---- REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE ----

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ORAN 1 - AHMED BENBELLA



N° d'ordre :……

Faculté de Médecine

Département de Pharmacie

Thèse de Doctorat en Sciences Médicales

Dr. ARABI KHEIRA MERIEM

Maître Assistante en Biochimie

Hyperbilirubinémie libre non hémolytique : étude biochimique et moléculaire et implication clinique

Soutenue publiquement le 19 Mai 2025

Président du jury		
MIDOUN NORI	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
Membres du jury		
LOUMI ABDERRAHMANE	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
NIAR SAKINA	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
BENCHIKH NASR-EDDINE	Professeur	Faculté de Médecine de Mostaganem
ABERKANE MERIEM	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
Directeur de Thèse		
CHIKOUCHE AMMAR	Professeur	Faculté de Médecine d'Alger

— Année 2025 —

---- REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE ----

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ORAN 1 - AHMED BENBELLA

N° d'ordre :

Faculté de Médecine

Département de Pharmacie

Thèse de Doctorat en Sciences Médicales

Dr. ARABI KHEIRA MERIEM

Maître Assistante en Biochimie

Hyperbilirubinémie libre non hémolytique : étude biochimique et moléculaire et implication clinique

Soutenue publiquement le 19 Mai 2025

Président du jury		
MIDOUN NORI	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
Membres du jury		
LOUMI ABDERRAHMANE	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
NIAR SAKINA	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
BENCHIKH NASR-EDDINE	Professeur	Faculté de Médecine de Mostaganem
ABERKANE MERIEM	Professeur	Faculté de Médecine d'Oran
Directeur de Thèse		
CHIKOUCHE AMMAR	Professeur	Faculté de Médecine d'Alger

— Année 2025 —

Remerciements

Tout d'abord, je me dois de remercier le Seigneur Tout-Puissant qui m'a donné la force, le courage et la santé pour terminer ce travail.

Je suis heureuse d'exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur *Chikouche Ammar* d'avoir accepté d'encadrer et diriger ce travail de thèse depuis ses débuts jusqu'au dernier mot. Je lui adresse mes meilleurs remerciements pour la confiance qu'il m'a accordée, et pour l'amabilité, la compréhension et la générosité dont il a fait preuve à mon égard lors de la préparation de ma thèse. J'espère que ce travail est à la hauteur de ses espérances.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur le professeur *Midoun Nori*, Chef de service d'Epidémiologie et de Médecine Préventive de l'EHUO, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury, pour l'ensemble des conseils qu'il m'a prodigués et pour sa grande disponibilité. Je lui adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

J'exprime également mes sincères remerciements à :

Madame le professeur *Aberkane Meriem*, Chef de service de Cytogénétique et de Biologie moléculaire de l'EHUO de m'avoir ouvert les portes de son service afin de réaliser ce travail. Je la remercie également pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses encouragements. Je suis très honorée de l'avoir comme membre du jury.

Je tiens également à adresser mes remerciements à :

Madame le professeur *Niar Sakina*, Chef de service de pédiatrie du CHUO, d'avoir cru en mon projet, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir permis d'accéder à son service pour réaliser ce travail. C'est un grand honneur qu'elle me fait en acceptant de siéger parmi les membres du jury afin de juger ce travail de thèse.

J'exprime mes sincères remerciements à :

Monsieur le professeur *Benchikh Nasr-Eddine*, Chef de service du laboratoire central du CHU de Mostaganem et Président du CPRS Ouest de Biochimie qui m'a fait l'honneur de siéger parmi les membres du jury et d'examiner avec attention ce travail de recherche. Je lui adresse mon profond respect.

Je remercie chaleureusement Monsieur le professeur *Loumi Abderrahmane*, d'avoir cru en mon projet depuis le début et pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans la réalisation de ce travail. Je suis très honorée de l'avoir comme membre du jury. Je lui exprime ma reconnaissance et mon profond respect.

Je voudrais surtout remercier Docteur *Yechkour Toufik*, Docteur *Abderrahmani Soumia*, Docteur *Youbi Amine* et Docteur *Ghassoul Amina* pour leur participation active à ce travail.

Comme je tiens à remercier vivement et chaleureusement Docteur *Bougherara Wafaa*, Docteur *Ammour Amina* et Docteur *Tifrit Karim* pour leur soutien et leur précieuse aide tout au long de ce travail.

Je salue vivement toute l'équipe du laboratoire de Cytogénétique et de Biologie moléculaire de l'EHUO pour son aide, particulièrement *Ilyes* et *Bouchra* pour leur aide tout au long de ce travail ainsi que pour les bons moments partagés, je dirai sans ambigüité que leur présence au laboratoire a donné un autre souffle à mon travail.

J'aimerai aussi remercier Madame le professeur *Manouni Chafika*, Chef de service de gastroentérologie de l'EHUO de m'avoir bien accueillie et de m'avoir facilité le travail au sein de son service. Je remercie aussi toute son équipe médicale et paramédicale pour sa précieuse collaboration dans le cadre du recrutement des patients.

Mes profonds remerciements au Professeur *Bouasria Hamza* et aux collègues gastroentérologues et hématologues d'Oran, d'Alger et de Constantine qui ont contribué au recrutement de ma population d'étude.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr *Rahal Kamel* pour sa contribution active au recrutement des patients. Son engagement et sa disponibilité ont été d'une grande aide tout au long de ce projet.

Je remercie chaleureusement mon ainé et collègue Dr *Chaalal Adel* pour sa grande disponibilité, sa gentillesse et surtout pour son soutien infaillible durant toute l'élaboration de cette thèse. C'est une occasion particulière qui s'offre à moi pour lui témoigner ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie également tous les assistants et résidents de l'unité de biochimie du laboratoire central de l'HMRUO ; Dr *Bouam Samira*, Dr *Hamdi Hacene*, Dr *Meddah Hichem*, Dr *Tennouga Mohamed Tahar*, Dr *Dhob Wiam*, Dr *Tadebirt Afaf* ainsi que tous les résidents de l'unité d'hémobiologie du laboratoire central de l'HMRUO pour leur aide et leur soutien.

J'adresse mes vifs remerciements à tout le personnel du laboratoire central de l'HMRUO et le personnel de l'unité de prélèvement du Centre de Consultation Spécialisé affilié à L'HMRUO, particulièrement *Nacera*, *Amel* et *Djamila* pour leur contribution active à ce travail.

Je dirais un grand merci au Docteur *Mezouar Abdessamed*, résident en épidémiologie à l'EHUO pour son aide qui a été précieuse dans l'élaboration de cette thèse.

J'adresse mes salutations les plus respectueuses et amicales à tous les Professeurs de Biochimie, sans exception, ainsi qu'à tous les Maîtres Assistants à qui je souhaite beaucoup de réussites.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à tous les patients qui n'ont jamais refusé de collaborer.

Je dédie cette thèse à mes très chers parents. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour tous les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. C'est grâce à vous si j'en suis arrivée à ce stade de ma carrière. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés.

Comme je dédie cette thèse à mes chers enfants *Melina* et *Dalil* qui ont réussi à grandir pendant que je rédigeais… et à me distraire plus souvent que prévu ! Votre amour et votre présence m'ont donné l'énergie d'aller jusqu'au bout. Vous êtes ma plus belle motivation. Cette thèse vous est dédiée, en témoignage de mon affection éternelle.

J'adresse également mes remerciements à mes frères et ma belle-sœur pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à mes beaux-parents, pour leur bienveillance, leur soutien discret mais constant, et pour m'avoir toujours accueillie avec chaleur et générosité. Leur présence à mes côtés, tout au long de ce parcours, a été précieuse.

Je tiens à remercier chaleureusement mon époux pour son aide inestimable, sa présence, son écoute et son soutien constant qui m'a permis de me surpasser en faisant ce travail.

A tous les gens qui m'ont aidé je serai toujours reconnaissante. Mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

—— Table des matières ——

Chapitres et sections	Page
Chapitre I **Introduction – Problématique et intérêt de la question**	2
Chapitre II **Revue de la littérature**	5
I.- Bilirubine et hyperbilirubinémies	6
1.- Définition	6
2.- Structure chimique	6
3.- Métabolisme de la bilirubine	7
3.1.- Synthèse de la bilirubine	7
3.2.- Captation par le foie	8
3.3.- Conjugaison de la bilirubine au niveau hépatique	8
3.4.- Devenir de la bilirubine conjuguée et cycle entérohépatique	8
4.- Méthodes de dosage	10
4.1.- Méthodes utilisant une diazoréaction	10
4.1.1.- Méthode de Malloy-Evelyn	11
4.1.2.- Méthode à la caféine benzoate	11
4.2.- Méthodes de chromatographie liquide haute performance (HPLC)	12
4.3.- Méthodes enzymatiques	13
4.3.1.- Méthode à la bilirubine oxydase	13
4.3.2.- Méthode à la vanadate oxydase	13
4.4.- Méthode par spectrophotométrie directe en chimie sèche	14
4.5.- Mesure transcutanée de la bilirubine	14
5.- Les hyperbilirubinémies	15
5.1.- Ictère néonatal	15
5.1.1.- Définition et généralités	15
5.1.2.- Etiologies	16
A.- Ictères bénins	16
A.1.- Ictère simple	16
A.2.- Ictère du lait maternel	17
B.- Ictères pathologiques	18
B.1.- Ictères hémolytiques	18
B.1.1.- Causes acquises	18
B.1.2.- Causes héréditaires	19
B.2.- Ictères héréditaires (Syndrome de Crigler-Najjar, maladie de Gilbert)	19
B.3.- Autres	19
5.2.- Ictère à bilirubine libre	20
5.2.1.- Ictère à bilirubine libre hémolytique	20

5.2.2.- Ictère à bilirubine libre non hémolytique	20
5.3.- Ictère à bilirubine conjuguée	22
5.3.1.- Ictère non cholestatique	22
A.- Syndrome de Dubin-Johnson	22
B.- Syndrome de Rotor	23
5.3.2.- Ictère cholestatique	23
6.- Complications des hyperbilirubinémies	24
6.1.- Encéphalopathie hyperbilirubinémique aigue	25
6.2.- Encéphalopathie chronique et ictère nucléaire	25
II.- Syndrome de Gilbert	26
1.- Rappel historique	26
2.- Définition et généralités	27
3.- Diagnostic	28
3.1.- Manifestations cliniques	28
3.2.- Manifestations biologiques	29
3.3.- Autres examens	30
3.4.- Diagnostic positif	32
3.5.- Diagnostic de certitude	33
3.5.1.- Analyse génotypique du polymorphisme UGT1A1*6 (rs4148323) par PCR-RFLP	34
3.5.2.- Analyse génotypique du polymorphisme UGT1A1*28 (rs8175347) par SSCP et séquençage	34
3.5.3.- Analyse génotypique des polymorphismes UGT1A1*28 et UGT1A1*6 par pyroséquençage	36
3.5.4.- Analyse par dHPLC (chromatographie liquide à haute performance en conditions dénaturantes)	37
3.5.5.- Analyse par PCR en temps réel	39
3.6.- Diagnostic différentiel	40
4.- Aspect génétique	42
4.1.- Le complexe multigénique UGT	42
4.2.- Les mutations du promoteur et de l'exon 1 du gène UGT1A1	44
4.3.- Transmission du SG	45
5.- Prise en charge	46
5.1.- La photothérapie	46
5.2.- L'exsanguino-transfusion	46
5.3.- Les inducteurs de l'UDP-GT	47
5.3.1.- Le phénobarbital	47
5.3.2.- Le clofibrate	47
5.4.- Mesures hygiéno-diététiques	47
III.- Bilirubine et effet antioxydant	48
1.- Pouvoir antioxydant de la bilirubine	49
2.- Bilirubine et maladies auto immunes	50
2.1.- Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)	50
2.2.- Lupus érythémateux systémique (LES)	50
2.3.- La polyarthrite rhumatoïde (PR)	51

