

REVUE TUNISIENNE DE BIOLOGIE CLINIQUE

المجلة التونسية للبيولوجيا السريرية

ORGANE DE LA SOCIÉTÉ TUNISIENNE
DE BIOLOGIE CLINIQUE

Comité de Direction :

A. Hedhili
F. Ben Hassine
C. Mazigh
S. Hmida
A. Trabelsi

Comité de Rédaction :

Rédacteur en chef :
MC. Ben Rayana
Attachés à la rédaction :
S. Besbes
L. SlimSaidi
N. Ben Romdhane
A. ElKadhi
N. Nabli

Comité de lecture :

A. Amor, A. Ayadi, H. Babba,
R. Barbouch, F. Barguelli,
E. Belhassen, S. Ben Ammar,
M.A. Ben Amor, K. Ben Romdhane,
Y. Brahem, E. Chaker, W. Douki,
M. Elloumi, M. Feki, S. Feki,
C. Fendri, N. Fnina, I. Ghedira,
Y. Gorgi, N. Gritli, M. Hassine,
S. Hmida, M. Jeddi, N. Kaabachi,
M. Kortas, C. Mazigh, T. Messaoud,
R. Mrad, M.F. Najjar, B. Nsiri,
A. Slim, L. Slim, Z. Tabka,
A. Trabelsi

Consultants étrangers :

V. Blatton (Belgique),
L. Chabraoui (Maroc), J-L. Dhondt
(France), M. Ferrari (Italie),
J.C. Forrest (Canada), M. Germanos
(Liban), P. Gillery (France),
J. Hickes (USA), A. Legrand
(France), JF. Lesesve (France),
M. Muller (Autriche),
P. Mura (France)

Adresse : RTBC/STBC

BP. N° 320 El Menzah 8
2037 Tunis - Tunisie

Tél : 70 832 242 - Fax : 71 577 526

E-mail : contact@stbc.org.tn

chiheb.rayana@rns.tn

SOMMAIRE

	Pages
• <i>Editorial</i>	3
✓ <i>La grippe en quelques mots</i> Moncef Jeddi	
• <i>Revue générale</i>	6
✓ <i>Epidémie de grippe A/H1N1 v «porcine» en Tunisie : premier bilan</i> A. Slim, M.A. Ben Hadj Kacem, A. El Moussi	
• <i>Articles originaux</i>	12
✓ <i>L'expression de l'Hb Bart's à la naissance serait-elle due à plusieurs facteurs génétiques ?</i> H. Siala, F. Ouali, T. Messaoud, S. Fattoum	
✓ <i>Dosage comparatif des immunoglobulines par deux méthodes d'immunoprécipitation : turbidimétrie et nephelométrie</i> I. Nouri, N. Sammar, H. Ksouri, F. Mellouli, M. Bejaoui, A. Ben Hassen.	
✓ <i>Mise au point d'un test de dépistage de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne par cytométrie en flux : à propos de 9 cas</i> S. Féki, N. Souihi, Z. Ben Rekaya, L. Berraïes, B. Meddeb, M. Mansour, N. Khalfallah, A. Laatiri, H. Omri, M. Medhaffar, T. Souissi, T. Ben Othman, K. Boukef, F. Jenhani.	
✓ <i>Impact de la mutation H63D du gène HFE sur la surcharge en fer chez les β-thalassémiques mineurs</i> H. Ben Jemaa, F. Mellouli, H. Kaabi, M. Chaabane, G. Cherif, H. Enneifer, S. Ben Tahar, A. Dridi, E. Ben Hassine, S. Hmida	
• <i>Pratique quotidienne</i>	45
✓ <i>Association of constitutional thrombophilic risk factors in aseptic osteonecrosis of femoral heads and thromboembolic disease : case report</i> R. Znazen, S. Guerhazi, C. Kooli, S. Azzebi, L. Ben Hassine, N. Khalfallah, M. Karoui	
• <i>Informations scientifiques</i>	50
• <i>Activités de la STBC et informations professionnelles</i>	52

Les Bandelettes Siemens : Multistix, Labstix...

C'est l'assurance de la qualité de l'analyse urinaire

Disponible chez Biomaghreb, le distributeur de Siemens Healthcare Diagnostics en Tunisie



Biomaghreb : 24, Av. Ibn Khaldoun - Ariana 2080 - TUNISIE

Tél.: (216) 71 821 052 / 71 821 053 - Fax : (216) 71 821 253 - GSM : 25 25 95 00

Site web : www.biomaghreb.com

MONCEF JEDDI

"La grippe en quelques mots"

La grippe ou influenza est une maladie causée par l'un des virus grippaux. Elle est généralement saisonnière frappant habituellement à la fin de l'automne et en hiver. En général, elle présente une grande contagiosité et une faible mortalité ; mais en raison du grand nombre de personnes atteintes, elle provoque, chaque année 250.000 à 500.000 décès. En dehors de l'homme la grippe atteint différentes espèces de mammifères (chevaux, ânes, porcs) et une multitude d'oiseaux, sauvages migrateurs ou domestiques. En fait, les oiseaux sauvages constituent un véritable réservoir de virus de la grippe et jouent un rôle très important dans l'épidémiologie de la grippe humaine.

Les virus de la grippe appartiennent à la famille des *orthomyxoviridae*, ce sont des virus enveloppés à ARN simple brin. Leur génome est segmenté. Il existe trois types de virus qui sont répartis en trois genres: Influenzavirus A, B et C. Les génomes des virus A et B sont constitués de huit segments tandis que le virus C, lui, n'en comporte que sept. De forme généralement sphérique, parfois filamenteuse, ils mesurent 80 à 120 nm de diamètre. Ils sont enveloppés, ce qui les rend sensibles aux détergents et aux solvants des lipides, l'enveloppe est hérissée de deux sortes de spicules : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). L'hémagglutinine est une glycoprotéine qui assure la fixation du virus sur la cellule. Elle est responsable de la virulence et constitue la cible majeure des anticorps neutralisants. La neuraminidase détache les particules néoformées des cellules dans lesquelles le virus s'est répliqué. Elle joue ainsi un rôle important dans la diffusion du virus et constitue aussi la cible des principaux antiviraux utilisés dans le traitement spécifique de la grippe.

L'épidémiologie de la grippe est dominée par l'importante variabilité des virus grippaux. Il y a deux mécanismes principaux distincts. Le premier est constant et s'appelle le glissement antigénique. Le deuxième, appelé cassure antigénique est plus rare et s'est produit tous les 10 à 40 ans. C'est ce dernier mécanisme qui est à l'origine des quatre pandémies observées depuis le début de XX^{ème} siècle : celle de 1918 (grippe espagnole) responsable de 20 à 40 millions de morts voire même 70.000.000 selon les dernières estimations. (Nature, 2009), celles de 1957 et 1968 et enfin celle que nous vivons actuellement depuis Avril 2009.

Le mécanisme le plus important qui est à l'origine de la variabilité génétique des virus grippaux réside dans l'apparition de mutations ponctuelles. Ces mutations peuvent affecter un site antigénique, on parle de glissement antigénique. Elles contribuent à l'échappement à l'immunité humorale antigrippale. A titre d'exemple on a observé qu'entre 1984 et 1995, le taux des mutations au niveau des gènes codant l'hémagglutinine du virus A (H3 N2) responsable de la pandémie qui a débuté en 1968, a atteint 10^{-3} , ce qui est considérable. Ces mutations s'accumulent dans le temps et aboutissent à l'émergence progressive et continue de nouvelles lignées de grippe A chez l'homme par pression de sélection positive. Pour suivre cette évolution la composition du vaccin contre la grippe est revue chaque année.

L'autre mécanisme de variation appelé cassure antigénique, se traduit par le remplacement de l'HA et/ou de la NA par une HA et/ou une NA de type moléculaire différent. Ce mécanisme qui ne se voit que pour le virus grippal de type A est à l'origine de l'apparition de nouveaux sous types. Pour le virus de type A, il existe 16 types d'hémagglutinines et 9 types de neuraminidases. Ainsi les sous-types possibles de ce virus sont donc au nombre de $9 \times 16 = 144$. En fait seul un petit nombre de sous types a été détecté chez l'homme : A (H1N1) A (H2N2) A (H3N3) responsables respectivement des pandémies de 1918, 1957 et 1968. D'autres sous types ont été, ces dernières années, mis au jour dans les maladies humaines A(H5N1) A(H7N7) A(H9N9) sans oublier A (H1N1) 2009.

Il ne faut pas perdre de vue que les virus de type A sont essentiellement des virus aviaires. Les virus aviaires sont certes capables d'infecter directement les êtres humains mais se répliquent souvent peu efficacement chez l'homme et se transmettent difficilement d'homme à homme. C'est actuellement le cas du virus H5N1 responsable la première fois en 1997, suite à un épisode de grippe aviaire, de plusieurs cas de grippe humaine à Hong-kong. Depuis lors ce virus a évolué et des souches différentes furent responsables en 2004 d'épizooties de grippe aviaire au Vietnam et en Thaïlande, puis les épizooties se propagèrent rapidement dans le Sud-est Asiatique et dans différents autres pays. En même temps plusieurs cas humains sont signalés et au 30-12-2009 l'OMS dénombre 467 cas humains de grippe H5 N1 dont 282 décès soit une mortalité de 60,38%. Il faut cependant noter que la quasi-totalité de ces cas résultent d'un contact étroit avec de la volaille malade et d'une exposition à une charge virale élevée. Il n'y a pas eu, pratiquement, de cas de transmission interhumaine et ce virus ne pose pas, pour le moment, de problème de contagiosité.

Ainsi il ne suffit pas à un virus aviaire d'avoir des antigènes (HA et/ou NA) inconnus par les populations humaines, faut-il encore qu'il soit capable de se répliquer chez l'homme et surtout de se transmettre d'homme à homme. Ce sont ces propriétés que possèdent les virus hybrides issus d'un réassortiment entre des virus différents à la suite d'une coinfection d'un mammifère, un porc par exemple, par un virus humain et un virus aviaire. Il peut alors se former une particule virale hybride ; ce phénomène étant favorisé par le fait que le génome du virus grippal est segmenté. Ce virus hybride ou réassortant peut avoir des gènes adaptés à l'homme et des gènes HA et/ou NA de virus aviaire. Ce virus réassortant peut donc se répliquer efficacement chez l'homme et ne pas rencontrer de moyens de défense spécifiques car l'HA et/ou la NA aviaires ne correspondent pas aux anticorps qui préexistent dans les populations humaines. On est alors en présence d'un virus nouveau chez l'homme qui est potentiellement capable de provoquer une pandémie c'est le cas du virus responsable de la grippe pandémique A (H1N1) 2009 dont le génome est constitué de segments provenant de virus humains, aviaires et porcins. Ainsi on parle de pandémie lorsqu'une épidémie de grippe atteint la totalité ou du moins une grande partie du globe terrestre en quelques semaines ou quelques mois. C'est ce que nous vivons actuellement avec l'apparition de la grippe pandémique A (H1N1) 2009 et ce, depuis Avril 2009. Les formes

pandémiques sont généralement liées à une forte mortalité. Pendant les périodes inter-pandémiques, comme celle que nous avons vécue depuis les années 1970 jusqu'en Avril 2009, la grippe sévit sous forme d'épidémies d'ampleur variable et le virus responsable subit pendant toute cette période des glissements antigéniques constants.

Cliniquement tous les intermédiaires, entre l'atteinte très bénigne, voir même inapparente, et la forme maligne qui entraîne le décès en quelques jours, existent. La virulence des virus grippaux résulte d'interactions très complexes, c'est pourquoi il est si difficile de détecter ou d'expliquer la virulence de tel ou tel variant ou souche.

L'évolution de la maladie est généralement favorable en 4 à 6 jours, cependant de très nombreuses complications ont été décrites : bronchite aiguë, pneumonie virale, pneumonie bactérienne de surinfection, complications cardiovasculaires complications neurologiques. Il faut aussi noter que la grossesse prédispose aux complications pulmonaires et cardiovasculaires et que le risque de complications pouvant entraîner le décès est élevé chez les femmes enceintes. Enfin et étant donné que de nombreux agents pathogènes peuvent provoquer des syndromes grippaux, il est important de savoir qu'un syndrome grippal peut être l'expression d'une pathologie d'étiologie virale, due à un autre virus que ceux de la grippe, bactérienne ou même parasitaire. En fait le diagnostic de certitude de l'infection grippale repose sur la mise en évidence du virus ou de ses antigènes et/ou sur le diagnostic sérologique.

Pour le traitement spécifique de l'infection grippale on a pu utiliser l'amantadine et la rimantadine qui agissent lors de la phase précoce de la multiplication virale en bloquant la décapsidation, ce qui aboutit à bloquer la réplication. Ces dernières années deux nouvelles molécules ont été mises sur le marché, il s'agit d'inhibiteurs de la neuraminidase, l'un l'oseltamivir (Tamiflu®) l'autre le zanamavir (Relenza®). La neuraminidase intervient en clivant les résidus d'acide sialique présents au niveau de la cellule hôte où le virus grippal s'est multiplié et à la surface de laquelle les particules virales sont en train de bourgeonner, ce qui a pour effet de libérer les particules virales néoformées. Les antineuraminidases bloquent la libération de ces particules virales ce qui empêche la diffusion du virus. Les inhibiteurs de la neuraminidase sont efficaces à condition d'être administrés très tôt après la contamination. L'oseltamivir est aussi préconisé, dans des conditions bien précises, à titre prophylactique. Il faut noter qu'à ce jour on a isolé quelques souches du virus de la grippe pandémique A (H1N1) 2009 porteurs d'une mutation sur le gène de la neuraminidase, qui leur confère une résistance à l'oseltamivir, mais pas au zanamavir. Même si rien n'indique une circulation généralisée de ces virus résistants, il y a des preuves nettes de transmission interhumaine limitée dans plusieurs situations épidémiologiques.

Il faut savoir enfin que la vaccination constitue l'arme la plus efficace dans la prévention de la grippe.

Epidémie de grippe A/H1N1 v «porcine» en Tunisie : Premier Bilan

A. SLIM,
M.A. BEN HADJ KACEM,
A. EL MOUSSI

Résumé : Nous rapportons les résultats préliminaires (au 14 janvier 2010) de l'épidémie de grippe pandémique A/H1N1 «v» en Tunisie à partir des données de Laboratoire, de la surveillance épidémiologique sur le terrain et des cas cliniques hospitalisés. Cette épidémie s'est caractérisée par 3 phases : Pré-épidémique dédiée à la recherche de cas d'importation aux frontières du pays et ce du 18 mai au 17 septembre 2009 lors de l'apparition du premier foyer groupé scolaire, Epidémique qui a commencé à la 46^{ème} semaine de l'année avec son pic atteint à la 49^{ème} semaine, et post épidémique qui est en cours depuis 3 semaines environ ce qui nous autorise à publier un premier bilan. Le Nombre de cas confirmés est aux alentours de 3.500 personnes, 900 hospitalisations dont 170 en service de réanimation et 24 décès ont été colligés. La surveillance épidémiologique continuera jusqu'à Fin avril ou un 2^{ème} bilan plus exhaustif sera possible.

Mots-clés : Tunisie- A/H1N1 «v»- RT-PCR - Pandémie

Abstract : We report the preliminary results (to date, January 14th 2010) of the epidemic due to the Influenza pandemic strain A/H1N1 "v" based on Lab results, ground epidemiologic data and hospitalized cases. This epidemic showed 3 phases : Pré-epidemic which was the tracking of imported cases at the country borders from may 18th to September 17th when the first grouped case scholar outbreak was found. Epidemic which started on week 46 and topped on Week 49 and post epidemic which is actually in course from about 3 weeks. Confirmed Lab cases are about 3,500, 900 were hospitalized and 170 needed special unit emergency care units. 24 fatal cases were also confirmed. Epidemiologic survey will continue until fall April 2010 where a more exhaustive report will be available.

Key-words : Tunisia - A/H1N1 «v»- RT-PCR - Pandemic

Unité de Virologie
EPS Charles Nicolle Tunis

Introduction

Cet article, non exhaustif, a pour but de tracer un premier bilan de la réponse Tunisienne à l'épidémie de grippe A/H1N1V dite «porcine» qui a envahi le monde depuis fin avril 2009 et touché la Tunisie à la rentrée scolaire 2009.

En effet, la tendance épidémique à la baisse depuis environ 3 semaines, basée sur de multiples indicateurs, nous autorise à publier un premier bilan de ce qui s'est passé en attendant la fin de l'épidémie et le calcul définitif des résultats épidémiologiques qui sera publié par l'Observatoire

National des Maladies Emergentes (ONME) responsable du suivi épidémiologique de cette épidémie.

Aspects Virologiques

Le virus responsable de cette pandémie, attendue depuis 1977 est apparu par surprise au Mexique probablement au courant de la saison grippale 2008-2009, mais on ne s'en est aperçu que le 16 avril 2009 lorsqu'une première souche de virus A atypique (non H1,H3,H5) a été isolée en Californie (puis une 2^{ème} similaire le 18 avril au

Texas, deux Etats frontaliers avec le Mexique) et adressée au CDC D'Atlanta pour confirmation. La RT-PCR des deux souches n'ayant donné un résultat positif qu'avec des amorces H1 porcines disponibles au CDC d'Atlanta, le virus a été séquencé en urgence et le 24 avril, le CDC d'Atlanta confirmait l'apparition d'un nouveau virus de type A/H1N1 d'origine porcine mais transmissible facilement d'Homme à Homme ce qui impliquait la survenue d'une pandémie dans les semaines suivantes [1]. La découverte de nouveaux cas aux Etats-Unis (plus de 1000 cas dans un collège à New-York le 28 avril) et un nombre anormalement élevé de décès par pneumonie au Mexique au courant du mois d'avril a fait que l'OMS a rapidement réagi et dès le 26 avril a relevé son niveau d'alerte à 5 puis à 6 au début du mois de mai 2009. On a vu alors cette pandémie se développer en temps réel depuis le mois de mai 2009 et les premiers cas Tunisiens au mois de Juin.

1- Structure du nouveau virus : Tel que séquencé par le CDC d'Atlanta et confirmé par la suite par de nombreux pays, il s'agit d'un virus mosaïque qui contient six anciens fragments d'ARN (cf. fig1) et deux nouveaux,

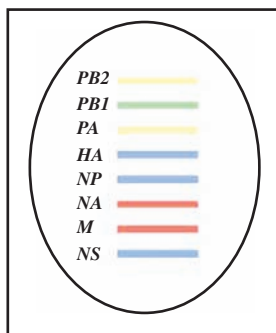


Fig1 : Le génome du nouveau virus A/H1N1 «v»
Source NEJM, 10.1056/nejmoa0903810. Les 2 nouveaux gènes porcins sont en rouge, les 2 gènes jaunes sont d'origine aviaire, le gène vert est dérivé d'un gène de virus humain H3

l'un sur le gène M et l'autre sur le gène N. Ces deux nouveaux fragments codent pour la synthèse d'une Hémagglutinine et une Neuraminidase de type H1 et N1 ce qui fait que sa formule antigénique telle que confirmée par l'OMS est de type A/H1N1 comme les virus responsables des Pandémies de 1918, 1934, 1947 et

1977 (on a rajouté le signe «v» pour variant pour le distinguer du virus A/H1N1 classique et enlever le terme «porcin» qui n'était plus de mise étant donné qu'il n'y avait plus besoin de contact avec le porc pour la transmission directe de la maladie chez les humains), le 2^{ème} fragment d'ARN étant d'origine humaine (le gène PB1 qui est dérivé d'un virus H3 ! d'où le terme de virus mosaïque puisqu'il contient aussi deux gènes d'origine aviaire le PB2 et le PA).

2- Conséquences de cette structure sur le plan épidémiologique : Cette originalité dans la structure a étonné plus d'un chercheur et a entraîné l'hypothèse (qui sera confirmée par la suite) que ce sera bien un virus pandémique puisque totalement nouveau sur deux gènes mais à pouvoir pathogène faible puisque les autres gènes présents sont soit anciens soit ayant circulé au cours des précédentes pandémies et qu'une proportion non négligeable de tranches d'âge de la population ferait une grippe de type «banal». Les catégories à risque pour cette transmission étant les jeunes enfants et la tranche d'âge 15-40 ans. Ces constatations et le fait que la production vaccinale des virus saisonniers était déjà en cours ont fait hésiter l'OMS avant qu'elle ne décide de recentrer les efforts sur la production d'un nouveau vaccin monovalent (les souches semences du nouveau virus pour la fabrication du nouveau vaccin étant livrées aux laboratoires industriels fin Mai). Il fallait donc s'attendre à une première vague épidémique à gérer sans vaccin au moins jusqu'à fin octobre et à partir de la livraison des vaccins aux pays demandeurs et selon le nombre de personnes vaccinées, canaliser cette épidémie et éviter l'apparition d'une 2^{ème} vague épidémique. Chaque pays a donc été invité par l'OMS à préparer ou à réactiver son plan d'urgence «grippe aviaire» pour faire face à cette pandémie et en limiter les dégâts. La première mesure était de s'assurer d'un diagnostic fiable au niveau des laboratoires nationaux de référence agréés par l'OMS et dès le 2 mai une liste de laboratoires agréés par l'OMS a été rendue publique sur son site dont notre laboratoire qui assure depuis les années 80 le rôle de Laboratoire national de référence pour la grippe.

3- Le Diagnostic Virologique : Il est basé sur la recherche du virus à partir d'un écouvillonnage naso-pharyngé de préférence le 2^{ème} et 3^{ème} jour de la maladie, prélèvement adressé sous glacière dans un milieu de transport adéquat. La technique de référence est la RT-PCR conventionnelle ou mieux en temps réel qui permet de traiter plus d'échantillons en utilisant les amorces spécifiques du nouveau virus. Ces amorces et les kits de RT-PCR (one step : réaction faite dans le même tube à partir de l'extraction des ARN viraux dans le prélèvement) ont été envoyés gratuitement aux laboratoires de référence en faisant la demande au CDC d'Atlanta à partir du 1er mai. Nous avons donc reçu un premier kit de 500 tests le 16 mai qui a été validé le 18 mai puis deux autres kits (un de l'EMRO et un autre du CDC d'Atlanta) qui nous ont permis de tenir la gestion quotidienne des analyses jusqu'en octobre. Le Ministère de la Santé Publique a pris le relais financier en dégageant un budget exceptionnel pour continuer à effectuer les analyses jusqu'à ce jour. Les ARN extraits subissent 45 cycles d'amplification selon le protocole du CDC d'Atlanta et un résultat positif en Virus A/H1N1 «v» doit répondre à trois critères d'amplification : une amplification franche avant le 40^{ème} cycle au niveau du Gène universel conservé du virus A de la grippe humaine, associée à une amplification au niveau du gène de l'hémagglutinine H1 porcine et une amplification du gène A porcine soit trois amplifications concordantes. Une 4^{ème} amplification est testée en contrôle du prélèvement reçu en utilisant le gène de la RNase P présent dans toutes les cellules humaines pour vérifier que le prélèvement est bien d'origine humaine (cf. fig 2). Au total, il s'agit d'une réaction difficile à pratiquer en dehors d'une structure spécialisée en biologie moléculaire de la grippe et qui nécessite des contrôles positifs et négatifs et aussi un contrôle positif d'extraction pour vérifier la bonne pratique de laboratoire. Le temps de technique est d'environ 4-5 heures en fonction du nombre de prélèvements et de l'entraînement de l'équipe qui fait le test. La commercialisation de tests rapides sur membrane destinés à la recherche de l'antigène de la grippe A ou B et plus récemment celle du virus A/H1N1 a facilité la tâche

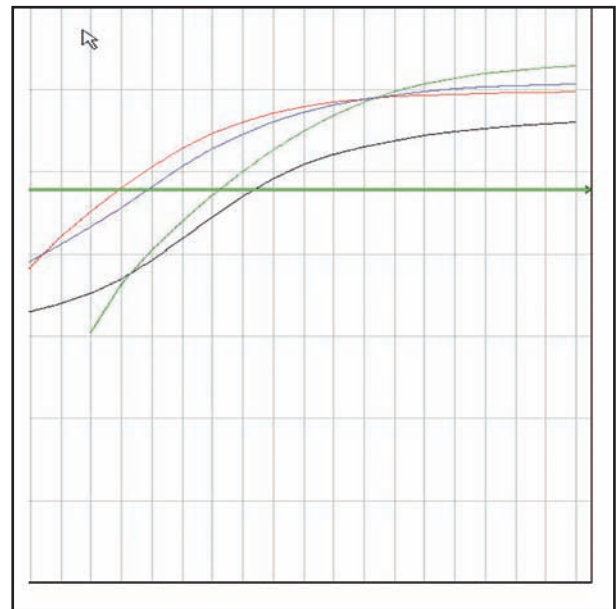


Fig2 : Exemple d'amplification positive pour la Grippe A/H1N1 «v» en RT-PCR suivant le protocole du CDC Atlanta, Tunis, Août 2009 La flèche verte horizontale indique le seuil de positivité, la courbe rouge : amplification du gène universel conservé de la grippe A humaine, la courbe Bleue : amplification du gène porcine de la grippe A, courbe verte : amplification du gène de la RNase P garant du Prélèvement d'origine humaine, courbe noire : amplification du nouveau gène de l'hémagglutinine H1 d'origine porcine. Les 4 courbes dépassent le seuil avant le 40^{ème} cycle d'amplification

puisqu'ils ont permis de délocaliser des examens de première ligne au niveau de pôles universitaires régionaux voire de cliniques ou de laboratoires privés (circulaire ministérielle du 5 octobre 2009 avec l'approbation du syndicat des laboratoires de libre pratique) Mais ces tests restent encore peu sensibles (maximum 75%) bien qu'ayant une bonne spécificité (environ 90-95%) et nécessitent une confirmation par biologie moléculaire en cas de négativité chez un sujet fortement suspect. Nous avons donc établi un algorithme d'interprétation pour ces tests (cf. fig 3) qui a été distribué à toutes les structures qui employaient ce test en première intention. Le Ministère de la Santé Publique a aussi accrédité l'Institut Pasteur de Tunis en 2^{ème} intention au cas où le Laboratoire de référence de l'EPS Charles Nicolle serait

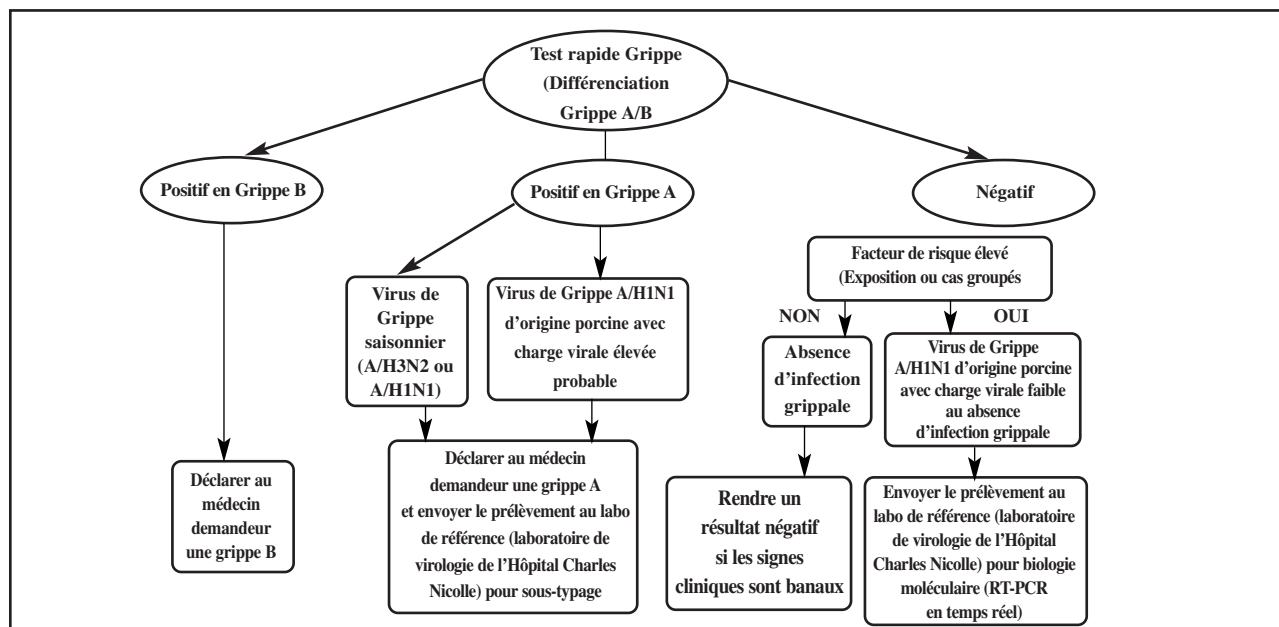


Fig 3 : Algorithme d'interprétation des tests rapides proposé par le laboratoire de référence de Tunis, septembre 2009

débordé puis l'Hôpital Militaire de Tunis (Pr. Ben Moussa) qui utilise un kit commercial acheté et validé depuis décembre 2009. Les tests sérologiques n'ont donc aucune place en période épidémique pour deux raisons : la nécessité d'avoir deux prélèvements à au moins 10 jours d'intervalle (ce qui élimine un diagnostic d'urgence de facto) et l'obtention d'un antigène spécifique de la nouvelle hémagglutinine H1 après culture virale ce qui a été très difficile à obtenir pour un laboratoire ne faisant pas de culture cellulaire dans des conditions de sécurité P 2 minimum. Cependant, les techniques ELISA recherchant les antigènes de capsid contre la grippe A et B restent valables pour un diagnostic préliminaire d'approche en sérologie mais elles ne différencient pas entre virus saisonnier et entre nouveau virus pandémique. La sérologie, par contre trouve sa place dans deux circonstances : Pour vérifier une protection post-vaccinale (surtout chez les sujets à risques immunodéprimés qui nécessitent deux doses vaccinales) et après l'épidémie pour apprécier sur une étude par tranches d'âge le taux d'immunisation de la population générale. Il est à noter aussi qu'un certain nombre de réactions croisées vis-à-vis d'anciens virus de la grippe pourraient protéger des personnes

âgées contre le nouveau virus [4], ce qui fait que même une sérologie positive doit être interprétée de façon très stricte en fonction du contexte clinique.

