. Ces deux mutations n'ont jamais été décrites dans d'autres populations ; elles sont spécifiques à la population Algérienne. Aucune association n'a été identifiée entre le type de mutation du gène F9 et la survenue de complications dans cet échantillon.

Dans le troisième volet de cette thèse, nous avons eu comme objectif de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du déficit de la protéine FIX. Les effets délétères de la nouvelle mutation c.1184T>C identifiée dans la première partie de cette étude ont été prédits en utilisant une combinaison de logiciels d'étude *in silico*. Cette mutation a été prédite comme délétère au niveau de la structure ainsi que la fonction du FIX. Les différences de propriétés physico-chimiques entre les deux acides aminés sont responsables de la perte des interactions moléculaires au sein de la protéine FIX. La nouvelle duplication c.657_660dupATCA n'a pas été étudiée dans cette partie, son impact est évident.

Les résultats de cette thèse pourront contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de l'hémophilie B. Après cette étude, on pourra contribuer à établir un véritable conseil génétique pour les familles à risque.

Mots clés : Hémophilie B, F9, FIX, diagnostic biologique, diagnostic moléculaire, mutation, étude *in silico*.

Abstract

Hemophilia B is a form of hemophilia characterized by FIX deficiency leading to spontaneous or prolonged hemorrhages. It is an inherited X-linked recessive disorder that affects men almost exclusively. Depending on the nature of the genetic mutation that is causing the disease, the affected clotting factor may be totally absent from the patient's body, or present but in a dysfunctional form. Different degrees of severity of haemophilia have been established: minor, moderate, severe, based on the level of plasma antihemophilic factor (AHF) activity. Generally, this rate of circulating AHF is correlated with the clinical manifestations observed.

This thesis represents a contribution to the biological and molecular study of hemophilia B in the Algerian population. Our first objective was to highlight the biological characteristics of this disease in a sample consisting of 39 patients belonging to 13 families by a biological diagnosis based on the one hand on the analysis of general characteristics such as sex, age, age diagnosis, circumstances of discovery and degree of severity and secondly on tests for exploration of hemostasis. For these last tests, only 29 out of 39 hemophilic B patients were included. The results obtained showed: Low FIX activity, a prolonged aPTT, normal platelet rate, normal prothrombin level, and normal FVIII activity. This disease is less common than hemophilia A, the severe form of which is the most common form for both types of hemophilia.

In the second part of this study, we focused on characterizing the molecular abnormalities of the F9 gene responsible for hemophilia B in a sample of 39 patients from 13 families using sequencing based on capillary electrophoresis. Molecular analysis of the F9 gene allowed identification of the molecular abnormalities responsible for hemophilia B in 11 families. These mutations are of four types: three nonsense mutations (c.357T>A, c.892C>T, c.1150C>T), five missense mutations (c.323G>A, c.373G>A, c.881G>A, c.1010C>T, c.1184T>C), one mutation at the promoter (c-52C>T), and one duplication (c.657_660dupATCA). With the exception of the mutation c.881G>A that has been identified in two unrelated families, the others mutations are specific to each family. Two new mutations (c.1184T>C, c.657_660dupATCA) were reported in this study. These two mutations have never been described in other populations; they are specific to the Algerian population. No association was identified between the type of F9 gene mutation and the occurrence of complications in this sample.

In the third part of this thesis, we aimed to contribute to the understanding of the molecular mechanisms at the origin of FIX protein deficiency. The deleterious effects of the new c.1184T> C mutation identified in the first part of this study were predicted using a combination of in silico software. This mutation has been predicted to be deleterious at the level of the structure as well as the function of the FIX. The differences in physico-chemical properties between the two amino acids are responsible for the loss of molecular interactions within the FIX protein. The new duplication c.657_660dupATCA has not been studied in this part, its impact is obvious.

The results of this thesis may contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlying hemophilia B. After this study, we will be able to help establish a real genetic counseling for families at risk.

Key words: Hemophilia B, F9, FIX, biological diagnosis, molecular diagnosis, mutation, in silico study.