3.- Bilirubine et protection cardiovasculaire	52
4.- Bilirubine et cancers	53
4.1.- Cancer du poumon	53
4.2.- Cancer colorectal	54
4.3.- Cancer de l'endomètre	54
4.4.- Lymphome de Hodgkin	54
4.5.- Autres cancers	54
5.- Bilirubine, diabète et syndrome métabolique	54
6.- Bilirubine et neuroprotection	55
7.- Bilirubine et accidents vasculaires cérébraux (AVC)	56
8.- Bilirubine et maladies infectieuses (Covid-19)	56
9.- Bilirubine et autres troubles	57
IV.- Syndrome de Gilbert et métabolisme des médicaments	59
1.- Analgésiques	59
1.1.- Paracétamol	59
1.2.- La morphine	60
2.- Anesthésiants	61
2.1.- Le propofol	61
2.2.- L'atracurium	61
2.3.- Les agents inhalés	61
2.3.1.- L'halothane	61
2.3.2.- Le sévoflurane et l'isoflurane	61
3.- Antirétroviraux	62
3.1.- Atazanavir	62
3.2.- Idinavir	62
4.- Antitumoraux	62
4.1.- Méthotrexate	63
4.2.- Tocilizumab	63
4.3.- Inhibiteurs de la tyrosine kinase	63
4.3.1.- Le pazopanib	63
4.3.2.- Le sorafénib	63
4.4.- Irinotécan	63
5.- Autres médicaments	67
Chapitre III **Méthodologie de l'étude**	68
1.- Objectifs de l'étude	69
1.1.- Objectifs principaux	69
1.2.- Objectifs secondaires	69
2.- Matériels et méthodes	69
2.1.- Type, lieu et période de l'étude	69
2.1.1.- Type de l'étude	69
2.1.2.- Lieu et champ de l'étude	69
2.1.3.- Période de l'étude	69
2.2.- Population d'étude	70

2.2.1.- Critères d'inclusion	70
2.2.2.- Critères de non inclusion	70
2.2.3.- Critères d'exclusion	70
2.2.4.- Le consentement	71
2.2.5.- Les renseignements personnels	71
2.2.6.- Calcul du nombre de sujets nécessaire (NSN)	73
2.3.- Matériels	73
2.3.1- Les prélèvements biologiques	73
2.3.2- Matériels utilisés	74
2.3.2.1.- Equipements	74
2.3.2.2.- Consommables et réactifs	74
2.4.- Méthodes	74
2.4.1.- Bilan hématimétrique	75
2.4.2.- Bilan biochimique	75
2.4.2.1.- Substrats et enzymes	75
1.- Glucose	75
2.- Acide urique	75
3.- Triglycérides	75
4.- Cholestérol	75
5.- HDL c	75
6.- LDL c	76
7.- Calcul du ratio HDLc/LDLc	76
8.- Fer	76
9.- UIBC	76
10.- TIBC	76
11.- CS	76
12.- Albumine	77
13.- Protéines totales	77
14.- Bilirubine totale	77
15.- Bilirubine directe	77
16.- Bilirubine indirecte	77
17.- Aspartate amino transférase ASAT	77
18.- Alanine amino transférase ALAT	77
19.- Phosphatase alcaline PAL	78
20.- Gamma glutamyl transférase GGT	78
21.- Lactate déshydrogénase LDH	78
2.4.2.2.- Protéines spécifiques	78
1.- CRP	78
2.- Transferrine	78
3.- Céruléoplasmine	78
4.- Haptoglobine	78
2.4.3.- Analyse génétique	79
2.4.3.1.- Préparation de l'ADN	79
A.- Extraction de l'ADN par la technique salting out	79
B.- Extraction de l'ADN par le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN)	80

2.4.3.2.- Contrôle de la qualité et quantification de l'extrait d'ADN	80
2.4.3.3.- Conservation	81
2.4.3.4.- Amplification des cibles : réaction de polymérisation en chaine (PCR)	81
1.- Définition	81
2.- Principe	81
3.- Les composés utilisés	81
4.- Les étapes de la PCR	81
5.- Optimisation de la PCR en fonction de la séquence à amplifier	83
6.- Aspects pratiques de l'amplification par PCR	83
6.1.- La pré-PCR	83
6.2.- La PCR proprement dite	85
6.3.- La post-PCR (contrôle de qualité)	85
2.4.3.5.- Analyse des produits de PCR contrôlés	86
1.- Analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	87
1.1.- Définition	87
1.2.- Principe de la restriction enzymatique	87
1.3.- Protocole expérimental	87
2.- Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 8%	89
2.1.- Principe	89
2.2.- Les étapes de l'électrophorèse	89
2.5.- Traitement et analyse statistique des données	92
Chapitre IV **Résultats de l'étude**	93
I.- Analyse des patients du groupe 1	94
1.- Analyse descriptive des patients	94
1.1.- Caractéristiques générales des patients	94
1.1.1.- Répartition selon les indicateurs de lieu	94
1.1.2.- Répartition selon l'âge et le sexe	97
1.1.3.- Indice de Masse Corporelle	98
1.2.- Caractéristiques cliniques des patients	100
1.2.1.- Antécédents des patients	100
1.2.2.- Symptomatologie clinique	101
1.2.3.- Motifs de la demande d'analyse et circonstances de découverte	103
1.2.4.- Facteurs déclenchant l'hyperbilirubinémie	104
1.2.5.- Comorbidités	105
1.2.6.- Explorations radio-endoscopiques	106
1.2.7.- Consommation de tabac	107
1.2.8.- Consommation d'alcool	107
2.- Etude du profil biologique des patients	108
2.1.- Profil de l'hémolyse	108
2.2.- Profil hépatique	109
2.3.- Profil lipidique	110
2.4.- Profil inflammatoire	111
2.5.- Profil antioxydant	112

2.5.1.- Bilan ferrique et protéines antioxydantes (Fer, CS, Transferrine, Céruloplasmine)	112
2.5.2.- Acide urique	113
2.6.- Glucose	113
3.- Etude moléculaire des patients	115
3.1.- Etude du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	115
3.1.1.- Génotypage et répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	115
3.1.2.- Répartition des génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) selon le sexe	116
3.2.- Génotypage et répartition des allèles du polymorphisme G211A(rs4148323)	116
4.- Etude des facteurs de risque cardiovasculaire des patients avec Syndrome de Gilbert confirmé (TA7/ TA7)	117
4.1.- Etude du statut antioxydant et de l'inflammation des patients GS (TA7/ TA7)	118
4.1.1.- Analyse des biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation dans deux sous-groupes d'âge	118
4.1.2.- Analyse des biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation selon le sexe	119
4.1.3.- Corrélations entre les concentrations de bilirubine indirecte (UCB) et les marqueurs du stress oxydatif dans la population étudiée GS (TA7/ TA7)	120
4.1.4.- Corrélations entre les concentrations de bilirubine indirecte (UCB) et les marqueurs liés au stress oxydatif dans les sous-groupes d'âge	121
4.1.5.- Corrélations entre les concentrations des deux types de bilirubine (BRB totale et BRB Indirecte) et d'autres facteurs de risque cardiovasculaire selon le sexe	122
4.2.- Etude du bilan lipidique et de la glycémie à jeun des patients GS (TA7/ TA7)	123
4.2.1.- Analyse des biomarqueurs du métabolisme lipidique et de la glycémie à jeun dans deux sous-groupes d'âge	123
4.2.2.- Analyse des biomarqueurs du métabolisme lipidique et de la glycémie à jeun selon le sexe	124
4.2.3.- Corrélations des concentrations des deux types de bilirubine (BRB totale et BRB indirecte) avec la glycémie à jeun et le bilan lipidique selon le sexe	125
II.- Analyse des patients du groupe 2	126
1.- Analyse descriptive des patients	126
1.1.- Caractéristiques générales des patients	126
1.1.1.- Répartition selon les indicateurs de lieu	126
1.1.2.- Répartition selon l'âge et le sexe	128
1.1.3.- Consanguinité parentale	129
1.2.- Caractéristiques cliniques des patients	129
1.2.1.- Antécédents des patients	129
1.2.1.1.- Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie	129
1.2.1.2.- Antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie	130
1.2.2.- Motifs de la demande d'analyse et circonstances de découverte selon les tranches d'âge	131
1.2.2.1.- Motifs de la demande d'analyse chez les nouveau-nés (≤28 jours)	131
1.2.2.2.- Motifs de la demande d'analyse chez les nourrissons (>28 jours - <1 an)	131
1.2.2.3.- Motifs de la demande d'analyse chez les enfants	132
1.2.3.- Type d'allaitement reçu chez les nouveau-nés	133
2.- Etude du profil biologique des patients	134
2.1.- Profil de l'hémolyse	134

2.2.- Profil hépatique	135
3.- Etude moléculaire des patients	138
3.1.- Etude du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	138
3.1.1.- Génotypage et répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	138
3.1.2.- Répartition des génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) selon le sexe	138
3.1.3.- Répartition de la bilirubine totale selon les génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	139
3.2.- Génotypage du polymorphisme G211A(rs4148323)	139
3.3.- Corrélation entre le génotype et l'allaitement maternel exclusif	140
III.- Critères pour le calcul de l'incidence du GS dans la population générale	141
Chapitre VI **Discussion**	144
Chapitre VII **Conclusion et perspectives**	171
Chapitre VIII **Références bibliographiques**	174
Annexes	216

Abréviations et acronymes

ABC	ATP-binding cassette
ABO	Le système des groupes sanguins A, B et O
ABCC2	ATP-binding cassette sub-family C member 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AFM	Allo-immunisation fœtomaternelle
AHA	American Heart Association
AHAI	Anémie hémolytique auto-immune
ALAT	Alanine amino transférase
ALP	Alkaline phosphatase
APAP	Acétyl-para-aminophénol (Acétaminophène)
ASAT	Aspartate amino transférase
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bδ	Delta bilirubine
Bu	Bilirubine non conjuguée
Bc	Bilirubine conjuguée à un sucre
BTc	Bilirubine transcutanée
BBBP	Bilirubin/BSP binding protein
BC	Bilirubine conjuguée
BCG	Bromocresol Green
BET	Bromure d'Ethidium
BIND	Bilirubin-Induced Neurological Dysfonction
BMI	Body mass index
BNC	Bilirubine non conjuguée
BOX	Bilirubine oxydase
BSP	Bromosulfophtaléine
BST	Bilirubine sérique totale
BVR	Biliverdine réductase
Cat	Catalase
CCR	Cancer colorectal
CE / CHER	Cholestérol-estérase
CDC	Centers for Disease Control
CHOD	Cholestérol-oxydase
CHUO	Centre hospitalo-universitaire d'Oran

CNP	Carcinome nasopharyngé
CRP	Protéine C-réactive
CO	Monoxyde de carbone
CS	Coefficient de saturation
CU	Colite ulcéreuse
DPD	Dichlorophényldiazonium
dHPLC	Chromatographie liquide à haute performance en conditions dénaturantes
dNTP	désoxy-nucléosides triphosphates
DT2	Diabète type 2
DO	Densité optique
EAT	Epicardial adipose tissue (tissu adipeux épicardique)
EDTA	Éthylène diamine-tétra acétique
EHA	Encéphalopathie hyperbilirubinémique aiguë
EHUO	Etablissement hospitalier universitaire d'Oran
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EST	Exsanguino-transfusion
FRET	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence
G6PD (G6PDH)	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GGT	Gammaglutamyl-transpeptidase
GK	Glycérol Kinase
GPO	Glycérol 3 phosphate oxydase
GS	Gilbert's syndrome
GSH	Glutathion
GPx	Glutathion peroxydase
HbF	Hémoglobine fœtale
HCA	Hôpital Central de l'armée
HDL	High density lipoprotein
HMRUO	Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran
HMRUC	Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine
HK	Hexokinase
HO-1	Hème oxygénase 1
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance)
hs	Hautement sensible
HSP	Heat shock protein (protéines de choc thermique)
H_2O dd	Eau distillée désionisée
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène

IFCC	Fédération Internationale de Chimie Clinique
IFME	Incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
kcal	Kilocalorie
kg	Kilogramme
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein
LES	Lupus érythémateux systémique
LPL	Lipoprotéine-lipase
MC	Maladie de Crohn
MCV	Maladie cardiovasculaire
MDH	Malate déshydrogénase
MICI	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
MT	Marqueur de taille
mM	Millimolaire
mg	Milligramme
mg/dl	Milligramme par décilitre
mg/L	Milligramme par litre
mmol/L	Millimoles par litre
MRP	Multidrug resistance protein
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
ng	Nanogramme
NAPQI	N- acétyl p-benzoquinone imine
NCEP	National Cholesterol Education Program
nm	nanomètre
NN	Nouveau-né
NO	Monoxyde d'azote
NSN	Nombre de sujets nécessaire
OABP	Organic anion binding protein

