

MINISTRE DE L'EDUCATION NATIONALE

REPUBLIQUE DU MALI



Un_Peuple

Un But

Une Foi

UNIVERSITE DE BAMAKO
Faculté de Médecine de
Pharmacie

ANNEE UNIVERSITAIRE 2005-2006

N°......./

THESE

ETUDE COMPARATIVE DE LA P.C.R
ET
DE L'ELECTROPHORESE DANS
LE DIAGNOSTIC DE LA

Présentée et soutenue publiquement le...../...../.../ devant la
Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto- Stomatologie du
Mali

Par : Mr Adoulaye dit Dialla DIAWARA
Pour Obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

Jury :

Président :

Professeur Moussa HARAMA

Membres :

Docteur Guimogo DOLO

Co- Directeur de thèse :

Docteur Aldiouma GUINDO

Directeur de thèse :

Docteur Sekou F M TRAORE

TITRE

:

**ETUDE COMPARATIVE DE LA PCR ET DE
L'ELECTROPHORESE DANS LE DIAGNOSTIC DE
LA DREPANOCYTOSE**

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-
STOMATOLOGIE**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2005- 2006

ADMINISTRATION

DOYEN : **MOUSSA TRAORE** - PROFESSEUR

1^{ER} ASSESSEUR : **MASSA SANOGO** - MAITRE DE CONFERENCES

2^{ème} ASSESSEUR : **GANGALY DIALLO** - MAITRE DE CONFERENCES

AGREGE

SECRETAIRE PRINCIPAL : **YENIMEGUE ALBERT DEMBELE** - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

AGENT COMPTABLE : **Madame COULIBALY Fatoumata TALL** -
CONTROLEUR DE TRESOR

LES PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie - Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE	Pédiatrie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-Entérologie

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	OrthopédieTraumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	ORL

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr. Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mme SY Aïda SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Issa DIARRA	Gynéco-obstétrique
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie - Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO	ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	ORL

5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mme Djénéba DOUMBIA	Anesthésie/Réanimation
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie. Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophtalmologie
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale
Mr Adama SANGARE	Orthopédie - Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI	Ophtalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophtalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie – Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophtalmologie
Mr Madi MAKALOU	Orthopédie/Traumatologie
Mr Aly TEMBELY	Urologie

Mr Niani MOUNKORO
Mr Tiemoko D. COULIBALY
Mr Souleymane TOGORA
Mr Mohamed KEITA

Gynécologie/Obstétrique
Odontologie
Odontologie
ORL

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO
Mr Siné BAYO
Mr Amadou DIALLO
Mr Moussa HARAMA
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Biologie
Chimie Organique
Parasitologie – Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Yénimégué Albert DEMBELE
Mr Anatole TOUNKARA
Mr Amadou TOURE
Mr. Flabou Bougoudogo
Mr Amagana DOLO

Chimie Organique
Immunologie **Chef de D.E.R.**
Histoembryologie
Bactériologie-Virologie
Parasitologie-Mycologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE
Mr Abdrahamane S. MAIGA
Mr Adama DIARRA
Mr Mamadou KONE
Mr.Massa SANOGO

Biochimie
Parasitologie
Physiologie
Physiologie
Chimie Analytique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE
Mr Sékou F.M. TRAORE
Mr Abdoulaye DABO
Mr Abdrahamane TOUNKARA
Mr Ibrahim I. MAIGA
Mr Benoît KOUMARE
Mr Moussa Issa DIARRA
Mr Kaourou DOUCOURE
Mr Bourrera KOURIB

Biologie
Entomologie médicale
Malacologie, Biologie Animale
Biochimie
Bactériologie - Virologie
Chimie Analytique
Biophysique
Biologie
Immunologie

Mr Souleymane DALLO
Mr Cheik Bougadari TRAORE
Mr Lassana DOUMBIA

Bactériologie-Virologie
Anatomie-Pathologie
Chimie Organique

5. **ASSISTANTS**

Mr Mounirou BABY
Mr Mahamadou A. THERA
Mr Mangara M. BAGAYOGO
Mr Guimogo DOLO
Mr Abdoulaye TOURE
Mr Djibril SANGARE
Mr Mouctar DIALLO
Mr Boubacar TRAORE
Mr Bokary SACKO

Hématologie
Parasitologie-Mycologie
Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Biologie Parasitologie
Immunologie
Biochimie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. **PROFESSEURS**

Mr Abdoulaye Ag RHALY
Mr Mamadou K. TOURE
Mr Mahamane MAIGA
Mr Baba KOUMARE
Mr Moussa TRAORE
Mr Issa TRAORE
Mr Mamadou M. KEITA
Mr Hamar A. TRAORE
Mr Dapa Aly DIALLO
Mr Moussa Y. MAIGA

Médecine Interne
Cardiologie
Néphrologie
Psychiatrie, **Chef de DER**
Neurologie
Radiologie
Pédiatrie
Médecine Interne
Hématologie
Gastro-entérologie

2. **MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Toumani SIDIBE
Mr Bah KEITA
Mr Boubacar DIALLO
Mr Somita KEITA
Mr Abdel Kader TRAORE
Mr Siaka SIDIBE
Mr Mamadou DEMBELE

Pédiatrie
Pneumo-Phtisiologie
Cardiologie
Dermato-Leprologie
Médecine Interne
Radiologie
Médecine Interne

3. **MAITRES ASSISTANTS**

Mr Mamady KANE
Mme Tatiana KEITA
Mme TRAORE Mariam SYLLA
Mr Adama D. KEITA
Mme SIDIBE Assa TRAORE
Mme Habibatou DIAWARA

Radiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Radiologie
Endocrinologie
Dermatologie

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE
Mr Bougouzié SANOGO
Mr Saharé FONGORO
Mr Bakoroba COULIBALY
Mr Kassoum SANOGO
Mr Seydou DIAKITE
Mme Habibatou DIAWARA
Mr Mahamadou B. CISSE
Mr Arouna TOGORA
Mme DIARRA Assétou SOUCKO
Mr boubacar TOGO
Mr Mahamadou TOURE
Mr Idrissa A. CISSE
Mr Mamadou B. DIARRA
Mr Anselme KONATE
Mr Moussa t. DIARRA
Mr souleymane DIALLO
Mr Souleymane COULIBALY
Mr Daouda K. MINTA
Mr Sounkalo DAO

Psychiatrie
Gastro-entérologie
Néphrologie
Psychiatrie
Cardiologie
Cardiologie
Dermatologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Médecine Interne
Pédiatrie
Radiologie
Dermatologie
Cardiologie
Hépatogastro-entérologie
Hépatogastro-entérologie
Pneumologie
Psychologie
Maladies Infectieuses
Maladies Infectieuses

5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO

Neurologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEUR

Mr Boubacar Sidiki CISSE
Mr Gaoussou KANOUTE

Toxicologie
Chimie Analytique, **Chef de D.E.R.**

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Ousmane DOUMBIA
Mr Drissa DIALLO

Pharmacie Chimique
Matières Médicales

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA
Mr Elimane MARIKO

Législation
Pharmacologie

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Alou KEITA
Mr Ababacar I. MAIGA
Mr Yaya KANE

Galénique
Toxicologie
Galénique

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA

Santé Publique, **Chef de D.E.R.**

2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA

Santé Publique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE

Santé Publique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE
Mr Adama DIAWARA
Mr Hamadoun SANGHO
Mr Massambou SACKO
Mr alassane A. DICKO

Santé Publique
Santé Publique
Santé Publique
Santé Publique
Santé Publique

5. ASSISTANTS

Mr Samba DIOP
Mr Seydou DOUMBIA
Mr Oumar THIERO

Anthropologie Médicale
Epidémiologie
Biostatistique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA
Mr Bouba DIARRA
Mr Salikou SANOGO
Mr Boubacar KANTE
Mr Souléymanne GUINDO
Mme DEMBELE Sira DIARRA
Mr Modibo DIARRA
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA
Mr Mahamadou TRAORE
Mr Yaya COULIBALY

Botanique
Bactériologie
Physique
Galénique
Gestion
Mathématiques
Nutrition
Hygiène du Milieu
Génétique
Législation

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA
Pr. Babacar FAYE
Pr. Eric PICHARD
Pr. Mounirou CISSE
Pr. Amadou Papa DIOP

Bromatologie
Pharmacodynamie
Pathologie Infectieuse
Hydrologie
Biochimie

DEDICACES

Je dédie ce travail

Au Tout Puissant ALLAH.

Gloire à Toi de nous avoir assisté de la lumière.

Au Prophète MOUHAMMAD.

Que la bénédiction et la paix d'ALLAH soient sur toi.

Nous te témoignons nos respects et notre gratitude.

A mon père GABOU DIAWARA.

Tu as consenti d'énormes sacrifices pour faire de tes descendants des Hommes.

Tu nous as appris le sens de l'honneur, de la dignité, de la justice, de la discipline et le respect de soi.

Tu nous as appris à aimer, à respecter l'homme et faire preuve de courage et d'endurance pour affronter la vie.

En cet instant mes pensées vont vers toi.

Que notre Seigneur t'accorde une longue vie et une excellente santé.

A ma mère MME DIAWARA SIRA DIALLO .

Tu as guidé mes pas, veillé sur moi et tu m'as toujours entouré de cette Tendresse que seules les mères sont capables d'offrir. Je te demande pardon et bénédiction nuit et jour.

Je ne trouverai pas ici de mots pour t'exprimer mes sentiments.

Que ce modeste travail soit le témoignage de ma profonde affection .

Puisse Allah le Tout Puissant te donner longue vie et bonne santé.

A la mémoire de ma mère FEUE MME DIAWARA AWA SACKO .

Mes vives reconnaissances.

Ce travail est aussi le votre.

En cet instant mes pensées vont vers toi.

Que Dieu le Tout Puissant t ' accueille dans sa miséricorde AMEN .

A mon frère DABA DIAWARA.

Puisse ton courage et ton abnégation nous servir d'exemple.

Trouves dans ce travail mon amour profond et ma profonde gratitude

Que le Seigneur t ' accorde une longue vie et une excellente santé .