4- Les Mutations virales : Le traitement spécifique par les anti-neuraminidases (Oseltamivir, Zanamivir et dernièrement Pérarnivir [3] aux Etats-Unis) étant préconisé pour les cas graves d'emblée ou pour les personnes à risque susceptibles de développer une forme grave de la maladie, la Tunisie a introduit ce protocole dans sa stratégie de lutte contre la pandémie puisque nous disposions déjà d'un stock stratégique de 100.000 doses acquies en 2006 dans le cadre de la lutte contre la grippe aviaire. Cela étant, il était naturel que la mutation H275Y qui entraîne la résistance à l'Oseltamivir par sélection des mutants résistants apparaisse pour le nouveau virus. Environ 150 souches résistantes à ce produit ont été signalées à l'OMS à ce jour, ne remettant pas en cause pour le moment cette thérapeutique de première intention qui a le mérite si, elle est correctement conduite de limiter la durée de la maladie (raccourcissement de 24 à 36 heures des signes cliniques) mais n'empêche pas la survenue de complications bactériennes ou autres sur un terrain

«fragilisé» (immunodéprimé, VIH+, etc...) Une autre mutation, la D222G a été rapporté chez des patients graves ou décédés, cette mutation favorise l'attachement du virus aux cellules du poumon profond et donc théoriquement une forme pulmonaire de la maladie plus importante. Mais cette mutation n'est pas nouvelle d'une part (retrouvée dans le virus de 1918) et d'autre part, elle a été aussi retrouvée chez des personnes ayant guéri sans problèmes, donc son impact sur la Santé Publique reste à préciser.

Aspects épidémiologiques

1- La phase pré-épidémique : Elle s'est étendue du 18 mai, date à laquelle nous avons commencé les analyses quotidiennes spécifiques jusqu'au premier foyer épidémique découvert (le 17 septembre 2009 avec le foyer du lycée Pierre Mendès France de Tunis). Les analyses de laboratoire visaient à déterminer le nombre de cas importés et à en réduire l'extension par leur prise en charge immédiate en milieu hospitalier ou en confinement familial avec traitement préventif des contacts éventuels. Cela a permis de détecter 73 cas positifs importés d'origine diverse (avion, bateau...) sur 682 analyses effectuées grâce à un dispositif de contrôle thermique aux frontières du pays et a sauvé la saison touristique d'été et la période délicate des examens de fin de saison (Juin-Juillet 2009). Il était attendu que l'épidémie pure et dure se produirait à

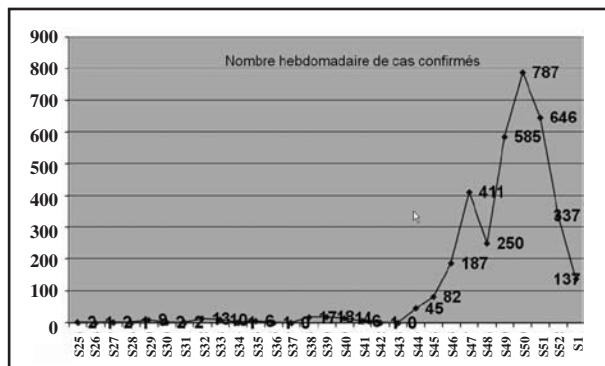


Fig4 : Courbe d'évolution hebdomadaire des cas confirmés (source : bulletin de l'ONME du 13 janvier 2009). Le pic de l'épidémie se situe à la semaine 50 et la décroissance est régulière depuis la semaine 52.

la rentrée scolaire et en fonction des conditions climatiques (le vent et le froid étant propagateur et conservateur du virus à distance).

2- La phase épidémique : la phase exponentielle de l'épidémie a donc commencé véritablement à la 46^{ème} semaine de l'année (entre le 2 et le 9 novembre). Le pic épidémique a été atteint à la 50^{ème} semaine et depuis 3 semaines environ, la décroissance aussi bien du nombre de cas diagnostiqués au laboratoire, du nombre de consultations, et du nombre d'hospitalisations pour cas graves. (cf. fig 4) fait que la pente descendante de l'épidémie est confirmée.

3- La phase post-épidémique : Elle se situera probablement entre la fin janvier et la fin février selon les conditions atmosphériques et l'apparition ou non du virus de la grippe saisonnière. Une attention particulière sera réservée fin mars-fin avril ou une 2^{ème} vague épidémique mais peu importante sera possible mais peu probable.

4- Evaluation du nombre de cas : Au 15 janvier 2010, 3253 cas positifs confirmés ont été enregistrés (1229 par PCR sur 4076 analyses et 2424 par tests rapides positifs en grippe A faites en dehors du laboratoire de référence).

5- Nombre d'hospitalisations : au total près de 900 personnes ont été hospitalisées dont 170 ont nécessité une intubation et une ventilation assistée en service de réanimation

6- Nombre de décès : il s'établit officiellement (c'est-à-dire personnes décédées confirmées au Laboratoire de Référence pendant la maladie ou en post mortem après autopsie) à 24 cas au 14 janvier 2010 dont trois enfants de moins de 10 ans avec des pathologies lourdes associées et cinq femmes enceintes sans facteurs de risques particuliers

IV- La campagne de vaccination : La Tunisie a été un des premiers pays à se prédisposer pour l'acquisition de vaccins auprès des laboratoires producteurs internationaux habilités et agréés par l'OMS [2] et ce, en fonction du plan national stratégique qui prévoyait en 2009 l'importation de 300.000

doses de vaccin saisonnier et environ 700.000 doses du vaccin contre la souche pandémique. La campagne de vaccination saisonnière a été lancée très tôt (fin septembre-fin octobre) pour qu'il n'y ait pas d'amalgame entre les deux vaccins. La campagne de vaccination contre le nouveau virus a été entamée le 16 novembre soit au début de la phase exponentielle de l'épidémie avec les 100.000 premières doses du vaccin reçu (Focetria* de Novartis, adjuvanté). Elle a concerné en premier lieu le personnel de santé, puis les sujets à risque en dehors des femmes enceintes, les immunodéprimés et les enfants de 6 à 23 mois pour lesquels 100.000 doses de vaccin non adjuvanté ont été commandées et 50.000 reçues à la fin novembre.

Après un démarrage timide du fait des réticences du corps médical et du grand public suite aux informations contradictoires publiées dans la presse nationale et internationale et des polémiques sur Internet et sur les TV satellitaires, les personnes vaccinées au 13 janvier 2010 (source : DSSB chiffres officiels des vaccinés, Dr. Mongi Hamrouni) sont au nombre de 270.000 avec une moyenne de 3000 personnes par jour ce qui fait que le stock de vaccins adjuvantés est utilisé à 80% et celui du vaccin non adjuvanté à 90%.

Conclusion

La gestion de l'épidémie au niveau du Ministère de la Santé Publique et au plus haut niveau a bénéficié d'un encadrement constant et ce, à tous les échelons : du laboratoire de référence, aux médecins de première ligne, aux structures hospitalo-sanitaires publiques et privées, tout le monde a retroussé ses manches et s'est mis au travail. Des réunions journalières ont eu lieu au siège du Ministère de la Santé Publique en présence de Mr. Le Ministre de la Santé Publique et de Madame La Secrétaire d'Etat qui n'ont pas ménagé leurs efforts pour stimuler, canaliser et regrouper les énergies et apporter des solutions en temps réel aux multiples problèmes se posant quotidiennement. Le résultat de tout ceci est que la Tunisie est un des rares pays ayant pu suivre en temps réel, l'arrivée des premiers cas, l'apparition et le suivi de

l'épidémie en temps réel. L'impact sur la société civile a été modéré voire négligeable, grâce aux évictions scolaires et à la prise en charge rapide des cas graves dans les services de réanimation. Il est à déplorer qu'un certain nombre de décès (surtout chez les femmes enceintes ou les jeunes enfants) auraient pu être probablement évités si la réticence initiale à la vaccination avait pu être levée plus rapidement.

Il reste encore un long chemin à parcourir avant de finaliser les résultats épidémiologiques et l'impact économique sur le pays après le passage de cette pandémie qui, on l'espère, ne se reproduira pas avant 20 autres années !

D'autres informations plus détaillées peuvent être obtenues à l'ONME qui édite le Bulletin national (www.onme@rns.tn) ou sur le site du Ministère de la Santé Publique (www.santetunisie@rns.tn). Un numéro vert est aussi fonctionnel tous les jours ouvrables de 9h00 à 21 heures (80 100 340).

Remerciements : Nos remerciements vont à tous les membres du comité national de lutte contre la pandémie A/H1N1 «v», à l'ONME, à la DSSB, et à toutes les directions régionales qui ont collaboré avec nous depuis le premier jour de la déclaration de l'épidémie ainsi qu'à tous les médecins et biologistes publics et privés qui nous ont fait confiance.

Références

- 1- Emergence of a novel swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans. Novel Swine_origin Influenza A (H1N1) virus investigation team New England Journal of Medicine May 7, 2009 p1-10.
- 2- Trial of 2009 Influenza A (H1N1) Monovalent MF59-Adjuvanted vaccine. Tristan W. Clarck et all New England Journal of Medicine December 17,2009 p2424-2435
- 3- The emergency use authorization of Peramivir for treatment of 2009 H1N1 Influenza Debra Birnkrant, Edward Cox. New England Journal of Medicine December 3, 2009 p 2204-2207
- 4- Cross reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 Influenza virus. K. Hancock et all New England Journal of Medicine, September 11, 2009 p1-8

L'expression de l'Hb Bart's à la naissance serait-elle due à plusieurs facteurs génétiques ?

H. SIALA,
F. OUALI,
T. MESSAOUD,
S. FATTOUM

Résumé : La détection d'Hb Bart's (γ_4) à la naissance est témoin de la présence d'une α -thalassémie. Toutefois, à génotype α -globine égal les sujets peuvent présenter des taux variables d'Hb Bart's. Nous nous interrogeons ici sur l'origine de cette variation en testant l'impact des déterminants impliqués dans la surexpression de la chaîne γ -globine.

21 enfants ayant présenté de l'Hb Bart's à la naissance ont été explorés pour ces déterminants : les mutations du gène β -globine recherchées par reverse dot blot, les motifs répétés $(AT)_xT_y$ du «silencer» du gène β -globine déterminés par séquençage direct, les promoteurs des gènes $G\gamma$ et $A\gamma$ explorés par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), la variation C \rightarrow T en -158 du gène $G\gamma$ recherchée par PCR/RFLP.

Le polymorphisme en-158 du gène $G\gamma$ et la configuration $(AT)_9T_5$ du motif répété du silencer du gène β de globine semblent expliquer la présence d'Hb Bart's à la naissance en absence de défaut α -thalassémique, ils expliqueraient aussi la variation dans l'expression de l'Hb Bart's chez les porteurs du même génotype ($\alpha^{5nt} \alpha/\alpha$).

Le facteur prépondérant dans l'expression de l'Hb Bart's à la naissance demeure incontestablement le génotype α -globine toutefois les déterminants impliqués dans la surexpression des gènes γ -globine semblent moduler cette expression et en particulier pour les taux relativement faibles.

Mots-clés : Hb Bart's, alpha-thalassémie, gènes β -globine, gène β -globine, marqueurs génétiques

Abstract : Raised Hb Bart's at birth was used for long time as an alpha-thalassaemia marker. However, the same α -globin genotype could give variable Hb Bart's levels. Herein, we wonder about this variability origin testing genetic determinants described earlier as involved in gamma-globin chain over-expression

21 children of 3 years old that carried Hb Bart's at birth and for which Alpha-thal genotype was explored earlier were tested for gamma-globin chain over-expression determinants : beta-thalassaemia mutations, gamma globin gene promoters, polymorphism C \rightarrow T at -158 of gamma-G gene were tested respectively by reverse Dot Blot, Denaturant Gradient Gel Electrophoresis : DGGE, PCR/RFLP). The $(AT)_xT_y$ motifs at -540 in the silencer of beta globin gene were explored by direct sequencing.

The $(AT)_9T_5$ configuration in the silencer of beta globin and the polymorphism C \rightarrow T at -158 of gamma-G seems give explanation for Hb Bart's carrier

Laboratoire de Biochimie Clinique
Hôpital d'Enfants de Tunis

with no identified molecular alpha-thal defects, these determinants justify also the variable Hb Bart's level for the same genotype carriers ($\alpha^{5m} \alpha/\alpha$). Expression of Hb Bart's at birth seems to be modulated by various factors. The preponderant one is alpha-thal genotype. However gamma globin gene expression determinants have to be integrated in the interpretation of Hb Bart's presence at birth especially for low levels.

Key-words : Hb Bart's, alpha-thalassemia, γ -globin gene, β -globin gene, genetic markers

Introduction

A la naissance l'hémoglobine fœtale ou Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) est l'hémoglobine majoritaire. Ainsi, tout déficit de synthèse en chaînes α -globine pendant cette période se manifeste par la présence d' Hb Bart's ou (γ_4), due à une accumulation de chaînes γ -globine libres. De ce fait la détection de l'Hb Bart's à la naissance a longtemps été employée comme un marqueur d'alpha thalassémie (1,2).

Toutefois, à l'usage cette corrélation a montré quelques faiblesses à justifier toutes les variations d'Hb Bart's à la naissance. Ainsi diverses études ont montré, d'une part que les nouveaux-nés hétérozygotes pour l' α^+ -thal ne présentent pas tous de l'Hb Bart's à la naissance (3,4) et d'autre part que les porteurs d'Hb Bart's ne présentent pas tous un défaut moléculaire dans les gènes β -globine_ (5,6,7)

Dans un travail préalable (8), nous avons exploré des porteurs d'Hb Bart's à la naissance pour déterminer les défauts α -thal éventuellement responsables de la présence de cette fraction. Les résultats avaient montré que la plupart des sujets étaient porteurs d'un défaut moléculaire au niveau du «cluster» α -globine toutefois des cas étaient demeurés sans réponse. De plus, une variabilité dans les taux d'Hb Bart's a été constatée chez des sujets portant le même génotype α -globine.

L'ensemble de ces données mènent à penser que le niveau d'expression de l'Hb Bart's ne serait pas tributaire exclusivement d'une diminution en chaînes α -globine mais pourrait aussi être dû à une augmentation intrinsèque de l'expression de la chaîne γ -globine.

Divers facteurs génétiques liés au cluster β -globine_ ont déjà été décrits comme impliqués dans la surexpression

de la chaîne γ -globine, ils sont en général associés à un niveau légèrement accru d'HbF dans les formes hétérocellulaires de la PHHF ou dans certaines hémoglobinopathies. Parmi ces déterminants on citera:

- Les mutations du gène β -globine responsables de β -thalassémie, ou d'hémoglobinoses (drépanocytose, hémoglobinoses C) qui peuvent influencer l'expression des gènes γ - globine par effet d'équilibre entre les gènes γ et β -globine (9, 10).
- Les variations dans le «silencer» du gène β -globine au niveau du motif répété $(AT)_xT_y$ localisé en-540 du gène. Certaines configurations, telle que la $(AT)_9T_5$, ont été impliquées dans l'atténuation de l'expression de la β -thalassémie ou de la drépanocytose par augmentation de la synthèse des chaînes γ - globin (11,12,13). Ces configurations ont aussi été impliquées dans l'élévation discrète du taux d'HbF chez des individus sains (14).
- Les mutations dans les promoteurs des gènes $G\gamma$ et $A\gamma$ dont la plus commune est la variation $C \rightarrow T$ en - 158 du gène $G\gamma$, elle a été décrite chez des drépanocytaires avec une HbF augmentée et un phénotype modéré (9,15). Les variations dans les promoteurs des gènes $G\gamma$ et $A\gamma$ ont également été impliqués dans l'augmentation d'HbF chez des sujets sains (14, 16, 17).

Dans le but de tester l'influence de ces déterminants sur l'expression de l'Hb Bart's à la naissance nous explorons une cohorte d'enfants, ayant présenté de l'Hb Bart's à la naissance et pour lesquels les défauts α -thalassémiques ont été identifiés dans un travail préalable (8).

Matériel et méthodes

Population étudiée

Au cours d'une enquête de dépistage des hémoglobino-

pathies sur sang du cordon menée dans une maternité de Tunis, des porteurs d'Hb Bart's ont été répertoriés. Au moment où ces porteurs ont atteint l'âge de 3 ans, ils ont été convoqués en vue d'une étude familiale. 21 familles ont répondu à la convocation et ont donné leur consentement pour les études hématologique et moléculaire. Elles ont ensuite été caractérisées pour les défauts α -thalasémiques dans un précédent travail (8). Elles font ici l'objet d'une étude complémentaire à la recherche de facteurs impliqués dans l'expression de l'Hb Bart's à la naissance.

Méthodes

L'ADN génomique a été extrait à partir du sang périphérique en utilisant le protocole standard d'extraction d'ADN au phénol chloroforme (18)

Les six mutations β -thal les plus communes en Tunisie (19) ont été recherchées par la technique du RDB (Reverse Dot Blot) (20).

La DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) a été employée pour analyser les promoteurs des gènes β , $G\gamma$ et $A\gamma$ de globine (21,22). Le polymorphisme C \rightarrow T en -158 du gène $G\gamma$ a été testé par PCR/RFLP en utilisant l'enzyme de restriction XmnI (selon les recommandations des fournisseurs Biolabs-England).

Les motifs (AT) $_x$ T $_y$ en -540 du gène β -globin, ont été

explorés par séquençage direct sur l'analyseur génétique ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Warrington, Lancashire, England) ; Un fragment de 760pb correspondant à la région en 5' du gène β est amplifié par les amorces B : 5'- CCT CAC CTg Agg AgT TAA TT-3', et D: 5'- CTA CCA TAA TTC AgC TTT ggg AT-3. La réaction de séquence est ensuite effectuée avec une amorce interne AT2 : 5'-gCA TgA gCA AAA TTA AgA AAA ACA ACA AC-3' en suivant le protocole précédemment décrit (23).

Résultats

La recherche de l'hémoglobine Bart's sur sang du cordon a été effectuée, au cours de l'enquête de dépistage, par l'électrophorèse sur acétate de cellulose, le taux d'Hb Bart's ne pouvait donc pas être déterminé avec précision et les porteurs ont été classés par une évaluation relative de l'intensité de la bande électrophorétique d'Hb Bart's en 3 catégories (1 (+), 2 (+), 3 (+), 4 (+)). Cependant, environ 10 des échantillons ont été simultanément examinés par HPLC automatisé. La comparaison entre les résultats a permis de faire correspondre à chaque catégorie une valeur comme suit : 1 (+) correspond à un taux d' Hb Bart's < 1%, 2 (+) à des taux compris entre 1 et 2%, 3 (+) à des taux compris entre 2 et 3%

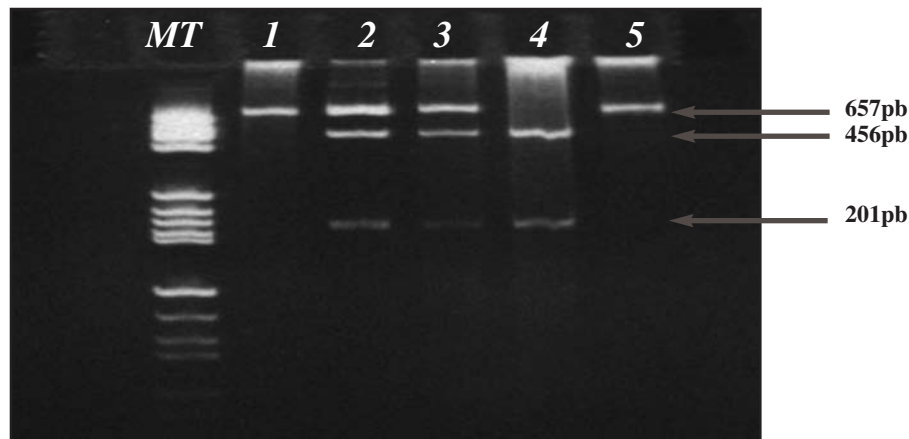


Figure 1 : Migration sur gel de polyacrylamide à 8% du produit PCR digéré par l'enzyme de restriction XmnI. Le fragment non digéré fait 657pb et donne après digestion en présence du site XmnI 456 pb et 201pb. MT= Marquer de poids moléculaire; 1= témoin non digéré ;2= sujet hétérozygote(+/-), 4= sujet homozygote, 5= sujet normal.

et 4(+) à des taux >3%. Il est à noter que le taux maximal d'Hb Bart's retrouvé était de 3,5% et que nous sommes dans une zone de variation infime.

Le polymorphisme C-T en -158 du gène Gg a été exploré par PCR-RFLP par l'enzyme XmnI (figure 1).

Les 21 cas explorés pour ce site ont montré 7 cas hétérozygotes (+/-), 3 cas homozygotes (++) et 11 cas homozygotes négatifs pour l'enzyme XmnI (-/-) (tableau 1).

Les promoteurs des gènes Gγ et Aγ ont été explorés par DGGE à la recherche d'une mutation ponctuelle ou d'une micro délétion.

Le fragment soumis à la DGGE est appelé fragment Gottardi, et fait 267 pb, Afin d'amplifier ce fragment spécifiquement pour chaque promoteur, un grand fragment spécifique d'un des promoteurs est amplifié et c'est à partir de cette PCR qu'une deuxième est menée pour amplifier le fragment Gottardi (c'est la «nested PCR»).

Pour le promoteur Gγ, le premier fragment amplifié fait 767 pb suivie par la PCR Gottardi. Le fragment obtenu est soumis à une électrophorèse en gradient dénaturant (figure 2).

La DGGE menée avec ce fragment n'a montré en dehors du polymorphisme en -158 du gène Gγ correspondant au site XmnI, aucune autre anomalie.

Pour le promoteur Aγ, le premier fragment amplifié fait 1073 pb suivi par la «nested PCR» qui donne le fragment Gottardi qui fait 267 pb. Sa migration en DGGE

n'a montré aucune anomalie.

La recherche des mutations β-thalassémiques les plus communes en Tunisie (19) (cd 39, IVS 1-110, IVS 1-1, IVS 1-5, cd 6, cd44) a été menée par la technique du Reverse Dot Blot.

Les 21 cas de porteurs d'Hb Bart's à la naissance ont été testés pour ces mutations et aucun des cas ne s'est révélé porteur d'une des mutations sus décrites. Ces résultats sont appuyés par des taux d'HbA₂ normaux chez les cas index et leurs parents respectifs.

Les séquences répétées (AT)_xT_y du «silencer» du gène β-globine ont été étudiés par séquençage direct et les motifs retrouvés sont :

- Le motif de référence (AT)₇T₇, il a été observé à l'état homozygote dans 7 cas (Tableau 1).