OATP	Organic anion transporting polypeptides
OATP1B1	Organic anion transporting polypeptide 1B1
OATP1B3	Organic anion transporting polypeptide 1B3
OH^-	L'ion hydroxyde
O_2	Oxygène
O_2^-	Anion superoxyde
PAGE	: Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAL	Phosphatase alcaline
pb	paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Potentiel hydrogène
POD	Peroxydase
PR	Polyarthrite rhumatoïde
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	Reactive oxygen species
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SDR	Syndrome de détresse respiratoire
SLB	Solution de lyse des globules blancs
SNC	Système nerveux central
SNP	Single nucleotide polymorphism (polymorphisme mononucléotidique).
SRA	Système rénine-angiotensine
Taq	Thermus aquaticus
TAE	Tris-acétate-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA
TIBC	Total Iron Binding Capacity
TNF	Tumor necrosis factors (facteur de nécrose tumorale)
Tm	Température de fusion
UCB	Unconjugated bilirubin (bilirubine non conjuguée)
UDP	Uridine diphosphate
UDP-GT / UGT	Uridine diphosphate- glucuronyl (glucuronosyl) transférase
UGT1A	UGT 1 family, polypeptide A
UGT1A1	UGT 1 family, polypeptide A1
UGT2B	UGT 2 family, polypeptide B
UIBC	Unsaturated Iron Binding Capacity
UMC	Urgences médico-chirurgicales
U	Unités

UV	Rayonnement Ultraviolet
SCN	Syndrome de Crigler-Najjar
SCN I	Syndrome de Crigler-Najjar de type 1
SCN II	Syndrome de Crigler-Najjar de type 2
SDJ	Syndrome de Dubin-Johnson
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SG	Syndrome de Gilbert
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SLCO1B1	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1
SLCO1B3	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B3
SN-38	7-éthyl-10-hydroxycamptothécine (métabolite actif de l'irinotécan)
SN-38G	SN-38 glucuronide
SOD	Superoxyde dismutase
SSCP	Single strand conformation polymorphism
SR	Syndrome de Rotor
TA	thymine-adénine
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	Very low density lipoprotein
µmol/L	Micromole par litre
µg	Microgramme
µM	Micromolaire
µl	Microlitre
%	pourcent

— Liste des tableaux —

Numérotation et intitulés		Page
Tableau I	Les principales causes de cholestase	24
Tableau II	Les caractéristiques différentielles entre le syndrome de Gilbert et le syndrome de Crigler-Najjar type 1 et 2	41
Tableau III	Nomenclature des allèles UGT1A1, localisation et phénotypes associés	45
Tableau IV	Composition du milieu réactionnel pour la PCR du polymorphisme UGT1A1*28	84
Tableau V	Composition du milieu réactionnel pour la PCR du polymorphisme UGT1A1*6	84
Tableau VI	Programme du thermocycleur PCR du gène UGT1A1	85
Tableau VII	Polymorphisme du gène UGT1A1 (UGT1A1*6)	86
Tableau VIII	Polymorphisme du gène UGT1A1 (UGT1A1*28)	86
Tableau IX	Restriction enzymatique du polymorphisme UGT1A1*6	87
Tableau X	Composition du Mix de digestion du polymorphisme UGT1A1*6	87
Tableau X bis	Profil de restriction du polymorphisme UGT1A1*6	88
Tableau XI	Répartition des cas (Groupe 1) selon les indicateurs de lieu de recrutement	94
Tableau XII	Répartition des cas (Groupe 1) selon les services de recrutement	95
Tableau XIII	Description des cas (Groupe 1) selon la moyenne d'âge et le sexe	97
Tableau XIV	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'âge et le sexe	98
Tableau XV	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'IMC	98
Tableau XVI	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'âge et le sexe	99
Tableau XVII	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie	100
Tableau XVIII	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les signes évocateurs	102
Tableau XIX	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les motifs de la demande d'analyse	103
Tableau XX	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les facteurs déclenchant l'hyperbilirubinémie	104
Tableau XXI	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les comorbidités	105
Tableau XXII	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'exploration radio-endoscopique	106
Tableau XXIII	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les résultats de l'exploration radiologique	107
Tableau XXIV	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan d'hémolyse	108
Tableau XXV	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan hépatique	109
Tableau XXVI	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan lipidique	110

Tableau XXVII	Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les valeurs d'interprétation des paramètres du bilan lipidique	110
Tableau XXVIII	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux de CRP	111
Tableau XXIX	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan ferrique et les protéines antioxydantes	112
Tableau XXX	Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux d'acide urique	113
Tableau XXXI	Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux de glycémie	113
Tableau XXXII	Récapitulatif des caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques, biomarqueurs du métabolisme des lipides et de l'inflammation de la population étudiée (Groupe 1)	114
Tableau XXXIII	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon le génotypage et la répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	115
Tableau XXXIV	Répartition des génotypes (TA)n(rs8175347) selon le sexe (Groupe 1)	116
Tableau XXXV	Description de la population d'étude (Groupe 1) selon le génotypage et la répartition des allèles du polymorphisme G211A (rs4148323)	116
Tableau XXXVI	Caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques, biomarqueurs du métabolisme des lipides et de l'inflammation des patients GS TA7/ TA7	117
Tableau XXXVII	Caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques et biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation des patients GS dans deux sous-groupes d'âge	118
Tableau XXXVIII	Caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques et biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation des patients GS selon le sexe	119
Tableau XXXIX	Corrélations entre UCB et les marqueurs liés au stress oxydatif dans la population étudiée (TA7/ TA7)	120
Tableau XL	Corrélations entre UCB et les marqueurs liés au stress oxydatif dans les sous-groupes d'âge	121
Tableau XLI	Corrélations entre les deux types de bilirubine (BRB T, BRB I) et d'autres facteurs de risque cardiovasculaire selon le sexe	122
Tableau XLII	Bilan lipidique et glycémie à jeun des patients GS dans deux sous-groupes d'âge	123
Tableau XLIII	Bilan lipidique et glycémie à jeun des patients GS selon le sexe	124
Tableau XLIV	Corrélations des deux types de bilirubine (BRB T et BRB I) avec la glycémie à jeun et le bilan lipidique selon le sexe	125
Tableau XLV	Répartition des cas (Groupe 2) selon les indicateurs de lieu de recrutement	126
Tableau XLVI	Répartition des cas (Groupe 2) selon les services de recrutement	126
Tableau XLVII	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon l'âge et le sexe	128
Tableau XLVIII	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon la consanguinité parentale	129
Tableau XLIX	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les antécédents personnels d'hyperbilirubinémie par tranches d'âge	129

Tableau L	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie	130
Tableau LI	Les motifs de la demande d'analyse chez les nouveau-nés (≤28 jours)	131
Tableau LII	Les motifs de la demande d'analyse chez les enfants (1-16 ans)	132
Tableau LIII	Description du type d'allaitement chez les nouveau-nés	133
Tableau LIV	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les paramètres du bilan d'hémolyse	134
Tableau LV	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les paramètres du bilan hépatique	135
Tableau LVI	Répartition de la bilirubine totale (Groupe 2) selon les tranches d'âge pédiatriques	136
Tableau LVII	Récapitualtif des caractéristiques démographiques, paramètres biologique de la population étudiée (Groupe 2)	137
Tableau LVIII	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon le génotypage et la répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	138
Tableau LIX	Répartition des génotypes (TA)n(rs8175347) selon le sexe (Groupe 2)	138
Tableau LX	Répartition de la bilirubine totale selon les génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) dans la population d'étude (Groupe 2)	139
Tableau LXI	Description de la population d'étude (Groupe 2) selon le génotypage du polymorphisme G211A (rs4148323)	139
Tableau LXII	Description des nouveau-nés exclusivement allaités selon le génotypage du polymorphisme (TA)n(rs8175347)	140
Tableau LXIII	Procèdes de calcul de l'incidence brute et standardisée du Syndrome de Gibert en population générale	141
Tableau LXIV	Taux d'incidence du GS estimé au niveau de la population de la Wilaya d'Oran à partir d'une population de référence Année 2024	142
Tableau LXV	Comparaison de l'âge des cas avec la littérature	145
Tableau LXVI	Comparaison de l'IMC des cas avec la littérature	146
Tableau LXVII	Comparaison de l'hémoglobine des cas avec la littérature	153
Tableau LXVIII	Comparaison de la LDH des cas avec la littérature	153
Tableau LXIX	Comparaison de la bilirubine totale et de la bilirubine non conjuguée des cas avec la littérature	154
Tableau LXX	Comparaison des enzymes de la cytolyse hépatique et de la fonction biliaire des cas avec la littérature	155
Tableau LXXI	Comparaison de la protidémie et de l'albuminémie des cas avec la littérature	155
Tableau LXXII	Comparaison du bilan lipidique (valeurs médianes) des cas avec la littérature	156
Tableau LXXIII	Comparaison du bilan lipidique (moyennes) des cas avec la littérature	156
Tableau LXXIV	Comparaison de la CRP des cas avec la littérature	158

Tableau LXXV	Comparaison du Fer (Iron) des cas avec la littérature	160
Tableau LXXVI	Comparaison de l'acide urique des cas avec la littérature	163
Tableau LXXVII	Comparaison de la glycémie des cas avec la littérature	164

— Liste des figures —

Numérotation et intitulés		Page
Figure 1	Structure chimique de la bilirubine naturelle IXα, 4Z, 15Z	6
Figure 2	Formation de la bilirubine	7
Figure 3	Métabolisme de la bilirubine	9
Figure 4	Augustin Gilbert	26
Figure 5	Effets d'un régime quotidien de 400 kcal sur la concentration plasmatique de bilirubine chez un individu atteint de Syndrome de Gilbert	31
Figure 6	Algorithme d'investigation de l'ictère inexpliqué chez l'adulte	33
Figure 7	Analyse conformationnelle du polymorphisme rs8175347 sur gel de polyacrylamide	35
Figure 8	Histogramme de pyroséquençage dans le gène UGT1A1 par logiciel de pyroséquençage	37
Figure 9	Chromatogrammes obtenus après amplification de la région promotrice du gène UGT1A1 chez des sujets présentant des génotypes différents en fonction du nombre de répétitions (TA)	38
Figure 10	Représentation graphique du locus du gène humain UGT1A codant pour les enzymes de glucuronidation UGT1A	43
Figure 11	Effets cytoprotecteurs de la bilirubine	51
Figure 12	Applications cliniques potentielles de la bilirubine	58
Figure 13	Métabolisme et risque de toxicité dans le traitement par l'irinotécan	66
Figure 14	Médicaments dont le métabolisme peut être modifié en cas de syndrome de Gilbert	67
Figure 15	Les étapes de la PCR	82
Figure 16	Thermocycleur BIO-RAD C 1000 Touch	82
Figure 17	Visualisation des produits d'amplification	86
Figure 18	Visualisation des produits de restriction	88
Figure 19	Molecular Imager BIO-RAD Gel Doc XR+	90
Figure 20	Visualisation des fragments d'ADN 71pb (sauvage) et 73pb du polymorphisme UGT1A1 *28	91
Figure 21	Répartition des cas (Groupe 1) selon la wilaya d'origine	96
Figure 22	Répartition des cas (Groupe 1) selon la tranche d'âge	97
Figure 23	Indice de masse corporelle des patients (Groupe 1) selon le sexe	99
Figure 24	Digramme des degrés de parenté chez les patients présentant des antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie	101
Figure 25	Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les signes cliniques évocateurs	102
Figure 26	Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les motifs de demande d'analyse	103

Figure 27	Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux de CRP	111
Figure 28	Répartition des cas (Groupe 2) selon la wilaya d'origine	127
Figure 29	Répartition des cas (Groupe 2) selon l'âge et le sexe	128
Figure 30	Répartition des nouveau-nés (≤28 jours) de la population d'étude (Groupe 2) selon les motifs de la demande d'analyse	131
Figure 31	Répartition des enfants (1-16 ans) de la population d'étude (Groupe 2) selon les motifs de la demande d'analyse	132
Figure 32	Répartition des nouveau-nés selon le type d'allaitement	133
Figure 33	Courbe de tendance de moyenne mobile du GS Estimation obtenue sur la population de la Wilaya d'Oran	143

— Liste des annexes —

Numérotation et intitulés		
Annexe I	Consentement Groupe 1	216
Annexe II	Consentement Groupe 2	217
Annexe III	Fiche de renseignements Groupe 1	218
Annexe IV	Fiche de renseignements Groupe 2	219
Annexe V	Liste des consommables utilisés	220
Annexe VI	Liste des réactifs	221
Annexe VII	Préparation des réactifs	222
Annexe VIII	Préparation du gel d'agarose à 8%	224
Annexe IX	Substrats et enzymes	225
Annexe X	Protéines spécifiques	232
Annexe XI	Les étapes de préparation de l'ADN par la technique salting-out	233
Annexe XII	Les étapes de préparation de l'ADN par le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN)	234
Annexe XIII	Les étapes de la PCR	236

Chapitre I :

Introduction – Problématique et intérêt de la question

La bilirubine est un produit de dégradation de l'hème contenu dans l'hémoglobine et les hémoprotéines; elle est largement mesurée dans l'exploration de routine de la fonction hépatique.