A ma belle mère MME TOURE NANA KONE.

Tu es une femme humble , fidèle à tes principes de bonté , de rigueur , de servitude et de subtilité dans tes rapports avec tes semblables .

Reçois ici l ' expression de toute ma reconnaissance et que Dieu te donne longévité et santé .

A ma femme MME DIAWARA KADIDIA DIARRA et à mes enfants.

Vous avez été un soutien inébranlable dans l ' accomplissement de ce travail .

Votre gentillesse , votre sagesse et votre complicité n ' ont pas fait défaut.

Ce travail est aussi le votre.

Que Dieu vous prête une bonne santé et une longue vie .

Trouver ici l'expression de mes sentiments les plus affectueux.

A toute ma famille (ascendants, descendants et collatéraux).

Votre sympathie et votre solidarité ne m'ont pas fait défaut.

Ce travail est aussi le votre.

Trouver ici l'expression de mes sentiments les plus affectueux .

A mes frères et sœurs.

Vous avez été pour moi plus que des frères et sœurs mais des Amis et des confidents .

A vous tous mes sentiments les plus sincères et fraternels .

A tous je vous souhaite tous une longévité et une bonne santé .

REMERCIEMENTS

Tout d'abord mes remerciements d'allure modeste certes mais d'essence éminemment sincère vont à :

Dr Guindo Aldiouma

Constamment sollicité pour corriger enrichir et améliorer la qualité de ce travail, vous avez éveillé en moi le goût du travail de laboratoire . Vous m'avez encadré et suivi dans cette thèse avec beaucoup de disponibilité, trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A tout le personnel du laboratoire de recherche sur le paludisme.

C'est un réel plaisir de travailler avec vous, votre convivialité et votre sens élevé du travail bien fait m'inspireront toujours.

Pr. Mamadou Lamine Traoré pour tous ce que vous avez fait pour moi.

Dr Traoré Dienca Diallo, Pharmacienne officine du Niger.

Vous m'avez accepté dans votre officine avec beaucoup de gentillesse. Durant mon séjour je n'ai manqué de rien pour l'accomplissement de mon travail. Votre disponibilité, votre courtoisie et votre sens élevé du devoir font de vous une pharmacienne respectable.

A tout le Personnel de la PHARMACIE DU NIGER.

Monsieur MAMADOU BAMOU TOURE ET FAMILLE pour m'avoir accepté dans votre famille avec gentillesse et respect.

Pr. Gaoussou Kanouté et Pr. Ousmane Doumbia

Vous avez été plus que des Professeurs mais des grands frères des cousins, trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Dr Abdoulaye Traoré coordinateur SANDOZ MALI.

Je dis les vrais amis sont difficiles à trouver, mais vous en êtes un. Votre gentillesse et votre simplicité fait de vous un homme exemplaire, trouvez ici l'expression de mes remerciements sincères.

Tout le personnel du LABORATOIRE SANDOZ MALI

Je ne citerai pas de nom mais vous vous reconnaissez, je n'oublierai jamais les liens de fraternité qui se sont tissés entre nous.

Dr Abdou Doumbia et Madame, Dr Oumar Labass Keita, Dr Nouhoun Sogodogo, Dr Sékou Traoré et Madame, Dr Badara Wade, Dr Abdrahamane Diarra, Dr Bakary Traoré vos encouragements et gentillesses étaient un stimulant précieux. Accepter chers Docteurs ma profonde gratitude.

A tous mes amis et parents pour leur soutien inconditionnel, **Trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.**

Aux membres du jury

A notre maître le président du jury : Pr. Moussa Harama.

Professeur agrégé en chimie organique

Responsable chargé de l'enseignement de la chimie organique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'odontostomatologie.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse.

En plus de vos qualités d'enseignant, nous gardons de vous l'image du maître aux qualités humaines inestimables.

Vos critiques et vos suggestions contribueront sans doute à améliorer ce travail.

Vos qualités humaines et votre rigueur scientifique font de vous un formateur apprécié de tous.

Veillez trouver ici, cher maître, l'expression de nos sentiments les plus dévoués et de notre profond respect.

A notre maître et juge : Docteur Guimogo DOLO

**Assistant en Entomologie Moléculaire Médicale à la Faculté de
Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie.
Chercheur, enseignant chargé des cours de génétique.**

Vos qualités humaines et intellectuelles font de vous un maître respecté et écouté.

Nous sommes honorés par le fait que vous avez bien voulu accepter de juger ce travail.

Veillez trouver ici, cher maître l'expression de notre profond respect.

A notre maître et juge: Docteur Mahamadou Traoré

Enseignant chargé des cours de génétique à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie.

Votre abord facile, votre modestie et votre humanisme forcent notre admiration.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury.

Veillez accepter cher maître, nos sentiments les plus respectueux.

A notre co- directeur de thèse : Docteur Aldiouma GUINDO

Pharmacien

Assistant chercheur au MRTC, candidat au Ph D.

Chef de l'unité polymorphismes des globules rouges et paludisme.

C'est par votre compétence, votre disponibilité que j'ai appris à faire la recherche et je vous prie de bien vouloir accepter, l'expression de ma grande admiration.

A notre maître et directeur de thèse : Docteur F.M. TRAORE

Maître assistant, chercheur, chargé des cours d'Entomologies Médicale à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie du Mali.

Cher maître, nous ne vous remercierons jamais assez d'avoir bien voulu nous confier ce travail et surtout de nous avoir aidé à le réaliser.

Homme de principe, la clarté de vos enseignements, votre rigueur scientifique et votre amour pour le travail bien fait, nous ont beaucoup impressionné au cours de notre formation.

Vos qualités humaines et intellectuelles attestent la grande audience que vous avez auprès de vos pairs et étudiants.

Soyez assuré cher maître de notre immense gratitude, de notre grande admiration et de notre profond respect.

LISTE DES ABREVIATIONS

Asp= Acide aspartique

Asn= Asparagine

A = Adenine

ADN= Acide désoxyribonucléique

ARN= Acide ribonucléique

ALT=

AW1=

AW2=

AFSC=

C= Cytosine

DNTP= Desoxy nucléotide triphosphate

EDTA= Ethylène Diamine Tétra-Acétique

**FMPOS= Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odonto-stomatologie**

G= Guanine

Glu= Acide glutamique

GIBCO BRL=

HbA= Hémoglobine A

HbS= Hémoglobine S

MIX=

MRTC=

MgCL₂= Chlorure de magnésium

PCR= Polymérase Chain Réaction

TAK=

T= Thymine

U= Uracile

UV= Ultra violet

Val= Valine

Sommaire

I / INTRODUCTION	1
II / OBJECTIFS.....	4
A) Objectif général.....	5
B) Objectifs spécifiques.....	5
III / GENERALITES.....	6
A) Généralités sur la drépanocytose.....	7
1. Distribution géographique de la drépanocytose.	7
2. Données cliniques et biologiques de la Drépanocytose.....	7
3. Mécanisme clinique et biologique des Hémoglobinoses:les mutations ponctuelles... ..	9
4. Physiopathologie.....	9
5. Clinique.....	10
6. Nomenclature des hémoglobines anormales ...	12
7. Autres mutations.....	12
a) Le crossing over.....	12
b) La délétion.....	12
c) La double substitution	13
d) L'élongation des chaînes.....	13
8. Traitement.....	13
B) Généralités sur l'ADN	15
1. Historique.....	15
2. Définition de l'ADN.....	15
3. L'amplification de l'ADN.....	15
4. La localisation de l'ADN.....	16
a) le noyau.....	16
b) les mitochondries.....	17
5. Structure de l'ADN : la double hélice.....	17
6. L'ADN en tant que support de l'information génétique.....	19

7. Les anomalies de l'ADN.....	20
a) Les modifications non systématiques	
Les mutations des ponctuelles.....	20
b) Les recombinaisons méiotiques permettent	
le brassage des gènes	21
8. La constance de l'ADN.....	22
IV / METHODOLOGIE.....	24
1. Lieu d'étude	25
2. Période d'étude.....	25
3. Echantillonnage.....	25
4. Type d'étude.....	25
5. Techniques de laboratoire.....	25
5.1 Les techniques d'extraction de l'ADN par le	
méthanol.....	25
a) Principe.....	26
b) Matériels et réactifs utilisés.....	26
c) Mode opératoire.....	26
5.2 Technique d'extraction de l'ADN par le	
QIAGEN.....	27
a) Principe.....	27
b) Matériels et réactifs.....	27
c) Mode opératoire.....	27
5.3 Technique de l'électrophorèse sur acétate de	
cellulose	29
a) Principe.....	29
b) Matériels et réactifs.....	29
c) Echantillon.....	29
d) Mode opératoire.....	29
5.4 P.C.R.....	32
a) Principe.....	32

b) Matériels et réactifs.....	32
6. Comparaison entre l'électrophorèse et la technique moléculaire	36
V / RESULTATS.....	37
VI / COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....	40
VII / CONCLUSION.....	42
VIII / RECOMMANDATIONS.....	44
IX / BIBLIOGRAPHIE.....	46
X) ANNEXES.....	49

I / INTRODUCTION

La drépanocytose est une hémoglobinopathie héréditaire caractérisée par la substitution d'un acide aminé de la chaîne bêta . L'expression clinique est variable selon que la tare chromosomique est portée à l'état homozygote ou hétérozygote.

La drépanocytose est la première hémoglobinose identifiée et la plus répandue dont la découverte et l'analyse biochimique ont été le point de départ et le modèle des travaux ultérieures sur la pathologie moléculaire de l'hémoglobine.

Elle est due à une mutation ponctuelle, en effet c'est l'**acide glutamique (HOOC—CH₂-CH₂-CHNH₂-COOH)** situé en sixième position sur la chaîne B de la globine qui est remplacé par la **valine (CH₂)₂—CH-CHNH₂—COOH**.

Elle est l'hémoglobinose la plus répandue dans le monde avec environ trois millions d'individus atteints.

Son foyer original semble être l'Afrique avec des fréquences variables d'une zone géographique à une autre .