- Des motifs préalablement décrits comme associés à des haplotypes drépanocytaires (Tableau1) :

- * (AT)₈T₅ (haplotype Camerounais) retrouvé à l'état hétérozygote en association avec le motif de référence (AT)₇T₇ dans 3 cas.

- * (AT)₆T₉ (haplotype Bantou) dans 2 cas l'un associé au motif (AT)₉T₅ et l'autre au motif (AT)₈T₄ (haplotype Beninois)

- * (AT)₉T₅ (haplotype Arabo-indien) retrouvé à l'état hétérozygote en association avec le motif de référence (AT)₇T₇ dans 6 cas, associé au motif. (AT)₆T₉

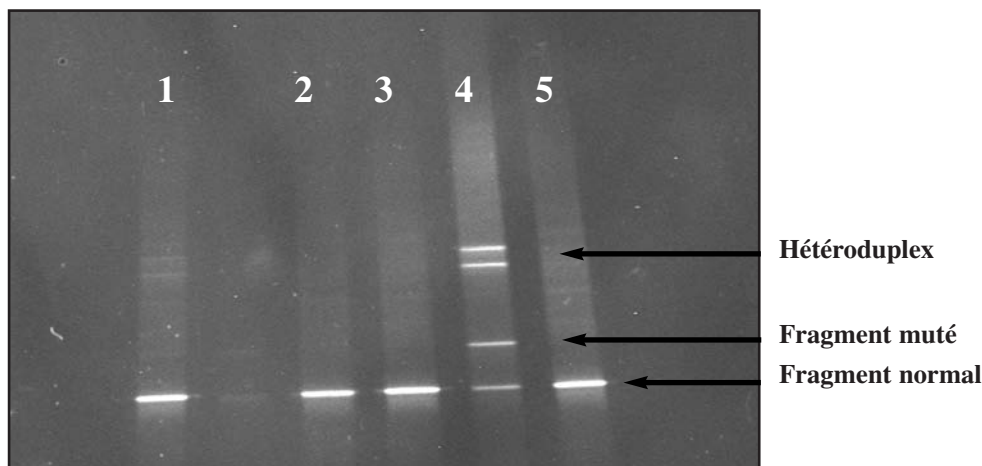


Figure 2 : Electrophorèse en gradient dénaturant (DGGE) du promoteur du gène Gγ 1,2,3 et 5 = sujets ne présentant aucune mutation au niveau du promoteur Gγ ; 4= sujet hétérozygote pour le site XmnI en -158 du gène Gγ

Tableau I : Résultats de l'étude des déterminants des locus α et β -globine chez les porteurs d'hémoglobine Bart's à la naissance.

N°	Génotype α -globine	XmnI	Motif (AT)xTy	Mutation β -thal	Promoteur Du gène G γ	Promoteur Du gène A γ	Hb Bart's*	HbF **
1	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-/+	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₈	N	XmnI HTZ	N	<1%	1,1
2	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	N	N	<1%	1,2
3	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-/-	AT ₈ T ₄ /AT ₆ T ₉	N	N	N	1 à 2%	1,3
4	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₉ T ₅	N	N	N	1 à 2%	0,6
5	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	-/+	AT ₇ T ₇ /AT ₉ T ₅	N	XmnI HTZ	N	1 à 2%	()
6	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	+/+	AT ₇ T ₇ /AT ₈ T ₅	N	XmnI HMZ	N	<1%	1
7	$\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}/\alpha\alpha$	-/+	AT ₇ T ₇ /AT ₈ T ₅	N	XmnI HTZ	N	<1%	1,5
8	$-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	N	N	1 à 2%	()
9	$-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha^{119}$	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	N	N	>3%	1
10	$\alpha^{5nt}\alpha/\alpha\alpha$	-/+	AT ₇ T ₇ /AT ₉ T ₅	N	XmnI HTZ	N	1 à 2%	0,8
11	$\alpha^{5nt}\alpha/\alpha\alpha$	-/+	AT ₆ T ₉ /AT ₉ T ₅	N	XmnI HTZ	N	1 à 2%	0,8
12	$\alpha^{5nt}\alpha/\alpha\alpha$	+/+	AT ₇ T ₇ /AT ₈ T ₅	N	XmnI HMZ	N	<1%	3,9
13	$\alpha^{5nt}\alpha/\alpha\alpha$	+/+	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	XmnI HMZ	N	1 à 2%	0,8
14	$\alpha^{5nt}\alpha/\alpha\alpha$	-/+	AT ₉ T ₅ /AT ₁₁ T ₃	N	XmnI HTZ	N	2 à 3%	1,2
15	$\alpha^{\text{cd}23}\alpha/\alpha\alpha$	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	N	N	1 à 2%	1,2
16	$\alpha^{+6\text{C}\rightarrow\text{G}}\alpha/\alpha\alpha$	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₉ T ₅	N	N	N	<1%	1
17	NI	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	N	N	<1%	1
18	NI	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₇	N	N	N	<1%	()
19	NI	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₇ T ₈	N	N	N	<1%	0,8
20	NI	-/+	AT ₇ T ₇ /AT ₉ T ₅	N	XmnI HTZ	N	1 à 2%	1
21	NI	-/-	AT ₇ T ₇ /AT ₉ T ₅	N	N	N	<1%	(-)

* Les porteurs d'Hb Bart's à la naissance ont été classés en 4 catégories : ceux présentant une Hb Bart's <1%, ceux dont le taux est compris entre 1 à 2%, ceux dont le taux est compris entre 2 à 3% et ceux dont le taux est >3%.

** Les taux d'HbF sont dosés à l'âge de 3 ans par HPLC automatisé (Variant II, BIO-RAD) ;

(-) taux non détectable d'Hb F

(Bantou) dans un cas et au motif (AT)₁₁T₃ qui est un motif décrit chez des sujets sains en Grèce ayant une élévation modérée de l'HbF, chez 1cas.

* Un nouveau motif : (AT)₇T₈ retrouvé en association avec le motif de référence (AT)₇T₇ dans 2 cas (figure3).

Discussion

Les résultats de la recherche de mutations α -thalassémiques, menée préalablement (8), ont montré que 6 mutations, présentes chez 16 des 21 sujets testés, étaient

à même d'expliquer la présence d'Hb Bart's à la naissance, 5 cas sont donc demeurés sans réponse quant à l'origine de cette présence d'Hb Bart's et ce en dépit de la recherche de défauts moléculaires poussés jusqu'au séquençage complet des gènes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de globine. D'où la recherche de marqueurs génétiques situés ailleurs que sur le cluster α -globine et associés à une augmentation de l'expression de la chaîne γ -globine.

Parmi les 5 cas irrésolus, 3 présentent au moins, l'un de ces marqueurs :

Le motif (AT)₉T₅ au niveau du «silencer» du gène β - glo-

bine, à l'état hétérozygote est présent dans 2 cas alors que le site XmnI est présent à l'état hétérozygote dans 1 cas. Ces deux derniers déterminants ont préalablement été décrits comme associés à un taux relativement élevé d'HbF chez les drépanocytaires (11) et les β -thalassémiques (15) et même chez les sujets PHHF (persistance héréditaire de l'Hb fœtale).

Une nouvelle configuration au niveau du silencer β (AT)₇T₈ a été relevée. En absence de toute autre variation que ce soit dans les déterminants α -thal ou dans les délétions du cluster β -globine, la détection d'Hb Bart's à la naissance chez ce sujet pourrait être expliquée par la présence de ce nouveau motif qui aurait un effet similaire à celui du motif (AT)₉T₅.

2 cas (n°17 et 18) n'ont présenté aucune variation dans les déterminants génétiques explorés. Etant donné qu'aucune variation hématologique n'a été relevée chez eux, il est peu probable qu'ils portent un défaut α -thalassémique. Un autre déterminant impliqué dans la sur-

par la variation du taux d'Hb Bart's à génotype égal chez les porteurs de la mutation -5nt ($\alpha^{5nt} \alpha/\alpha\alpha$). Cette variation peut être expliquée par la coprésence de déterminants sus-décrits impliqués dans l'expression de la chaîne γ de globine. Celui présentant le taux le plus élevé d'Hb Bart's (n°14) en présente trois : Le site XmnI à l'état hétérozygote, le motif (AT)₉T₅ et le motif (AT)₁₁T₃. Ceux avec des taux moyens n'en présentent que deux. Le taux le plus faible est associé au site XmnI à l'état homozygote mais avec la coprésence du motif (AT)₈T₅ préalablement décrit comme associé à une Hb F diminuée et impliqué dans une expression diminuée de la chaîne γ de globine.

Les taux d'Hb F à 3ans (tableau 1) présentent peu de corrélations avec les taux d'Hb Bart's à la naissance, il semble que les marqueurs n'agissent pas de la même manière sur l'expression de la chaîne γ de globine à la naissance et au stade adulte, les phénomènes du switch étant potentiellement à l'origine de cette variation.

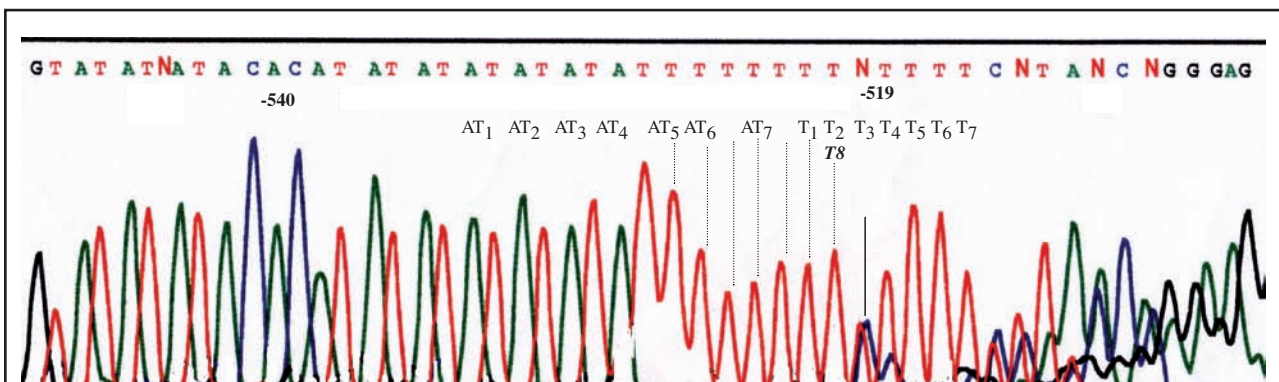


Figure 3 : Association du motif répété (AT)₇T₇ et du nouveau motif (AT)₇T₈ observés en -540 du gène β -globine au niveau de son «Silencer»

expression de la chaîne γ , pourrait être évoqué: tel que le site hypersensible (HS2) dans la région de contrôle (LCR) du locus β (23) ou le motif (TG)_m (CG)₅(TG)₈ situé au niveau de l'IVS2 du gène $A\gamma$ (25) décrits au préalable comme intervenant dans l'augmentation du taux d'HbF.

L'action des déterminants du locus β -globine sur l'expression de l'Hb Bart's à la naissance, peut être appuyée

Ainsi donc, l'expression de l'Hb Bart's à la naissance serait tributaire de 2 facteurs essentiels : l' α -thalassémie d'une part, qui agit en diminuant les chaîne α -globine et qui est probablement le facteur prépondérant, et les déterminants génétiques impliqués dans la surexpression de la chaîne γ -globine d'autre part. L'interaction de ces deux facteurs modulerait l'expression de l'Hb Bart's à la naissance

Conclusion

La détection d'Hb Bart's demeure le meilleur moyen d'explorer des α -thalassémies par ailleurs difficiles à détecter sur le plan phénotypique. Toutefois, son utilisation devrait désormais, prendre en considération la fluctuation des taux d'Hb Bart's qui pourrait dépendre de facteurs exogènes tels que les déterminants impliqués dans la surexpression de la chaîne γ de globine. Par ailleurs, la mise en place dans le laboratoire des techniques d'exploration des marqueurs susceptibles d'agir sur l'expression des gènes du cluster β -globine ouvre des perspectives d'études des corrélations phénotype/génotype en vue d'une meilleure prise en charge des hémoglobinopathies.

Bibliographie

1. Pembrey ME, Weatherall DJ, Clegg JB, Bunch C, Perrine RP. Hemoglobin Bart's in Saudi Arabia. *Br. J Haematol* 1975;29 (2): 221-234.
2. Henni T, Bachir D, Tabone P, Jurdic P, Godet J, Colonna P. Hemoglobin Bart's in Northern Algeria. *Acta Haematol* 1981;5(4): 240-246.
3. Galanello R, Maccinoni L., Ruggeri R, Perseu L. and Cao A. Alpha thalassaemia in Sardinian newborns. *Br J Haematol* 1984 ;58: 361-368.
4. Fei YJ, Kutlar F, Harris I, Wilson MM, Milana A, Sciacca P, Schiliro G, Masala B, Manca L, Altay C, Gurgey A, De Pablos J, Villegas A and Huisman THJ. A search for anomalies in the ϵ , α , β , and γ -globin gene arrangements in normal black, Italian, Turkish and Spanish newborns. *Hemoglobin* 1989;13(1): 45-65.
5. Higgs DR, Presley L, Clegg JB, Weatherall DJ, Serjaent G. Detection of alpha-thalassemia in negro infants. *Br. J Haematol* 1980: 46: 39-46.
6. Velati C, Sampietro M, Sciariadi L, Allievi E, Mosconi L, Cappellini MD, Fiorelli G. Neonatal screening for Hb Bart's in Italian subjects of heterogeneous regional origin born in Lombardy. *Hematologica* 1983: 68 (1): 20-29
7. Zorai A., Harteveld CL, Bakir A, Van Delft P, Falfoul A, Dellagi K, Abbes S, Giordano PC. Molecular spectrum of alpha-thalassemia in Tunisia : epidemiology and detection at birth. *Hemoglobin* 2002; 26(4): 353-62.
8. Siala H, Ouali F, Bibi A, Messaoud T, Fattoum S. α -thalassemia in Tunisia: some epidemiological and molecular data. *J Genet* 2008: 87 (3):
9. Labie D., J Pagnier, C. Lapoumeroulie, F. Rouabhi, O. Dunda-Belkhodja, P. Chardin, C. Beldjord, H. Wajcman, M. E. Fabry, and R. L. Nagel. Common haplotype dependency of high Ggamma-globin gene expression and high HbF levels in beta-thalassemia and sickle cell disease anemia patients. *PNAS USA* 1985: 82: 2111-2114.
10. Trabuchet G, Elion J, Baudot G, Pagnier J, Bouhass R, Nigon VM, Labie D, Krishnamoorthy R. Origin and spread of β -globin gene mutations in India, Africa, and Mediterranean: analysis of the 5 β flanking and intragenic sequences of β^s and β^c genes. *Human Biology* 1991: 63: 241-252.
11. Elion J, Berg PE, Lapoumeroulie C, Trabuchet G, Mittel M, Krishnamoorthy R; Schechter AN; Labie D. DNA sequence variation in a negative control region 5' to the β -globin gene correlates with the phenotypic expression of the β^s mutation. *Blood* 1992: 79 (3):787-792.
12. Goncalves I, Henriques A, Raimundo A, Picanco I, Reis A, Correia E, Santos E, Nogueira P, Osorio-Almeida L. Fetal Hemoglobin elevation in Hb Lepore heterozygote and its correlation with β -globin cluster linked determinants. *Am J Hematol* 2002: 69: 95-102.
13. Kalotychoy V, Kollig P, Voskaridou E, Patargias T, Anagnou NP, Loukopoulos D. Functional role of the four different types of (AT) $_x$ T $_y$ motifs 5' to the β -globin gene and their distribution in the Greek population. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2002: 28 (1):39-46.
14. Zertal-Zidani S, Ducrocq R, Sahbatou M, Satta D, Krishnamoorthy R. Foetal hemoglobin in normal healthy adults : relationship with polymorphic sequence cis to the β -globin gene. *Eur J Hum Genet* 2002 : 10(5):320-326.
15. Ragusa A, Lombardo M, Beldjord C, Ruberto C, Lombardo T, Elion J, Nagel RL, Krishnamoorthy R. Genetic epidemiology of β -thalassemia in Sicily: Do sequences 5' to the Gg and 5' to the β -gene interact to enhance HbF expression in β -thalassemia? *Am J Hematol* 1992: 40:199-206.
16. Sampietro M, Thein SL, Contreras M, Pazmany L. Variation of HbF-Cell number with the G γ XmnI (C-T) polymorphism in normal individual. *Blood* 1992;79 (3):832-839
17. Thein SL and Craig. Genetics of HbF/F Cell Variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin* 1998: 22 (5 and 6): 401-414.

- 18.** Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- 19.** Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Rapid and simultaneous typing of Hemoglobin S, Hemoglobin C and seven Mediterranean mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood* 1993; 81(1):239-242.
- 20.** Fattoum S., Messaoud T., and Bibi A. Molecular basis of β -thalassemia in the population of Tunisia. *Hemoglobin* 2004; 28(3):177-87.
- 21.** Ghanem N, Girodon E, Vidaud M, Martin J, Fanen P, Plassa F, Goossens M. A comprehensive scanning method for rapid detection of beta-globin gene mutations and polymorphisms. *Hum Mutat.* 1992; 1(3):229
- 22.** Gottardi E, Losekoot M, Fodde R, Saglio G, Camaschella C, Bernini LF. Rapid identification by denaturing gradient gel electrophoresis of mutation in the gamma-globin gene promoter in non deletion type HPFH. *Br J Haematol* 1992; 80: 533-538.
- 23.** Siala H., Fattoum S., Messaoud T., Ouali F., Gerard N. and Krishnamoorthy R. A novel α -thalassemia nonsense mutation in codon 23 of the α 2-globin gene (GAG \rightarrow TAG) in a Tunisian Family. *Hemoglobin* 2004; 28(3):249-254.
- 24.** Merghoub T, Perichon B, Maier-Redelsperger M, Dibenedetto SP, Samperi P, Ducrocq R, Feingold N, Elion J, Schiliro G, Labie D, Krishnamoorthy R. Dissection of the association status of two polymorphisms in the β -globin gene cluster with variation in F-cell number in non anemic individuals. *Am J Hematol* 1997; 56:239-243.
- 25.** Concalves I, Ducrocq R, Lavinha J, Nogueira, Peres J, Picanco I, Correia E, Reis AB, Silva C, Krishnamoorthy R, Almeida LO. Combined effect of two different polymorphic sequences within the β -globin gene cluster on the level of HbF. *Am J Hematol* 1998; 57: 269-276.

Dosage comparatif des immunoglobulines par deux méthodes d'immunoprécipitation : turbidimétrie et nephelométrie

I. NOURI¹,
N. SAMMAR²,
H. KSOURI³,
F. MELLOULI⁴,
M. BEJAOUTI⁴,
A. BEN HASSEN³.

Résumé : Au cours de ce travail, nous avons comparé deux méthodes d'immunoprécipitation en milieu liquide, la néphélométrie et la turbidimétrie, en utilisant respectivement l'automate Cobas 400 plus de Roche DiagnosticsTM et le semi-automate Minineph de Binding-SiteTM.

Cette étude a porté sur le dosage des immunoglobulines (G, A et M) sériques dans 150 échantillons appartenant à trois populations différentes également réparties (des patients atteints de déficits immunitaires humoraux, des sujets non atteints de déficits immunitaires humoraux et des adultes sains).

Une mauvaise concordance entre les valeurs fournies par les 2 méthodes a été retrouvée. Elle s'est traduite par des différences statistiquement significatives confirmées par le test de concordance avec des coefficients de concordance Kappa (K) variant entre mauvais et faible (K = 0,06 à K = 0,239), avec une unique valeur de concordance moyenne (Kappa = 0,48), correspondant à la concentration des IgA chez les sujets non atteints de déficits immunitaires humoraux. La concordance entre les deux méthodes a été d'autant plus mauvaise que la concentration en immunoglobulines était plus élevée.

Une meilleure standardisation des méthodes réduirait probablement ces différences, et améliorerait la concordance entre ces deux méthodes.

Mots clés : immunoglobulines, néphélométrie, turbidimétrie,

Abstract : Our objective in this study was to compare turbidimetry and nephelometry using the automat Cobas 400 plus (Roche DiagnosticsTM) and the semi-automat Minineph (Binding-SiteTM). The study was based on the determination of sera collections (IgG, IgA, IgM) of 150 samples each. Every fifty sera belong to respectively, patients affected by a humoral congenital immunodeficiency, young subjects without such deficiency and healthy adult. The rates of concordance of the results showed a significant difference in the concentration rate between those methods, confirmed by an agreement coefficient K between fair (K = 0,06 à K = 0,239) and moderate (Kappa = 0,48). The high the immunoglobulin concentration, the worst the concordance between the two assays.

An improved method standardization will probably reduce differences.

Key words : immunoglobulin, nephelometry, turbidimetry,

¹ Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis.

² Département de Statistique, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis.

³ Service des Laboratoires. Centre National de Greffe de Moelle Osseuse de Tunis.

⁴ Unité d'Hémo-Immunologie. Centre National de Greffe de Moelle Osseuse de Tunis.

Introduction

Le dosage des immunoglobulines (Ig) sériques représente dans notre laboratoire un examen de routine pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de déficits immunitaires humoraux congénitaux qui reçoivent mensuellement un traitement substitutif à base d'Ig polyvalentes. L'évaluation des Ig résiduelles après ce traitement permet d'apprécier le degré de couverture thérapeutique de ces patients (1).

La multiplicité des méthodes spécifiques de dosage des protéines, la disponibilité de plus en plus grande en appareils d'analyse et en réactifs et la nécessité d'utiliser les méthodes les plus rentables tant sur les plans de la haute sensibilité analytique, du temps de réalisation et du coût, nous a incité à réaliser une analyse comparative des (Ig) par deux méthodes d'immunoprécipitation en milieu liquide : la turbidimétrie et la néphélémétrie. Certains travaux ont évalué comparativement ces deux méthodes et ont portées surtout sur la protéine C-réactive (CRP) (2-4), dont le dosage présente un intérêt lors des infections et autres syndromes inflammatoires (5). En outre la CRP constitue un facteur prédictif du risque d'atteinte des artères coronaires cardiaques (6,7), des variations minimales de l'ordre du mg / l de cette protéine, fait basculer le risque d'une atteinte coronaire du faible vers l'élevé (8). Ainsi, la sensibilité analytique de la méthode utilisée est d'une importance capitale pour un classement exacte du risque d'atteinte coronaire. Lors de ces analyses comparatives (2-4), les auteurs ont rapporté une bonne corrélation entre ces deux méthodes avec des différences inter-méthodes pour les concentrations élevées imputées à un manque de standardisation des méthodes. Dans deux travaux récents (9,10) plusieurs paramètres dont les Ig ont été analysées, et les auteurs on aboutit aux mêmes conclusions.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé respectivement l'automate Cobas Integra 400 plus de «Roche Diagnostics™» et le semi-automate Minineph de «Binding-Site™» pour l'analyse d'échantillons appartenant à une population jeune (respectivement 50 patients atteints et 50 sujets non atteints de déficits immunitaires

humoraux primitifs) et une population de 50 adultes sains. Une analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée.

Matériels et méthodes

Matériel

Notre travail a porté sur 150 personnes réparties en 3 groupes :

Groupe 1 : Patients atteints de déficits immunitaires humoraux primitifs (1). Cinquante sérums prélevés chez des patients d'âge moyen 13 ans (2 ans - 24 ans), respectivement dix de sexe féminin et quarante de sexe masculin.

Groupe 2 : Sujets non atteints de déficits immunitaires humoraux primitifs. Cinquante sérums prélevés chez des sujets d'âge moyen 8 ans (1 ans - 19 ans), respectivement vingt de sexe féminin et trente de sexe masculin.

Groupe 3 : Sujets sains. Cinquante sérums prélevés chez des sujets d'âge moyen 35 ans (18 ans - 60 ans), respectivement quarante quatre de sexe féminin et six de sexe masculin.

Les échantillons de sang ont été prélevés sur tube sec sur des patients à jeun. Les sérums ont été aliquotés et conservés à -70°C jusqu'au moment de l'analyse.

Méthodes

Méthodes

Pour le dosage des Ig, nous avons eu recours à l'automate COBAS INTEGRA 400 plus de «Roche Diagnostics™» et le Minineph de «Binding-Site™», utilisant respectivement les méthodes de turbidimétrie et de néphélémétrie.

1-1-COBAS INTEGRA 400 plus :

Pour le dosage des Ig, on utilise deux solutions, solution 1 (antisérum de lapin anti-Ig humaine) et solution 2 correspondant à un réactif pour la vérification de l'excès d'antigène. Pour la détection des concentrations très faibles on utilise un programme sensible pour l'IgA et l'IgM : Ig P (Ig pédiatrique). Le Precinorm Protéine (PP) s'utilise pour le contrôle de qualité et permet d'évaluer l'exactitude et la précision des tests. Dans ce test, les sérums sont utilisés purs, et le temps de l'analyse de chaque paramètre est de 3 minutes.

1-2-Le Minineph :

Le Minineph est un néphélomètre laser. Les antisérums utilisés sont des Ig humaines monospécifiques (origine non précisée). Les contrôles de qualité correspondent à un pool de sérums humains stabilisés avec des concentrations d'Ig connues (contrôle bas et haut). Les échantillons sont dilués au 1/11 (40 µl sérum + 400 µl de tampon). Un barreau aimanté est placé dans la cuvette contenant l'échantillon dilué, l'anti-Ig (elle-même diluée dans un tampon) est ajoutée ultérieurement et le temps de l'analyse est respectivement dans de 15, 60 et 180 secondes pour les IgG, IgA et IgM. Chaque classe d'Ig est dosée à part.

2- Outils statistiques :

L'étude porte sur 2 méthodes de dosage des Ig sériques de trois séries de sérums, chaque série représente une population bien déterminée. Les données statistiques de base consistent en 3 variables (concentration des IgG, IgA et IgM) mesurée par deux méthodes de dosage différentes. Chaque sérum est caractérisé par deux valeurs, chacune mesurée par une des deux méthodes.

Le test de Shapiro et Wilk a permis de conclure que les distributions des trois populations ne sont pas normales, ce qui nous a amené à utiliser des tests de comparaison non paramétriques. Le test de (Wilcoxon) Mann Whitney a permis de comparer les moyennes de deux échantillons. Pour confirmer les résultats du test de Wilcoxon, on le rapporte à un test Z. Le coefficient Kappa «K» propose de quantifier le degré d'association entre les résultats qualitatifs de deux méthodes. Le calcul du coefficient de corrélation «r» entre ces deux variables a permis de calculer la corrélation entre les deux variables statistiques, et a traduit l'intensité de leur liaison.