ملخص

الهيموفيليا ب هي نوع من أنواع الهيموفيليا، تتميز بنقص في عامل التخثر التاسع مما يؤدي الى نزيف تلقائي أو لفترات طويلة. هو مرض وراثي متنحي مرتبط بالكروموزوم X و الذي يصيب الرجال في أغلب الحالات. اعتمادا على طبيعة الطفرة الوراثية التي هي أصل المرض، يمكن لعامل التخثر المتأثر أن يكون غائبا تماما عن جسم المريض، أو حاضرا ولكن مختل وظيفيا. تم إنشاء درجات مختلفة من حدة الهيموفيليا: ثانوية، معتدلة، حادة، استنادا إلى نسبة النشاط البيولوجي البلازمي لعامل التخثر. عموما، هذه النسبة مرتبطة بالمظاهر الكلينيكية الملاحظة.

ان هذه الأطروحة هي عبارة عن مساهمة في دراسة بيولوجية و وراثية جزيئية لمرض الهيموفيليا ب في الجزائر. يتمثل أول هدف لهذه الأطروحة في معرفة الخصائص البيولوجية لهذا المرض في عينة تتكون من 39 مريض ينتمون ل 13 أسرة عن طريق تشخيص بيولوجي قائم من جهة على تحليل الخصائص العامة مثل الجنس والعمر والعمر عند التشخيص وظروف الاكتشاف ودرجة الشدة ومن جهة أخرى على اختبارات فحص تخثر الدم. لهذه الاختبارات الأخيرة، تم تضمين فقط 29 مريضا من بين 39 مصاب بالهيموفيليا ب. النتائج المتحصل عليها بينت: نقص في العامل التاسع، زيادة نسبة السيفالين+المنشط مع نسبة عادية للصفائح الدموية و للبروترومبين و كذا لعامل التخثر الثامن. هذا المرض أقل شيوعا من الهيموفيليا أ، والحالة الحادة هي الأكثر نسبة بالنسبة لكلا نوعي الهيموفيليا.

في الجزء الثاني لهذه الدراسة، انصب اهتمامنا على توصيف التشوهات الجزيئية في الجين F9 المسؤولة عن الهيموفيليا ب في عينة تتكون من 39 مريض ينتمون ل 13 أسرة عن طريق استخدام السيكنساج. لقد سمح التحليل الجزيئي بتحديد التشوهات الجزيئية المسؤولة عن الهيموفيليا ب في 11 أسرة. تتكون هذه الطفرات من أربعة أنواع: ثلاثة طفرة هوائية (c.357T>A, c.892C>T, c.1150C>T)، خمسة طفرات مغلطة (c.323G>A, c.373G>A c.881G>A, c.1010C>T, c.1184T>C)، طفرة على مستوى المروج (C-52C>T)، وطفرة ازدواجية (c.657_660dupATCA). باستثناء الطفرة c.881G>A المحددة عند عائلتين، فالطفرات الأخرى هي محددة لكل أسرة. في هذه الدراسة فقد تم اكتشاف طفرتين جديدتين (c.657_660dupATCA (c.1184T>C) لم يسبق وصفهما في الشعوب الأخرى و بالتالي فهما تخصان الشعب الجزائري. لم يتم تحديد أي ارتباط بين نوع طفرة الجين F9 و حدوث مضاعفات في هذه العينة.

في الجزء الثالث من هذا البحث سعينا لفهم الآليات الجزيئية التي تسبب العجز في البروتين FIX. تم التنبؤ بالآثار الضارة للطفرة الجديدة c.1184T>C المحددة في الجزء الأول من هذه الدراسة باستخدام مزيج من البرمجيات للدراسة في السيليكون. أظهرت هذه الطفرة آثار سلبية على بنية و وظيفة البروتين FIX بحيث الاختلافات في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للحمضين الامينيين تؤدي الى فقدان روابط جزيئية على مستوى البروتين FIX. لم تدرس الطفرة الازدواجية في هذا الجزء لأن آثارها واضحة. النتائج المتحصل عليها في هذا البحث تساهم في فهم أفضل الآليات الجزيئية الأصلية للهيموفيليا ب. بعد هذه الدراسة، يمكننا أن نساعد على تقديم الاستشارة الوراثية للأسر المعرضة للخطر.

الكلمات المفتاحية: الهيموفيليا ب، مورثة عامل التخثر التاسع، عامل التخثر التاسع، التشخيص البيولوجي، التشخيص الجزيئي، طفرة.