Au Mali sa fréquence varie entre 3 et 15 % selon les ethnies.

La drépanocytose constitue de nos jours un problème de santé publique.

La manifestation clinique la plus patente est l'anémie falciforme.

La méthode la plus simple utilisée pour l'étude des hémoglobines anormales reste l'électrophorèse de l'hémoglobine.

Des mutations différentes peuvent être responsables de migrations électrophorétiques identiques. Il existe ainsi plusieurs hémoglobines migrant en position S et C (A₂).

Pour les distinguer, il faut étudier les migrations électrophorétiques à différents pH. Parfois la densitométrie et l'étude des séquences des acides aminés permet de démontrer l'hétérogénéité d'un groupe électrophorétique d'hémoglobine.

L'électrophorèse de l'hémoglobine permet de distinguer les hémoglobines mutées des hémoglobines normales, à la seule condition que la mutation fasse apparaître une différence de charge par rapport aux Hb normales et principalement par rapport à l'HbA.

En principe, la substitution d'un acide aminé de même charge ne devrait donc pas modifier l'électrophorèse de l'hémoglobine.

Malgré ces avancées, son diagnostic constitue un problème majeur pour bon nombre de laboratoires.

La biologie moléculaire paraît un outil précieux de diagnostic de la drépanocytose.

Cette méthodologie du diagnostic repose sur l'étude de la fraction de l'ADN codant pour le gène de la drépanocytose.

Notre étude se propose de mettre au point la technique moléculaire du diagnostic de la drépanocytose.

II / OBJECTIFS

A) Objectif général :

Comparer l'électrophorèse de l'hémoglobine à la PCR dans le diagnostic de la drépanocytose.

B) Objectifs spécifiques :

- 1) Mettre au point la technique de dépistage de la drépanocytose par la méthode moléculaire.**
- 2) Comparer les deux méthodes de diagnostic de la drépanocytose.**
- 3) Recommander le choix d'une des méthodes.**

III / GENERALITES

A) GENERALITE SUR LA DREPANOCYTOSE :

1).Distribution géographique de la drépanocytose:

Les hémoglobinopathies concernent environ la moitié de la population du globe terrestre.

Cette distribution est inégale selon le type d'hémoglobine.

-Ainsi plusieurs millions de sujets sont porteurs de l'Hb S. La large dissémination de ce gène peut s'expliquer par la théorie du polymorphisme équilibré : dans les régions où règne le paludisme, la présence d'Hb S serait un avantage sélectif, les hétérozygotes AS résisteraient mieux au parasite que les sujets normaux (10).

L'Hb S est essentiellement trouvée dans les régions tropicales, le foyer de loin le plus important traverse en ceinture le continent Africain ("ceinture sickleémique de Lehman"). La dissémination du gène de l'Hb S a pu s'effectuer à partir d'un foyer unique. Selon cette hypothèse la mutation serait apparue dans les antiques plaines fertiles d'Arabie puis, en suivant les courants de migration des populations, aurait gagné l'Est et l'Ouest. A l'opposé de cette théorie d'autres auteurs avancent une origine pluricentrique, les conditions écologiques assurant alors à chaque fois le succès de la mutation.

2) Données clinique et biologique de la drépanocytose:

Ingram a montré que la différence de charge électrophorétique de l'Hb S était due à une substitution d'un acide aminé à l'intérieur d'un peptide de la chaîne β . La bande correspondant au premier peptide trypsique de cette chaîne est déplacée.

La détermination de sa composition en acides aminés et de sa séquence, effectuée après élution a révélé que l'acide glutamique situé en sixième position était remplacé par une valine. L'Hb S se désigne donc comme étant le variant β^6 (A3) Glu \rightarrow Val.

On distingue deux formes cliniques selon qu'il s'agit de sujets homozygotes qui possèdent essentiellement de l'Hb S ou de sujets hétérozygotes dont les globules rouges contiennent plus d'Hb A que d'Hb S.

Alors que les drépanocytaires homozygotes souffrent d'une anémie hémolytique chronique grave permettant rarement une espérance de vie normale, les hétérozygotes sont, au contraire, le plus souvent en bonne santé.

Le tableau hématologique et clinique de la drépanocytose homozygote a été individualisé dès 1910 par Herrick et son caractère héréditaire reconnu quelques années plus tard. Chez les homozygotes, les globules rouges prennent une forme allongée, en faux, lorsque le sang est désoxygéné (falciformation des globules rouges).

La falciformation des cellules est due à un réarrangement des molécules d'Hb à l'intérieur de l'hématie. Normalement, l'hémoglobine est présente dans le globule rouge à une concentration de 33% et constitue un fluide de haute viscosité dans un état paracristallin. L'Hb S désoxygénée a une solubilité diminuée et forme des cristaux allongés (de 1 à 15 μ de long). De tels cristaux unidirectionnels sont appelés tactoïdes. A l'intérieur du globule rouge des fibres d'environ 200 Å de diamètre se constituent. Chacune d'elles est composée de plusieurs filaments où les molécules d'hémoglobine se disposent comme les perles d'un collier.

La gélation de l'Hb S à l'intérieur de la cellule a deux conséquences majeures. La première est une augmentation de la viscosité du sang, ce qui aboutit à une stase avec comme corollaire acidose et désoxygénation accrue d'où aggravation du phénomène initial. Ceci peut aboutir à des crises vaso-occlusives très douloureuses entraînant des lésions dans divers organes. La deuxième conduit à une fragilisation de la membrane cellulaire et à une destruction précoce des cellules. La durée de vie des globules rouges est ramenée à 17 jours contre 120 chez le sujet normal (29).

3) Mécanisme génétiques des hémoglobinoses : les mutations ponctuelles.

La plupart des mutations observées à propos des hémoglobines anormales sont des mutations ponctuelles. Il faut néanmoins noter qu'un quart seulement de ces mutations sont détectées par les moyens couramment utilisés, tel que l'électrophorèse de l'hémoglobine qui ne met en évidence que des différences de charge électrique. La substitution d'un acide aminé par un autre acide aminé de même charge a de plus grandes chances de passer inaperçue, si la substitution porte sur une zone superficielle de la molécule de l'hémoglobine. Celle-ci apparaît à l'électrophorèse et par analyse de structure comme étant normale ; un tel mécanisme a été invoqué pour expliquer certaines thalassémies.

4) Physiopathologie :

Cette modification biochimique a de graves conséquences :

L'hémoglobine anormale se polymérise lorsque l'oxygénation du sang diminue et elle précipite sous forme de cristaux qui déforment l'hématie et lui donnent une forme de faucille (falciformation).

Donc tout facteur de désoxygénation favorise la falciformation : acidose, stase sanguine, déshydratation, ralentissement du transit capillaire...

La falciformation ralentit la microcirculation, obstrue les capillaires et provoque thromboses et infarctus, particulièrement dans les organes très vasculaires : rate, reins, moelle osseuse.

L'hématie ainsi déformée et circulant plus difficilement a une durée de vie écourtée ; elle est prématurément détruite d'où hémolyse et anémie.

Le système des phagocytes mononuclés est débordé dans la fonction de macrophage par ces hématies détruites et n'est plus disponible pour la lutte contre les bactéries. Il s'ensuit une sensibilité du drépanocytaire aux infections.

En outre, la moelle osseuse, sollicitée à l'excès pour préparer le déficit en globules rouges, donne des atteintes des os.

Deux situations génétiques peuvent être réalisées :

- le trait drépanocytaire hétérozygote dont les porteurs ont à la fois de l'hémoglobine normale et de l'hémoglobine anormale dans les hématies. Il n'a pas d'expression clinique, dans les conditions habituelles de la vie.
- La maladie drépanocytaire homozygote ou il n'y a pas d'hémoglobine normale dans les hématies.

5) Clinique :

C'est une maladie congénitale qui se manifeste dès le plus jeune âge (3 mois) par une anémie avec subictère et splénomégalie modérée. Rien ne fera suspecter la drépanocytose jusqu'à la première crise à partir de laquelle la maladie va évoluer en une succession d'épisodes aigus séparés par des phases de silence clinique.

Ces crises se traduisent par trois types de syndromes : hémolytique, algique et infectieux.

- **la crise hémolytique**, surtout chez l'enfant, avec accentuation de l'anémie, de l'ictère, de pronostic réservé ou avec apparition soudaine d'une splénomégalie, de très mauvais pronostic ;
- **la crise algique** aiguë provoquée par un facteur inapparent ou mineur comme effort musculaire, fièvre, émotion et qui traduit un infarctus de siège variable :

- pulmonaire avec fièvre et toux
- ostéo-articulaire dont le syndrome 'pied main' de l'enfant de moins de 5 ans est la forme caractéristique.
- abdominal, splénique, ou hépatique, ressemblant à un abdomen aiguë chirurgical ;

- **la crise infectieuse**, reste la principale cause de mortalité :

Pneumocoque par pneumonies et méningites, Haemophilus influenzae par méningite, salmonelles par ostéomyélite, paludisme aigu encore qu'il y ait une certaine résistance des drépanocytaires au plasmodium falciparum..

Au fur et à mesure de la maladie le tableau se complique et l'état général s'altère :

- les fonctions rénales deviennent insuffisantes,
- les fonctions hépatiques se détériorent (ictère, cholécystite...),
- l'os est remanié par l'expansion médullaire,
- la peau est le siège d'ulcères provoqués par les blessures ou piqûres minimales,
- le cœur est hypertrophié et son débit augmenté,
- les poumons sont le siège d'une fibrose progressive avec hypoxémie qui aggrave à son tour la drépanocytose,
- le système nerveux est atteint par des lésions focales : accidents vasculaires cérébraux, lésions des nerfs crâniens...

- tous les tissus ou organes, muscles, l'appareil génito-urinaire (priapisme), rate, sont touchés et leur fonctionnement perturbé.

- la grossesse aggrave anémie et augmente la fréquence des accidents infectieux. Le test d'Emmel permet la mise en évidence de la falciformation sans toutefois distinguer les homozygotes des hétérozygotes.