Nous avons appliqué la régression linéaire simple pour essayer de trouver une relation numérique entre les résultats des deux méthodes. Lorsque la relation linéaire n'était pas vérifiée, une linéarisation du modèle a été obtenue par une transformation adéquate des données (logarithme, racine carrée)⁽²⁾. La régression linéaire simple a été aussi appliquée pour tester la reproductibilité de chaque méthode. Nous

(2) Cette relation $Minineph = f(Cobas)$ [$Y = aX + b$] [Y : concentrations mesurées par le Minineph ; X : concentrations mesurées par le Cobas] permettrait de prédire les résultats d'une méthode semi-automatique (Minineph) à partir des résultats d'une méthode automatique (Cobas).

avons ainsi appliqué le test «t» de Student sur un groupe de 20 individus appartenant à la population des adultes sains. Chaque sérum a été analysé deux fois par chacun des deux méthodes. Le pourcentage de variabilité donné par le coefficient de détermination ($r^2 = \text{carré du coefficient de corrélation } r$) a été utilisé pour déterminer avec quel pourcentage les résultats d'une méthode expliquaient la variabilité des résultats de l'autre méthode.

Résultats

Les valeurs moyennes des concentrations des immunoglobulines mesurées par turbidimétrie (Cobas) sont supérieures à celles mesurées par néphélométrie (Minineph) chez les trois groupes étudiés et pour tous les paramètres analysés à deux exceptions près (IgA et IgM des patients avec un déficit immunitaire) (Tableau I). Pour ces trois groupes, les deux méthodes donnent des résultats significativement différents d'après le test de Wilcoxon (avec un

Tableau I : Valeurs moyennes et intervalles des concentrations des immunoglobulines mesurées par les deux méthodes

		Cobas	Minineph
Patients avec DI	IgG	3,71 (2,5 - 6,6)	2,82 (0,15 - 5,25)
	IgA	0,21 (0,047 - 1,5)	0,97 (0,35 - 1,12)
	IgM	0,43 (0,015 - 4,3)	0,76 (0,25 - 3,5)
Sujets sans DI	IgG	14,17 (6,38 - 33,46)	9,31 (4,11 - 19,42)
	IgA	2,37 (0,36 - 5,77)	1,56 (0,36 - 2,53)
	IgM	1,33 (0,4 - 5)	0,91 0,4 - 2,15
Adultes	IgG	12,2 (5,6 - 29,18)	8,37 (4,5 - 15)
	IgA	2,37 (0,36 - 4,11)	1,6 (0,36 - 2,78)
	IgM	1,81 (0,8 - 4,65)	1,2 0,66 - 2,27

DI : Déficit immunitaire

Dosage comparatif des immunoglobulines par deux méthodes d'immunoprécipitation

risque $\alpha < 5\%$) (Tableau II, III, IV). Pour les patients atteints de déficits immunitaires, le coefficient de concordance Kappa est proche du zéro indiquant une mauvaise concordance des résultats entre les deux méthodes (Tableau II). Pour les sujets sans déficits immunitaires, le coefficient de concordance kappa est mauvais, faible et modéré, pour IgG, IgMP, et IgAP respectivement (Tableau III), alors que les coefficients de

concordance Kappa sont très proches de «0», traduisant une concordance aléatoire entre les deux méthodes pour les trois paramètres analysés concernant les adultes sains (Tableau IV).

Concernant les patients atteints de déficits immunitaires, la courbe de régression logarithmique montre que 64,1% (r^2) des points suivent relativement bien ce modèle [Minineph = $2,87 * \log_e(\text{Cobas})$] Ce modèle logarithmique indique que

Tableau II- Résultats des tests statistiques des patients atteints de déficits immunitaires

Tests appliquées		Trois paramètres		
		IgG	IgA	IgM
Comparaison de valeurs moyennes	Test Wilcoxon	88	99	394
	Z calculée	5,304	5,198	2,350
Test de concordance	Kappa	0,060	nf	nf
Test de liaison	r^2	0,641	nf	nf
	Modèle	Minineph = $2,87 * \log_e(\text{cobas})$		nf

nf : non fait.

Tableau III- Résultats des tests statistiques des sujets non atteints de déficits immunitaires.

Tests appliquées		Trois paramètres		
		IgG	IgA	IgM
Comparaison de valeurs moyennes	Test Wilcoxon	$\sqrt{32}$	$\sqrt{192}$	$\sqrt{213}$
	Z calculée	5,845	4,300	4,097
Test de concordance	Kappa	0,112	0,481	0,239
Test de liaison	r^2	0,535	0,387	0,4
	Modèle	Minineph = $-2,69 + 3,30$ (Cobas)	Minineph = $0,15 + 0,95$ (Cobas)	Minineph = $0,057 + 0,80$ (Cobas)

Tableau IV- Résultats des tests statistiques des adultes sains.

Tests appliquées		Trois paramètres		
		IgG	IgA	IgM
Comparaison de valeurs moyennes	Test Wilcoxon	0	10	28
	Z calculée	6,153	6,057	5,883
Test de concordance	Kappa	0,060	0,109	0,077
Test de liaison	r^2	0,849	0,928	0,893
	Modèle	Minineph = $1,51 + 0,56$ (Cobas)	Minineph = $0,31 + 0,51$ (Cobas)	Minineph = $0,44 + 0,41$ (Cobas)

le Minineph a été beaucoup plus sensible aux faibles valeurs (< 2 g/L) que le Cobas (Figure 1).

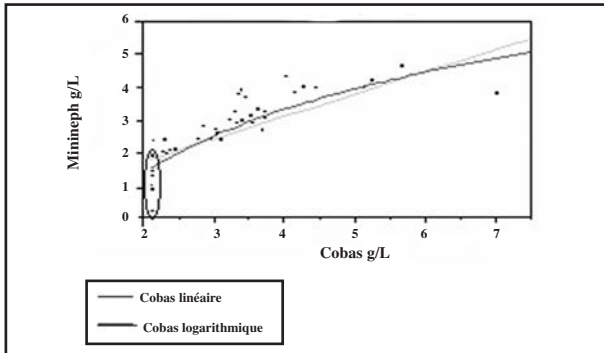
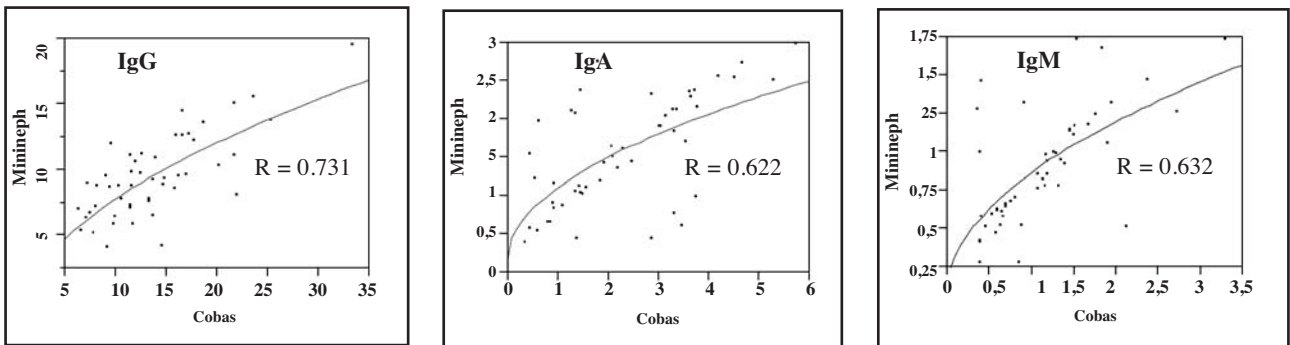


Figure 1- Linéarisation du modèle de la relation numérique entre les valeurs des IgG fournies par les deux méthodes chez les patients atteints de déficits immunitaires (Courbe de régression linéaire de Minineph en fonction du log de Cobas).

La modélisation des résultats du Minineph en fonction de celles du Cobas n'a pas pu être appliquée pour les IgAP et IgMP, car leurs concentrations sont agrégativement réparties en groupes.

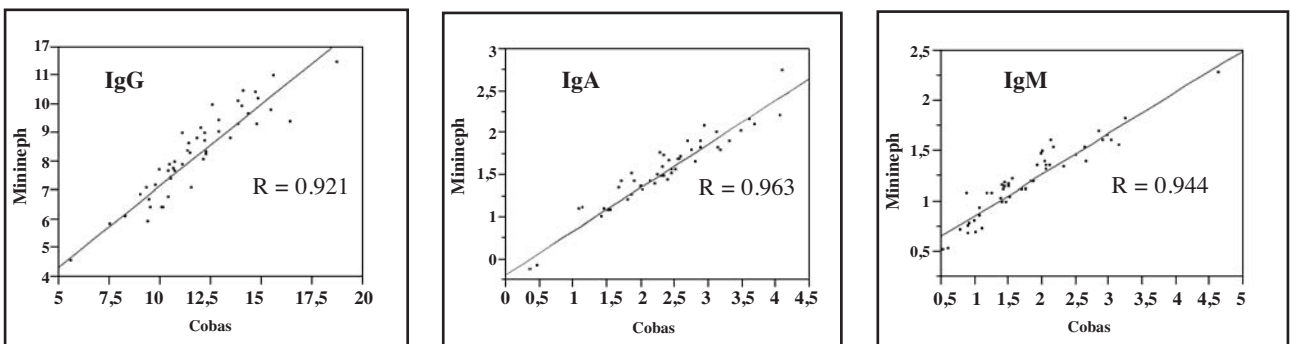
Les coefficients de détermination (r^2) entre les deux méthodes sont faibles à moyens pour les trois paramètres dosés (IgG, IgAP, et IgMP) chez les sujets non atteints de déficits immunitaires congénitaux, ce qui traduit que la majorité des valeurs est moyennement prédite par les modèles de courbes de régression (Figure 2). Suivant les résultats des coefficients de corrélation, on distingue une corrélation moyenne entre ces deux méthodes pour les trois paramètres chez cette population.

Chez les adultes sains, les coefficients de détermination (r^2) sont très élevés (proche de 1) comme en témoignent les modèles des courbes de régression (Figure 3). Selon



$$\text{Minineph} = -2.69 + 3.30 * \sqrt{\text{Cobas}} \quad \text{Minineph} = 0.15 + 0.95 * \sqrt{\text{Cobas}} \quad \text{Minineph} = 0.057 + 0.80 * \sqrt{\text{Cobas}}$$

Figure 2- Linéarisation du modèle de la relation numérique entre les valeurs fournies par les deux méthodes chez les sujets non atteints de déficits immunitaires (Courbe de régression linéaire de Minineph en fonction de la racine carrée de Cobas)



$$\text{Minineph} = 1.51 + 0.56 (\text{Cobas}) \quad \text{Minineph} = 0.31 + 0.51 (\text{Cobas}) \quad \text{Minineph} = 0.44 + 0.41(\text{Cobas})$$

Figure 3- Linéarisation du modèle de la relation numérique entre les valeurs fournies par les deux méthodes chez les adultes sains (Courbe de régression linéaire des valeurs Minineph en fonction de celles de Cobas)

les résultats des coefficients de corrélation, on distingue une bonne corrélation entre ces deux méthodes pour les trois paramètres IgG, IgA et IgM chez cette population.

Discussion

Des études de comparaison entre néphélométrie et turbidimétrie ont été réalisées pour le dosage de différents paramètres. Alors que plusieurs auteurs (2-4, 9,10) ont trouvé des résultats assez comparables, d'autres (11) ont noté une différence significative entre les deux méthodes, avec parfois des résultats faiblement concordants.

Les tests de Wilcoxon ont montré que les résultats des deux méthodes étaient significativement différents. Ces différences concernent les trois paramètres analysés (IgG, IgA, et IgM), et intéressent l'ensemble des groupes étudiés. Concernant l'analyse de concordance entre les deux méthodes, le coefficient Kappa était très faible chez les patients atteints de déficits immunitaires ($K_{IgG} = 0.06$), traduisant une mauvaise concordance entre les deux séries de résultats (Tableau II). Le modèle de la courbe de régression logarithmique montre une meilleure linéarité que celle de la courbe de régression linéaire (Figure 1).

Pour les groupes de sujets sans déficits immunitaires, les résultats des IgG, IgMP, et IgAP ont montré des concordances respectivement, mauvaise ($K = 0.112$), faible ($K = 0,239$) et moyenne ($K = 0,48$) (Tableau III). Les courbes de régression (Figure 2) décrivant les valeurs fournies par le Minineph en fonction de la racine carrée des valeurs fournies par Cobas donnent des corrélations moyennes à cause d'une forte dispersion des points.

D'une manière générale, la relation entre les valeurs fournies par le Minineph et le Cobas n'a pas été linéaire respectivement chez les patients avec et les sujets sans déficits immunitaires, cela peut être dû en partie à l'hétérogénéité d'âges des individus de ces deux groupes. En effet les âges varient de 1 à 24 ans dans ces deux groupes ce qui pourrait être à l'origine de la forte dispersion des résultats issus des deux méthodes.

Les plus mauvaises concordances parmi les groupes étudiés ont été cependant trouvées chez les adultes, chez qui les concentrations en Ig sont les plus élevées

(Tableau IV, Figure 3). Certains auteurs (2- 4, 9) ont rapporté une diminution de la concordance des résultats entre les deux méthodes avec une valeur pour un même échantillon plus faible pour le Minineph, principalement pour les concentrations élevées.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de ces mauvaises concordances. Ainsi, Lolekha et al. (3) bien qu'ayant utilisé un même calibre pour les deux méthodes, retrouvent des résultats significativement différents. Thuillier et al (10) note que malgré la préparation du standard international CRM 470 et les recommandations pour son utilisation, les résultats des différents systèmes analytiques ne sont pas transférables, sauf pour l'albumine. La différence entre les modes opératoires des deux méthodes (le facteur de dilution qui affecte la linéarité de la courbe d'étalonnage, l'avidité des anticorps utilisés, l'automatisation, la qualité de l'échantillon «hémolyse, ictère, hyperlipidémie»), pose un problème de standardisation des méthodes (10,12). Ainsi, la procédure d'étalonnage des coffrets commercialisés par les différentes sociétés doit être améliorée et les anticorps utilisés comme réactifs doivent être plus homogènes (dirigés contre des épitopes publiques retrouvés chez tous les sujets) (10). Les longueurs d'ondes des mesures primaires et secondaires, la température de réaction, le point final du signal, la composition des tampons de réaction, etc... constituent autant de paramètres analytiques qui restent à standardisés (10). De plus, le problème de l'excès d'antigène qui peut aboutir à un risque de sous-estimation des concentrations (12), reste l'un des pièges majeurs de la précipitation en milieu liquide. Ce fait expliquerait les concentrations moyennes moins élevées retrouvées par néphélométrie (Tableau I), puisque dans notre travail, seule la turbidimétrie utilise l'ajout d'antigène. Le fait que seuls les déficits immunitaires présentent une valeur moyenne des IgA et IgM mesurées par le Cobas inférieure à celle mesurées par le Minineph (Tableau I), est dû au seuil inférieur de détection plus faible du premier par rapport au second (0,047 g/l versus 0,35 g/l) pour les IgAP et (0,015 g/l versus 0,25 g/l) pour les IgMP. L'effet «automate et non méthode» auquel conclut Thuillier et al. dans

leur article original (10) rend bien compte d'un côté du fait que les méthodes néphélométriques et turbidimétriques présentent des performances analytiques comparables. D'un autre côté, le rôle primordial de la standardisation est confirmé, puisque bien que le principe de base de chaque méthode soit le même pour les automates utilisant une même méthode (néphélomètre ou turbidimètre), à chaque automate correspond une procédure standard qui lui est propre.

A l'ensemble de ces facteurs de standardisation, s'ajoute un biais majeur dans notre travail et qui correspond à la comparaison entre un automate (Cobas) et un semi-automate (Minineph), ce qui accentue encore plus les discordances entre les résultats.

Seules les valeurs du groupe des adultes sains montrent une bonne corrélation entre les deux méthodes représentée par les résultats du coefficient de corrélation et du coefficient de détermination très proche de «1» (Tableau IV, Figure 3), ce qui signifie que ces méthodes donnent des résultats fortement proportionnels autour d'un certain coefficient égal à la pente de chaque modèle linéaire, garantissant la possibilité de correction entre les deux séries de résultats. Il n'en demeure pas moins que la transférabilité directe des résultats est à proscrire, comme sus cité (10).

D'un point de vue pratique, les limites de détection très faibles de la turbidimétrie (Cobas), 0,047 g/L et 0,013 g/L respectivement pour les IgAP et IgMP, ne présentent pas un intérêt particulier quant au diagnostic des déficits immunitaires humoraux primitifs, puisqu'ils sont très en dessous des concentrations normales à l'âge où le diagnostic de tels déficits est fait (> 6 mois). Un gain en temps d'analyse des échantillons est réalisé en utilisant le Cobas, si toutefois on a à faire à un grand nombre d'échantillons. Par contre, le Minineph reste plus rentable économiquement.

Conclusion

Les méthodes néphélométriques et turbidimétriques présentent des performances analytiques comparables, l'absence d'une méthode de référence laisse la porte ouverte à une utilisation au choix de l'une des deux méthodes. L'une des contraintes majeures de notre travail a été la rareté de références concernant l'étude comparative du dosage des

immunoglobulines par ces deux méthodes. D'un autre côté, les études citées concernent des comparaisons entre des automates, alors que dans notre travail nous avons comparé des résultats fournis par un automate (Cobas) et un semi automate (Minineph).

L'étude comparative du dosage des immunoglobulines par la turbidimétrie et la néphélométrie trouve des résultats faiblement concordants. Ces différences statistiquement significatives sont d'autant plus importantes que les concentrations sont élevées. Plusieurs facteurs seraient à l'origine de ces résultats, tel que le facteur de dilution, la nature des tampons, l'avidité des anticorps utilisés, le problème d'excès d'antigène, etc...Les conclusions des études comparatives rapportées dans la littérature tout comme la notre s'accordent sur la nécessité d'une meilleure standardisation des méthodes, afin de réduire ces différences.

Références

- 1- Kazatchkine M, Mouthon L, Kaveri SV. Effets immunomodulateurs des immunoglobulines intraveineuses. *Ann Med Interne* 2000;151 (Suppl.1):1S13-1S18.
- 2- Robert WL, Moulton L, Law TC, et al. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. *Clin Chem* 2001; 47: 418-25.
- 3- Lolehka PH, Chittamma A, Roberts WL, Sritara P, Cheepudomwif S, Suriyawongpaisal G. Comparative study of two automated high-sensitivity C-reactive protein methods in a large population. *Clin Biochem* 2005; 38:31-5.
- 4- Dominici R, Laraschi P, and Franzini C. Measurement of C-reactive protein: two high sensitivity methods compared. *J Clin Lab Anal* 2004; 18: 280-4.
- 5- Pepys M. C-reactive protein fifty years on. *Lancet* 1981; 1:653-6.
- 6- Tracy RP, Kuller LH, Psaty BM, Cushman M, Meilahn EN, Smith N. C-reactive protein and incidence of cardiovascular disease in older women: the Rural Health Promotion Project and the Cardiovascular Health Study. *Circulation* 1996; 93:622- 8.
- 7- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331:417- 24

8- Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease : application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107: 499-511.

9- Denham E, Mohn B, Tucker L, Lun A, Cleave P, Boswell DR. Evaluation of immunoturbidimetric specific protein methods using the Architect ci8200: comparison with immunonephelometry. *Ann Clin Biochem* 2007; 44: 529-36.

10- Thuillier F, Demarquilly C, Szymanowicz A, Gaillard C, Boniface M, Braidy C et al. Turbidimétrie ou néphélémétrie : quel choix pour les dosages de l'albumine, l'ApoA, la CRP, l'haptoglobine, l'IgM et la transthyréline ? Turbidimétrie ou néphélémétrie : quel choix pour les dosages de l'albumine, l'ApoA, la CRP, l'haptoglobine, l'IgM et la transthyréline ? *Annales de Biol Clin* 2008 ; 66 (1) : 63-78.

11- Maggiori U, Cristol JP, Canaud B, Dupuy A, Formica M, Pozzato MA, et al. Comparison of 3 automated assays for C-reactive protein in end-stage renal disease: Clinical and epidemiological implications. *J Clin Lab Med* 2005; 6: 305-8.

12- Hay F C., Westwood OM.R, Nelso PN. Antibody interactions with antigens in *Practical Immunology*. Blackwell Science. Fourth edition 2002; pp 71 -115.

Mise au point d'un test de dépistage de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne par cytométrie en flux : à propos de 9 cas

S. FÉKI¹,
N. SOUIHI¹,
Z. BEN REKAYA¹,
L. BERRAÏES¹,
B. MEDDEB²,
M. MANSOUR³,
N. KHALFALLAH⁴,
A. LAATIRI⁵,
H. OMRI⁵,
M. MEDHAFFAR⁶,
T. SOUISSI⁶,
T. BEN OTHMAN⁷,
K. BOUKEF¹,
F. JENHANI¹.

Résumé : L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est une maladie rare dans le monde et dont les données épidémiologiques manquent en Tunisie. Dans ce travail, nous présentons une méthode rapide et peu coûteuse pour le diagnostic de l'HPN par cytométrie en flux (CMF) que nous avons mis au point dans notre laboratoire, en nous inspirant des divers travaux décrits dans la littérature tout en les adaptant à la situation économique de notre pays. Notre technique se base sur deux types de cellules du sang périphérique - les monocytes et les granulocytes - qui expriment, respectivement, les protéines GPI-dépendantes CD14 et CD16. Une stratégie de fenêtrage et d'identification des clones HPN a été basée sur la mesure du pourcentage de cellules CD14- sur la population des cellules CD33^{bright} au niveau de la fenêtre des monocytes ; et la mesure du pourcentage de cellules CD16- sur la population des cellules CD13^{bright} au niveau de la fenêtre des granulocytes. Grâce à cette technique, nous avons été en mesure de détecter un déficit en ancre GPI pour 9 patients suspectés de HPN mais pour qui le test de Ham-Dacie était négatif, confirmant ainsi la supériorité de la cytométrie en flux par rapport au test de Ham Dacie dans le diagnostic de l'HPN et contribuant à l'établissement des premières données épidémiologiques de cette maladie en Tunisie.

Mots clés : hémoglobinurie paroxystique nocturne - diagnostic -cytométrie en flux Tunisie.

Abstract : Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (PNH) is a rare disease in the world and which epidemiologic data lack in Tunisia. In this study, we present a rapid and low cost method for PNH diagnosis by flow cytometry that we adjusted in our laboratory, getting inspired by the several works described in the literature, adapting them to the economic reality of our country. Our technique is based on two peripheral blood cells - monocytes and granulocytes - which respectively express the GPI-dependant proteins CD14 and CD16. Gating and PNH clone identification strategies was based on the CD14- cell percentage measure among CD33^{bright} cell population in the monocytes gate; and the CD16-cell percentage measure among CD13^{bright} cell population in the granulocytes gate. Owing to this technique, we were able to detect a GPI anchor deficiency for 9 PNH suspected patients for whom the Ham-Dacie test was negative, contributing then to the establishment of the first epidemiologic data for this disease in Tunisia.

Key words : paroxysmal nocturnal haemoglobinuria - diagnosis -flow cytometry - Tunisia.

¹ Centre National de Transfusion Sanguine, Tunis

² Hôpital Aziza Othmana, Tunis

³ Hôpital Militaire, Tunis

⁴ Hôpital Charles Nicolle, Tunis

⁵ Hôpital Farhat Hached, Sousse

⁶ Hôpital Hédi Chaker, Sfax

⁷ Centre National de Greffe de Moelle Osseuse, Tunis.

Introduction

L'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) est une pathologie rare (1). Sa prévalence dans le monde, est estimée à des valeurs situées entre 1 et 10 par million selon les régions (2). En France, par exemple, sa fréquence est évaluée à 1,5 cas par million d'habitants et l'incidence se situe autour de 8 nouveaux cas par an (3). En Tunisie, les données épidémiologiques concernant cette maladie sont pratiquement inexistantes.

Cette maladie est considérée, actuellement, comme une maladie de la cellule souche hématopoïétique, de nature clonale (4). Elle est provoquée par une mutation somatique au niveau du gène GPI-A (5) indispensable à la synthèse de la molécule de glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), molécule d'ancrage membranaire de nombreuses protéines telles que le CD14, CD16, CD55 et CD59 (6, 7). Au cours de cette maladie, le déficit en protéines régulatrices du complément à la surface des globules rouges les rend sensibles à son action et favorise l'hémolyse intra vasculaire qui est la manifestation clinique fondamentale de la maladie (7). Ces deux molécules sont le CD55 ou DAF (decay accelerating factor) et le CD59 ou MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis), molécules qui empêchent normalement l'assemblage final du complexe d'attaque membranaire (CAM) (8).

L'HPN est, classiquement, diagnostiquée par le test de Ham-Dacie qui est basé sur l'hémolyse dépendante du complément présent dans un sérum humain frais acidifié (9, 10). Mais, depuis une vingtaine d'année, le développement de la cytométrie en flux (CMF) a permis la mise au point de techniques immunophénotypiques permettant d'évaluer le degré d'expression de protéines GPI-dépendantes, dont l'expression est déficiente à la surface des hématies (CD55 et CD59) ou des leucocytes (CD14 et CD16) au cours de l'HPN (11, 12) et, très rapidement, ces techniques sont devenues les méthodes de choix dans le diagnostic de l'HPN (13, 14, 15). En effet, en plus d'être relativement simples, elles sont aussi sensibles du fait qu'elles peuvent détecter de petits clones HPN, de l'ordre de 5%, ce qui n'est pas possible avec les méthodologies dépendantes du Complément (16). Par

ailleurs, ces méthodes immunophénotypiques sont spécifiques puisque le déficit concomitant de plusieurs molécules GPI-dépendantes n'a été décrit que dans les HPN : HPN de novo ou HPN survenant à la suite d'une aplasie médullaire (17).

Dans ce travail, nous présentons une méthode rapide et peu coûteuse pour le diagnostic de l'HPN par CMF que nous avons mis au point dans notre laboratoire.