Elle a longtemps été considérée comme un déchet non fonctionnel et le plus souvent, un signe inquiétant de maladies hépatiques, ou même une substance potentiellement neurotoxique. Cependant, il est devenu de plus en plus évident que cette molécule représente un modulateur important de diverses fonctions biologiques du corps humain ce qui en fait l'un des antioxydants endogènes les plus puissants **(1).**

Ainsi, depuis la découverte de son potentiel antioxydant par Stocker et coll. en 1987, le domaine de la bilirubine a attiré de nombreux chercheurs, entraînant une augmentation explosive du nombre d'études expérimentales ainsi que des données cliniques sur le métabolisme de la bilirubine **(2).**

Les données développées au cours des trois dernières décennies ont démontré de manière convaincante que des concentrations sériques de bilirubine légèrement élevées, comme celles typiquement observées chez les personnes atteintes du syndrome de Gilbert (SG, hyperbilirubinémie bénigne), peuvent protéger contre diverses maladies de civilisation généralement accompagnées d'une augmentation du stress oxydatif **(3).**

Il est admis que le stress oxydatif contribue de manière importante à la pathogenèse de nombreuses maladies de civilisation, y compris les maladies cardiovasculaires, l'hypertension artérielle, le diabète, l'obésité, le syndrome métabolique, certains cancers ainsi que les maladies auto-immunes et neurodégénératives.

Plusieurs travaux de recherches scientifiques ont apporté des preuves sur un lien possible entre une bilirubine non conjuguée légèrement élevée et certains médiateurs de l'inflammation ainsi qu'une altération du métabolisme des lipides **(4,5).**

En effet, la bilirubine grâce à ses puissantes propriétés antioxydantes, est un piégeur très efficace de radicaux peroxyles; elle peut protéger les lipides membranaires de l'oxydation par ces radicaux.

L'effet protecteur de la bilirubine a également été décrit en étudiant sa relation avec d'autres facteurs biologiques, comme les paramètres du stress oxydatif, et il continue d'être de plus en plus étudié dans différentes régions du monde **(6).**

Cependant, en Algérie, aucune étude sur l'association entre la bilirubine et les marqueurs biologiques incriminés dans une amélioration de l'état clinique n'a été rapportée jusqu'à ce jour.

L'hyperbilirubinémie non conjuguée observée dans le syndrome de Gilbert (Gilbert's syndrome, GS) de est causée par des mutations génétiques du gène UGT1A1 codant pour l'enzyme de conjugaison de la bilirubine ce qui entraine une réduction de son activité.

Le gène UGT1A1 est le siège de plusieurs variations qui peuvent altérer la fonction de l'enzyme et être à l'origine d'hyperbilirubinémies cliniques. Parmi les variations les plus étudiées, le polymorphisme homozygote UGT1A1*28 affectant le gène dans sa région promotrice et la mutation homozygote UGT1A1*6 au niveau de la zone codante du gène sont les plus courantes dans le syndrome de Gilbert.

Le polymorphisme UGT1A1*28 est le génotype le plus associé au syndrome de Gilbert dans les populations caucasienne et africaine alors que le polymorphisme UGT1A1*6 est observé chez les asiatiques de l'Est, y compris les Japonais, les Chinois et les Coréens **(7).**

Le syndrome de Gilbert a un taux de prévalence compris entre 4 % et 16 %, mais cela peut varier en fonction des groupes ethniques. Chez les caucasiens, sa prévalence a été estimée entre 2 et 10 %. Le Japon et l'Asie de l'Est ont une prévalence d'environ 2 %, tandis que l'Inde, l'Asie du Sud et le Moyen-Orient ont des taux allant jusqu'à 20%. **(8).**

Dans la population Tunisienne le polymorphisme UGT1A1*28 a été rencontré chez 11% de la population alors que l'UGT1A1*6 a été rencontré chez 15.7% de la population ce qui suggère que la population Tunisienne semble être hétérogène du point de vue statut mutationnel du gène UGT1A1 **(9).**

En Algérie, à notre connaissance, aucune donnée n'est rapportée jusqu'à présent sur la prévalence des polymorphismes les plus répandus et qui sont en association avec les hyperbiliribunémies.

Un autre impact du syndrome de Gilbert est apparu au cours des dernières années concernant ses implications pharmacologiques, si bien que le génotype UGT1A1*28 est devenu un élément important dans la tolérance aux médicaments **(10).**

La diminution d'activité de l'UGT1A1, observée dans le syndrome de Gilbert, est susceptible de modifier le métabolisme des drogues nécessitant une glucuronoconjugaison par cette enzyme pour être actives ou éliminées. Cela a déjà été clairement établi pour un certain nombre de molécules comme le paracétamol et le phénobarbital. C'est le cas également de l'irinotécan, un anticancéreux utilisé dans le traitement de certains cancers colorectaux métastatiques de l'adulte et qui est bien connu pour provoquer une toxicité chez les patients atteints du GS **(11).**
Pour d'autres médicaments comme les agents antiviraux atazanavir et indinavir qui inhibent l'UGT1A1, certains auteurs ont démontré qu'en présence du variant UGT1A1*28, les patients développent des degrés variables d'hyperbilirubinémie d'où la nécessité d'identifier les patients à risque d'hyperbilirubinémie avant le début du traitement et diminuer ainsi les épisodes de jaunisse **(12,13).**

L'émergence de la pharmacogénétique dans la pratique médicale courante et les données de la littérature ont démontré l'intérêt du génotypage de l'UGT1A1 en thérapeutique ce qui a permis d'adapter les traitements médicamenteux et leur posologie, en fonction du statut génétique des patients **(14).**

L’individualisation des traitements étant particulièrement indiquée en oncologie, car les médicaments utilisés, en particulier les chimiothérapies, présentent un index thérapeutique étroit et des variabilités interindividuelles. La pharmacogénétique peut présenter un intérêt majeur en routine clinique pour l’optimisation et la sécurisation des chimiothérapies anticancéreuses, afin d’améliorer la tolérance des patients à ces traitements tout en préservant une efficacité optimale **(15).**

En Algérie, les protocoles d’adaptation de posologie en fonction du génotype de l’UGT1A1 ne sont malheureusement pas encore d’usage courant.

Par ailleurs, chez les nouveau-nés, une population dans laquelle l'hyperbilirubinémie est fréquente et souvent d'étiologie multifactorielle, l’UGT1A1 est impliqué en tant que facteur aggravant dans l’ictère néonatal.

En effet, l'hyperbilirubinémie néonatale peut être sévère ou prolongée et justifier l'analyse génétique de l’UGT1A1 à la recherche des troubles héréditaires qui sont le syndrome de Crigler-Najjar ou le syndrome de Gilbert.

Certains auteurs ont décrit l’utilité clinique du test génétique de l’UGT1A1 dans l’hyperbilirubinémie non conjuguée pédiatrique ; en néonatologie, mais également chez des enfants plus âgés pour confirmer une impression clinique du syndrome de Gilbert **(16,17).**

Au final l’ensemble de ces données souligne l’importance du génotypage de l’UGT1A1. D’une part, il va s'inscrire dans une démarche diagnostique devant diverses situations comme la découverte d'une hyperbilirubinémie libre isolée non expliquée, la découverte d'une hyperbilirubinémie au cours d'un traitement ou encore en néonatologie; le génotypage permettra de définir si l’hyperbilirubinémie est d’origine héréditaire. D’autre part, le diagnostic moléculaire devrait permettre d'éviter les procédures de diagnostic invasives et il servira à établir les procédures thérapeutiques correctes dans une variété de maladies (par exemple, chimiothérapie anticancéreuse).

L’étude biochimique associée à une élévation de la bilirubine libre et l’identification des polymorphismes de l’UGT1A1 propres à notre population sont les deux approches qui constituent l’objectif principal de notre recherche.

Nous rapportons la première approche génétique sur le gène UGT1A1 afin de déterminer la prévalence des polymorphismes les plus associés au syndrome de Gilbert. Cela servira comme point de départ pour des études de corrélation phénotype/génotype et permettra, pour la première fois, une caractérisation spécifique de ces polymorphismes dans la population algérienne.

Chapitre II :

Revue de la littérature

I.- BILIRUBINE ET HYPERBILIRUBINEMIES :

1.- Définition :

La bilirubine est une famille de pigments biliaires contenant tous une structure commune de tétrapyrrole asymétrique. Il existe trois grandes classes de bilirubine dans le sang : la bilirubine non conjuguée (Bu), la bilirubine conjuguée à un sucre (Bc), et la bilirubine liée de manière covalente à l'albumine également appelée δ- bilirubine (Bδ) ou biliprotéine. La bilirubine a longtemps été associée aux pathologies hépatiques et aux conditions hémolytiques et est supposée posséder peu ou pas de fonction biologique **(18)**.

2.- Structure chimique :

La bilirubine est un composé tétrapyrrolique de formule $C_{33}H_{36}N_4O_6$. La bilirubine naturelle est appelée IXα, 4Z, 15Z. Cette notation indique qu'elle est dérivée de l'isomère IX de la protoporphyrine, l'isomère retrouvé dans l'hème et les hémoprotéines comme l'hémoglobine par clivage du macrocycle de la porphyrine au niveau du carbone du pont α et que l'arrangement stéréochimique au niveau des carbones des ponts 14 et 15 est en configuration Z. Cette structure stéréochimique est particulière, tous les groupes hydrophiles sont impliqués dans de fortes liaisons hydrogène ce qui transforme la molécule en une molécule fermée avec une conformation en forme de tuile de crête. Cette configuration bloque l'exposition des groupes polaires de la molécule aux solvants aqueux et du carbone du pont central à l'attaque des réactifs diazoïques, et est donc à la base du comportement hydrophobe de la bilirubine et de sa lente activité diazoïque **(19)**.

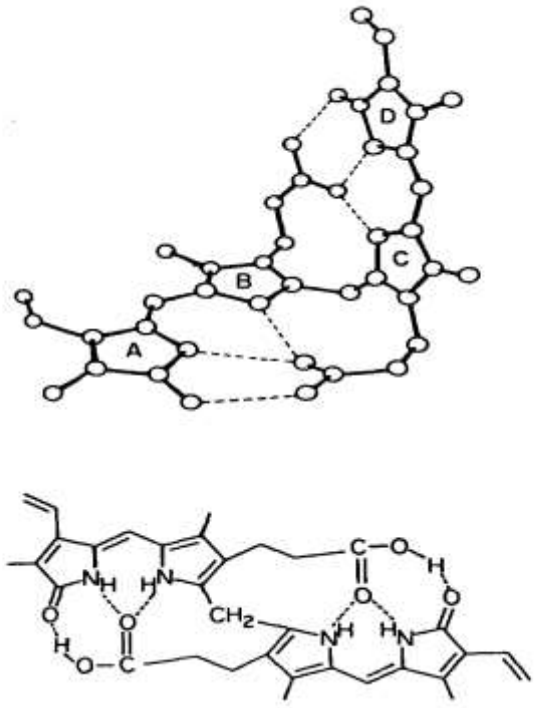


Fig. 1 : Structure chimique de la bilirubine naturelle IXα, 4Z, 15Z **(18)**

3.- Métabolisme de la bilirubine :

Le métabolisme comprend principalement 4 étapes : production, captation par le foie, conjugaison hépatocytaire et excrétion.