6) Nomenclature des hémoglobines anormales :

La nomenclature actuelle fait suivre le nom de la ville ou le nom de la région où l'hémoglobine mutée a été découverte (par exemple l'Hb Mexico, L'Hb Toulouse) de l'indication de la chaîne et de l'acide aminé muté en indice (par exemple Hb S $\alpha_2\beta_2^6$ Glu-----> Val).

Si l'hémoglobine a les caractères d'une hémoglobine déjà désignée par une lettre, la désignation géographique est indiquée en indice inférieur (par exemple Hb S_{askatoon}).

7) Autres mutations :

7.1. Le crossing over :

Les hémoglobines Lepore sont le produit d'un crossing over inégal entre deux gènes voisins, le gène β et le gène δ . Le début de la chaîne est de type δ , la fin, de type β . Des exemples d'hémoglobine anti Lepore ont été récemment

découverts (Hb Congo, P.Nicolic). L'hémoglobine Kenya s'explique également par crossing over mais entre les chaînes γ et β .

7.2. La délétion :

Huit hémoglobines structurellement anormales actuellement connues sont dues à des délétions. Les deux premières identifiées ont été l'hémoglobine Freiburg () et l'hémoglobine Gunhill (). La valine β^{23} manque dans la première ; dans la seconde, manquent 5 résidus β impliqués dans l'attachement de l'hème. Il s'agit ici d'une semi-hémoglobine appelée ainsi parce que deux seulement des quatre chaînes sont porteuses d'hème.

7.3. La double substitution:

Il en existe quelques exemples : hémoglobine C Harlem (14, 15) où deux substitutions ont été mises en évidence sur la même chaîne β (β^6 Glu \rightarrow Val et β^{73} Asp \rightarrow Asn) ; l'hémoglobine J. Singapour et l'hémoglobine Arlington Park.

La présence de deux anomalies sur une seule chaîne peut s'expliquer génétiquement de deux manières différentes : ou bien, il s'agit d'une mutation ponctuelle itérative, un gène muté subit une nouvelle mutation, ou bien il s'agit d'un produit de crossing over entre deux gènes mutés, les produits de la recombinaison étant un gène normal et un gène porteur de deux mutations.

7.4L'élongation des chaînes:

Les deux premiers exemples connus ont été l'hémoglobine α Constant Spring (Hb CS) et l'hémoglobine β TAK (9), où plusieurs acides aminés (31 pour l'Hb CS, 10 pour l'Hb TAK) font suite à une chaîne normale. Le mécanisme

génétique de cette élongation de chaîne reste incertain et n'est peut être pas univoque.

8) Traitement :

Il est purement symptomatique.

Devant une crise hémolytique, la transfusion sanguine est indiscutablement nécessaire lorsque le taux d'hémoglobine descend au dessous de 6gr / 100ml.

Devant les crises vaso-occlusives algique, il faut calmer la douleur (antalgique), réhydrater le patient et lutter contre les infections.

En cas d'infection respiratoire, il faut utiliser l'amoxicilline pour couvrir les deux germes les plus fréquents : pneumocoque et Haemophilus influenzae.

En cas d'ostéomyélites, il faudrait couvrir les salmonelloses mais aussi les staphylocoques : ampicilline.

Enfin pour faciliter la circulation des drépanocytes, on utilisera des agents vaso-érythroactifs type extrait de pervenche, ergot de seigle ou bien des produits tels cétiédil, pentoxifylline, buflomédil ...

Ces agents vasodilatateurs doivent être prescrits en permanence pour prévenir l'apparition de crise.

Joint à une chimiothérapie anti malarique préventive et à des règles d'hygiène de vie et de diététique rigoureuse, la survie du malade sera facilitée dans un confort de vie tout à fait convenable .

B) GENERALITE SUR L'ADN:

1. Historique :

En **1869 Miescher** décrivait une substance isolée du noyau qu'il appela « **nucléine** » .

Dix ans plus tard Flemming constatait qu'une partie de la substance nucléaire fixait fortement les colorants basiques .Il lui donna le nom de chromatine qui est maintenant le terme consacré. Dès cette époque on remarquait que cette substance aux caractères tinctoriaux particuliers était susceptible de modifier sa structure au cours du temps.

A sa forme la plus condensée, observée au cours de la mitose, **Waldeyer** donna le nom de **chromosomes en 1889**.

2. Définition de l'ADN :

L'acide désoxyribonucléique est le support biochimique des caractères héréditaires transmis de génération en génération.

Il renferme à lui seul l'information qui, de génération en génération ,spécifie la séquence des acides aminés dans la chaîne polypeptidique et que le code génétique fait correspondre un tri nucléotide (codon) donné à un acide aminé donné.

3. L'amplification de l'ADN :

Les techniques d'amplification de l'ADN représentent une révolution, car elles permettent d'obtenir des dizaines, voire des centaines de nano grammes d'une séquence dont on n'a que des quantités infimes.

Ces techniques sont basées sur la répétition de réplication in vitro de l'ADN à partir d'amorces spécifiques, éventuellement en passant par l'ARN.

La plus célèbre d'entre elles est la technique PCR (Polymerase Chain Reaction).Celle-ci a complètement bouleversé les stratégies utilisées jusqu'alors en biologie moléculaire , et ouvre d'immenses possibilités pour l'avenir .

4. La localisation de l'ADN :

a) Le noyau :

La quasi-totalité de l'ADN se trouve localisée, chez les eucaryotes, dans le noyau.

Une petite molécule de l'ADN circulaire possédant une organisation et un code génétique légèrement différents est aussi retrouvée dans la mitochondrie ; elle complète le patrimoine génétique de la cellule.

La chromatine est une entité complexe.

Dans le noyau l'ADN n'est jamais nu, mais toujours associé à des protéines, et même à des ARN, l'ensemble constituant ce que l'on appelle **la chromatine**.

Du fait de sa complexité la chromatine est restée une entité floue pendant près d'un siècle. Le contraste est grand entre les connaissances sur l'ADN accumulées depuis la découverte de la double hélice et la pauvreté des informations concernant les interactions avec les protéines au sein de la chromatine. C'est pourtant dans ces interactions que résident les mécanismes fondamentaux de la régulation de l'expression du message génétique.

La vie cellulaire impose qu'à tout moment l'information adéquate soit trouvée parmi les 3 milliards de paires de bases, puis lue de manière régulée. Cette information doit être protégée, réparée en cas d'altération et pérennisée dans les cellules filles. Tout cela est l'œuvre, au moins en très large part, des protéines de la chromatine qui jouent un rôle central. Ce n'est que par la connaissance détaillée de leur structure et de leur mécanisme de fonctionnement que l'on pourra comprendre la régulation des gènes

En plus des histones, quelques protéines sont quantitativement dans la chromatine.

L'histone H 1^o est une protéine uniquement retrouvée dans les cellules quiescentes.

Les protéines minoritaires sont encore mal connues .

b) Les mitochondries:

Les mitochondries possèdent un génome autonome mais très largement insuffisant pour coder toutes les protéines dont elles ont besoin. Ces protéines sont donc majoritairement importées du cytosol. Bien que ce génome soit court, il représente une quantité d'ADN non négligeable puisque l'on en trouve plusieurs copies par mitochondrie, et qu'une cellule possède plusieurs milliers de mitochondries. Ce génome est circulaire. L'un des deux brins est appelé H (heavy) et l'autre L(light).

Une partie des chaînes polypeptidiques appartenant à des enzymes de la membrane interne des mitochondries est codée par l'ADN nucléaire

Ces polypeptides sont synthétisés dans le cytoplasme et pénètrent dans la mitochondrie ou ils s'associent aux polypeptides codés par l'ADN mitochondrial, pour former l'enzyme active qui s'insère alors dans la membrane.