Matériels et méthodes

Matériel

Patients

Notre étude s'étale sur la période 2002-2005 et concerne 32 patients pour lesquels la recherche de clones HPN a été demandée en raison d'une suspicion d'HPN dans 77,8% des cas suite à la présence de signes d'hémolyse et de pancytopenie et, dans 22,2% des cas, dans le cadre du bilan biologique d'une aplasie médullaire. Un test de Ham-Dacie avait été effectué et le résultat avait été négatif pour la totalité des patients qui, pour une proportion d'entre eux inconnue de manière précise mais non négligeable, ont reçu une transfusion de globules rouges. L'âge moyen était de 34,3 ans, avec des extrêmes de 2 à 71 ans et les 32 patients se subdivisaient en 17 hommes et 15 femmes, avec un sexe ratio (H/F) égal à 1,13. Des échantillons sanguins ont été prélevés sur EDTA et envoyés par les services d'hématologie clinique ou les laboratoires de sept institutions hospitalières situées dans des régions différentes de la Tunisie.

Réactifs

Nous avons utilisé des anticorps monoclonaux de Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS) : Contrôles isotypiques (IgG1 FITC* et IgG1 PE** de souris), CD45 FITC, CD14 FITC, CD33 PE, CD16 FITC et CD13 PE. Nous avons également utilisé les produits CellWash, (BDIS), Chlorure d'ammonium (Sigma) et Paraformaldéhyde (Sigma).

* FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

** PE : Phycoérythrine

Méthode

Marquage cellulaire

Le principe de notre technique est basé sur des combinaisons de deux marqueurs : une protéine non GPI-dépendante/une protéine GPI dépendante. Le marqueur non GPI-dépendant permet d'identifier la population cible (CD13 pour les granulocytes et CD33 pour les monocytes), tandis que le marqueur GPI-dépendant (CD16 pour les granulocytes et CD14 pour les monocytes) permet de mesurer le degré d'expression de la protéine GPI-dépendante à la surface cellulaire. Nous avons donc utilisé la combinaison CD13/CD16 pour identifier les granulocytes HPN et la combinaison CD33/CD14 pour identifier les monocytes HPN.

Réaction immunologique

La méthode utilisée est celle préconisée par le fournisseur des anticorps monoclonaux (BDIS) pour un marquage de surfaces cellulaires sur un échantillon de sang total prélevé sur EDTA. Pour chaque patient, nous avons préparé quatre tubes avec les marquages suivants : IgG1FITC/IgG1PE ; CD45FITC ; CD14FITC/CD33PE ; CD16FITC/CD13PE. Les anticorps ont été mis à incuber avec l'échantillon de sang pendant 15 min ; après un lavage de 5 min, une lyse des hématies a été réalisée en 15 min, avec une solution à base de chlorure d'ammonium ; enfin, après deux lavages de 5 min, les cellules ont été fixées dans le paraformaldéhyde puis analysées sur un cytomètre FacsCaliburTM (BDIS) muni du logiciel CellQuest ProTM.

Stratégie de fenêtrage

Les populations de monocytes et de granulocytes ont été délimitées sur la base de leurs caractéristiques de diffusion de la lumière, c'est-à-dire sur un diagramme Taille (FSC) / Granularité (SSC).

Enfin, des diagrammes biparamétriques CD14 FITC / CD33 PE et CD16 FITC / CD13 PE ont respectivement été conditionnés sur les fenêtres des monocytes et des granulocytes.

Stratégie d'identification des clones HPN :

Les monocytes normaux expriment aussi bien le CD33 que le CD14 (14), alors que les monocytes déficients en ancre GPI expriment le CD33 mais pas le CD14. Par conséquent, pour un patient donné, les monocytes nor-

maux apparaîtront tous double-positifs CD33+CD14+ tandis que les monocytes HPN apparaîtront simple-positifs CD33+CD14- (figure 1). De la même manière, les granulocytes normaux seront tous double-positifs CD13+CD16+ tandis que les granulocytes HPN apparaîtront simple-positifs CD13+CD16-(figure 2).

Mesure de la proportion des clones HPN au sein des monocytes et des granulocytes :

Il nous est très vite apparu que, du fait que notre stratégie de fenêtrage est relativement imprécise, certaines cellules non monocytaires (lymphocytes, granulocytes) se retrouvent dans la fenêtre des monocytes, alors que certaines cellules non granulocytaires (des monocytes essentiellement) se retrouvent dans la fenêtre des granulocytes ; ceci, bien entendu, serait préjudiciable à la précision de notre analyse en faussant les pourcentages cellulaires à mesurer pour les clones HPN qui devrait se faire parmi des monocytes purs ou des granulocytes purs. Cependant, cet obstacle est aisément contourné aussi bien pour les monocytes que pour les granulocytes. En effet, il est apparu, dans notre système d'analyse - c'est-à-dire avec des anticorps tous de la même marque et ayant tous subi une exposition au soleil à peu près équivalente - que les monocytes marqués pour leur CD33 émettent une fluorescence d'intensité élevée, tandis que lorsqu'ils sont marqués pour leur CD13, ils émettent une fluorescence d'intensité relativement faible ; ils sont alors dits CD33^{bright}CD13^{dim}.

Similairement, les granulocytes, quant à eux, expriment une densité antigénique faible pour leur CD33 et forte pour leur CD13 ; ils sont alors dits CD33^{dim}CD13^{bright}. De plus, les lymphocytes sont, de toute façon, négatifs pour ces quatre marqueurs myéloïdes. Par conséquent, pour évaluer la proportion du clone HPN au sein des monocytes, il suffira de mesurer le pourcentage de cellules CD14- sur la population des cellules CD33^{bright} ; pour les granulocytes, il suffira de mesurer le pourcentage de cellules CD16 - sur la population des cellules CD13^{bright}.

Résultats

Nous avons fait le choix, dès le départ, de travailler en

double-marquages seulement, avec des fluorochromes du type isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou phycoerythrine (PE). Nous avons aussi fait le choix de n'utiliser le CD45 qu'une seule fois par patient, dans un tube à part. La délimitation des fenêtres pour les monocytes et les granuleux dans les diagrammes FSC/SSC était aisée

(figures 1 et 2).

Le conditionnement des diagrammes biparamétriques CD14FITC/CD33PE et CD16FITC/CD13PE respectivement sur les fenêtres des monocytes et des granulocytes a permis, de manière aisée, d'observer la présence d'un clone de cellules déficitaires en ancre GPI, c'est-

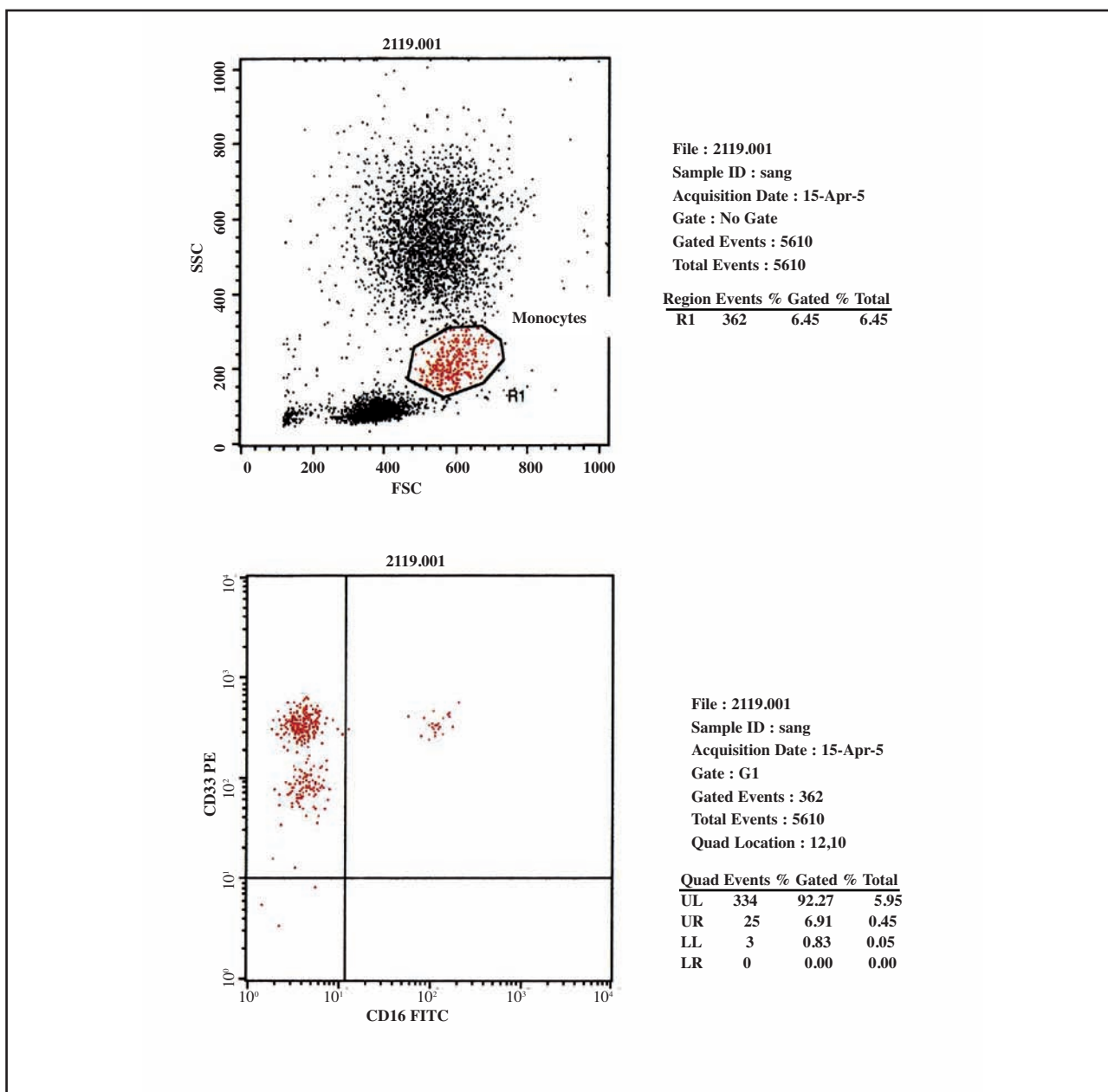


Figure 1 : Exemple illustrant l'identification d'un clone HPN au sein des monocytes

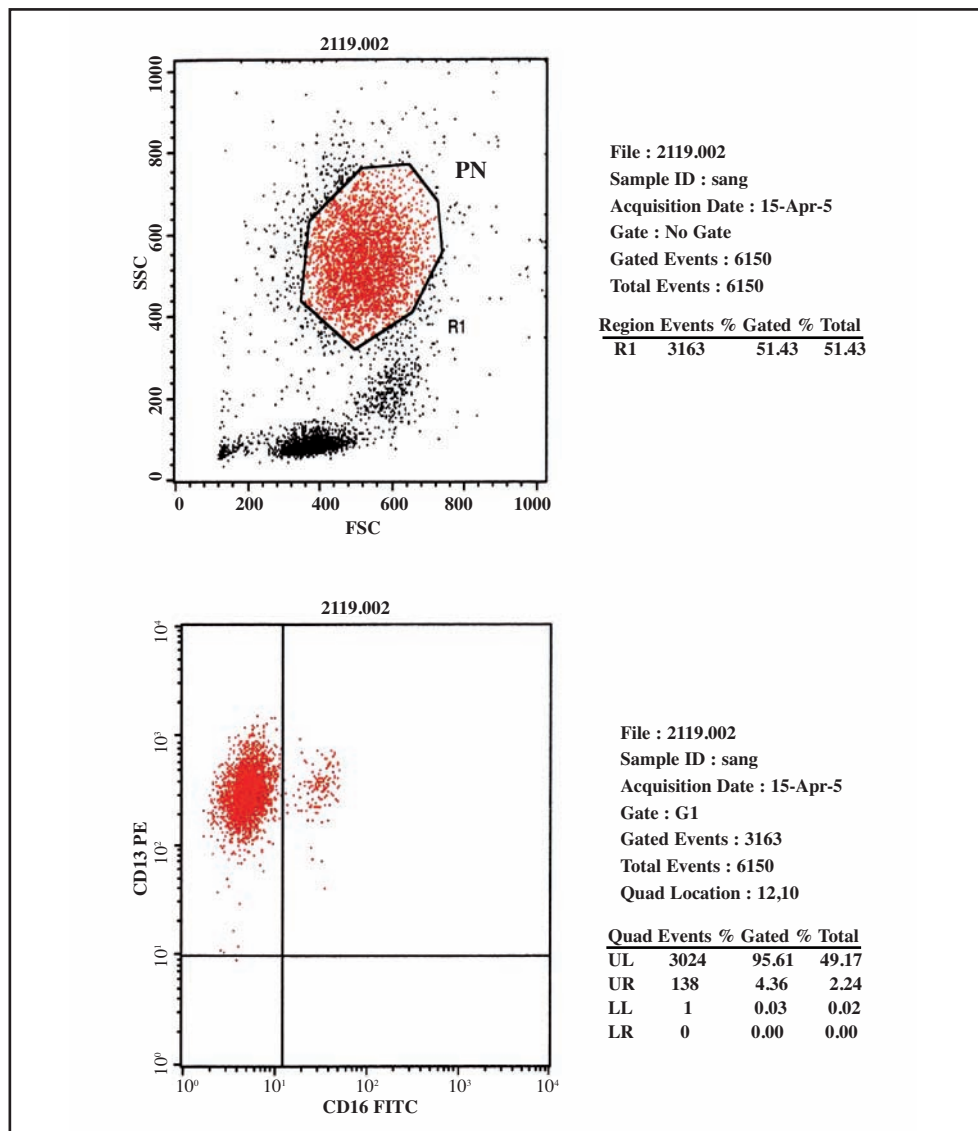


Figure 2 : Exemple illustrant l'identification d'un clone HPN au sein des granulocytes

dire CD33+CD14- dans la fenêtre des monocytes et CD13+CD16- dans la fenêtre des granulocytes, pour 9 patients suspectés de HPN mais pour qui le test de Ham-Dacie était négatif.

Par la suite, le traçage d'une fenêtre sur la totalité des cellules CD33bright et une autre sur la totalité des cellules CD13bright a permis, également de manière aisée, de déterminer le pourcentage exact du clone HPN parmi les monocytes (CD33brightCD14-) et parmi les granulocytes (CD13brightCD16-).

cytes (CD13brightCD16-).

Notre méthode a permis, tout à fait aisément, de révéler l'existence d'un clone HPN chez 9 patients (28,1% des échantillons reçus) alors que leur test de Ham-Dacie était négatif, ce qui revient à 2,25 nouveaux cas de HPN diagnostiqués par an (Figure 3). Pour 22,2% de ces patients HPN positifs, la recherche du clone HPN a été réalisée dans le cadre d'un bilan étiologique d'une aplasie médullaire.

Ces 9 patients se subdivisent en 4 hommes et 5 femmes

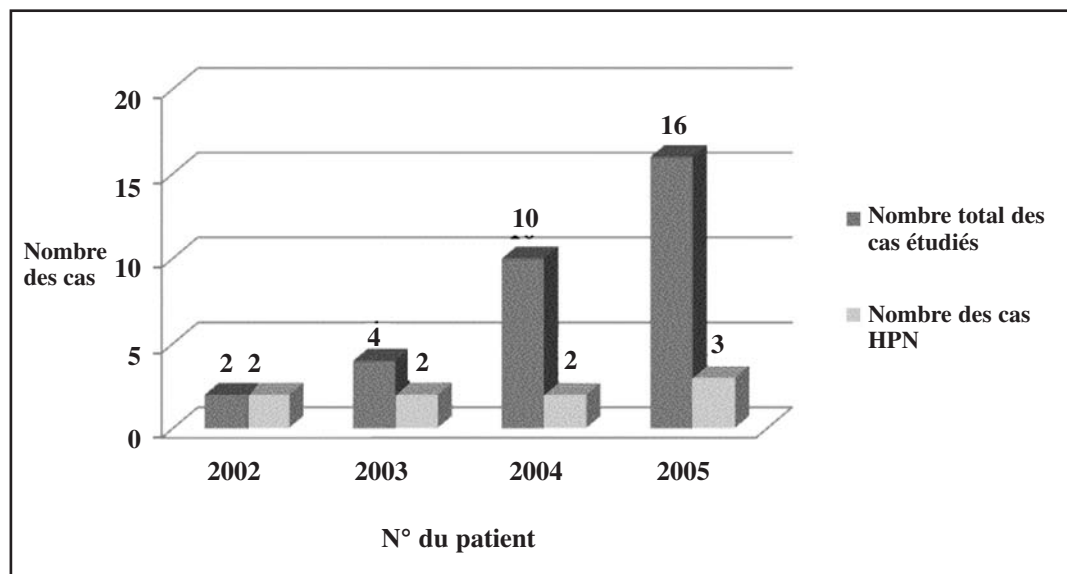


Figure 3 : Répartition par année des cas de HPN diagnostiqués.

(sexe ratio égal à 0,8) et la tranche d'âge la plus touchée est celle des 21-30 ans qui a concerné, à elle seule, 44,5% des cas de HPN diagnostiqués (Figure 4) ; les autres tranches d'âge étaient moins touchées, avec zéro cas diagnostiqué pour la tranche des enfants de moins de 10 ans. 100% des patients présentaient une anémie et une thrombopénie. En effet, leurs taux d'hémoglobine (Figure 5) sont largement en-dessous de la limite inférieure de l'intervalle des valeurs usuelles et, dans certains cas même, ce taux atteint des valeurs dramatiquement basses (1,3 g/dl pour le patient 5 et 4,7 g/dl pour le patient 4) ; pour la majorité de ces malades, l'anémie est normochrome normocytaire. Quant à leurs taux de plaquettes, ils sont aussi tous inférieurs aux valeurs usuelles, avec même des valeurs inférieures à $50.10^3 /\mu\text{l}$ pour 5 sur 9 des patients (Figure 6).

Concernant le taux de leucocytes dans le sang de ces patients, il était diminué pour 5 sur 9 des cas, mais même les 4 cas qui étaient à l'intérieur de l'intervalle de référence avaient des valeurs très proches de la limite inférieure de cet intervalle (Figure 7). 33,3% des patients étaient en même temps neutropéniques et lymphopéniques ; cependant, l'ensemble des patients a présenté des valeurs toutes oscillant autour de la limite inférieure

de l'intervalle de référence, avec, par exemple pour les lymphocytes, des extrêmes allant de 900 à 1 800 lymphocytes $/\mu\text{l}$ (Figure 8).

Comme complication de l'HPN, un seul cas a présenté des thromboses artérielles et veineuses digestives.

La profondeur du déficit en ancre GPI a été mesurée par le pourcentage de cellules $\text{CD33}^{\text{bright}}\text{CD14}^-$ en comparaison avec les cellules $\text{CD13}^{\text{bright}}\text{CD16}^-$. Les deux populations cellulaires ont présenté un déficit équivalent pour chacun des neuf patients (donnée non montrée). 5 sur 9 des patients (55,6%) ont présenté une population $\text{CD33}^{\text{bright}}\text{CD14}^-$ supérieure à 80%, alors que 2 sur 9 (22,2%) avaient une population $\text{CD33}^{\text{bright}}\text{CD14}^-$ inférieure à 50% par rapport aux $\text{CD33}^{\text{bright}}$ totaux (Figure 9).

Discussion

Dans ce travail, nous présentons une méthode de diagnostic de l'HPN par cytométrie en flux, méthode que nous avons mis au point dans notre laboratoire en nous inspirant des divers travaux décrits dans la littérature (8, 11, 12, 13) tout en les adaptant à la situation économique de notre pays. Le principe de base était de veiller à utiliser deux anticorps monoclonaux différents, dirigés

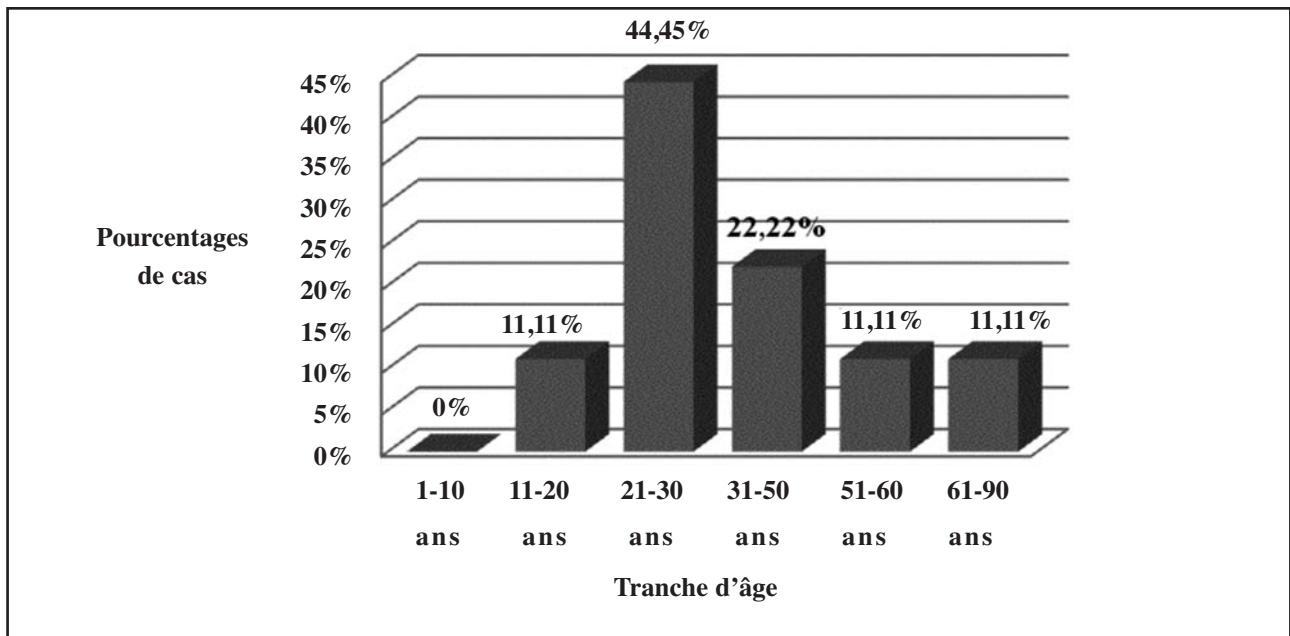


Figure 4 : Répartition par âge des cas de HPN diagnostiqués.

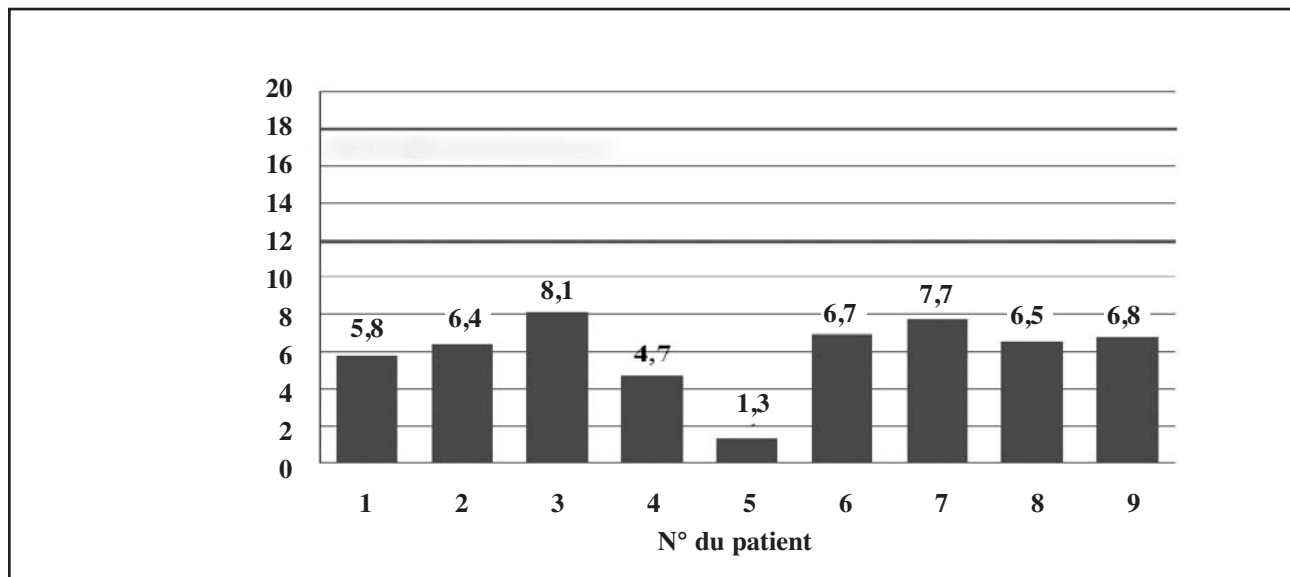


Figure 5 : Taux d'hémoglobine chez les neuf patients HPN (les barres représentent l'intervalle des valeurs usuelles)

contre deux protéines GPI-dépendantes situées sur au moins deux lignées cellulaires différentes (17).

Dès le départ, nous avons fait le choix de travailler sur des leucocytes plutôt que sur des hématies car, chez les patients atteints de HPN, la durée de vie des hématies

est réduite en raison de l'hémolyse intra vasculaire (16). Nous aurions pu ainsi cibler notre recherche sur les molécules CD55 et CD59 qui existent aussi à la surface des monocytes et des granulocytes ; cependant, pour nous, investir dans des anticorps monoclonaux qui ne

seraient utilisés que pour le diagnostic de l'HPN alors qu'ils coûtent chers et que l'HPN est une pathologie relativement rare, nous a paru inapproprié. Par contre, il nous a semblé judicieux d'utiliser les anticorps CD14 et CD16 qui font partie d'ores et déjà de notre panel d'immunophénotypage leucocytaire comme dans tout laboratoire de cytométrie en flux clinique ; de cette façon, même si l'HPN est une maladie très rare, ils sont rapidement rentabilisés avec d'autres explorations.

De plus, nous avons fait le choix, dès le départ (c'est-à-dire en 2002), de travailler seulement en double marquages avec FITC et Phycoerythrine alors que nous étions en mesure de faire jusqu'à des quadruple-marquages avec un nombre de tubes minimum, mais cela nous aurait coûté plus cher ; d'abord, parce qu'il aurait fallu utiliser deux fois plus de CD45 et, ensuite, parce qu'il aurait fallu avoir recours à des fluorochromes plus chers.

notre population cible.