3.1. - Synthèse de la bilirubine :

Le corps humain produit approximativement 4 mg/kg de bilirubine par jour soit 200 à 300 mg. Environ 80% de cette bilirubine est dérivée de la dégradation de l'hémoglobine dans les érythrocytes (les érythrocytes sénescents principalement, une plus faible partie étant dérivée des érythrocytes nouvellement formés ainsi que d'autres sources telles que l'hémolyse intravasculaire). Le reste de la production quotidienne provient du renouvellement des protéines de l'hème telles que les isoenzymes du cytochrome P450, la myoglobine, etc.

Au bout d'environ 120 jours, les globules rouges sénescents sont phagocytés par les macrophages du système réticulo-endothélial. Au cours de ce processus l'hémoglobine est dégradée en globine et en hème, un tétrapyrrole cyclique. La globine subit une protéolyse, et l'hème est ensuite dégradé par un processus enzymatique impliquant plusieurs étapes.

La première étape implique le système hème oxygénase dont l'activité représente l'étape limitante du catabolisme de l'hème. L'action de cette enzyme consiste à cliver le pont α- méthylène du cycle tétrapyrrole de l'hème pour générer la biliverdine IXα, le monoxyde de carbone et le fer. Un clivage sur un site autre que le carbone α, en plus faible mesure, est possible. Il en résulte la formation d'autres isomères dont l'isomère IXß retrouvé dans l'urine du nouveau-né et dans le méconium. La biliverdine IXα est ensuite réduite par une enzyme cytosolique, la bilirubine réductase, en bilirubine IXα. Cette bilirubine est apolaire, elle se lie à des transporteurs du plasma sanguin dont l'albumine qui l'achemine jusqu'au foie **(20)**.

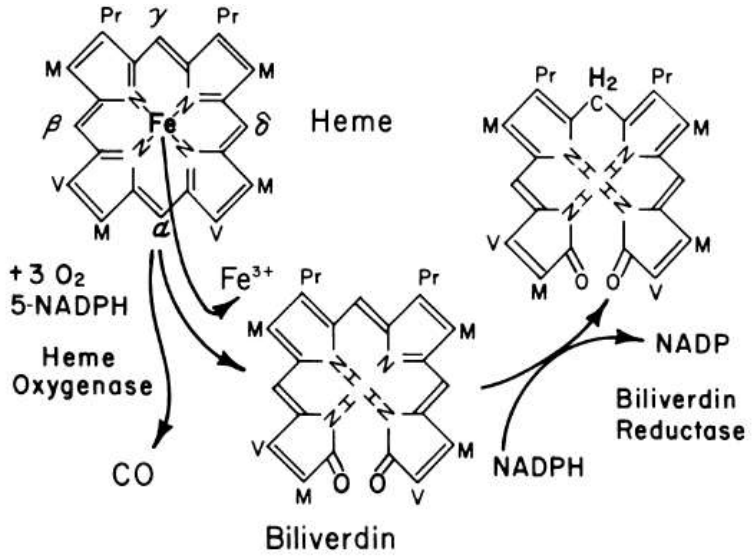


Fig. 2 : Formation de la bilirubine **(19)**.

3.2.- Captation par le foie :

La bilirubine est absorbée par l'hépatocyte à travers la membrane sinusoïdale après dissociation de l'albumine.

Le mécanisme exact de l'absorption hépatocytaire n'étant pas clair, il semble être médié par des protéines. Au moins 4 transporteurs d'anions organiques dont la bilirubine et la bromosulfophtaléine (BSP) ont été décrits : La Bilitranslocase, la protéine de liaison à la bilirubine/BSP (BBBP), la protéine de liaison aux anions organiques (OABP) et le polypeptide de transport d'anions organiques (OATP) en particulier OATP1B1 et OATP1B3.

Une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, la bilirubine est principalement liée à des protéines cytosoliques appartenant à la famille des glutathion-S-transférase A (ligandine) et une petite partie est liée à la protéine de liaison des acides gras. Similairement à ce qui est observé au niveau sérique, cet état lié de la bilirubine maintient un niveau faible de bilirubine libre qui est potentiellement toxique **(21)**.

3.3. - Conjugaison de la bilirubine au niveau hépatique :

Dans les hépatocytes, la ligandine achemine la bilirubine au réticulum endoplasmique. Dans ce dernier, la bilirubine est conjuguée dans une liaison ester avec des fragments de sucre donnés par les sucres de l'Uridine diphosphate (UDP).

La conjugaison est catalysée par l'UDP glucuronyltransférase (UDP-GT), une enzyme codée par le gène UGT1A1.Dans cette réaction, une ou deux molécules d'acide glucuronique sont couplés aux groupes carboxyles de l'acide propionique des chaines de bilirubine dans une liaison ester donnant la bilirubine monoconjuguée et diconjuguée.

L'estérification rompt les liaisons hydrogène intramoléculaires ouvrant ainsi la molécule et rend les bilirubines conjuguées (Bc) plus hydrosolubles permettant leur excrétion dans la bile **(22)**.

3.4. - Devenir de la bilirubine conjuguée et cycle entérohépatique:

Le glucuronide de bilirubine formé quitte le réticulum endoplasmique, il est transporté dans le cytoplasme et diffuse à travers l'une des deux surfaces de l'hépatocyte. A la surface canaliculaire, la bilirubine conjuguée est excrétée dans la bile contre un gradient de concentration par l'intermédiaire d'un transporteur membranaire canaliculaire multidrug resistance-related protein (MRP2), également appelé ABC-C2, appartenant à la famille de l'adénosine triphosphate (ATP) binding cassette.

Les conjugués sont incorporés dans des vésicules biliaires qui passent avec la bile dans l'intestin, puis au colon, ou elles sont réduites sous l'action des enzymes bactériennes en un mélange de substances : l'urobilinogène, l'urobiline, la stercobiline et la stercobilinigène.

La majorité de l'urobilinogène produit dans le côlon est éliminé dans les selles sous forme de stercobiline.

Une petite fraction de l'urobilinogène subit une déconjugaison principalement par les enzymes bactériennes ; la ß glucuronidase et redonne de la bilirubine non conjuguée. Cette dernière pourrait être réabsorbée par l'intestin et excrétée par les reins sous forme d'urobiline.

Une partie du stercobilinogène, de l'urobiline et de la bilirubine conjuguée est réabsorbée par l'intestin, passe dans le sang et retourne au foie pour continuer leur transformation à l'origine de la circulation entéro-hépatique **(18,23,24)**.

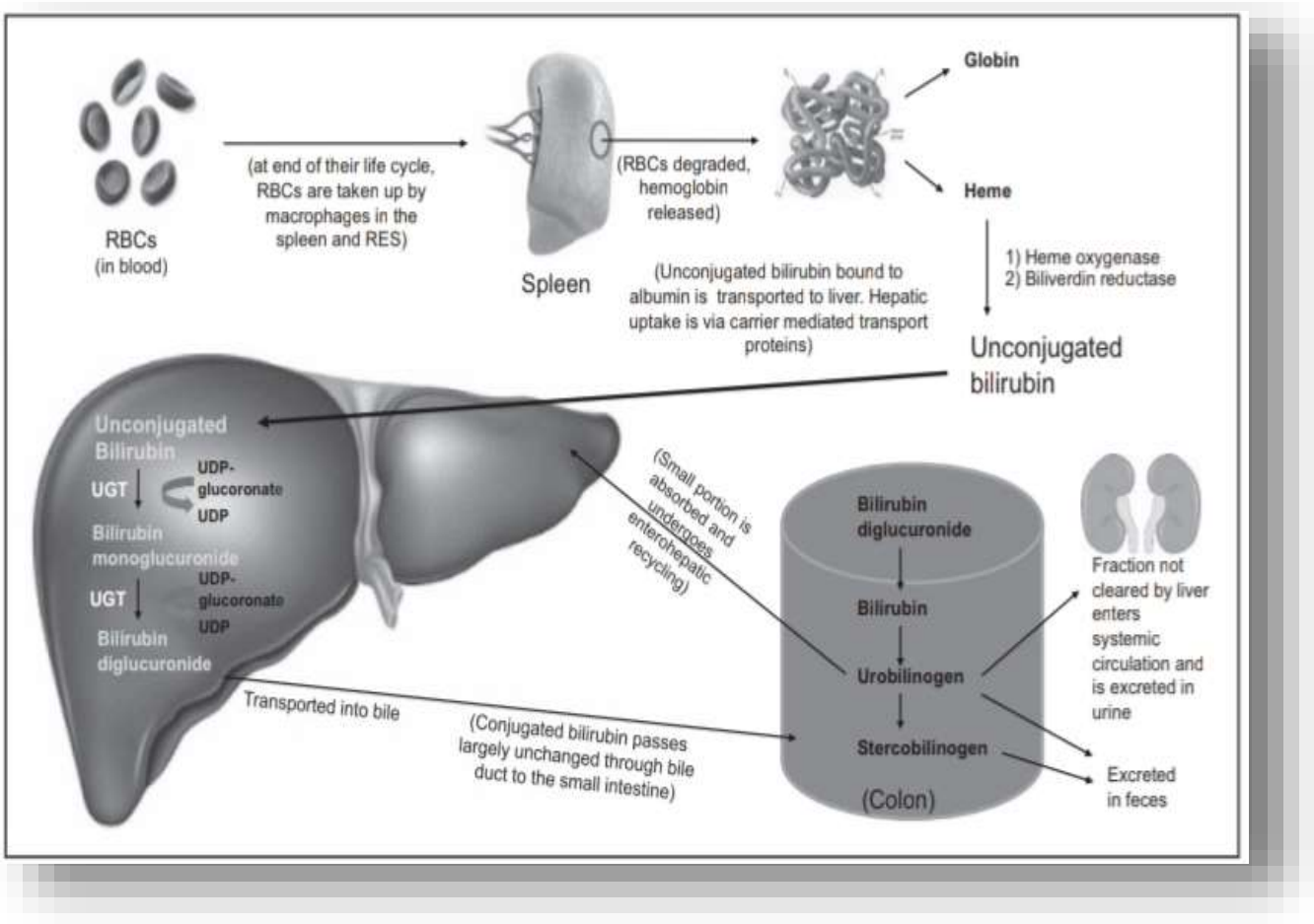


Fig. 3 : Métabolisme de la bilirubine **(25)**.

4. - Méthodes de dosage :

Les méthodes utilisées pour mesurer la bilirubine circulante ont progressé au cours des 50 dernières années. Celles-ci ont évolué à partir de l'utilisation de réactifs colorants dont l'acide sulfanilique, en passant par la méthode enzymatique à la bilirubine oxydase jusqu'à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la bilirubinométrie transcutanée non invasive.

Connue sous le nom de réaction diazo, la réaction de la bilirubine avec l'acide sulfanilique diazoté a été découverte par Ehrlich en 1883 et appliquée à la mesure de la bilirubine dans le sérum et la bile par van den Bergh et Muller en 1916 **(26)**.

Ces derniers ont observé que la réaction était lente dans les sérums de nourrissons atteints de jaunisse et a nécessité un accélérateur pour se poursuivre ; tandis que la réaction était rapide dans les sérums adultes et dans la bile sans addition d'éthanol ce qui a conduit aux termes de bilirubine directe et indirecte respectivement.

La méthode au colorant diazoïque est la plus largement utilisée actuellement dans les laboratoires de biologie médicale. Elle permet de quantifier les taux de bilirubine directe (principalement des glucuronides de bilirubine) ou bilirubine totale (comprenant non conjuguée, liée à l'albumine et les glucuronides de bilirubine) lorsque des agents solubilisants sont ajoutés **(27, 28, 29, 30, 32)**.