FIGURE : représente la structure d'une mitochondrie



5. Structure de l'ADN : la double hélice.

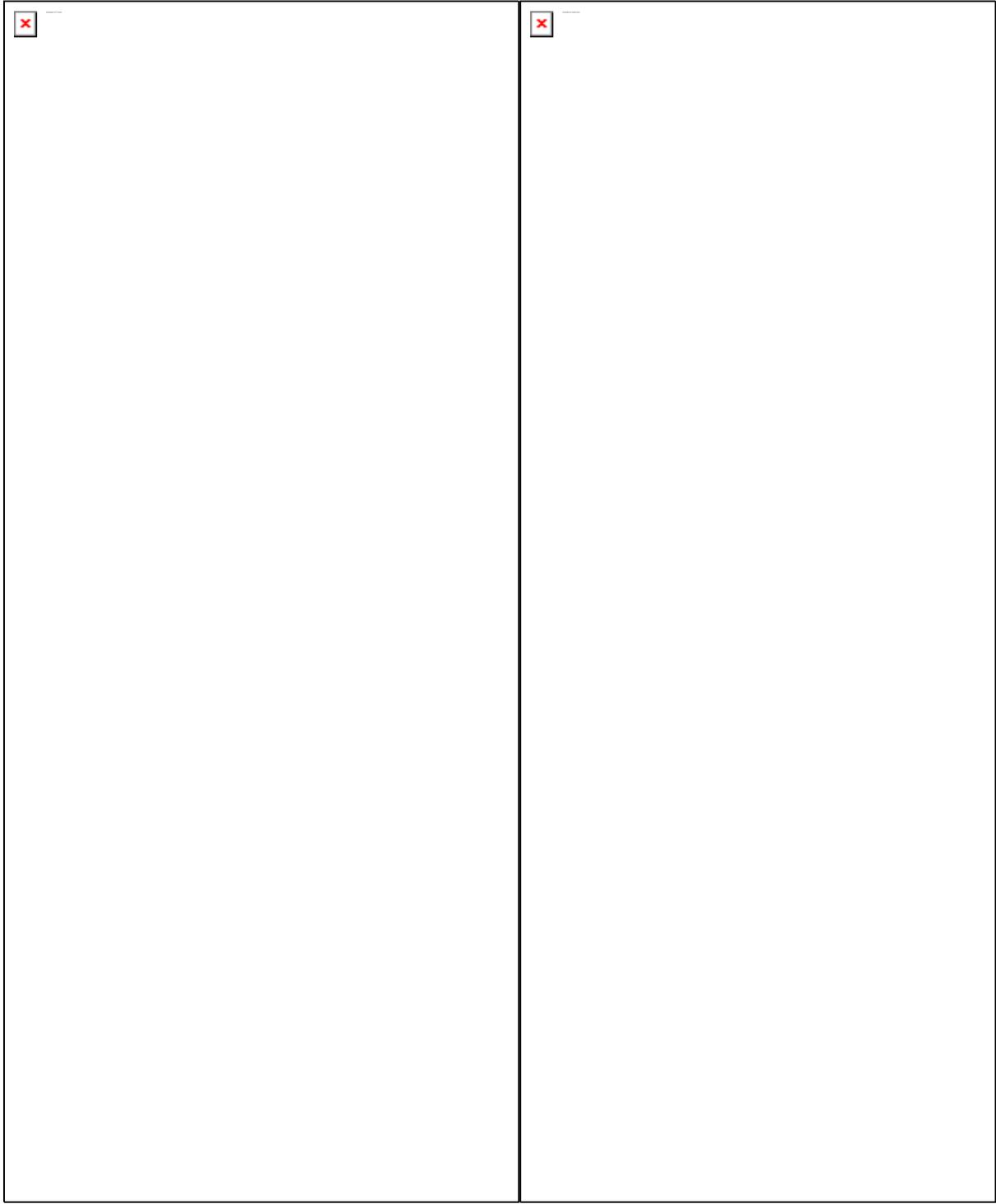


FIGURE 1 : STRUCTURE DE LA DOUBLE HELICE

Les travaux d'Avery, MacLeod et McCarty ont montré en 1944 que l'ADN était le support moléculaire de l'information génétique. Sa structure a été élucidée par Watson, Crick et Wilkins en 1953.

La structure de l'ADN est étonnamment simple.

La molécule d'ADN est composée de l'union de deux brins, enroulés en hélice droite, constitués chacun par une longue chaîne polydésoxyribonucléotidique ou Les unités de bases, les nucléotides formés par l'union d'une base avec le désoxyribose 5' phosphate, sont accrochés les uns aux autres par les liaisons 5'-----3' phosphodiester.

Dans chaque brin le squelette est formé par une répétition de molécules de désoxyribose reliées entre elles par les liaisons phosphodiester et portant chacune une base greffée entre un azote et le carbone 1 (C'1) du sucre (liaison Osidique).

Les bases sont au nombre de quatre : **Adénine (A)** et **Guanine (G)** qui sont des bases puriques ; **Cytosine (C)** et **Thymine (T)** qui sont des bases pyrimidiques.

L'association d'une base et d'un sucre porte le nom de **nucléoside**, l'association d'un nucléoside avec un ou plusieurs phosphates porte le nom de **nucléotide**.

Les substrats utilisés in vivo par les polymérases pour synthétiser les acides nucléiques sont les nucléosides triphosphates.

Les deux chaînes de l'ADN s'associent entre elles au niveau de leurs bases.

Ces associations ne peuvent se faire qu'entre adénine et thymine ou entre Guanine et cytosine .On dit que les bases des **couples A et T** d'une part, et **G et C** d'autre part sont **complémentaires**.

Cette donnée explique l'observation expérimentale que tout l'ADN, quelle qu'en soit, possède des qualités équimolaires de thymine et d'adénine ainsi que de guanine et de cytosine.

Cette association dans la molécule résulte de liaisons hydrogènes entre les bases.

Elles sont au nombre de trois entre guanine et cytosine et de deux adénine et thymine.

Ce type de liaisons appartient à la classe des liaisons faibles. Il suffit de peu d'énergie pour les briser et ainsi permettre la séparation des deux brins du ADN, mais leur multiplicité donne une forte cohésion à la molécule.

La structure globale de la molécule de ADN est celle d'une double hélice droite. Les bases aussi bien puriques que pyrimidiques sont des molécules planes.

Chaque brin de la double hélice possède une extrémité 5' phosphate et à l'autre bout une extrémité 3' hydroxyle libre constituant ainsi une **séquence orientée** définie par l'enchaînement des nucléotides.

Les orientations des deux brins de la double hélice sont opposées : les deux brins sont dits **antiparallèles**.

De cette donnée découlent deux notions fondamentales :

- chaque brin est constitué d'une séquence de base différente, donc d'une information différente de celle de son partenaire ;

- les deux brins sont reliés par une relation de complémentarité :

C----G, T----A.

Cette relation explique la cohésion de la structure ; elle comporte en outre une possibilité d'autoréplication permettant d'engendrer deux molécules filles à partir d'une molécule mère.

Il existe des iso formes de la double hélice de ADN : les formes A, B et Z.

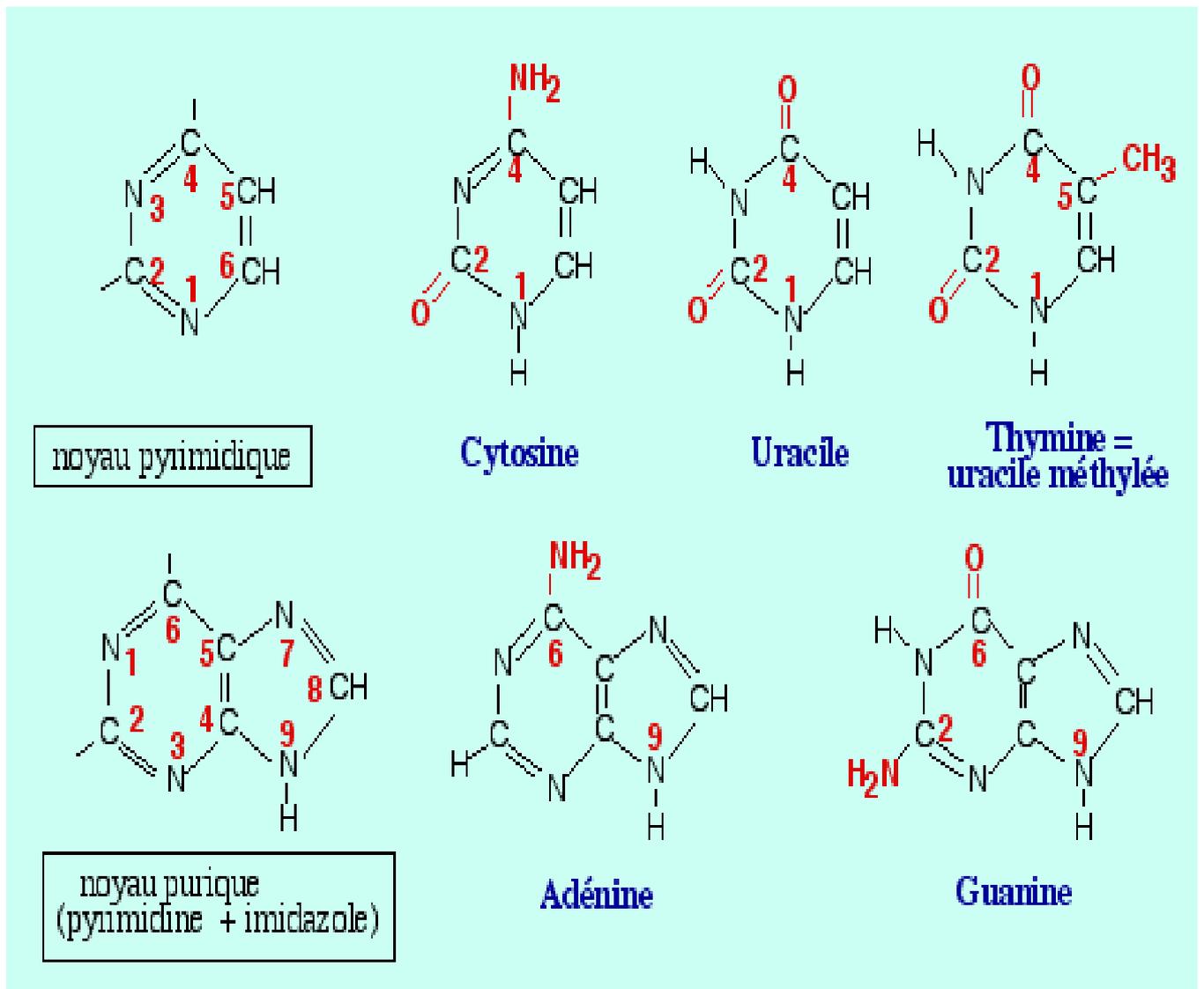


FIGURE 2 : STRUCTURE DU NOYAU ET DES BASES PURYQUES ET PYRIMIDIQUES

6. L'ADN en tant que support de l'information génétique.

La structure de la molécule de ADN est relativement simple et apparemment monotone, ce qui pose le problème du codage de l'information . Ce problème a été résolu dans les années 1960 par la mise en évidence du code génétique .

En pratique l'information dont la cellule a besoin concerne exclusivement l'ordre des acides aminés sur les chaînes polypeptidiques.

En effet c'est leur structure primaire qui conditionne pour une grande part les organisations supérieures et l'activité biologique. La seule variable dans la molécule de l'ADN est l'ordre d'enchaînement des bases .

Comme il n'existe que quatre types de bases et que les acides aminés composant les protéines sont au nombre de 20, il faut au minimum un enchaînement ordonné de trois bases ou triplet ($4^3 = 64$ triplets différents possibles) pour définir un code d'acide aminé . C'est effectivement le moyen utilisé par la cellule pour assurer le codage. Les relations faisant correspondre les différents acides aminés portent le nom de **code génétique**. Le transcodage séquence nucléique donne séquence protéique est assuré dans le cytosol par le système de traduction.

Ce système faisant correspondre un motif de 3 bases appelé codon à un acide aminé pose immédiatement des problèmes de redondance , puisqu'il y a 64 codons possibles pour seulement 20 acides aminés.