De cette façon, en un temps relativement court, nous avons été en mesure de détecter un déficit en ancre GPI pour 9 patients suspectés de HPN mais pour qui le test de Ham-Dacie était négatif, confirmant ainsi la supériorité de la cytométrie en flux par rapport au test de Ham Dacie dans le diagnostic de l'HPN (13). Cette fausse négativité du test de Ham-Dacie est vraisemblablement due au fait que ces patients avaient été récemment transfusés (18). En effet, les tests d'hémolyse utilisant la sensibilité des érythrocytes au pH (test de Ham et Dacie) ou au sucrose sont relativement faciles à mettre en œuvre puisqu'ils ne nécessitent pas de matériel sophistiqué ; ils permettent aussi un diagnostic rapide et fiable mais, tout ceci, à condition que la population érythrocytaire anormale soit suffisamment importante, ce qui n'est pas le cas à la suite d'une transfusion de globules rouges (19).

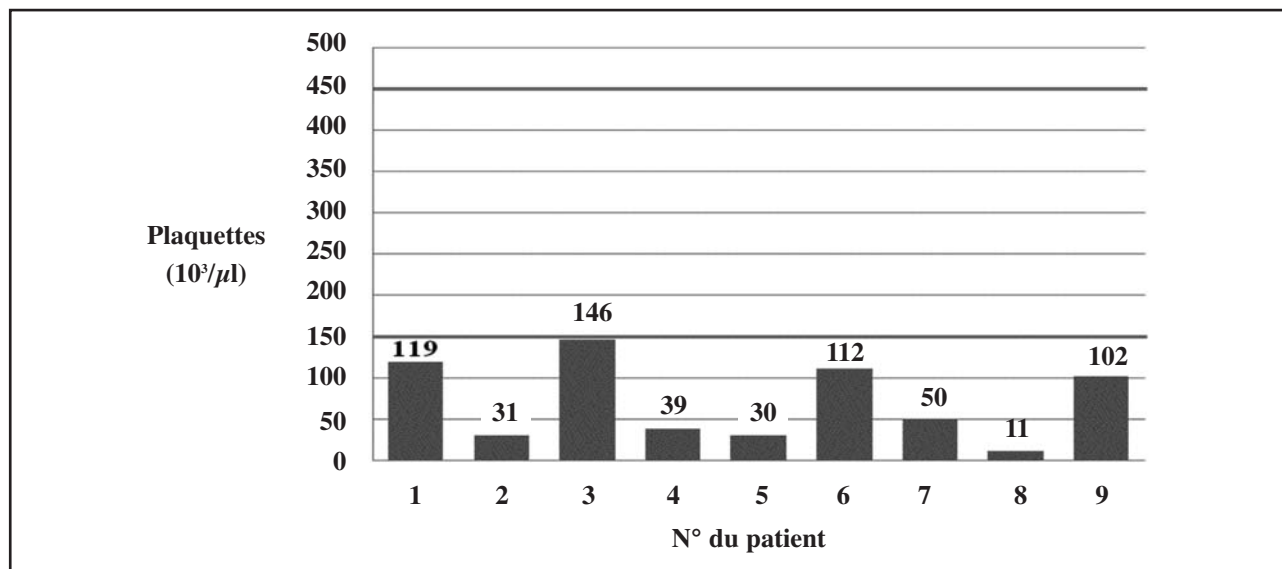


Figure 6 : Taux des plaquettes chez les neuf patients HPN (les barres représentent l'intervalle des valeurs usuelles)

Ainsi, l'utilisation du marqueur pan leucocytaire CD45 dans un seul tube a permis, à faible coût, de vérifier que nous avons bien des leucocytes, d'évaluer leur proportion et, en nous basant sur le fait que tous les tubes ont été travaillés de la même façon, d'exclure, lorsque le cas se présente, les débris cellulaires et les plaquettes de

A l'opposé, notre méthode de cytométrie en flux est basée sur l'expression de molécules GPI-dépendante à la surface de leucocytes et non des hématies, expliquant ainsi sa performance intacte après toute transfusion de globules rouges.

Les données bibliographiques concernant l'HPN en

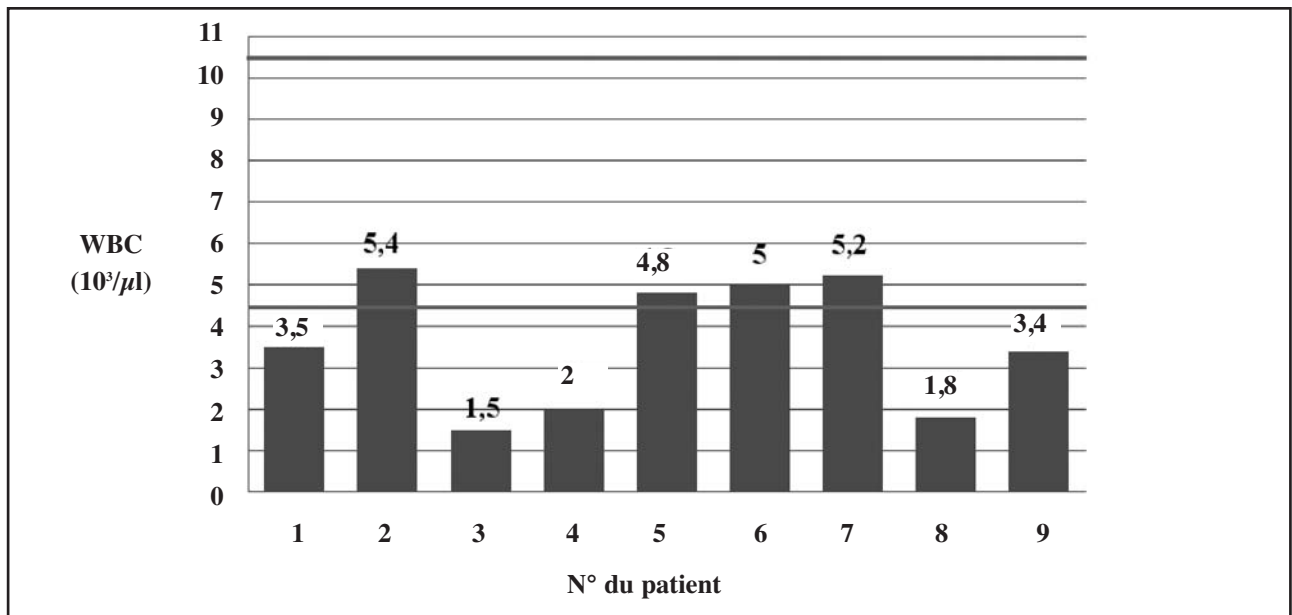


Figure 7 : Taux des leucocytes chez les neuf patients HPN (les barres représentent l'intervalle des valeurs usuelles)

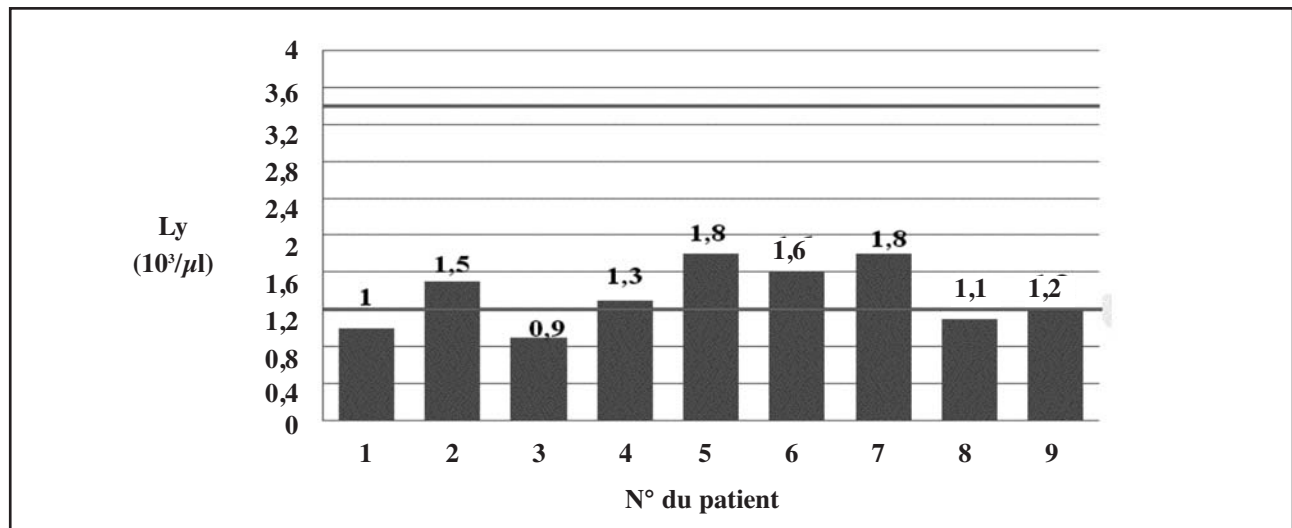


Figure 8 : Taux des lymphocytes chez les neuf patients HPN (les barres représentent l'intervalle des valeurs usuelles)

Tunisie sont quasi inexistantes car la maladie est très peu fréquente et les rares cas diagnostiqués (sur la base du test de Ham Dacie) étaient dispersés dans les principales institutions hospitalières du pays. Depuis l'année 2002, ces institutions se sont mises à nous adresser leurs cas suspects de HPN, permettant ainsi l'établissement des pre-

mières données épidémiologiques de cette maladie en Tunisie. De cette manière, nous avons pu diagnostiquer une moyenne de 2,25 nouveaux cas de HPN par an et, dans notre courte série de 9 patients, nous pouvons affirmer que les hommes (4 cas) et les femmes (5 cas) étaient atteints de manière équivalente, tout ceci étant en accord

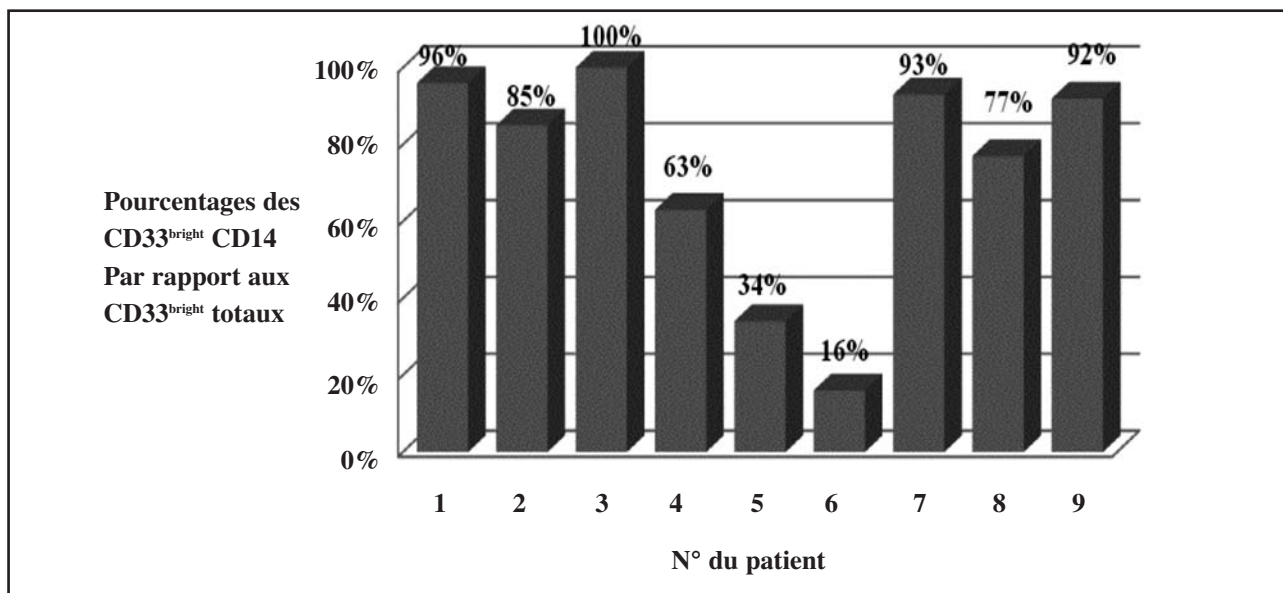


Figure 9 : Degré de déficit mesuré au sein de la population monocyttaire dans notre série.

avec ce qui est trouvé dans les pays occidentaux (1,3). Toutes les tranches d'âge étaient représentées, sauf celles des enfants de moins de 10 ans (Figure 4). Dans la littérature, l'HPN a été décrite chez l'enfant, bien que l'incidence exacte n'a pu être établie (3). L'absence d'enfants dans notre série pourrait être expliquée, d'une part, par le fait que l'HPN est plutôt une maladie de l'adulte jeune, beaucoup plus que de l'enfant ; d'autre part, par le fait qu'en Tunisie, les gens consultent de manière relativement plus tardive qu'en occident et ce, d'autant plus qu'ils arrivent à vivre avec leur mal, ce qui pourrait être le cas lors d'un déficit partiel en ancre GPI, expliquant là aussi, cette majorité de déficits profonds que nous avons trouvée. Ceci dit, il y avait quand même quatre enfants parmi les 32 cas qui nous ont été envoyés, mais tous dans le cadre du dépistage d'un syndrome de Fanconi qui est aussi suspecté, en bas âge, devant des signes de cytopénie (anémie, neutropénie ou thrombopénie). L'anémie et la thrombopénie sont des symptômes constants chez nos patients HPN (Figures 5 et 6). Nous pouvons considérer que la leucopénie est aussi un symptôme constant puisque la totalité de nos patients HPN avait des taux de globules blancs inférieurs ou très proches de la limite inférieure de l'intervalle de référen-

ce (Figure 7). Pour les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes, même si le déficit n'était pas profond, néanmoins l'ensemble des patients présentaient des taux autour de la limite inférieure de l'intervalle de référence (Figure 8). Enfin, une pancytopénie globale, intéressant conjointement les hématies et les leucocytes, a donc été observée chez 55,6% des patients, ce qui est plus élevé que les valeurs de 30% à 40% rapportées dans la littérature (4), mais pouvant être relié à la présence d'une majorité de nos malades présentant un déficit profond. Dans notre série, que la détermination du degré de déficit en ancre GPI soit réalisée sur les cellules CD33^{bright}CD14- ou les cellules CD13^{bright}CD16-, le résultat était équivalent (donnée non montrée) ; cependant, il est recommandé de rechercher ce déficit sur deux lignées cellulaires distinctes afin de s'assurer que l'absence du marqueur GPI-dépendant n'est pas due à un autre facteur que le défaut de synthèse de la molécule GPI. Concernant notre série de malades HPN et en nous référant aux cellules CD33^{bright}, 55,6% des patients avaient un déficit supérieur à 80% et seulement 22,2% des patients avaient un déficit inférieur à 50% par rapport aux CD33^{bright} totaux (Figure 5). Cette technique est donc simple et peu coûteuse puis-

qu'elle utilise cinq marqueurs seulement (CD45, CD33, CD13, CD14 et CD16) et qui font, de plus, partie des panels classiques d'immunophénotypages leucocytaires utilisés dans les laboratoires. Elle est aussi plus performante que le test classique de Ham Dacie.

D'un autre côté, en incorporant les combinaisons CD33/CD14 et CD13/CD16 dans les panels d'immunophénotypages leucocytaires de routine, il serait possible de faire le dépistage des cas de HPN cliniquement inapparentes dans les situations de cytopénies inexpliquées.

Références bibliographiques

1. Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999 ; 1544 : 269-286.
2. Boccuni P, Del Vecchio L, Di Noto R, Rotoli B. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Critical Reviews in Oncology : Hematology* 2000; 33: 25-43.
3. De Gramont A, J. Debray. Hémoglobinurie paroxystique nocturne : Synthèse et réflexions à partir d'une série francophone de 151 patients. *La revue de médecine interne* 1985; 6: 477-480.
4. De Latour RP, Socié G. Hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Rev Prat* 2007; 57:701-703.
5. Ware RE, Nishimura JI, Moody MA, Smith C, Rosse WF, and Howard TA. The PIG-A mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998;92:2541-255.
6. Johnson R J, Hillmen P. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy. *J Clin Pathol : Mol Pathol* 2002 ; 55 : 145-152.
7. Parker CJ, Omine M, Richards S, Nishimura JI, Bessler M, Ware R, Hillmen P and al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106 : 3699-3709.
8. De Latour RP. Hémoglobinurie paroxystique nocturne - Aplasie médullaire. *Hématologie* 2008;14:14-20.
9. Maurice G. Maladie de Marchiafava-Micheli ou hémoglobinurie paroxystique nocturne. In : Bernard J, Lévy JP, Varet B. *Hématologie*. Flammarion (médecine-science)1976. 59.779.
10. Bernard Dreyfus. Hémoglobinurie paroxystique nocturne. In Janine Breton Gorius, Félix Reyes, Henri Rochant, Jean Rosa, Jean-Paul Vernant. *Hématologie du Bernard Dreyfus*. Flammarion médecine 1992.752-762.
11. Van der Schoot CE, Huizinga TW, Van't Veer-Korthof ET, Wijmans R, Pinkster J, Von dem Borne AE: Deficiency of glycosylphosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood* 76:1853, 1990.
12. Schubert J, Alvarado M, Uciechowski P, Zielinska Skowronek M, Freund M, Vogt H, Schmidt RE : Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 79:487, 1991.
13. SE Hall and WF Rosse. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996 ; 87: 5332-5340.
14. Thomason RW, Papiez J, Lee RV, Szczarkowski W. Identification of unsuspected PNH-type cells in flow cytometric immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2004;122:128-134.
15. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, et al. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989 ; 73 : 284-289.
16. Nelson A. Matos-Fernandez, Yasser R. Abou Mourad, William Caceres, Mohamed A. Kharfan-Dabaja. Current Status of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2009 (article sous presse).
17. Robert A. Brodsky. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Reviews* (2008) 22, 65-74.
18. Olteanu H, Karandikar NJ, McKenna RW, Xu Y. Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2006;126:781-788.
19. Blanchard D, Navenot JM, Griscelli B, Socié G, De Gramont A, Mathieu D, Rhamouni A, Dhumeaux D. Prise en charge des patients atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN). *Hématologie* 1995 ; 1 : 57-60.

Impact de la mutation H63D du gène HFE sur la surcharge en fer chez les β -Thalassémiques mineurs

H. BEN JEMAA¹,
 F. MELLOULI²,
 H. KAABI¹,
 M. CHAABANE¹,
 G. CHERIF¹,
 H. ENNEIFER¹,
 S. BEN TAHAR¹,
 A. DRIDI¹,
 E. BEN HASSINE²,
 S. HMIDA¹

Résumé : La mutation H63D du gène HFE ainsi que la β -thalassémie sont deux tares génétiques relativement fréquentes chez les tunisiens. Au cours de ce travail nous nous sommes fixés pour objectif d'étudier l'impact des mutations C282Y et H63D du gène HFE sur le statut martial chez les β -thalassémiques mineurs tunisiens.

Une population de 61 β -thalassémiques mineurs a été comparée à une population de 62 donneurs de sang sains non apparentés. Le statut martial a été évalué par le dosage de la ferritinémie. L'étude des mutations du gène HFE (C282Y et HD63D) a été faite par PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment-length polymorphism).

Aucune mutation C282Y n'a été retrouvée. La fréquence allélique de la mutation H63D chez les β -thalassémiques mineurs (17,2%) n'était pas différente de celle des témoins (15,5%) ($p=0,09$). La comparaison des ferritinémies moyennes chez les patients (porteurs ou non de la mutation H63D) et les témoins n'a pas montré de différence statistiquement significative.

Nos résultats suggèrent que la mutation H63D n'est pas fréquente aussi bien chez les β -thalassémiques mineurs que dans la population générale et ne permettent pas de conclure sur l'implication de cette mutation dans la surcharge en fer.

Mots-clés : HFE, H63D, β -thalassémie mineure, statut martial

Abstract : The H63D mutation of the HFE gene and the β -thalassemia are two genetic features that are relatively frequent in the Tunisian population. The aim of this study was to investigate the impact of H63D and C282Y HFE gene mutations on iron overload in Tunisian β -thalassemia carriers.

A 61 heterozygous β -thalassemia population was compared to a 62 healthy and non-apparently blood donors population. Iron overload was evaluated by measuring the serum ferritin level. C282Y and H63D HFE gene mutations were screened by RFLP-PCR (restriction fragment-length polymorphism polymerase chain reaction). C282Y mutation was not present in our studied population. The allele frequency of H63D mutation in β -thalassemia carriers (17.2%) was not different from that found in the healthy donors population (15.5%) ($p=0.09$). No statistically significant difference of serum ferritin level was detected between the patients and the healthy donors with or without HFE mutations.

Our results suggest that the H63D mutation is not frequent in heterozygous β -thalassemia Tunisian patients and in the general population. The number of subjects carrying H63D mutation was too low to conclude his effect on the iron status.

Key words : HFE, H63D, heterozygous β -thalassemia, iron status

¹ Centre National de Transfusion Sanguine de Tunis Tunisie.

² Centre National de Greffe de Moelle Osseuse de Tunis-Tunisie.

Introduction

Le gène HFE, initialement appelé HLA-H, est localisé sur le bras court du chromosome 6. Il s'étend sur 12 Kb et comprend 7 exons (1). Le produit de ce gène est une protéine transmembranaire de 343 acides aminés, ayant une structure similaire à celle des protéines du complexe HLA de classe I (2). La protéine HFE joue un rôle important dans la régulation de l'absorption intestinale du fer.

Plusieurs mutations du gène HFE ont été décrites, dont deux qui sont majoritaires : la mutation C282Y/G845A au niveau de l'exon 4 et la mutation H63D/C187G au niveau de l'exon 2.

La β -thalassémie hétérozygote est caractérisée par une dysérythropoïèse modérée qui peut entraîner une augmentation de l'absorption digestive du fer. Cependant, très peu de patients atteints de cette forme de thalassémie développent une hémochromatose vraie.

En 2004, Rute Martins et al ont étudié l'impact de l'association β -thalassémie mineure-mutations du gène HFE sur la surcharge en fer. Ils ont montré que la mutation H63D, même à l'état hétérozygote, semble aggraver la surcharge en fer chez les patients β -thalassémiques mineurs (3). De même, Melis et al ont rapporté une différence significative de la ferritinémie moyenne entre les β -thalassémiques mineurs homozygotes pour la mutation H63D et les témoins homozygotes pour cette même mutation (4).

En Tunisie, malgré la grande fréquence de la β -thalassémie ainsi que celle de la mutation H63D dans la population générale ($15.17 \pm 2.1\%$) (5), peu de données sont actuellement disponibles sur l'effet de cette mutation sur la surcharge en fer chez les β -thalassémiques mineurs.

Nous avons déjà démontré que la mutation H63D n'a pas d'influence sur le statut martial des β -thalassémiques majeurs tunisiens (6). Le but de ce travail consiste à déterminer la prévalence des mutations H63D et C282Y du gène HFE chez une population de sujets atteints de β -thalassémie mineure et à évaluer l'impact de ces deux mutations sur leur statut martial.

Matériel et méthodes

Population étudiée

Nous avons étudié 61 tunisiens porteurs du trait β -thalassémique. Cette population est composée de 25 hommes et 36 femmes dont l'âge moyen est de 42,6 ans (24 - 56 ans).

Le diagnostic de la β -thalassémie mineure a été porté sur le nombre de globules rouges ($> 5\ 000\ 000 /\text{mm}^3$), la microcytose (VGM $< 70\text{fl}$) et l'augmentation de l'Hb A2 ($> 3.5\%$) à l'électrophorèse de l'hémoglobine.

62 volontaires sains non β -thalassémiques, ayant un VGM $> 85\text{fl}$ ont constitué la population témoin. Cette population est composée de 16 hommes et 46 femmes avec un âge moyen de 41,7 ans (25 - 59 ans).

Nous avons exclu de cette étude les sujets ayant une cytolysé hépatique jugée sur l'élévation des transaminases à deux fois la normale ainsi que les sujets ayant une infection récente jugée sur l'interrogatoire et l'augmentation de la CRP, afin d'éliminer une éventuelle interférence sur le taux de la ferritinémie (fausse augmentation).

Au cours des prélèvements, aucun des sujets n'a été sous traitement martial pour carence en fer.

Méthodes

Evaluation de la surcharge en fer

Pour des raisons éthiques, notre évaluation de la surcharge en fer s'est limitée à la seule ferritinémie, bien que la biopsie hépatique soit la méthode la plus spécifique et la plus sensible. Le taux de ferritinémie a été déterminé par une méthode basée sur la technique immuno-enzymatique micro particulaire (MEIA).

Un taux de ferritinémie supérieur à 150 mg/l chez les femmes et 300 mg/l chez les hommes a été considéré comme élevé.

Analyse moléculaire

La détection des mutations H63D et C282Y du gène HFE a été réalisée par la technique PCR- RFLP. Pour l'amplification des régions qui flanquent les deux mutations en question, nous avons utilisé les couples d'amorces décrits par Feder et al ainsi que les conditions

de PCR détaillées par ces mêmes auteurs (7).

Analyses statistiques

La comparaison de la distribution des fréquences a utilisé le test du χ^2 (test du chi-deux de Pearson).

La comparaison des moyennes a été réalisée par le test de la variance non paramétrique (adapté aux faibles échantillons) de Kruskal et Wallis.

La comparaison des fréquences des trois génotypes deux à deux et des taux de ferritinémie des deux groupes malades et témoins pour les trois génotypes a fait appel au test non paramétrique de Mann et Whitney.

Le seuil de significativité a été fixé à 5%.

Résultats

Sur les 61 β -thalassémiques hétérozygotes étudiés, aucune mutation C282Y n'a été retrouvée. La mutation H63D a été retrouvée chez 19 sujets. Il s'agit de 17 formes hétérozygotes (H63/63D) et 2 formes homozygotes (63D /63D). Les 42 patients restants sont normaux (H63/H63) (Tableau I). La fréquence allélique de la mutation H63D chez les β -thalassémiques mineurs est de 17.2%. Cette fréquence n'est pas différente de celle trouvée dans notre population témoin qui est de 14.5% ($p = 0.09$).

La comparaison de la ferritinémie moyenne dans les trois groupes de génotypes HFE chez les β -thalassémiques mineurs a montré qu'il existe une différence

significative entre les groupes H63/H63 et 63D /63D ($p=0.028$) et les groupes H63/63D et 63D/63D ($p=0.034$) alors qu'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les groupes H63/H63 et H63/63D ($p = 0,653$) (Tableau II).

Par contre, nous n'avons pas trouvé de différence significative en comparant la ferritinémie entre les trois groupes de génotypes HFE chez les témoins.

Par ailleurs, la comparaison du taux de ferritinémie entre les β -thalassémiques mineurs et les témoins pour chaque génotype HFE n'a pas montré de différence significative (Tableau III).