4.1.- Méthodes utilisant une diazoréaction :

Elles sont basées sur le couplage de la bilirubine avec un composé diazoïque. Dans cette réaction le diazoréactif, acide sulfanilique diazoté, réagit avec la bilirubine pour produire deux fragments azodipyrroliques colorés et mesurables par spectrophotométrie ; leurs couleurs étant rouge-violet à pH neutre et bleu à pH faible ou élevé. Van den Bergh et Muller ont appliqué cette réaction à la quantification de bilirubine dans le sérum, ils ont décrit la fraction de bilirubine qui a réagi avec le réactif diazoïque en absence d'un accélérateur (alcool) comme la fraction directe de bilirubine et ils ont utilisé le terme de bilirubine indirecte pour la différence entre la bilirubine totale (trouvée après l'ajout d'alcool au mélange réactionnel) et la fraction directe de bilirubine.

De nombreuses variantes de la méthode de Van den Bergh et Muller ont été développées. Les modifications ont concerné l'agent de diazotation, la nature de l'accélérateur, le pH de la diazoréaction et le pH du milieu de lecture.

Différents types d'accélérateurs sont utilisés pour faciliter la réaction de la bilirubine non conjuguée (indirecte) avec le réactif diazoïque. Certains sont des compétiteurs comme la caféine et la diphylline. D'autres, agissent en dénaturant la protéine, ce qui modifie la liaison albumine-bilirubine tout en augmentant la solubilité du pigment dans le milieu de diazoréaction ; c'est le cas du méthanol ou de l'éthanol. Le Diméthylsulfoxyde occupe une place à part, il agit en augmentant la solubilité de la bilirubine dans le milieu de réaction et permet une diazoréaction rapide **(26,31, 33, 39)**.

4.1.1.- Méthode de Malloy-Evelyn:

Malloy et Evelyn ont introduit le méthanol comme accélérateur, il réagit avec la bilirubine totale dans le sang pour former un composé de couleur rose à rouge-violet dont l'absorbance sera mesurée à 540nm.

Parmi les inconvénients de cette méthode ; la turbidité due à la précipitation des protéines par le méthanol ce qui peut conduire à des résultats par défaut et un temps de réaction long. C'est pourquoi cette méthode a pratiquement été abandonnée **(34, 40, 54)**.

4.1.2.- Méthode à la caféine benzoate :

Cette méthode a été décrite par Jendrassik et Grof en 1938 et modifié ultérieurement par Doumas et ses collègues **(35,56)**.
Dans cette technique, une solution aqueuse de caféine et de benzoate de sodium sert d'accélérateurs dans la réaction diazoïque pour la détermination du taux de bilirubine totale.

Le mécanisme d'action qui a été retenu pour rendre cette réaction possible serait que la caféine et peut-être le benzoate, déplace la bilirubine non conjuguée de ses sites de liaison sur l'albumine. Ceci implique la formation de liaisons hydrogène entre la bilirubine et la caféine rendant donc la bilirubine soluble dans l'eau, ou la formation de complexes et perturbation des liaisons hydrogène internes de la bilirubine.

Cette méthode a été développée par the Committee on Standards of the American Association for Clinical Chemistry et accréditée par the National Reference System for the Clinical Laboratory **(67)**.

La méthode implique l'ajout de tartrate alcalin à la fin de la réaction, ce qui déplace les maximums d'absorbance des produits azodipyrrole de 530 nm à 600 nm.

L'avantage de cette méthode est qu'elle n'est pas affectée par les changements de pH, qu'elle peut maintenir une sensibilité optique même à de faibles concentrations de bilirubine et qu'elle n'est pas sensible à des concentrations élevées de protéines. Certaines modifications supplémentaires de cette méthode comprennent la substitution de la dyphylline à la caféine, les réactifs contenant de l'acétate de dyphylline ou de la caféine-acétate-benzoate ont un rendement identique dans les valeurs de bilirubine totale dans les sérums humains.

Dans d'autres méthodes, de l'acide ascorbique ou de l'iodure de potassium est ajouté pour éliminer l'excès de réactif diazonium, car un excès de réactif diazonium dans le système réactionnel provoquera la décomposition du produit **(35)**.

4.2.- Méthodes de chromatographie liquide haute performance (HPLC) :

Ces méthodes ont permis une séparation et une quantification simultanée des différentes fractions de bilirubine dans le sérum **(38)**. Plusieurs méthodes HPLC sont disponibles ; la première a été développée par Lauff et ses collègues **(82)**.

Dans cette méthode les quatre fractions de bilirubine restent en solution après une étape qui consiste à relarguer les globulines avec du sulfate de sodium. Les valeurs de bilirubine totale mesurée dans le sérum par cette méthode concordaient bien avec ceux obtenus par une méthode modifiée de Jendrassik-Grof.

Cette méthode présente cependant certains inconvénients dont la nécessité de prétraiter le sérum pour éliminer les globulines peut entraîner une perte variable de B_{δ}, la méthode est insensible aux concentrations de bilirubine totale inférieures à 1 mg/dl (17 µmol/L) et est trop laborieuse pour une analyse clinique de routine.

Dans la méthode de Blanckaert **(131)** les conjugués de bilirubine sont convertis en esters méthyliques de bilirubine par transestérification catalysée par une base dans le méthanol suivi d'une extraction au chloroforme.

Cette procédure a permis de récupérer les fractions de bilirubine α-, β- et γ mais la fraction δ-bilirubine n'a pas été détectée car elle a été éliminée avec les protéines sériques dénaturées suite à l'extraction au chloroforme.

Une méthode HPLC simple et rapide a été publiée par Adachi et al **(135)** cette méthode ne nécessite pas de relargage des globulines ou la transformation chimique des conjugués de bilirubine.

Cette méthode sépare la bilirubine sérique en cinq fractions ; la cinquième fraction étant le photoisomère Z,E ou E,Z de la bilirubine est éluée entre le monoglucuronide et la bilirubine non conjuguée.

La HPLC a servi à élucider la nature de espèces de bilirubine naturellement présentes dans le sang ou formées lors de la photothérapie chez les nouveau-nés.

La connaissance du pourcentage de chacune des fractions de bilirubine dans le sang n'a aucune valeur diagnostique c'est pourquoi la HPLC n'apporte que peu ou pas d'aide au médecin dans le diagnostic différentiel des ictères.

Une méthode d'électrophorèse capillaire pour mesurer les différents types de bilirubine ont été développés par Wu et ses collaborateurs **(136)**.

4.3.- Méthodes enzymatiques :

4.3.1.- Méthode à la bilirubine oxydase :

Le développement des méthodes enzymatiques pour mesurer la bilirubine a été rendu possible par la disponibilité de la bilirubine oxydase (BOX), enzyme isolée d'un champignon Myrothecium verrucaria. Celle-ci catalyse l'oxydation de la bilirubine en biliverdine par l'oxygène moléculaire sans formation de peroxyde d'hydrogène.

Bilirubine + 1/2 02 $\xrightarrow{\text{BOX}}$ Biliverdine + H_20

À un pH proche de 8 et en présence de cholate de sodium et de dodécylsulfate de sodium (SDS) les quatre fractions de bilirubine sont oxydées en biliverdine qui est ensuite oxydée en produits violets et finalement incolores. La diminution de l'absorbance liée à la disparition de la bilirubine est proportionnelle à la concentration de bilirubine totale.

Les taux d'oxydation des différentes fractions de bilirubine dépendent du pH du mélange réactionnel et de la présence d'agents tensioactifs.

À un pH allant de 3,7 à 4,5 l'enzyme oxyde les conjugués de bilirubine et la δ-bilirubine mais pas la bilirubine non conjuguée ce qui permet de mesurer la bilirubine directe à cette plage de pH.

À pH 10 l'enzyme oxyde sélectivement les deux glucuronides. Le taux d'oxydation de la δ-bilirubine est maximum à pH proche de 4 et minimum à pH proche de 10 tandis que l'oxydation de la bilirubine non conjuguée à ces valeurs de pH est négligeable.

Le choix de la longueur d'onde de mesure se situe entre 420 et 470 nm. Le maximum d'absorbance est 445 nm pour la bilirubine non conjuguée, 425 nm pour la bilirubine conjuguée et 440 nm pour la bilirubine delta. C'est pourquoi il est préférable d'effectuer les mesures à la longueur d'onde de 445 nm.

Les résultats obtenus par la méthode à la bilirubine oxydase était en accord avec ceux obtenus par la méthode Jendrassik-Grof **(28, 176, 273, 353, 382)**.

4.3.2.- Méthode à la vanadate oxydase :

L'acide vanadique est utilisé comme agent oxydant. Cette méthode présente une excellente corrélation avec la méthode diazoïque. En raison de son processus plus simple et plus rapide que celui de la méthode diazoïque, la méthode du vanadate peut être utilisée alternativement pour les échantillons contenant des substances interférentes.

Récemment, un instrument électronique a été conçu pour mesurer la bilirubine à travers la peau à l'aide d'une méthode photométrique basée sur l'acide vanadique. Cette méthode utilise deux longueurs d'onde spécifiques pour évaluer la valeur de la bilirubine de manière non invasive. L'oxydation complète est achevée dans les trois minutes qui suivent la mesure **(429)**.

4.4.- Méthode par spectrophotométrie directe en chimie sèche :

Le système de chimie sèche est capable de mesurer directement plusieurs formes de bilirubine (totale, conjuguée et non-conjuguée) permettant ainsi le calcul de la bilirubine delta correspondant à la bilirubine liée par covalence à l'albumine.

L'analyseur Kodak Ektachem et les plaques BuBc ont permis la mesure simultanée des bilirubines non conjuguées et conjuguées dans le sérum par réflectométrie **(433)**.

L'analyse est basée sur la liaison des espèces de bilirubine à un polymère cationique intégré dans la plaque ce qui a pour but d'améliorer la capacité d'absorption molaire et la stabilité des composés de bilirubine non conjugués (Bu) et conjugués (Bc).

Les concentrations de Bu et Bc sont calculées à partir des densités de réflexion mesurées et les réflectivités molaires prédéterminées des deux espèces de bilirubine à deux longueurs d'onde (400 et 460 nm) et l'utilisation d'équations simultanées.

La bilirubine totale peut être quantifiée avec précision en utilisant un calibrateur de bilirubine non conjuguée Bu ou des solutions de ditaurate de bilirubine.

Ce système ne mesure pas la bilirubine delta, retenue dans les couches supérieures de la plaque, il peut être utilisé pour mesurer la bilirubine totale du nouveau-né chez qui la concentration en bilirubine delta est négligeable **(36,37)**.

4.5.- Mesure transcutanée de la bilirubine :

La bilirubinométrie transcutanée a été introduite en pratique clinique en 1980 par Yamanouchi et al. À l'aide d'un bilirubinomètre développé par Minolta **(434)**. Cet instrument était un photomètre à réflectance qui utilisait deux filtres pour mesurer une couleur jaune corrigée en fonction de l'hémoglobine.

Le BiliCheck (SpectRx Inc ; États-Unis) est l'un des appareils de mesure de bilirubine transcutanée (BTc) utilisés en néonatologie, et plus particulièrement chez le nouveau-né (NN) prématuré. La valeur de la BTc est la moyenne de 5 mesures réalisées au niveau du front, site de mesure recommandé par le constructeur. Le principe de fonctionnement est basé sur l'analyse d'une lumière blanche transmise puis réfléchie par la peau et les tissus sous-cutanés. Cette technique utilise tout le spectre de la lumière visible (380 à 760 nm).

Le taux de bilirubinémie est calculé par un algorithme qui analyse la lumière absorbée par l'hémoglobine, la mélanine et l'épaisseur du derme.

Il en déduit par soustraction l'absorbance de la bilirubine présente dans les capillaires et les tissus sous-cutanés.

La mesure de la bilirubine sanguine totale par méthode transcutanée est indolore et permet un monitorage de la bilirubinémie. Son intérêt principal est d'obtenir un taux instantané de bilirubinémie permettant de débuter sans tarder le traitement de l'ictère par photothérapie **(168, 435)**.

5.- Les hyperbilirubinémies :

Le métabolisme de la bilirubine implique l'absorption de la bilirubine par la circulation, le stockage intracellulaire, la conjugaison avec l'acide glucuronique et l'excrétion dans la bile. Des anomalies dans l'un de ces processus conduisent à une hyperbilirubinémie.