Cette disparité résulte d'une part de l'existence de signaux de ponctuation au nombre de trois , les **codons non-sens ou stop :UAA, UAG ,UGA** qui indiquent ou doit être arrêté la traduction ,d'autre part du fait que le code est **dégénéré** ,ce qui veut dire que plusieurs codons différents peuvent correspondre à un acide aminé . Malgré sa consonance péjorative la dégénérescence du code génétique est un avantage pour la cellule.

7. Les anomalies de l'ADN:

Les variations de l'ADN résultent des processus de mutations et les recombinaisons génétiques :

Une série de phénomènes qui ont pour nom : mutation, délétion, insertion , recombinaison ,conversion génétique, transposition font que le contenu en

information des cellules est loin d'être immuable. Cette dynamique des séquences peut survenir aussi bien dans les cellules somatiques que dans les cellules germinales ; dans ce dernier cas les modifications informationnelles seront transmises héréditairement.

a) **Les modifications non systématisées : les mutations ponctuelles:**

Les mutations ponctuelles sont considérés comme les causes les plus fréquentes de maladies génétiques. On les trouve à l'origine de près de 70 pour 100 des cas de maladies génétiques ou un défaut moléculaire intragénique a pu être caractérisé avec précision. Elles consistent en substitutions, suppressions ou additions de bases.

Leur déterminisme est variable. Elles peuvent résulter de perturbations biochimiques endogènes :

- **dépuration** spontanée, due à une plus grande labilité de la liaison N-glycosidique reliant les bases puriques au squelette polydesoxyribose-phosphate.
-
- **transitions tautomériques** (forme $-NH_2$ - en - forme $=NH$; .forme $=C=O$ —en forme $=C-OH$) favorisant les appariements contre nature ;
- **désamination** avec transition de l'Adénine en Hypoxantine, de la Guanine en Xanthine, de la Cytosine en Uracile

Les mutations ponctuelles peuvent aussi résulter d'une erreur de réplication ou de réparation échappant à la vigilance des systèmes de contrôle.

Ainsi s'expliquent sans doute les mutations par délétion ou addition d'une base ou d'un très petit nombre de bases.

b) **Les recombinaisons méiotiques permettent le brassage des gènes:**

Les mécanismes de recombinaison générale chez l'homme ne sont pas connus. Les seules données concernent les recombinaisons méiotiques. Durant cette période les chromosomes homologues s'associent en formant des **synapses**. Il est vraisemblable que les échanges entre séquences homologues qui s'effectuent au niveau du complexe synaptonémal utilisent un mécanisme proche de celui d' E.coli. Ces recombinaisons méiotiques sont indispensables au bon déroulement de la méiose, il s'en produit une soixantaine par méiose chez l'homme. Il en résulte un large brassage de l'information génétique, puisque des portions de plusieurs millions de paires de bases sont échangées entre les chromosomes homologues. D'où une modification des assortiments d'allèles en cis (haplotypes) dans la région considérée. Les accidents de méiose sont source de pathologie. Les mécanismes des autres types de recombinaison (mitotique, etc.) chez l'homme ne sont pas connus en détail.

La recombinaison entre allèles peut se traduire par :

- leur modification, la conversion génique.
- L'augmentation du nombre de copies de gènes répétés.
- L'élimination des gènes défectueux dans les familles de gènes répétés.
- Les recombinaisons peuvent provoquer des lésions.
- La recombinaison peut être la base de la régulation de l'expression.

8 . La constance de l'ADN :

La constance de l'ADN résulte de deux processus la réplication et la duplication. La division cellulaire est précédée par une duplication de l'information de manière à ce que les cellules filles possèdent exactement le même contenu informatif. Cette duplication est assurée par la **réplication** de l'ADN au cours de laquelle une molécule d'ADN engendre deux molécules filles rigoureusement identiques à la molécule de départ. Cette réplication s'effectue selon un modèle **semi conservateur** : chaque brin parental engendre son complémentaire.

Pour éviter une dégénérescence rapide, le contenu informatif doit être parfaitement conservé au cours du temps. Or deux phénomènes sont susceptibles de l'altérer :

- *la non fidélité de la réplication ;

- *les agressions physiques (rayonnements cosmiques, radioactivité et ultraviolets) et les agressions chimiques (molécules réactives et radicaux libres).

Le maintien de l'intégrité de l'information face à ces éléments perturbateurs est obtenu grâce à un ensemble de systèmes protéiques qui à tout moment assurent la réparation de l'ADN lésé.

L'ensemble des structures et superstructures de l'ADN étant de nature hélicoïdale, toute lecture ou duplication de l'information contenue dans l'ADN pose des problèmes topologiques.

IV / METHODOLOGIE

1. Lieu d'étude :

Notre étude s'est déroulée au laboratoire de recherche sur le paludisme de la Faculté de Médecine de pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako.

Il fut créé dans le cadre de la collaboration entre la FMPOS et l'Institut National de Santé des Etats Unis d'Amérique.

Ce laboratoire a une vocation de recherche sur le paludisme.

2. Période d'étude :

Cette étude se déroulera de Janvier à Septembre 2005.

3. Type d'étude : C'est une étude comparative entre l'électrophorèse et la **PCR** (Polymerase Chain Reaction) après **extraction de l'ADN** par le **méthanol** ou le **QIAGEN** dans le diagnostic de la drépanocytose.

4. Echantillonnage:

Ce travail a été fait en collaboration avec les centres de Références et la CMIE—ZONE.

L'ensemble de ces sujets nous ont été référés a partir de ces centres après diagnostic établi de la drépanocytose par électrophorèse de l'hémoglobine.

Par ce procédé un total de 42 sujets a été retenu.

4. Techniques de laboratoire :

Il existe plusieurs techniques d'extraction de l'ADN, mais nous nous intéresseront à deux d'entre elle :

- L'extraction de l'ADN par le **méthanol**
- L'extraction de l'ADN par le **QIAGEN^R**.

4.1. Technique d'extraction d'ADN par le méthanol :

a) Principe :

C'est une technique rapide et efficace qui consiste à extraire l'ADN à chaud par l'eau après fixation des grosses molécules par le méthanol .

b) Matériels et Solvants utilisés

.Matériels :

- Ciseaux
- Tubes 1 .5 ml
- Gants
- Mouchoir
- Plaques chauffantes
- Thermomètre
- Portoirs
- Vortex
- Pipettes
- Embouts

.Solvants :

- Eau
- Méthanol

c) Mode opératoire :

- Découper les spots de confettis imbibés de sang à l'aide de ciseaux et les introduire dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml (3 à 6 morceaux).
- Ajouter 100 à 150 μ l du méthanol (les confettis découpés doivent être imbibés de méthanol).

- Recouvrir les tubes avec du papier hygiénique et laisser à la température ambiante du laboratoire jusqu'à l'évaporation totale du méthanol (environ 24h).
- Ajouter 150 à 200 µl de l'eau distillée et chauffer entre 95°-100°c pendant 15 minutes, agiter vigoureusement au vortex toutes les 5 minutes.
- Conserver l'ADN a -20°c.

4.2. Technique d'extraction de l'ADN par le Kit QIAamp (QIAGEN) :

a) Principe :

La technique consiste à cristalliser l'ADN préalablement libéré par hémolyse de 200 µl de sang prélevé sur EDTA suivi du lavage puis de l'élution de l'ADN ainsi cristallisé par des solutions appropriées.

b) Matériels et réactifs :

.Matériels :

- plaques chauffantes
- Thermomètre
- Tube 1,5ml
- Agitateur
- Gants
- Ciseaux
- Centrifugeuse
- Pipette

.Réactifs :

- Kit QIAamp

c) Mode opératoire :

Les spots de confettis imbibés de sang sont découpés à l'aide de ciseaux et introduits dans les tubes Eppendorf de 1,5 ml :

- Ajouter 180 µl de Buffer ATL, incubé à 80°C pendant 10 minutes, centrifuger
- Ajouter 20 µl de protéinase K, mélanger à l'aide d'un agitateur, incubé à 56°C pendant 1 heure ensuite centrifuger brièvement pour faire descendre le liquide sur la paroi du tube.
- Ajouter 200 µl de Buffer ALT, agiter à l'aide d'un agitateur et incubé à 70°C pendant 10 minutes, centrifuger. Cette étape correspond à la lyse des hématies
- Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) , agiter et centrifuger brièvement ; transférer tout le contenu du tube de 1,5 ml dans la colonne munie de filtre , bien fermer la colonne et centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute.
- Placer la colonne tube de 2 ml (fourni) et jeter contenant le filtrat.
- Ajouter 500 µl de Buffer AW1 dilué avec de l'éthanol (19 ml de Buffer AW1 plus 30 ml de l'éthanol) dans la colonne
- Centrifuger à 8000 tours par minute pendant une minute ensuite éliminer le tube contenant le filtrat. Placer le tube QAIGEN dans un autre tube de 2 ml

- Ajouter 500 µl de Buffer AW2 dilué avec de l'éthanol (13 ml de Buffer AW2 plus 30 ml de l'éthanol) dans la colonne
- Centrifuger à 1400 tours par minute pendant 3 minutes . Eliminer le tube contenant le filtrat et placer le tube QIAGEN dans un autre tube de 1,5 ml.

Ajouter 150 µl de Buffer AE dans la colonne et incuber à la température ambiante de la salle pendant une minute, centrifuger à 8000 tours par minute et a de l'ADN qui doit être conservé à -20° c.