La valeur de la ferritinémie moyenne chez les β -thalassémiques mineurs homozygotes pour la mutation H63/63D (63D/63D) est de 363 mg/l. Cette valeur est élevée, par comparaison avec celle trouvée chez le groupe témoin (24.89 mg/l). Cependant, la comparaison statistique de ces deux ferritinémies n'a pas montré d'écart significatif ($p = 0.121$). Les caractéristiques des 2 β -thalassémiques mineurs et des 2 témoins porteurs de la mutation H63/63D à l'état homozygote sont détaillées dans le tableau IV.

Discussion

Peu d'informations sur l'association β -thalassémie hétérozygote et génotype HFE sont actuellement disponibles chez les populations nord-africaines. La mutation C282Y

Tableau I : Les fréquences des différents génotypes HFE chez les β -thalassémiques mineurs et la population témoin

Génotypes <i>HFE</i>	Population témoin		Population des β thalassémiques mineurs		Comparaison des fréquences des différents génotypes <i>HFE</i> entre les deux populations
	Nombre	Fréquence (%)	Nombre	Fréquence (%)	
63 D /63 D	2	3.2	2	3.279	$\chi^2=0$ $p = 0.09$
H63/63D	14	22.6	17	27.869	$\chi^2=0.46$ $p =0.5$
H63/H63	46	74.2	42	68.852	$\chi^2= 0.43$ $p = 0.09$
Total	62	100	61	100	

Tableau II : La ferritinémie en fonction du génotype HFE chez la population témoin et la population des β -thalassémiques mineurs

Génotypes <i>HFE</i>	Ferritinémie moyenne (mg/l) chez la population témoin		Ferritinémie moyenne (mg/l) chez la population des β thalassémiques mineurs	
H63/H63 Vs H63/63D	40.1 \pm 48.24 Vs 18.81 \pm 14.17	p=0.110	35.49 \pm 40.447 Vs 40.70 \pm 39.313	p=0.653
H63/H63 Vs 63D/63D	40.1 \pm 48.24 Vs 24 .89 \pm 22.3	p=0.662	35.49 \pm 40.447 Vs 363.00 \pm 352.139	p=0.028
H63/63D Vs 63D/63/D	18.81 \pm 14.17 Vs 24 .89 \pm 22.3	p=0.598	40.70 \pm 39.313 Vs 363.00 \pm 352.139	p=0.034

Tableau III : La ferritinémie chez la population témoin et les β thalassémiques mineurs selon le génotype *HFE*

Génotypes <i>HFE</i>	Ferritinémie moyenne (mg/l) chez la population témoin	Ferritinémie moyenne (mg/l) chez la population des β thalassémiques mineurs	Comparaison des Ferritinémies selon les génotypes HFE entre les deux populations.
63 D /63 D	24 .89 \pm 22.3	363.00 \pm 352.139	p= 0.121
H63/63D	18.81 \pm 14.17	40.70 \pm 39.313	p= 0.068
H63/H63	40.1 \pm 48.24	35.49 \pm 40.447	p=0.751

Tableau IV : Caractéristiques des témoins et β -thalassémiques mineurs homozygotes pour la mutation H63D du gène *HFE* :

	Age (ans)	Sexe	Ferritinémie (mg/l)
Témoin 1	58	F	9.12
Témoin 2	59	F	40.65
Malade 1	54	F	612
Malade 2	50	H	114

F : Femme

H : Homme

n'a pas été retrouvée chez les β -thalassémiques mineurs de notre étude. Ceci rejoint la faible fréquence de cette mutation dans la population générale tunisienne (0.09% \pm 0.17) (5). La rareté de l'allèle C282Y est en rapport avec son origine celtique ce qui explique sa restriction aux populations européennes (8).

La mutation H63D est relativement fréquente dans notre

population β -thalassémique mineure. Sa fréquence est de 17.2%. Elle est très proche de celle rapportée dans la population générale tunisienne 15.17 \pm 2.1% (p=0.61) (5). Des résultats différents ont été rapportés dans d'autres ethnies. En effet, les mutations H63D et C282Y semblent être plus fréquentes chez les β -thalassémiques mineurs que dans la population générale iranienne (9).

Martins et al ont comparé les fréquences alléliques des mutations du gène HFE et le statut martial chez 101 individus hétérozygotes pour la β -thalassémie et 101 individus témoins. Ils ont trouvé que les fréquences alléliques des mutations C282Y (1.5 contre 3.5%), H63D (15.3 contre 18.3%) et S65C (1.0 contre 1.5%) ne diffèrent pas entre les β -thalassémiques mineurs et la population témoin. Par contre, ils ont trouvé que le fer sérique ($p=0.029$) et la saturation de la transferrine ($p=0.009$) sont plus élevés chez les β thalassémiques mineurs hétérozygotes pour la mutation H63D (3).

Dans notre étude, la ferritinémie moyenne était plus élevée chez les β -thalassémiques mineurs porteurs de la mutation H63D à l'état homozygote que chez les porteurs de la mutation à l'état hétérozygote ($p=0.034$) ou chez les homozygotes normaux ($p=0.028$). Cependant nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les homozygotes normaux et les hétérozygotes pour cette même mutation ($p=0.653$).

Par contre, chez la population témoin, la ferritinémie moyenne ne diffère pas entre les sujets normaux et les sujets porteurs de la mutation H63D qu'elle soit homozygote ou hétérozygote.

Ces résultats ne nous permettent pas d'affirmer l'effet de la mutation H63D sur le statut martial chez les β -thalassémiques mineurs. En effet, la population des sujets porteurs de la mutation à l'état homozygote n'est représentée que par deux sujets au sein de la population témoin et deux sujets au sein de la population de β -thalassémiques mineurs. Miniero et al ont rapporté des valeurs de ferritinémie augmentées chez un patient β -thalassémique mineur homozygote pour la mutation H63D suggérant son implication dans la dysrégulation de l'absorption digestive du fer (10, 11). Le mécanisme exact par lequel cette mutation intervient dans l'augmentation de l'absorption digestive du fer chez les β -thalassémiques mineurs est non élucidé.

Melis et al en 2002 ont étudié 152 β -thalassémiques hétérozygotes et ont rapporté que la ferritinémie moyenne chez les porteurs de la mutation H63D à l'état homozygote 63D/63D (389 ± 75 mg/L) est plus élevée que celle observée chez les homozygotes normaux H63/H63 (250 ± 138

mg/L) ($p=0.022$). Ceci suggère que la mutation H63D présente un effet modulateur sur l'absorption du fer chez les β -thalassémiques mineurs (4).

D'après, Ruiz-Arguëlles et al, la mutation H63D, même à l'état hétérozygote, pourrait augmenter la ferritinémie chez les porteurs du trait thalassémique (12).

D'où la recommandation par certains auteurs de rechercher les mutations du gène HFE chez les porteurs du trait thalassémique présentant des anomalies du bilan martial en particulier une augmentation de la saturation de la transferrine et/ou du taux de ferritinémie en vue de diagnostiquer précocément l'hémochromatose avant l'apparition des manifestations cliniques (10).

A l'opposé, d'autres publications ont rapporté que même l'homozygotie pour la mutation H63D ne semble pas causer une surcharge en fer chez les β thalassémiques mineurs. Garewal et al ont montré que la mutation H63D est plus répandue que la mutation C282Y chez les indiens du nord, et que la présence de la mutation H63D à l'état homozygote ou hétérozygote n'augmente pas le risque de surcharge en fer évaluée par le taux de ferritinémie chez les β -thalassémiques mineurs (13).

De même, Yamsri et al, en étudiant les β -thalassémiques mineurs thaïlandais, n'ont rapporté aucune différence du taux de ferritine sérique entre les hétérozygotes pour la mutation H63D et les homozygotes normaux (14).

En raison de la rareté de la mutation H63D à l'état homozygote aussi bien chez les β -thalassémiques mineurs que dans la population générale, une méta-analyse s'impose pour conclure définitivement sur le rôle éventuel de la mutation H63D dans la surcharge en fer chez les β -thalassémiques mineurs.

Références

- 1- Loréal O, Le Lan C, Troade C, Brissot P. Actualités sur l'hémochromatose. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28: D92-D102.
- 2- Deugnier Y, Moirand R, Guyader D. Surcharges en fer et gène HFE. *Gastroenterol Clin Biol* 1999; 23:122-31.

- 3-** Martins R, Picanco I, Fonseca A, Ferreira L, Rodrigues O, Coelho M et al.
The role of HFE mutations on iron metabolism in β -thalassemia carriers.
J Hum Gen 2004; 49: 651-5.
- 4-** Melis M A, Cau M, Deidda AF, Barella S, Cao A, Galanello R.
H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in β -thalassemia carriers.
Haematologica 2002; 87:242-5.
- 5-** Sassi R, Hmida S, Kaabi H, Hajje A, Abid A, Abdelkefi S et al.
Prevalence of C282Y and H63D mutations in the haemochromatosis (HFE) gene in Tunisian population.
Ann Gen 2004; 47 : 325-30.
- 6-** Mellouli F, El Borgia W, Kaabi H, Ben Hassen E, Sassi R, Hmida H et al.
Mutations du gène HFE chez des β -thalassémiques majeurs tunisiens et surcharge en fer.
Transfus Clin Biol 2006; 13: 353-7.
- 7-** Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A et al
A novel MHC class I like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis.
Nat Genet 1996;14: 249-51.
- 8-** Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson CJH.
Global prevalence of putative hemochromatosis mutations.
J Med Genet 1997; 34: 275-8.
- 9-** Jazayeri M, Bakayev V, Adibi P, Farhad Haghghi R, Zakeri H, Kalantar E et al.
Frequency of HFE gene mutations in Iranian beta-thalassaemia minor patients.
Eur J Haematol 2003; 71: 408-11.
- 10-** Miniario R, Tardivo I, Roetto A, De Gobbi M.
Heterozygous beta-thalassemia and homozygous H63D hemochromatosis in a child : an 18-year follow-up.
Pediatr Haematol Oncol 2005; 22: 163-6.
- 11-** Townsend A, Drakesmith H.
Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease and secondary iron overload.
Lancet 2002, 359: 786-90.
- 12-** Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Sanchez Anzaldo J, Ruiz-Delgado GJ, Jiménez-González C et al.
Heterozygosity for the H63D mutation in the hereditary hemochromatosis (HFE) gene may lead into severe iron overload in beta-thalassemia minor: observations in a thalassaemic kindred.
Rev Invest Clin 2001; 53: 117-20.
- 13-** Garewal G, Das R, Ahluwalia J, Marwaha RK.
Prevalence of the H63D mutation of the HFE in north India: its presence does not cause iron overload in beta thalassemia trait
Eur J Haematol 2005; 74: 333-6
- 14-** Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Jetsrisuparb A, Wiangnon S et al.
H63D mutation of the hemochromatosis gene and serum ferritin levels in Thai thalassemia carriers.
Acta Haematol 2007; 118: 99-105.

Association of constitutional thrombophilic risk factors in aseptic osteonecrosis of femoral heads and thromboembolic disease : case report

R. ZNAZEN¹,
S. GUERMAZI¹,
C. KOOLFI²,
S. AZZEBI²,
L. BEN HASSINE²,
N. KHALFALLAH²,
M. KAROUFI¹

Résumé : L'ostéo-nécrose aseptique non traumatique des têtes fémorales est une pathologie complexe, induisant la destruction de la hanche chez l'adulte. Son étiopathogénie est multifactorielle. Il a été avancé que la thrombophilie constitutionnelle et acquise, ainsi que les états d'hyperfibrinolyse, sont considérés parmi les causes de cette maladie. Nous décrivons le cas d'un jeune homme âgé de 42 ans ayant développé une ostéo-nécrose aseptique bilatérale de la tête fémorale associée à des événements thrombotiques. Les investigations biologiques ont révélé la présence d'un déficit en protéine C, d'une résistance à la protéine C activée avec mutation facteur V Leiden hétérozygote et d'une mutation G20210 A hétérozygote du gène de la prothrombine. Ce patient aurait une maladie thrombotique systémique en rapport avec un état d'hypercopagulabilité sanguine résultant de la présence de ces facteurs de risque thrombophilique. Ceci évoquerait la possibilité de la contribution de la thrombophilie dans le développement de l'ostéo-nécrose. Les investigations nécessaires devraient, alors, être réalisées et une thérapie anticoagulante appropriée démarrée.

Mots clés : ostéonécrose aseptique de la tête fémorale, déficit en protéine C, résistance à la protéine C active, facteur V Leiden, mutation gène prothrombine.

Abstract : Aseptic non-traumatic osteonecrosis of femoral heads is a complex pathology, resulting in the destruction of the hip in adult. Its etiopathogenesis is multifactorial. Constitutional and acquired thrombophilia and hypofibrinolysis states have been postulated to be causative of this disease. We describe the case of a 42 - years - old man who developed bilateral aseptic osteonecrosis of femoral head with thromboembolic events. Among biological investigations, protein C deficiency, activated protein C resistance associated with heterozygous factor V Leiden mutation and heterozygous G20210A prothrombin gene mutations were performed. This patient was thought to have systemic thromboembolism because of the increased blood coagulability resulting from the presence of these thrombophilic risk factors. This raises the possibility that thrombophilia is a contributing factor to the development of osteonecrosis. Related investigations should be performed and appropriate anticoagulant therapy started.

Keywords : aseptic osteonecrosis of femoral head, protein C deficiency, activated protein C resistance, factor V Leiden, prothrombin gene mutation

¹ Laboratory of Haematology,
Charles Nicolle Hospital
Tunis

² Department of Internal
Medicine B, Charles Nicolle
Hospital. Tunis

Introduction

Aseptic non-traumatic osteonecrosis of femoral heads is a complex pathology, resulting usually, in the destruction of the hip in adult [1, 2]. The etiopathogenesis, not yet cleared up, is multifactorial including chemotherapy, radiotherapy, alcoholism, corticosteroids therapy, but as well familial and acquired thrombophilia and hypofibrinolysis states [1 - 7]. In this paper, we report the case of bilateral aseptic osteonecrosis (AON) of femoral head with thrombotic events occurrence in a young adult, presenting the association of multiple constitutional thrombophilic risk factors.

Case report

The patient SF, a 42 - years - old man, was followed in Orthopaedy since 2002 for bilateral AON of femoral head. The diagnosis has been confirmed by radiographs and magnetic resonance imaging. Other Osteonecrosis (ON) lesions have not been found. This patient has got a successful right hip replacement realized on July 2005, with effective prophylactic anticoagulant therapy. On October 2005, he experienced a deep and superficial venous thrombosis in the left upper limb. So, he was hospitalized for the first time, in Internal Medicine Department, and received as anticoagulant treatment, Innohep (0,6 UI / day) relieved after that, by anti-vitamin K (acenocoumarol). The diagnosis of Behçet disease was suspected in front of recurrent oral and genital ulcers, since the patient was 16-year-old, but couldn't be holded because of criterion insufficiency (HLA-B50, negative pathergy test) [8]. The immunological explorations have not detected either anti-nuclear antibodies nor antiphospholipids antibodies. The blood lipids levels were in normal ranges. Constitutional thrombophilia screening revealed Protein C (PC) deficiency (54% ; NV : 70 - 100%), activated protein C resistance (APCR) (patient at 60 sec ; NV \geq 120 sec using Staclot APCR kit from Diagnostica Stago, Asnières, France), heterozygous factor V Leiden (FVL) mutation and heterozygous G20210A prothrombin gene mutation.

Serological Homocystein level was in normal ranges (9,92 μ mol/l, NV : 5-15 μ mol/l). Hematologic and biochemical data figure in table1.

Blood tests also were conducted on the patient's relatives (brothers, sister and daughter), and there were no noteworthy abnormalities, except lowered PC (60%) activity in one brother without any thrombo-embolic events.

On April 2006, the patient has got a second hip replacement in the left side. Although, an anticoagulant therapy with unfractionated heparin has been prescribed at curative dose (45 UI x 6 / day), this replacement was complicated 10 days after, in massive and early pulmonary embolism confirmed by spiral computed tomographic scan. Heparin induced thrombocytopenia was already excluded (platelets count stable at $40 \times 10^4 / \mu$ L). After a short stay in intensive care, the evolution was favorable under oxygen therapy and unfractionated heparin relieved then, by anti-vitamin K.

Discussion

ON is characterized by the death of marrow and bone tissues. All bones may be affected, most commonly those of the hip, knee, shoulder and ankle. It typically affects patients in their third, fourth and fifth decades of life. ON has been classified as secondary or primary, according to the presence or absence of risk factors, respectively [2]. The pathogenesis of non-traumatic AON is considered to be multifactorial, and several factors have been proposed as possible causes of ON, including thrombophilic states [1 - 5, 7, 9].

The patient in the current report, had no history of alcohol abuse, corticosteroid treatment, or underlying diseases known to be associated with ON. But, he held simultaneously, 4 congenital thrombophilic abnormalities; PC deficiency, APCR, heterozygous FVL mutation and heterozygous G20210A prothrombin gene mutation. Clinical expression in the patient, had included AON of femoral heads and thrombo-embolic events.

Some recent studies and reports published in the literature, suggest the etiopathogenic role of constitutional thrombophilia and decreased fibrinolysis in the occur-

Table 1 : Laboratory Data of the Patient at the first hospitalisation in Internal Medicine Department (October 2005).

Test Item	Value	Test Item	Value
White blood cells (4000-9 000/ μ l)	10 400 / μ l	Glutamic pyruvic transaminase (0-41 IU/l)	41 IU/l
Red blood cells (450-550 x 10 ⁴ / μ L)	310 x 10 ⁴ / μ L	Total Bilirubin (0-17 μ mol/l)	7 μ mol/l
Hemoglobin (13-16 g/dl)	10,4 g/dl	Total serum Iron (7-28 μ mol/l)	2,3 μ mol/l
Hematocrit (40-52%)	32,5%	Total Iron Binging-Capacity (50-75 μ mol/l)	68 μ mol/l
Mean cell volum (82-102 μ ³)	79 μ ³	Ferritin (20-250 ng/ml)	30,1 ng/ml
Mean cell hemoglobin concentration (31-35 g/dl)	31,9 g/dl	Homocystein (5-15 μ mol/l)	9,92 μ mol/l
Platelet (15-40 x 10 ⁴ / μ L)	41 x 10 ⁴ / μ L	Antithrombin (80-120%)	135%
Erythrocyte sedimentation rate (2-10 mm/hour)	43 mm/hour	Protein C (70-130%)	54%
Prothrombin time (70-100%)	69%	Protein S (70-130%)	102%
Activated partial thromboplastin time (28-40 seconds)	(32 seconds)	APCR (\geq 120 seconds)	60 seconds
Fibrinogen (2-4 g/l)	(3,42 g/l)	V Leiden mutation	Positive, heterozygous
D-Dimers ($<$ 0,5 μ g/ml)	$>$ 4 μ g/ml	G20210A prothrombin mutation	Positive, heterozygous
C reactive protein ($<$ 6mg /l)	24,8 mg/l	Factor VIII (60-150%)	350%
Glucose (3,9-6,1 mmol/l)	5,6 mmol/l	Factor IX (60-150%)	168%
Creatinine (50-100 μ mol/l)	76 μ mol/l	Factor XI (60-150%)	150%
Total cholesterol (3,78-6,32 mmol/l)	3,92 mmol/l	Lupus anticoagulant (negative)	not detected
Triglyceride (0,57-1,97 mmol/l)	0,78 mmol/l	Anticardiolipin antibodies (negative)	not detected
Lactic acid dehydrogenase (240-480 IU/l)	410 IU/l	Anti- α 2 GP1 ($<$ 20 U/ml)	$<$ 5 U/ml
Gamma GT (8-61 IU/l)	26 IU/l	Anti-nuclear antibodies (negative)	not detected
Glutamic oxalo acetic transaminase	19 IU/l (0-37 IU/l)	BW serology	negative

rence of non-traumatic AON : antithrombin, PC and protein S deficiencies, FVL mutation, G20210A prothrombin gene mutation, hyperhomocysteinemia, increase in plasminogen activator inhibitor type 1...[1, 3, 5, 7, 9]. Many authors described anticoagulant proteins deficiency in patients with AON, sometimes associated with thrombotic manifestations [7, 9]. Our patient had a PC deficiency and his brother had too, but without thromboembolic events for the latter. This constitutional thrombophilic state has been reported particularly, in child with Legg-Calve-Perthes disease (LCPD) [10].

The current patient had APCR related to the presence of FVL mutation. Thrombophilic mutations; FVL [1, 11], G20210A prothrombin gene mutation [11] and C 677 T gene mutation of the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with hyperhomocysteinemia [7] have been studied by many authors in patients with AON of the femoral head and the results concerning the link between these most common inherited thrombophilic risk factors among Caucasians and AON are conflicting.

Björkman A et al [11] investigated 63 adult patients with non traumatic ON of the femoral head for etiologic factors, such as corticosteroid medication and alcohol abuse, and the occurrence of FVL and the prothrombin G20210A gene mutation. These 2 mutations were significantly more frequent in patients with idiopathic ON than in a population of healthy control subjects (OR = 2.7; 95% CI : 1.2-5.8) and in patients with ON caused by corticosteroid medication or alcohol abuse (OR = 10.8; 95% CI : 1.4-84).

Also, Zalavras CG et al [1] have compared in their study evaluating the potential association of FVL mutation and G20210A mutation of prothrombin gene with ON of the femoral head, 72 consecutive adult patients with non-traumatic AON to 300 healthy controls, all of Caucasian origin. They found that the Odd Ratio was statistically significant for the FVL (OR = 4,5; 95% CI: 2 - 10), but not for the prothrombin gene mutation (OR = 1,6; 95% CI : 0,4 - 6,1).

Posan E et al [5] have analyzed haemostatic disturbances in 49 adults and 47 children with AON of femoral head. They have detected FVL, particularly, among

children with LCPD and noted that the presence of homozygous mutation was associated with a more severe course of the pathology, suggesting that FVL mutation, probably, does not induce the development of aseptic necrosis of bone tissue in children, but it does play a role in its acceleration. In the other hand, the authors [5] haven't certainly, detected FVL in adult cases, but they suggest that impaired fibrinolysis, elevated lipoprotein (a) level, increased platelet activity and slight elevation of fibrinogen might have clinical relevance.

Some authors [12, 13] didn't find in their studies an increased rate of FVL, prothrombin G20210A gene mutation and C 677 T mutation of the MTHFR gene for LCPD cases, compared to the natural incidence. As well, some studies conducted in East Asian [14] and Turkish [15] patients did not confirm the role of thrombophilic disorders in AON.

Association of multiple thrombophilic risk factors in a patient with AON, as for the current patient, has also been described in the literature [3, 7, 11]. Even so, a familial history of thrombo-embolic events and / or AON associated with familial thrombophilia has been reported [7, 10].

In this case report, only femoral head were affected, but also multifocal ON in different sites of the bone tissue could develop in patients with altered hemostasis, as it was described by some authors [3, 9].

ON develops as the end-result of reduced blood flow to the femoral head [6]. Indeed, the physiopathological mechanism advanced by some authors would be intravascular coagulation with fibrin thrombosis that begins in the capillaries and sinusoids of the intra-osseous micro-circulation [2] and venous thrombosis leads to increased intra-osseous venous pressure, reduced arterial flow and hypoxic bone death resulting in mechanical failure of the involved bone [4, 6].

Some authors [4, 6] speculated that if coagulation disorders cause ON, then anticoagulation might ameliorate ON. In deed, provided that curative anticoagulant therapy is started before irreversible segmental collapse of the head of the femur, ON in subjects with coagulation disorders, may be arrested or, speculatively, sometimes

reversed [6]. This has the potential of preventing femoral head collapse which, usually, leads to total hip replacement as it was the case of the current patient. A Japanese team [16] has demonstrated that the incidence of femoral head necrosis is significantly less in a group of spontaneously hypertensive rats provided with water containing warfarin (10,5%) than in a group given normal water (52,6%).

Conclusion

Further studies are necessary to clear up the potential etiopathogenic role of thrombophilic states in AON of femoral head, and to precise the interest of their systematic screening in the face of this disease.

It is more likely important to propose an appropriate therapy, based on early starting of the anticoagulant treatment that will possibly, stop the disease progression. Placebo-controlled trials with a long follow-up will be required to assess the promise of the pilot anticoagulant studies in ON.

Références

- 1- Zalavras CG, Vartholomatos G, Dokou E, Malizos KN. Genetic background of osteonecrosis : associated with thrombophilic mutations ? Clin Orthop Related Res 2004 ; 422: 251 - 5.
- 2- Jones JP. Epidemiological risk factors for non-traumatic osteonecrosis. Orthopade 2000 ; 29 : 370 - 9.
- 3- Lazzarin P, Cesaro G, Puggina S, Perin B, Cremonini L, Padovani G, et al. Femoral and humeral head osteonecrosis in a patient with hypofibrinolysis and hyperhomocysteinemia. A case report and a review of the literature. Reumatismo. 2004 ; 56: 202 - 10.
- 4- Glueck CJ, Freiberg RA, Wang P. Role of thrombosis in osteonecrosis. Curr Hematol Rep 2003 ; 2 : 417 - 22.
- 5- Posen E, Szepesi K, Gaspar L, Csernatony Z, Harsfalvi J, Ajzner E, et al. Thrombotic and fibrinolytic alterations in the aseptic necrosis of femoral head. Blood Coagul Fibrinolysis 2003 ; 14: 243 - 8.
- 6- Glueck CJ, Freiberg RA, Fontaine RN, Sieve - Smith L, Wang P. Anticoagulant therapy for osteonecrosis associated with heritable hypofibrinolysis and thrombophilia. Expert Opin Investig Drugs 2001 ; 10 : 1309- 16.
- 7- Elishkewich K, Kaspi D, Shapira I, Meites D, Berliner S. Idiopathic osteonecrosis in an adult with familial protein S deficiency and hyperhomocysteinemia. Blood Coagul Fibrinolysis 2001; 12 : 547 - 50.
- 8- Tunc R, Uluhan A, Melikoglu M, Ozyazgan Y, Ozdogan H, Yazici H. A reassessment of the International Study Group criteria for the diagnosis (classification) of Behçet's syndrome. Clin Exp Rheumatol 2001 ; 19 suppl 24 : S45 - 7.
- 9- Kubo T, Tsuji H, Yamamoto T, Nakahara H, Nakagawa M, Hirasawa Y. Antithrombin III deficiency in a patient with multifocal osteonecrosis. Clin Orthop Relat Res 2000 ; 378 : 306 - 11.
- 10- Glueck CJ, Glueck HI, Greenfield D, Freiberg R, Kahn A, Hamer T, et al. Protein C and S deficiency, thrombophilie, and hypofibrinolysis : pathophysiologic causes of Legg-Perthes disease. Pediatr Res 1994 ; 35 : 383- 8.
- 11- Björkman A, Svensson PJ, Hillarp A, Burtscher IM, Rünow A, Benoni G. Factor V Leiden and prothrombin gene mutation : risk factors for osteonecrosis of the femoral head in adults. Clin Orthop Relat Res 2004 ; 425 : 168 - 72.
- 12- Schmitz A, Pfortner J, Protzel A, Harbrecht U. Incidence of thrombophilic factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation in Perthes disease - a pilot study. Z Orthop Ihre Grenzgeb 2001; 139: 143 - 6.
- 13- López- Franco M, Gónzalez-Moran G, De Lucas JC Jr, Llamas P, De Velasco JF, Vivancos JC, et al. Legg-perthes disease and heritable thrombophilie. J Pediatr Orthop 2005; 25: 456 - 9.
- 14- Lee JS, Koo KH, Ha YC, Koh KK, Kim SJ, Kim JR, et al. Role of thrombotic and fibrinolytic disorders in osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop Relat Res 2003; 417: 270 - 6.
- 15- Celik A, Tekis D, Saglam F, Tunalı S, Kabakci N, Ozaksoy D, et al. Association of corticosteroids and factor V, prothrombin, and MTHFR gene mutations with avascular osteonecrosis in renal allograft recipients. Transplant Proc 2006 ; 38 : 512 - 6.
- 16- Wada M, Kumagai K, Murata M, S - Yamashita Y, Shindo H. Warfarin reduces the incidence of osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. J Orthop Sci 2004; 9 : 585 - 90.