L'augmentation du taux sérique de la bilirubine produit une coloration jaune à bronze, généralisée de la peau et des muqueuses ; c'est l'ictère appelé couramment « jaunisse ». Il s'accompagne le plus souvent d'urines foncées et de selles plus claires, c'est un symptôme d'un trouble médical et non pas une maladie en soi.

Les causes d'ictère sont très nombreuses. Elles sont séparables en deux catégories selon la prédominance de l'augmentation sur la bilirubine non conjuguée ou sur la bilirubine conjuguée **(45, 46)**.

L'hyperbilirubinémie non conjuguée survient dans l'une des trois principales conditions physiopathologiques ou une combinaison de celles-ci :

- **Un excès de production de bilirubine** : par une hyperhémolyse qui provoque une anémie hémolytique, un gros hématome ou une dysérythropoïèse.
- **Une absorption altérée de la bilirubine :** par diminution de la captation hépatique.
- **Un défaut de conjugaison de la bilirubine :** par défaut d'expression génétique de l'enzyme de conjuguaison de la bilirubine.

L'hyperbilirubinémie conjuguée peut être liée à deux mécanismes :

- Un obstacle sur les voies biliaires intra ou extra hépatiques à l'origine d'ictères obstructifs, on parle alors d'ictères cholestatiques.
- Un dysfonctionnement des hépatocytes diminuant l'excrétion dans la bile de la bilirubine conjuguée.

5.1.- Ictère néonatal :

5.1.1.- Définition et généralités :

L'ictère néonatal appelé aussi jaunisse du nouveau-né se caractérise par l'apparition d'une coloration jaune de la peau et/ou des yeux, il est cliniquement perceptible dès que la concentration sanguine de la bilirubine totale dépasse 40mg/L (50mmol/L).

C'est le plus fréquent des symptômes observés dans la période néonatale, puisque l'on estime qu'il touche environ 2/3 des nouveau-nés soit 65% à 70%, et plus fréquent chez les prématurés.

L'ictère néonatal peut être lié à une hyperbilirubinémie non conjuguée ou à une hyperbilirubinémie conjuguée.

Contrairement à l'adulte, l'ictère du nouveau-né est dans l'immense majorité des cas à bilirubine indirecte liposoluble et potentiellement neurotoxique.

Plus rarement observé, l'ictère à bilirubine directe est dit « cholestatique » ou « retentionnel » par réduction du flux biliaire de la bilirubine directe et résulte de pathologies malformatives des voies biliaires ou métaboliques. C'est une urgence diagnostique et thérapeutique, son pronostic dépend de la précocité de prise en charge spécialisée **(47, 48, 49, 50, 101)**.

La plupart des ictères du nouveau-né sont bénins car ils évoluent spontanément vers la résolution.

Cependant, en raison de la toxicité potentielle de la bilirubine, les nouveau-nés doivent être surveillés pour identifier ceux qui pourraient développer une hyperbilirubinémie sévère. L'ictère nucléaire est la forme de neurotoxicité la plus sévère. Une encéphalopathie aiguë peut être suivie de divers troubles neurologiques.

Le traitement dépend de la cause et du degré d'élévation de la bilirubine. Si l'ictère est dû à une pathologie spécifique, sa prise en charge consiste à traiter celle-ci, et si le traitement d'un taux de bilirubine élevé s'avère nécessaire, le traitement classique comprend la photothérapie et l'exsanguino-transfusion **(51, 52)**.

5.1.2.- Etiologies :

Deux types d'ictères sont observés avec de nombreuses causes :

-Les ictères bénins

-Les ictères pathologiques

A.- Ictères bénins :

Ils comprennent l'ictère simple ou ictère physiologique, et les ictères dus à l'allaitement.

A.1.- Ictère simple ou physiologique :

L'ictère simple anciennement dénommé « ictère physiologique » est l'ictère néonatal le plus fréquent, il est lié à une accumulation de bilirubine libre.

Il intéresse des enfants bien portants, sans facteurs de risque avec un examen clinique normal et des urines claires. Il apparait généralement au deuxième ou troisième jour de vie avec un maximum d'intensité autour du quatrième jour. Le taux de bilirubine sanguine ne dépasse pas 250 mmol/L et disparait spontanément dans les dix jours.

L'ictère simple du nouveau-né est le reflet d'un déséquilibre d'adaptation entre la production et l'élimination de la bilirubine, se traduisant par un excès de bilirubine non conjuguée ou libre dans le sang ; c'est la particularité du métabolisme de la bilirubine en période néonatale **(53, 54)**. Il est causé par :

- **La production augmentée de bilirubine en période néonatale :**

La production de bilirubine chez un nouveau-né est estimée à 8,5 mg/kg/24 h, soit deux à trois fois plus élevée que la production journalière de bilirubine d'un adulte.
Cette augmentation de synthèse est en partie expliquée par l'hémolyse physiologique qui survient à la naissance (masse globulaire plus élevée, durée de vie des hématies plus courte) mais aussi de l'activité importante de l'hème oxygénase. En effet, cette enzyme est 8 fois plus concentrée dans le foie du nouveau-né que dans celui de l'adulte ,elle est induite en 1 à 2 heures par l'hème lui-même qui initie la chaine de réaction aboutissant à un excès de production de bilirubine (6 à 8 mg/kg/24 h au lieu de 3 à 4 mg/kg/24 h chez le sujet mature) **(41, 55, 58)**.

- **L'activité réduite de l'UGT1A1 :**

Dans les 10 premiers jours de vie, elle est secondaire à l'immaturité hépatique. L'expression de son gène varie entre les individus, elle est diminuée en Asie.

- **Un cycle entéro-hépatique augmenté :**

L'excrétion de la bilirubine conjuguée est immature, le cycle entérohépatique est très actif du fait d'une colonisation bactérienne faible et d'une activité augmentée de la ß-glycuronidase.

A.2.- Ictère du lait maternel :

Décrit pour la première fois par Newman et Gross en 1963, l'ictère du lait maternel est une cause courante et relativement bénigne d'hyperbilirubinémie non conjuguée chez les nouveau-nés en bonne santé bénéficiant dès les premiers jours de vie d'une lactation maternelle abondante. Il apparaît après 5 à 7 jours de vie et disparait entre 4 et 6 semaines après la naissance. Les taux de bilirubine sérique totale ne dépassent généralement pas 12 mg/dl, bien que des taux de bilirubine plus élevés et de rares cas d'ictère nucléaire aient été signalés.

Il est provoqué par certaines substances contenues dans le lait maternel qui interfèrent avec la capacité du foie à excréter la bilirubine, parmi ces substances :

- **La bêta-glucuronidase :** Une concentration augmentée de bêta-glucuronidase excrétée dans le lait provoque une augmentation de la déconjugaison et de la réabsorption de la bilirubine.
- **La lipoprotéine lipase :** D'une concentration importante dans le lait maternel, elle entraîne une libération importante d'acides gras responsables d'une inhibition de la glucuroconjugaison.

Son diagnostic était anciennement confirmé par la diminution de l'ictère après interruption de l'allaitement maternel, ou par le chauffage du lait justifié par le caractère thermosensible de l'activité lipoprotéine-lipase.
L'abstention thérapeutique est de règle à l'heure actuelle, comme pour l'ictère simple (pas d'interruption de l'allaitement maternel, pas de chauffage du lait), car ses bénéfices prédominant sur le préjudice d'une coloration ictérique prolongée **(23,60,61,62)**.

B.- Ictères pathologiques :

B.1.- Ictères hémolytiques :

L'hyperhémolyse est la première cause d'ictère pathologique. Il est lié à la production anormalement élevée de bilirubine, consécutive à la lyse des globules rouges.

L'ictère est précoce, avant la 24ème heure de vie, rapidement intense. Il entraîne une élévation du taux de bilirubine dans le sang, une baisse du nombre de globules rouges à l'origine d'une anémie régénérative plus ou moins profonde avec une réticulocytose et une érythroblastose importante **(63)**.

L'ictère hémolytique répond à de nombreuses causes :

B.1.1- **Causes acquises :**

- **Incompatibilité ABO :**

L'incompatibilité fœto-maternelle érythrocytaire (IFME) ABO induit une immuno-hémolyse. Elle est la cause la plus fréquente des incompatibilités érythrocytaires fœto-maternelles, et des hyperbilirubinémies sévères et précoces du nouveau-né, à risque de complications neurologiques. Elle résulte d'un conflit immunologique entre un antigène érythrocytaire du nouveau-né hérité du père et le système immunitaire de la mère transmis par voie placentaire (allo-anticorps de type IgG anti-A et anti-B), responsables de l'hémolyse fœtale et néonatale.

En revanche, la prophylaxie des incompatibilités dans le système ABO n'est pas réalisable. Aussi, les ictères néonatals liés à ce type de conflit immunologique, généralement moins sévères, demeurent fréquents **(64, 65, 66)**.

- **Incompatibilité Rhésus :**

Elle résulte de l'alloimmunisation des globules rouges maternels contre les antigènes des globules rouges pour lesquels la mère et le fœtus sont incompatibles. La prophylaxie systématique par injection d'immunoglobulines spécifiques anti-D a permis une réduction notable de la fréquence des allo-immunisations fœtomaternelles (AFM) vis-à-vis de l'antigène Rhésus **(68, 69, 70)**.

- **Anémie hémolytique auto-immune (AHAI)** :

Elle se caractérise par une diminution de la durée de vie des hématies liée à la présence d'auto-anticorps dirigés contre un ou plusieurs antigènes de la membrane érythrocytaire entrainant leur destruction accélérée.

- **Anémie hémolytique d'origine infectieuse :**

Toute infection néonatale d'origine bactérienne comme la septicémie, virale ou parasitaire peut s'accompagner d'une hyper hémolyse à l'origine d'une hyperbilirubinémie non conjuguée.

B.1.2- Causes héréditaires :

- **Enzymopathies :**

Le déficit en G6PD ou favisme est l'une des causes les plus fréquentes de l'anémie hémolytique corpusculaire. Le diagnostic est généralement posé durant l'enfance, et pour le variant méditerranéen, l'hémolyse survient souvent après ingestion de fèves **(71, 72, 73)**.

- **Hémoglobinopathies :**

L'hémoglobine du nouveau-né étant représentée par l'HbF ; les anomalies de la chaine ß à savoir la ß thalassémie ou la drépanocytose ne s'expriment pas chez le nouveau-né. Elles se résument à la période néonatale à l'α thalassémie par défaut de synthèse des chaines α, celle-ci étant rencontrée en extrême orient, la forme la plus sévère est létale **(74, 75, 76)**.

- **Sphérocytose héréditaire :**

Appelée aussi maladie de Minkowski Chauffard, c'est la plus fréquente des anémies constitutionnelles. Elle est secondaire à une anomalie de la membrane érythrocytaire. Le diagnostic est fait au frottis sanguin qui montre des sphérocytes et sur la résistance globulaire qui est diminuée.

La sphérocytose héréditaire est souvent méconnue comme cause de l'hyperbilirubinémie néonatale. La forme néonatale sévère est rare **(77, 78)**.

B.2.- Ictères héréditaires :

Des maladies métaboliques héréditaires ou congénitales peuvent à être à l'origine d'une hyperbilirubinémie non conjuguée ou conjuguée, c'est le cas du : syndrome de Crigler-Najjar, syndrome de Gilbert, syndrome de Dubin-Johnson et de Rotor.

B.3.- Autres :

- **Résorption d'hématome :**

Les nouveau-nés ayant eu un traumatisme de l'accouchement peuvent parfois présenter une accumulation de sang ou hématome sous la peau. La résorption sanguine d'hématomes important peut provoquer un ictère. La présence d'un hématome chez le nouveau-né est significativement associée à un ictère sévère**(79)**.

- **L'ictère chez le nouveau-né de mère diabétique :**

L'hyperbilirubinémie est un paramètre classiquement étudié parmi les complications néonatales du diabète maternel. Elle n'est pas une complication grave si elle est prise en charge pour des valeurs qui ne sont pas toxiques. Le nourrisson né d'une mère diabétique ayant pu recevoir une grande quantité de sang à travers le placenta, sa décomposition serait en cause de l'hyperbilirubinémie **(80)**.