4.3. Technique de l'électrophorèse sur Acétate de cellulose :

Cet examen permet de séparer les différentes fractions de l'hémoglobine et de détecter les hémoglobinoses.

a) Principe :

Il consiste à faire migrer un hémolysât sur une plaque d'acétate de cellulose à pH alcalin .Les différentes fractions de l'hémoglobine migrent plus ou moins rapidement en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge électrique.

b) Matériels et Réactifs utilisés :

- Tampon tris EDTA borate
- Plaque d'acétate de cellulose
- Eau distillée
- Cuves à électrophorèse HELENA
- Générateur de courant
- Papiers pour ponts
- Papiers buvards pour éliminer l'excès de tampon
- Applicateur
- Plaques d'alignement
- Micropipette

- Acide acétique dilué à 5%
- Rouge ponceau
- Methanol
- Clear Aid
- Intégrateur
- Contrôle AFSC
- Microtube à hémolyse
- Centrifugeuse, Bacs de coloration, Râtelier

c) Echantillon :

Les échantillons sont prélevés sur anticoagulant et peuvent être gardés au frais pendant plusieurs jours.

d) Mode opératoire

- Préparation de la plaque de acétate de cellulose :

Pour ce faire remplir le bac de migration avec le tampon tris EDTA borate ou supra-hème. Sur la face lisse de la plaque, marquer le haut avec le marqueur qui indiquera le début de la migration. S'assurer que le nombre de plaque est suffisant pour les échantillons à traiter. Déposer les plaques sur le râtelier et plonger les doucement dans le bac pendant 30 mn.

- Préparation de la chambre de migration :

Verser 50 ml de tampon dans chacun des deux compartiments extérieurs de la chambre.

Appliquer les bandes de papier buvards sur les bords internes des compartiments contenant le tampon pour former un pont sur les bords des compartiments vides en évitant de former des bulles d'air entre la paroi et la bande humide.

Prendre soin de recouvrir le bac pour éviter l'évaporation du tampon.

- Préparation de l'échantillon, Application et migration :

Préparer l'hémolysât en ajoutant de l'eau distillée au culot de globules rouges dans une proportion de 1 goutte d'eau distillée pour 10% d'hématocrite.

A l'aide d'une micropipette Helema, déposer 5 µl de l'hémolysât sur la plaque à microtitration. Cette plaque doit comporter un témoin AFSC 5LABO Helena.

Retirer la plaque d'acétate de cellulose de la solution tampon, la sécher entre deux papiers buvards et la déposer sur le support (la partie lisse contre le support).

Déposer les hémolysats sur la plaque d'acétate de cellulose à l'aide d'un applicateur.

Mettre la plaque d'acétate de cellulose dans la chambre de migration, la face recouverte de cellulose étant dirigée vers le bas.

Appliquer une différence de potentiel de 350 volts à partir d'un générateur pendant 25 mn.

- Coloration de la plaque :

A la fin de la migration, retirer la plaque de la chambre et plonger la dans le rouge ponceau pendant 5 mn. Laver la plaque par trempages successifs pendant 3 mn dans trois bacs contenant chacun une solution d'acétate à 5%. Plonger la plaque dans une solution transpirante pendant 10 mn, sécher la plaque dans une étuve à 56°C pendant 10 mn..

La solution de transpiration est composée :

Acide acétique glacial 70 ml

Méthanol 30 ml

- Résultats et interprétation :

- L'évaluation qualitative est visuelle, la plaque de migration est inspectée et on détermine la présence ou non d'hémoglobines anormales :
- L'hémoglobine S migre à mi-distance entre l'hémoglobine A2 et A1
- Les hémoglobine D, G et P présentent la même migration électrophorétique que l'hémoglobine S.

La présence d'hémoglobine S permet de poser le diagnostic de la drépanocytose hétérozygote si elle est retrouvée en même temps que l'hémoglobine A1, ou homozygote si elle n'est pas associée à une bande d'hémoglobine A1.

Les hémoglobines C et E migrent comme l'hémoglobine A2.

- L'hémoglobine F migre entre l'hémoglobine A1 et S.

L'évaluation quantitative est faite par le densitomètre et le calculateur qui donne le pourcentage des différentes fractions d'hémoglobine.

Un test d'Emmel sera effectué chez tous les sujets A+S et SS dans le but de ne pas confondre les autres migrants au même niveau que S.

De même un frottis mince sera aussi fait pour la recherche de cellules cibles chez tous sujets A+C et CC.



4.4. PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR nichée : Méthode de digestion

a) Principe :

Le principe consiste à faire le diagnostic de la mutation ponctuelle au niveau du gène de la drépanocytose par une nichée. Au cours de cette technique, le produit issu d'une première PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorce, qui s'hybride à une partie interne (nichée) de la séquence amplifiée. À l'hybridation, elles se positionnent en face de leurs séquences complémentaires respectives. Puis en faisant agir une ADN Polymerase (Taq Polymerase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'----- 3' d'une séquence exactement complémentaire du brin copié.

- Matériel :

Ciseaux

Gants stériles

Tubes de 0.5ml, 1.5ml, 15 ml et de 50 ml

Pipettes de 2µl, 10 µl, 20µl, 200µl, 1000µl

Embouts de 2µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl

Agitateur

Chronomètre congélateur Box de conservation

Marqueur indélébile

Cuve pour migration, cuve pour gel, peignes pour gel

Chambre à PCR

Scotch pour papier

Bics, Balance pèse produit, Erlenmeyer

Racks pour les tubes

Thermocycler

Appareil photo UV

Film Polaroid

Centrifugeuse paraffine

Mouchoir

- Réactifs

Agarose ultra pure GIBCO BRL

Bromure d'Ethidium (Sodium)

Amorces :

Première amplification : A2 : GTCTTCTGGGTCAGGGAT

B2 : GGAGAAAGCTCTCTCTCC

Deuxième amplification : NA4 : CCTGTTCCCTCTGCCACA

NB4 : GGGGGTCTCAAGAAGTAC

DNTP : Desoxy nucléotide triphosphate

10 X PCR-Buffer

50 Mm chlorure de magnésium

Taq Polymerase

Eau dé ionisée

Préalable : porter des gants stériles et nettoyer l'aire de travail ainsi que les pipettes avec de l'alcool à 90%.

Première amplification

Identifier les tubes nécessaires pour la réaction PCR envisagée.

Ensuite, préparer la mixture (mélange réactionnel) en fonction du nombre total

D'échantillons à traiter.

Préparation du MIX de la première amplification pour un volume final de 40.7 µl

Composants	Concentrations finales	Volume/ réaction en µl
H2O		31.5
10X PCR Buffer		5
50Mm MgCL 2		1.5
100Mm dNTP	10Mm	1
Amorces (A2+b2)		1
Taq Polymerase		0,2
Total		40,7

- Repartir dans chaque tube 40,7 µl de MIX.
- Ajouter 2,5µl d'ADN dans chaque tube correspondant au numéro d'ADN
- Placer les tubes bien fermés dans le thermocycler pour la première amplification en utilisant le programme ci-dessous
- Dénaturation initiale à 90°C pendant 2 minutes
- Puis 45 cycles de :
 - . Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes
 - . Hybridation à 60°C pendant 30 secondes
 - . Extension à 72°C pendant 1 minute
 - . Extension finale à 72°C pendant 4 minutes
 - . Conservation à +4°C pendant un temps indéterminé

- Sortir les tubes et les garder au réfrigérateur à 4°C.

Deuxième amplification

- Identifier les tubes pour la deuxième en reportant les numéros précédents.
- Préparer le MIX pour la deuxième amplification en fonction du nombre d'échantillon à traiter.

Préparation du MIX

Composants	Concentrations finales	Volume/réaction en μ l
H ₂ O		31,5
10X PCR Buffer		5
50mM MgCl ₂		1,5
100mM dNTP	10mM	1
Amorces (NA4/NB4)		1
Taq polymerase		0,2
Total		40,7

- Repartir dans chaque tube 40,7 μ l de MIX
- Ajouter 1 μ l du produit de la première amplification dans chaque tube correspondant.
- Placer les tubes dans le thermo cycler pour la 2^{ème} amplification suivant le programme ci-après.
 - . Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes
 - . Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes
 - . Hybridation à 60°C pendant 30 secondes
 - . Extension à 74°C pendant 45 secondes
- 35 cycles
- . Extension finale à 74°C pendant 5 minutes
- . Conservation à 4°C pendant une durée illimitée.