Agenda des manifestations scientifiques

The First International Conference on Basic and Applied Mycology

Assiut University, Assiut, Egypt
March 9-11 March, 2010
www.aun.edu.eg/aumc/aumc.htm

Sixth Palestinian Conference of Laboratory Medicine

March 12-13, 2010 - Abu-Dies, Jerusalem
www.palmta.org

10th Ecuadorian Clinical Biochemistry Congress

6th International Clinical Biochemistry Congress

1st International Alimentary Inocuidat Congress

March 23-27, 2010 - Quito, Ecuador
<http://www.sebiocli.com/eventos/congreso/>

International Conference on European Education in Laboratory Medicine and Recognition of Professional Qualifications

March 25-27, 2010 - Warsaw, Poland
www.ifcc.org/PDF/congresses

The Third Congress of the Moroccan Association of Laboratory Medicine

April 2-3, 2010 - Tangier, Morocco
www.ifcc.org/PDF/congresses

4th European Congress of virology,

Cernobio, Italy ; 7 -11 Avril 2010
www.eurovirology2010.org

Course on biological bases and molecular markers in the diagnosis of Fe metabolism disorders.

Hemoglobinopathies diagnostic and prognostic markers in oncohematological diseases and TMO.

Pharmacogenetics and drug resistance in Hematology
April 9-10 - May 7-8 - Jun 11-12 - July 16-17, 2010 - Mar del Plata, Argentina
www.ifcc.org/PDF/congresses

ECCMID 2010

20th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Disease

Vienna, Austria
10 Apr 2010, 13 Apr 2010
www.ifcc.org/PDF/congresses

IFCC General Conference

Corfu, Greece
18 Apr 2010, 19 Apr 2010
www.ifcc.org/PDF/congresses

XIX Latin American Congress of Clinical Biochemistry

April 20-23, 2010 - Santiago, Chile
www.colabiocli-chile2010.cl

XXXII Nordic Congress in Medical Biochemistry

June 1-4, 2010 - Oslo, Norway
www.labmed2010.no

8^{eme} Congrès National de la Société Française de Microbiologie

Marseille, France ; 2-4 juin 2010
www.sfm.asso.fr

Congrès de la Fédération Internationale des Techniciens de Laboratoire

International Federation of Biomedical Laboratory Science (IFBLS)

IFBLS World Congress 2010

June 6-10, Nairobi, Kenya
www.akmlso-ifbils2010.org

CSCC 2010 Annual Conference - Plain Science on the Prairies

June 13-16, 2010 - Saskatoon Saskatchewan, Canada
<http://www.cscs.ca/index.php/publisher/articleview/frmArticleID/117/>

RAML 5th Conference

June 16-19, 2010 - Mamaia, Romania

<http://www.raml-conference.ro/>

**American Association of Clinical Chemistry
& Laboratory Medicine****AACC Annual Meeting 2010**

25-29 Juillet 2010

Anaheim, California, USA

10th Baltic Congress in Laboratory Medicine

September 16-18, 2010 - Tallinn, Estonia

www.ifcc.org/PDF/congresses

6th European Course on Clinical Cytometry and**10th Euroconference on Clinical Cell Analysis**

September 21-25, 2010 - Valencia, Spain

<http://www.cytometry2010.eu/>

**5th Santorini Conference - Functional Genomics
towards Personalized Health Care**

September 29 - October 2, 2010 - Santorini Island, Greece

www.santorini2010.org

**5th International Symposium on Integrated Biomarkers
on Cardiovascular Diseases**

September 30-October 2, 2010 - Berlin, Germany

<http://www.lorenzinifoundation.org/biomarkers2010berlin.asp>

XII Asian Pacific Congress of Clinical Biochemistry

October 3-7, 2010 - Seoul, Korea

www.apccb2010.org

**XVII Congress of Medical Biochemistry
and Laboratory Medicine**

October 4-9, 2010 - Belgrade, Serbia

www.ifcc.org/PDF/congresses

6th EFCC Symposium for Balkan Region

October 7-8, 2010 - Belgrade, Serbia

www.ifcc.org/PDF/congresses

Journée Internationales de Biologie (JIB) 2010

CNIT, Paris, France ; 2-5 Novembre 2010

www.jib-sdbio.fr

MEDICA 2010**Interbational World Fair & Congress world Forum
for Medecine**

17-20 Novembre 2010

Düsseldorf, Germany

www.medica-tradefair.com

MEDLAB 2011

24 - 27 Janvier 2011

Dubai International Conention & Exhibition Center

Dubai, EAU

www.arabhealthonline.com/congress/MEDLAB_2010.htm

**21st IFCC International Congress of Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine - Berlin, Germany****19th IFCC-EFCC European Congress of Clinical****Chemistry and Laboratory Medicine - Berlin**

Internationales Congress Centrum - May 15th - 19th, 2011

www.berlin2011.org

Fray International Symposium

December 4-7, 2011 - Cancun, Mexico

www.flogen.com/FraySymposium

Activités de la STBC et informations professionnelles

La STBC a organisé durant l'année 2009, 19 ateliers et séminaires de formation pratique.

Ces séminaires ont portés sur différents thèmes :

- La qualilogie : 3 séminaires de formation en qualilogie ont été réalisés pour les biologistes hospitaliers, universitaires et de libre pratique et 4 autres pour les techniciens en biologie

Ces séminaires visent à assurer une amélioration continue de nos laboratoires d'analyse médicale. Ils ont portés en particulier sur la conception de la phase pré-analytique et le système documentaire, la gestion des équipements et consommables, l'évaluation du SMQ, la phase analytique, la phase post-analytique ainsi que sur l'hygiène et sécurité au laboratoire.

Tous ces séminaires ont été organisés sous l'égide de l'ULB en collaboration avec l'OMS

- l'infection au VIH et les infections opportunistes au cours du SIDA : Différents séminaires ont été organisés à Tunis, Monastir, Kairouan et Tabarka pour les biologistes et les techniciens en biologie sur le VIH et les infections bactériennes, virales et parasitaires. Le but était de sensibiliser les biologistes sur les particularités de ces infections chez ces sujets immunodéprimés aussi bien en ce qui concerne les formes cliniques que sur les difficultés de leur diagnostic étiologique.

Ces séminaires ont été réalisés dans le cadre du projet global fund «appui au partenariat et au renforcement de la riposte à la menace d'extension du HIV/SIDA en Tunisie».

- Les traitements anticoagulants et la cytologie en hématologie ont été les sujets de la journée de Sfax en Mars 2009

- Les gaz du sang

- La rédaction scientifique

- La biologie moléculaire : Les applications pratiques ont portés sur l'identification du polymorphisme du gène du facteur V Leiden, la conception des primers, la vérification de la conformité des amorces, la technique RFLP.

Des équipes tunisiennes, italiennes et allemandes ont participé à l'animation de ce work-shop.

Réunion du bureau de la Fédération internationale Francophone de biologie Clinique et de Médecine de Laboratoire

le 5 Novembre 2009 a eu lieu la réunion du bureau élargi aux membres de la commission administrative (CA) de la FIFBCML, au CNIT (la Défense-Paris). Plusieurs points ont été discutés touchant :

- Les adhésions à la FIFBCML

- La représentativité et le soutien des industriels aux activités de la FIFBCML

- Les activités scientifiques de la FIFBCML où des actions coordonnées devraient être menées au niveau des pays du bassin euro méditerranéen, africains, asiatiques et américains.

- La participation de la FIFBCML à différents projets concernant en particulier le SIDA, le paludisme et la tuberculose.

- La préparation du premier congrès de la FIFBCML couplé au 24^{èmes} JNBC en Tunisie avec la participation des différentes sociétés Francophones.

- Le site Web, dont la STBC a la charge, et l'annuaire de la FIFBCML

Réunion de la commission administrative de la Fédération Arabe de Biologie Clinique

La réunion de la commission administrative de la FABC a eu lieu à Beyrouth le 02/10/2009, en présence de tous les états membres que sont: le Liban, la Syrie, le Yemen, la Jordanie, le Soudan, la Palestine, l'Egypte, la Tunisie, l'Algérie et le Maroc.

Parmi les décisions prises pendant cette réunion :

- Le remplacement du comité consultatif de la FABC par un comité scientifique. La présidence de ce nouveau comité a été attribuée à la Tunisie en la personne de notre ami Pr A. HEDHILI

- Participer à hauteur de 2% dans la caisse de la FABC à chaque congrès arabe

- Création d'un site web portant les couleurs de la FABC sous la responsabilité des membres algériens et palestiniens du bureau,

- Planification des manifestations scientifiques : notre collègue Mme Salwa AMARIN représentante de la Jordanie est chargée de cette mission

Activités de la STBC et informations professionnelles

- Adhésion des confrères saoudiens à la FABC : Mr. Foued Harb l'ancien président de la FABC est chargé de mener les discussions à ce sujet.
- Création d'un comité de mise en place du système de management de la qualité dans les laboratoires arabes. Ce comité organise des ateliers et Workshops dans différents pays pour promouvoir la qualité, le dernier a eu lieu en Jordanie en octobre 2009, et deux autres sont prévus en 2010 au Soudan et au Maroc ; Le coordinateur de ce comité est le représentant tunisien auprès du bureau de la FABC : le Dr. Wadie KHROUF
- Les prochains congrès de la FABC auront lieu en 2012 au Maroc, et 2015 au Soudan.
- Election du nouveau bureau dont la composition est la suivante:
 - Mr Mohamed CHAARAOUI - président d'honneur (Egypte)
 - Mr Imed ITANI - président (Liban)
 - Mr Oussama NAJJAR - Vice président (Palestine)
 - Mr Foued HARB - ancien président (Syrie)
 - Mr Abdelghafour GHDIRA - Secrétaire général (Maroc)
 - Mr Wadie KHROUF - Trésorier (Tunisie)
 - Mr Ghassen CHANNEN - membre (Syrie)
 - Mme Salwa AMARIN - Membre (Jordanie)
 - Mr Kamel HASSAN - membre (SOUDAN)
 - Mr Ismail BELAZOUG - membre (ALGERIE)
 - Mr Samir CHARJABI- Membre (YEMEN)
 - Mr Med Zakaria GAD - Membre (Egypte)

Réunion du bureau de la STBC et du comité de rédaction de la RTBC

Une réunion a regroupé le 24 octobre 2009, au siège de la STBC, le Bureau Directeur et le Comité de Rédaction (CR) de la RTBC. Au cours de cette réunion, Professeur M'BAZAA a présenté un rapport détaillé sur les activités du comité de rédaction depuis l'année 2000, en insistant sur les réalisations du CR et les difficultés rencontrées. Il a terminé par

différentes suggestions visant à améliorer le rendement du comité et la qualité de la revue. Le Bureau de la STBC a rendu un vif hommage au travail réalisé par le CR et à sa tête Professeur M'BAZAA Abderraouf. Un nouveau Comité de Rédaction a été désigné dont la composition est la suivante :

Rédacteur en chef : Ben Rayana Mohamed Chiheb

Membres :

Besbes Sophie
Ben Romdhane Neila
Saidi - Slim Leila
Nabli Naoufel
ElKadhi Amina

Nous reviendrons dans un prochain numéro sur les questions débattues ainsi que sur le programme du CR pour les années à venir.

NOUVELLES PROFESSIONNELLES

- Notre confrère Mohamed Ali Memmi est parti à la retraite à compter du mois d'octobre 2009. Nous lui souhaitons bonne santé et longue vie
 - Notre consoeur Mme Nadia Trabelsi-Hammami, pharmacien biologiste a intégré l'équipe de l'ULB le 01/01/2009
 - Notre consoeur, Mme Noura BEN HAMIDA ep GHARIANI, biologiste inspecteur Divisionnaire de la santé Publique a été nommée Directeur de l'ULB le 17/11/2009
- Toutes nos félicitations aux deux consoeurs

REGLEMENTATION

Parution au JORT du décret N°2009-3849 du 30/12/2009, relatif aux conditions de la formation spécialisée en biologie médicale vétérinaire pour le responsable du laboratoire d'analyses médicales vétérinaire (texte d'application de la loi N°2002-54 du 11/06/2002, relative aux laboratoires d'analyses médicales et notamment son article 16)

Un arrêté du Ministre de la Santé Publique fixant les modalités du contrôle de qualité national des analyses médicales humaines, en date du 22 janvier 2010, est paru dans le journal officiel de la république tunisienne du 29 janvier 2010. nous reproduisons le texte intégral de cet arrêté.

Activités de la STBC et informations professionnelles

Arrêté du Ministre de la Santé Publique

Arrêté du ministre de la santé publique du 22 janvier 2010, fixant les modalités du contrôle de qualité national des analyses médicales humaines.

Le ministre de la santé publique,

Vu la loi n°2002-54 du 11 juin 2002, relative aux laboratoires d'analyses médicales et notamment ses articles 27,28 et 29,

Vu le décret n°74-872 du 20 septembre 1974, portant statut du corps des inspecteurs médicaux et juxtamédicaux, ensemble les textes qui l'ont modifié ou complété et notamment le décret n°2000-76 du 10 janvier 2000,

Vu le décret n°74-1064 du 28 novembre 1974, fixant la mission et les attributions du ministère de la santé publique,

Vu le décret n°81-793 du 9 juin 1981, portant organisation des services de l'administration centrale du ministère de la santé publique, ensemble les textes qui l'ont modifié ou complété et notamment le décret n°2006-746 du 13 mars 2006,

Vu l'arrêté du ministre de la santé publique du 28 mai 1990, fixant les modalités du contrôle de la qualité des analyses de biologie médicale.

Arrête :

Article premier - Le contrôle de qualité national des analyses médicales humaines, consiste à l'évaluation externe de la qualité des analyses médicales pratiquées par les laboratoires d'analyses médicales humaines sur des échantillons biologiques destinés à cet effet appelés "échantillons de contrôle".

Ce contrôle tend à permettre à chaque laboratoire d'analyses médicales humaines de vérifier son bon fonctionnement et la valeur des techniques qu'il utilise de façon à assurer la fiabilité et le perfectionnement des analyses médicales qui lui sont confiées.

Ce contrôle est confidentiel et obligatoire pour tous les

laboratoires d'analyses médicales humaines.

Art.2- Le contrôle de qualité national des analyses médicales humaines est organisé par les services de l'unité des laboratoires de biologie médicale au ministère de la santé publique. Il est effectué au moins une fois par an pour chaque discipline biologique.

Art.3- Tout laboratoire d'analyses médicales humaines soumis à une opération de contrôle effectuée dans le cadre du contrôle de qualité national des analyses médicales humaines doit, communiquer par voie postale et sous pli confidentiel, les résultats des analyses contrôlées à l'unité des laboratoires de biologie médicale au ministère de la santé publique et ce, dans un délai maximum de 30 jours à partir de la réception des échantillons de contrôle.

Art.4- Après chaque contrôle, l'unité des laboratoires de biologie médicale adresse à chacun des laboratoires contrôlés un bulletin-réponse ainsi que le rapport analytique des résultats des contrôles effectués dans ce cadre.

Art.5- Tout laboratoire rendant des résultats inacceptables à deux opérations de contrôle de qualité national successives est soumis à un contrôle de bonne exécution des analyses, réalisé par un médecin ou pharmacien inspecteur de la santé publique et un biologiste hospitalo-universitaire spécialiste dans la discipline concernée.

Un rapport est adressé à cet effet au responsable du laboratoire concerné et communiqué à l'unité des laboratoires de biologie médicale au ministère de la santé publique.

Le laboratoire concerné sera soumis à une expertise si les résultats du contrôle de qualité national des analyses médicales humaines demeurent inacceptables après un contrôle de bonne exécution des analyses.

Art.6- L'expertise prévue à l'article 5 du présent arrêté est réalisée par une équipe désignée à cet effet par le ministre de la santé publique et composée par un médecin ou un pharmacien inspecteur de la santé publique, un biologiste hospitalo-universitaire spécialiste dans la discipline concernée et un responsable de laboratoire d'analyses médicales humaines qui peut être de libre pratique lorsqu'il s'agit d'expertiser un laboratoire privé.

Un rapport d'expertise est adressé à cet effet et soumis à l'avis du comité technique de biologie médicale dans le

Activités de la STBC et informations professionnelles

respect de la confidentialité de l'expertise.

Le rapport d'expertise susmentionné et l'avis du comité y afférent sont soumis au ministre de la santé publique qui décide des suites à leur donner.

Art.7- L'unité des laboratoires de biologie médicale au ministère de la santé publique garde, pendant leur durée normale de conservation, des spécimens des échantillons biologiques de chaque opération de contrôle réalisée dans le cadre du contrôle de qualité national des analyses médicales humaines en vue de permettre, le cas échéant, une expertise ou un contrôle de bonne exécution des analyses.

Art.8- Les frais occasionnés par l'exécution technique du contrôle de qualité national des analyses médicales humaines sont imputés sur le budget de l'administration centrale du ministère de la santé publique.

Art.9- Sont abrogées, toutes les dispositions antérieures et contraires au présent arrêté et notamment les dispositions de l'arrêté susvisé du 28 mai 1990.

Tunis, le 22 janvier 2010

Le ministre de la santé publique

Mondher Zenaidi

Vu

Le Premier ministre

Mohamed Ghannouchi

SEMINAIRE- ATELIER ANTIBIOGRAMME

«De la théorie à la pratique »

TUNIS- 26-27 AVRIL 2010

Lundi 26-04-2010

- 8h30 : Accueil des participants
- 9h00 : INTRODUCTION: **L. SLIM-SAIDI, A. BEN HASSEN**
- 9h15 : Entérobactéries et β -lactamines: mécanismes de résistance et méthodes de détection
I. BOUTIBA
- 10h00 : Pause café
- 10h15 : Entérobactéries et autres antibiotiques **M. MASTOURI**
- 10h45 : Antibiogramme des entérobactéries en pratique
- 12h30 : Déjeuner
- 14h00 : STAPHYLOCOQUE : Mécanismes de résistance aux antibiotiques et méthodes de détection
B. PANGON
- 15h30 : Autres cocci à Gram + et antibiotiques **E. MEHIRI**
- 16h:00 : Pause café
- 16h15 : Antibiogramme des Cocci Gram + en pratique

Mardi 27-04-2010

BGN non fermentant et antibiotiques :

- 9h00 : Pseudomonas aeruginosa **F. BARGUELLIL**
- 9h30 : Acinetobacter **S. BESBES**
- 10h00 : Haemophilus, Neisseria et antibiotiques **H. SMAOUI**
- 10h30 : Pause café
- 10h45 : Antibiogramme des BGN non fermentant au quotidien
- 12h00 : Apport de l'automation dans la détection des résistances bactériennes.
C. ELOY
- 13h00 : Discussion - clôture du séminaire

Contact : contact@stbc.org.tn - leila.saidi@rns.tn

Instructions aux auteurs

La Revue Tunisienne de Biologie Clinique (RTBC) est publiée par la Société Tunisienne de Biologie Clinique. Les sujets publiés se rapportent à tous les aspects de la Biologie Clinique de toutes disciplines et tout mode d'exercice. La revue publie des articles originaux, des revues générales, des notes de pratique quotidienne ou de formation continue, des revues de presse ou de livres et des lettres à la rédaction. Toutes les publications se font en français, en anglais ou en arabe et doivent être obligatoirement accompagnées d'un résumé en anglais (Les lettres à la rédaction, les revues de presse ou de livres ainsi que les notes, ne requièrent pas de résumé).

Les manuscrits soumis à la revue ne doivent pas avoir fait l'objet de publication antérieure (en dehors des thèses, mémoires, ou abstracts). Les manuscrits sont soumis à aux moins deux lecteurs anonymes sélectionnés par le comité de rédaction.

Si des corrections sont demandées aux auteurs, la version corrigée doit être soumise de nouveau à la rédaction dans un délai ne dépassant pas 2 mois. Elle doit être accompagnée d'une version sur disquette informatique (logiciel word).

Une fois accepté, le manuscrit ne peut être publié dans une autre revue sans l'autorisation préalable de la RTBC.

Recommandations générales

● Soumission des manuscrits

Les manuscrits sont adressés en 3 exemplaires (y compris les illustrations) au rédacteur en chef, à l'adresse suivante :

Revue Tunisienne de Biologie Clinique

BP. N° 320 El Menzah 8 - 2037 Tunis - Tunisie

E-mail : contact@stbc.org.tn

chiheb.rayan@rns.tn

Les manuscrits doivent être accompagnés d'une lettre précisant la rubrique à laquelle les auteurs désirent voir apparaître leur manuscrit et les engageant quant à la non soumission à une autre revue. Cette lettre doit porter la signature de tous les auteurs.

● Préparation des manuscrits

Les manuscrits doivent être rédigés en interligne 1,5, taille des caractères : 12, sur du papier format A4, en recto uniquement.

Laisser une marge de 2,5 cm des 4 côtés de la page.

Mettre les références, les tableaux et les figures sur des pages séparées du texte. Toutes les pages doivent être numérotées, en commençant par la page de titre. Les différentes sections du manuscrit doivent répondre aux recommandations suivantes :

page de titre

- le titre de la publication, reflétant son contenu (2 lignes maximum)
- les noms et prénoms des auteurs, ainsi que les adresses professionnelles des équipes (lorsqu'il existe plus d'un laboratoire d'origine, indiquer en "exposant" après chaque nom, le numéro du laboratoire correspondant).
- une adresse de correspondance avec N° de téléphone. fax et E-mail.

résumé et mots clés

- Le résumé consiste en un paragraphe unique comportant moins de 200 mots.
- Aucune abréviation ni référence ne doivent apparaître dans le résumé.
- Le résumé est suivi d'une série d'au maximum six mots clés.

remerciements

Les remerciements éventuels sont placés à la fin du texte, avec un caractère différent.

références (1)

Les références sont numérotées par ordre d'apparition dans le texte et présentées selon le modèle suivant :

- **Pour les articles de revues** : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine. Nom

abrégé de la revue année ; volume : première et dernière page de l'article.

Exemple : Boscato LM, Stuart MC. Incidence specificity of interference in two-site immunoassays. Clin Chem 1986 ; 32 : 1491-5.

(1) : *International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. N Engl J Med 1991 ; 324 : 424-8.*

- **Pour les articles de livres** : Noms des auteurs de l'article suivis des initiales des prénoms. Titre de l'article dans la langue d'origine. In : noms et initiales des auteurs de l'ouvrage. Titre du livre. Ville, éditeur, année de publication ; première et dernière page de l'article.

Exemple : Kohn RR. Aging and age related disease : Normal processes. In : Johnson HA. Relation Between Normal Aging and Disease. New York, Raven Press, 1985: 1-44.

- **Pour un livre** : Noms des auteurs suivis des initiales des prénoms. Titre du livre. ville, éditeur, année de l'édition : nombre de pages ou les pages exactes à consulter (la 1^{ère} et la dernière).

Exemple : Forbes GB. Human body composition. New York : Springer Verlag, 1987 : 27.

tableaux et figures

Ils sont présentés sur des pages séparées du texte et numérotés respectivement en chiffres romains et arabes.

Ils sont accompagnés de titres et de légendes suffisamment clairs et explicites.

abréviations

Tout sigle ou abréviation nécessaire doit être explicité à sa première apparition dans le texte.

Rubriques

● Editorial

Habituellement écrit à la demande du Comité de Rédaction, sur une question «d'actualité», par un auteur qui fait autorité sur le sujet. Il doit être court, de l'ordre de cinq pages dactylographiées et comporter moins de 10 références bibliographiques.

● Revues générales

Elles ont pour objet de présenter une mise au point des connaissances et de souligner les acquisitions récentes.

Les revues générales sont normalement publiées sur invitation du comité de rédaction. Toutefois, des suggestions au rédacteur en chef peuvent être avancées.

Les recommandations de la rédaction sont identiques à celles concernant les articles originaux.

● Articles originaux

Ils ont pour objet de présenter un travail original se rapportant à la résolution de problèmes en pathologie humaine et où la biologie tient une place prépondérante.

Le nombre de pages est limité à 15, illustrations, références et résumé compris.

Ils doivent comporter les sections suivantes dans l'ordre : titre, résumé, mots clés, introduction, matériel et méthodes, résultats, discussion, remerciements (éventuellement), références, tableaux et figures.

● Lettres à la rédaction

Cette rubrique permet aux lecteurs de réagir à propos d'un article paru dans la RTBC, d'une nouveauté ou d'un événement en biologie clinique. La lettre doit être concise (moins de 750 mots, références comprises). Une figure ou un tableau peut y être inclus.

● Notes de pratique quotidienne

Il s'agit d'un espace réservé à des articles courts consacrés à l'exercice quotidien de la biologie (évaluation technique et réactovigilance, cas cliniques, valeur sémiologique des analyses, organisation et gestion des laboratoires,...). Ces articles doivent comporter moins de 1500 mots, 2 tableaux ou figures au maximum, et moins de 15 références.