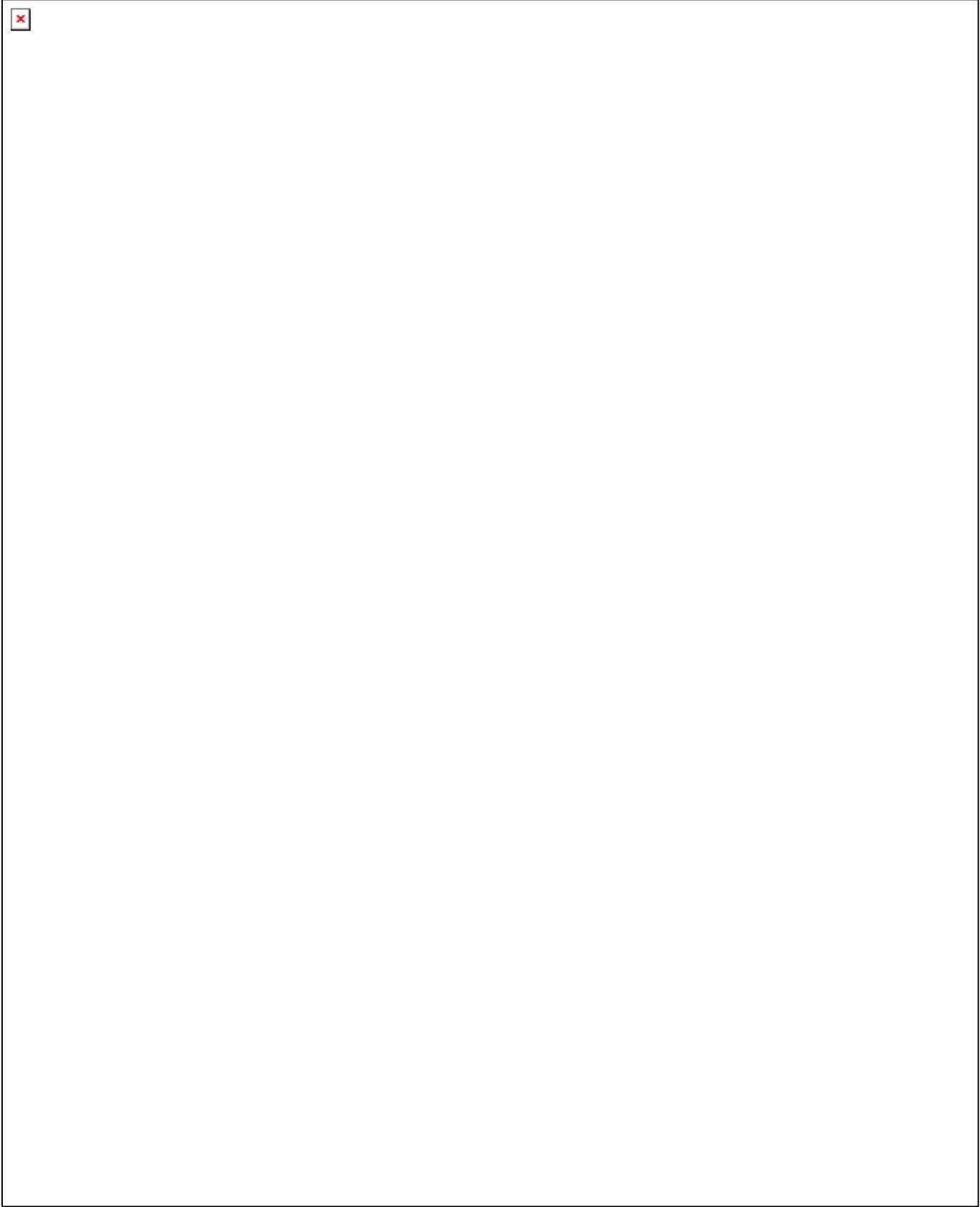


FIGURE : schéma de la méthode PCR (polymerase Chain reaction)

5. Comparaison entre l'électrophorèse et la technique moléculaire :

Lorsqu' on essaye de comparer l'électrophorèse de l'hémoglobine et la P.C.R, il n'apparaît aucune différence dans le diagnostic de la drépanocytose pour les échantillons traités.

Mais sur le plan coût la P.C.R semble être plus économique, mais du fait de la commercialisation limitée du matériel et réactif, cette technique paraît sophistiquée.

V / RESULTATS

V. RESULTATS :

a) **Tableau 1** : Répartition des sujets en fonction de l'âge et le sexe.

Age	0 à 5 ans	5 à 10 ans	+ de 10 ans	Total
Sexe				
Masculin	15	6	4	25
Féminin	8	3	6	17
Total	23	9	10	42

* La répartition des sujets en fonction des tranches d'âge montrait que la majorité était âgée de moins de 11ans.

* Quand à la distribution par sexe 60 % était de sexe masculin.

b) Tableau 2 : Répartition des sujets en fonction de l'ethnie.

SEXE		
Ethnie	Masculin	Féminin
Peuls	9	9
Dogons	7	3
Sarakolé	3	2
Bozo	4	1
Bambara	1	2
Total	25	17

Les peuls étaient majoritairement représentés, suivi des Dogons. Les Bambara étaient les moins représentés avec une fréquence de 7%.

c) **Tableau 3** : Résultats comparés des deux techniques.

Techniques Age	Electrophorèse	PCR
0 à 5 ans	23	23
5 à 10 ans	9	9
+ de 10 ans	10	10
TOTAL	42	42

Quelque soit la tranche d'âge considérée, on observait une corrélation entre les deux techniques utilisées

Tableau 4 :

Montre la répartition des sujets en fonction du génotype.

Etat Sexe	Homozygote	Hétérozygote	Total
Sujets de 0 à 10 ans	1(2,3%)	25(59,5%)	26
Sujets de plus de 10 ans	0(0%)	16(38,1%)	16
Total	1(2,3%)	41(97,7%)	42

La répartition des sujets en fonction du génotype montrait que 97,7 % des sujets étaient hétérozygote contre 2,3% d'homozygote.

L'ensemble des sujets homozygotes avait un age compris entre 0 et 10 ans.

**VI / COMMENTAIRES
ET
DISCUSSIONS**

Notre travail s'intègre dans le cadre d'une étude comparative de deux techniques de diagnostic de la drépanocytose conduite au centre de recherche sur le paludisme de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie (F.M.P.O.S). Elle vise à mieux comprendre le diagnostic de la drépanocytose. L'étude s'est déroulée de Janvier à Septembre 2005.

Toutefois, les effectifs étudiés au cours de cette étude sont encore faibles pour porter un jugement sur concordance des deux techniques utilisées.

C'est pourquoi nous voudrions considérer les résultats présentés ici comme des résultats préliminaires.

Durant notre étude 42 échantillons venant de sujets drépanocytaires ont été traités par les techniques de l'électrophorèse et celle de la PCR.

Parmi ces 42 sujets, seulement un seul cas était homozygote contre 41 cas de sujets hétérozygotes. L'homozygotie était retrouvée dans la tranche d'âge de 0-5 ans ; ceci s'expliquerait par le fait que les homozygotes vivent rarement au-delà de 10 ans.

La majorité des sujets inclus avait un âge compris entre 2 ans et 10 ans avec une moyenne d'âge de $5,76 \pm 3,82$ ans. Ceci pourrait s'expliquer par une susceptibilité beaucoup plus grande de cette tranche d'âge à développer les manifestations cliniques de la drépanocytose.

L'ensemble des échantillons traités à l'électrophorèse s'est confirmé par la technique moléculaire. Nous n'avons observé aucune différence entre ces deux techniques quant au diagnostic de la drépanocytose.

Ces résultats obtenus nous amènent à conclure que l'électrophorèse de l'hémoglobine demeure valable dans le diagnostic de la drépanocytose malgré les avancés techniques de la biologie moléculaire.

VII / CONCLUSION

Depuis les travaux princeps d'Allison, le diagnostic de la drépanocytose reposait sur le test d'Emmel et l'électrophorèse de l'hémoglobine.

Du fait de la migration d'autres types d'hémoglobines à la même position que l'Hb S telles que l'Hb D, G et P, l'électrophorèse de l'hémoglobine semble de nos jours être non spécifique pour le diagnostic de la drépanocytose.

Cependant elle demeure l'outil précieux pour le diagnostic médical de routine.

La biologie moléculaire caractérisée par une matérialisation de la pathologie par l'étude du gène paraît de nos jours le diagnostique de référence de la drépanocytose et de toutes les anomalies génétiques.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude .Malgré ces constats, la biologie moléculaire nécessite un équipement, qui fait que sa réalisation est beaucoup plus coûteuse que celle de l'électrophorèse.

VIII / RECOMMENDATIONS

Au terme de ce travail, nous recommandons :

- Une continuation du diagnostic de la drépanocytose par l'électrophorèse de l'hémoglobine.

- Effectuer une étude similaire dans d'autres laboratoires sur un échantillonnage beaucoup plus grand..

- Une vulgarisation du dépistage de la drépanocytose par la technique moléculaire PCR (Réaction de Polymérisation en chaîne).

IX / BIBLIOGRAPHIE

1. JEAN-CLAUDE KAPLAN /MARC DELPECH.

Biologie moléculaire et médecine.

2 ème EDITION.

Médecine Sciences

Flammarion dépôt légal Avril 1998.

2. D.GERMAIN / O.GENTILHOMME / P.A.BRYON

B.COIFFIER.

Physiologie Humaine

Cellules sanguines et organes hématopoïétiques.

Dépôt légal 2eme trimestre 1981.

3. G.SCHAPIRA

Eléments de biochimie générale.

Flammarion.

Dépôt légal 1^{ER} TRIMESTRE 1965.

4. LEHNINGER

Les principes de biochimie.

FLAMMARION MEDECINE - SCIENCES

Dépôt légal 1989.

5. P.LAPIE, J.DEUTSCH

Génétique Biologie Moléculaire.

MALOINE.

Dépôt légal Novembre 1999.

6. BABY .MOUNIROU.

Approche pluridisciplinaire des hémoglobinopathies chez les dogons de l'arrondissement de Sangha (MALI) .Thèse de Pharmacie, Bamako 1991.

7. DIANE. F.

Evaluation de la situation sanitaire au Mali.

Thèse de doctorat en Pharmacie; 1986.

8. GUINDO. ALDIOUMA.

Hémoglobinopathies et paludisme chez l'enfant d'âge scolaire au Mali.

Impact de deux schémas de supplémentation martiale.

Thèse de doctorat en Pharmacie 1998.

9. TOURE .ALADJI.

Paludisme et drépanocytose, résultats d'une enquête longitudinale de janvier 1989 à décembre 1989 dans le service de pédiatrie de l'HGT.

Thèse de Médecine Bamako, 1989.

10. JAMES .D.WATSON .

Biologie Moléculaire du gène.

Torsion Edition.

Inter Edition. Paris .Dépôt légal 1978.

11. MASSON

Biologie Moléculaire.

Abderrahmane Maftah.

Raymond Julien Septembre 1996.

12. M GUILLOTON et B. QUINTARD.

Biochimie.

Collection Amphi Sciences 1996.

13. J. MAISSIAT, J. C. BACHR et J. L. PICARD

Biologie Animale 1. Invertébrés.

Collection Amphi Sciences 1996.

X / ANNEXES

FICHE SIGNALECTIQUE

Nom : DIAWARA

Prénom : ABDOULAYE DIT DIALLA DIAWARA

Titre de la thèse : Etude comparative de la PCR et de l'électrophorèse dans le diagnostic de la drépanocytose.

Année : 2004 -2005

Ville de soutenance : Bamako

Payes d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie

Mots clés : PCR, électrophorèse, Drépanocytose

Résumé : Notre étude s'inscrit dans le cadre de l'amélioration de la qualité du diagnostic de la drépanocytose au Mali.

Elle vise à comparer les techniques d'électrophorèse et de biologie moléculaire. Elle a porté sur 42 drépanocytaires dans le district de Bamako.

Les résultats obtenus montrent une corrélation entre ces deux techniques de dépistage.

Malgré cette concordance, l'électrophorèse paraît comme un outil précieux de diagnostic de la drépanocytose dans les zones où la biologie moléculaire n'est pas applicable.

Serment de Galien

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples, d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobres et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Je le jure