- **Ictère par atteinte hépatique à bilirubine mixte ou à prédominance conjuguée :**

L'hypothyroïdie s'accompagne fréquemment d'un ictère prolongé, probablement par insuffisance fonctionnelle de l'UGT1A1, l'ictère disparaît sous traitement hormonal. La galactosémie, une intolérance au fructose, un déficit en alpha-1 anti-trypsine, une dyslipoïdose, une intoxication et l'atrésie des voies biliaires sont des causes plus rares devant être évoquées devant un ictère chez le nouveau-né **(53)**.

5.2.- Ictères à bilirubine libre :

Ils peuvent être hémolytiques ou non hémolytiques.

5.2.1.- Ictère à bilirubine libre hémolytique :

C'est un ictère où le siège de l'anomalie est préhépatique, dans ce cas le foie est sain.Il répond à de nombreuses causes, notamment les anémies hémolytiques héréditaires et acquises. (Se référer à l'ictère néonatal)

5.2.2.- Ictère à bilirubine libre non hémolytique :

Ictères où l'affection est située au niveau hépatique **(57)**.

- **Syndrome de Crigler-Najjar :**

A. Définition :

Le syndrome de Crigler-Najjar (SCN), du nom des deux médecins qui ont décrit la maladie pour la première fois en 1952, John Crigler et Victor Najjar, est une maladie autosomique récessive héréditaire, rare, du métabolisme de la bilirubine qui affecte le foie, son incidence moyenne avoisine 1 pour 106 naissances.

Il est lié à un déficit congénital de l'activité de l'UGT1A1.Il se manifeste dès les premières heures de la vie par un ictère intense à bilirubine non conjuguée avec un risque précoce d'encéphalopathie grave. C'est l'une des principales causes d'ictère congénital non hémolytique.

En fonction de la mutation du gène, la gravité du syndrome peut varier de légère, avec une augmentation modérée des taux de bilirubine sérique, à sévère, avec des niveaux élevés, on distingue deux types **(41, 42, 43, 44, 59)** :

- **Le syndrome de Crigler-Najjar de type I :** caractérisé par une absence presque totale d'activité enzymatique UGT1A1 associée à une concentration sérique de bilirubine comprise entre 205 et 440 mg/l. Il se manifeste par un ictère sévère et une atteinte neurologique due à une encéphalopathie bilirubinique pouvant entraîner des séquelles neurologiques permanentes.
- **Le syndrome de Crigler-Najjar de type II :** connu également sous le nom du syndrome d'Arias, caractérisé par une activité enzymatique UGT1A1 inférieure à 10% de la normale mais pas complètement abolie, associée à une concentration sérique de bilirubine plus faible de 58 à 233 mg/l, des symptômes plus légers et les patients atteints survivent jusqu'à l'âge adulte sans atteinte neurologique.

B. Aspect clinique :

La distinction clinique entre le type I et type II de la maladie de Crigler-Najjar repose sur l'efficacité du traitement inducteur par le phénobarbital :

Type I : ne répond pas au traitement et les enfants doivent rester sous photothérapie 10 à 12 heures par jour jusqu'à une éventuelle transplantation hépatique.

Type II : le phénobarbital entraîne une diminution importante de l'hyperbilirubinémie, on considère que le traitement est efficace lorsque la bilirubine décroit des deux tiers au bout de 15 jours à 3 semaines de traitement. L'efficacité du traitement inducteur mettant ainsi l'enfant à l'abri des complications neurologiques.

C. Diagnostic :

Le diagnostic est évoqué lorsque l'hyperbilirubinémie non conjuguée est intense, supérieure à 40 mg/L et d'apparition précoce. Cependant, il faut d'abord éliminer les autres causes d'élévation de la bilirubine indirecte. L'hémolyse est exclue par le dosage des réticulocytes, de lactate déshydrogénase et de l'haptoglobine.

L'examen clinique, l'échographie et le bilan biologique hépatique y compris les transaminases et les enzymes de cholestase sont normaux.

Le diagnostic de certitude du syndrome de Crigler-Najjar se fait par la recherche des mutations en cause dans le gène UGT1A1, mais ce test n'est accessible qu'aux centres spécialisés. Les critères cliniques sont utilisés en pratique.

D. Prise en charge et traitement :

Le principal objectif du traitement du syndrome de Crigler-Najjar est de réduire la quantité de bilirubine non conjuguée dans le sang aussi rapidement et systématiquement que possible. Ceci est accompli de différentes manières pour le SCN de type I et de type II **(45, 49, 52, 53, 55, 81)**.

- **SCN de type I :**

Le traitement principal est la photothérapie avec du phosphate de calcium par voie orale comme complément éventuel .L'enfant est exposé à une lumière bleue pendant 12 heures par jour dans un appareil similaire à un lit de bronzage, elle est efficace car elle rompt les liaisons hydrogène internes de la bilirubine non conjuguée en la transformant en un photo-isomère hydrosoluble qui est excrété dans la bile. Le traitement définitif du syndrome de CN type I est actuellement la transplantation hépatique qui devrait être effectuée avant que des dommages neurologiques soient présents, en particulier dans les cas où un traitement de photothérapie bien fait ne peut être garanti.

- **SCN de type II :**

Le traitement au phénobarbital est le traitement de choix dans le type II. C'est un inducteur enzymatique qui augmente l'activité d'UGT1A1 favorisant la conjugaison de la bilirubine et améliore également le flux biliaire. Il est efficace pour réduire de 25% les taux de bilirubine chez ces patients. Dans certains cas, les patients atteints d'hyperbilirubinémie sévère peuvent avoir besoin d'une photothérapie ou d'exsanguino-transfusions. Cependant, souvent les patients atteints du SCN type II peuvent ne nécessiter aucun traitement, mais seulement une surveillance de routine.

- **Syndrome de Gilbert :**

Appelé également cholémie familiale, c'est une affection bénigne héréditaire du métabolisme hépatique liée à un déficit partiel et modéré de l'activité de conjugaison de la bilirubine par l'enzyme UGT1A1 qui est réduite à 30% de la normale. Le modèle d'hérédité du SG est généralement autosomique récessif, mais peut également être dominant **(83, 84)**.

5.3.- Ictères à bilirubine conjuguée :

L'hyperbilirubinémie à prédominance conjuguée s'inscrit le plus souvent dans le cadre d'une cholestase définie comme l'arrêt ou la diminution de la sécrétion biliaire par obstruction des gros canaux biliaires (cholestase extrahépatique) ou par lésions des petits canaux biliaires ou des hépatocytes (cholestase intrahépatique).

Elle peut également résulter de problèmes qui surviennent après la conjugaison de la bilirubine dans le foie. Ces causes post-hépatiques peuvent être divisées en obstruction intrinsèque ou extrinsèque du système canalaire.

Les formes rares d'hyperbilirubinémie conjuguée d'origine génétique sont principalement le syndrome de Dubin-Johnson, le syndrome de Rotor **(23, 85)**.

5.3.1.- Ictère non cholestatique :

A.- Syndrome de Dubin-Johnson (SDJ) :

A.1.- Définition :

Décrit pour la première fois en 1954 par Dubin et al., Sprinz et al. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive liée à un défaut héréditaire de la sécrétion biliaire de pigments de bilirubine dû à des mutations de la protéine MRP2 (multidrug resistance protein 2) codée par le gène ABCC2, qui est le principal transporteur de la bilirubine conjuguée au pôle canaliculaire de l'hépatocyte. Ce syndrome se caractérise par une hyperbilirubinémie chronique ou intermittente, à prédominance de bilirubine conjuguée.

Le SDJ est rare, survient également chez les hommes et les femmes. Il se manifeste généralement à l'adolescence ou au début de l'âge adulte mais il a rarement été décrit chez le nouveau-né. Il peut atteindre des sujets de toutes origines ethniques mais il est plus fréquent chez les Juifs du Moyen Orient et les japonais **(86, 87, 88, 89,90, 91)**.

A.2.- Aspect clinique :

La plupart des patients atteints de SDJ sont souvent de jeunes adultes et sont asymptomatiques. L'hyperbilirubinémie est découverte de manière fortuite lors d'un examen de routine ou d'un examen pour un autre problème sans rapport. Ils peuvent rarement présenter un léger ictère, une faiblesse et/ou des douleurs abdominales hautes. Le prurit n'est pas un symptôme du SDJ puisque les taux sériques totaux d'acides biliaires sont normaux.

Le SDJ doit être suspecté chez tout nouveau-né présentant une hyperbilirubinémie conjuguée inexpliquée, prolongée, modérée ou sévère. Il diffère du SDJ de l'adulte en ce qu'il se présente comme suit : une cholestase et une hépatomégalie sévères expliquées par une physiologie biliaire immature combinée au défaut de MRP2. Au fur et à mesure de la maturation du foie, les nourrissons deviennent asymptomatiques jusqu'à un âge avancé où ils peuvent présenter une hyperbilirubinémie intermittente.

Parmi les facteurs déclenchant du SDJ : la grossesse, la consommation d'alcool, les pilules contraceptives, les infections **(23, 90, 92)**.

B.- Syndrome de Rotor :

B.1.- Définition :

Décrit pour la première fois en 1948 par Rotor et al. C'est une maladie autosomique récessive bénigne et rare, caractérisée par une hyperbilirubinémie chronique à prédominance conjuguée, dû à un défaut d'absorption et de stockage hépatocellulaire de la bilirubine conjuguée.

Il est causé par des mutations génétiques homozygotes à la fois des gènes SLCO1B1 et SLCO1B3 sur le chromosome 2 entraînant une déficience fonctionnelle complète des deux transporteurs respectivement OATP1B1 et OATP1B3 qui sont responsables du transport de la bilirubine à travers la membrane sinusoïdale des hépatocytes perturbant ainsi la recapture hépatique des conjugués de bilirubine, par conséquent il y aura une accumulation de bilirubine conjuguée dans le sang.

Il n'y a pas de prédisposition au sexe observée avec le syndrome de Rotor (SR). Bien que la maladie se présente souvent à l'adolescence ou au début de l'âge adulte, il a été signalé qu'elle se présentait peu de temps après la naissance ou pendant l'enfance **(23, 44, 93)**.

B.2.- Aspect clinique :

Généralement, les patients sont asymptomatiques. Le principal symptôme est l'ictère récidivant, léger à modéré, sans prurit. Des crises douloureuses abdominales et une fébricule sont possibles, mais rares.

5.3.2.- Ictère cholestatique :

Ce syndrome est dû à une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire suite à un obstacle à l'écoulement normal de la bile responsable d'un défaut de transport des acides biliaires du foie vers l'intestin et d'une augmentation de leurs concentrations dans le sang et les tissus engendrant une hyperbilirubinémie à fraction conjuguée.

La cholestase peut être due :

Soit à une anomalie primitive du transport canaliculaire des acides biliaires, cette situation se rencontre notamment lorsque l'ictère est dû à une insuffisance hépatique.

Soit à une obstruction des gros canaux biliaires dans le cas de cholestase extrahépatique , ou par obstruction des petits canaux biliaires interlobulaires ou des hépatocytes dans le cas de cholestase intrahépatique **(94)**.

A.- Aspect clinique et biologique :

Les signes cliniques de la cholestase sont dominés par un ictère associé à des urines foncées, des selles décolorées et un prurit. En cas d'ictère intense, la peau peut avoir des reflets verdâtres. Elle est marquée par l'élévation de la bilirubine conjuguée, de la phosphatase alcaline sérique principalement (PAL), une augmentation de la gammaglutamyl-transpeptidase (GGT) à des taux supérieurs à deux fois la normale, une augmentation du cholestérol sérique et de la concentration des sels biliaires **(95)**.

B.- Etiologies :

Tableau I : Les principales causes de cholestase **(96, 97, 98, 99)**

Cholestase intrahépatique		Cholestase extrahépatique	
Fréquente	**Rares**	**Fréquente**	**Rare**
○ Hépatite virale ○ Hépatite alcoolique ○ origine médicamenteuse	○ Cirrhose biliaire primitive ○ Hépatite chronique Métastase	○ Lithiase biliaire ○ Cancer du pancréas ○ Pancréatite	○ Sténose biliaire ○ Cholangite ○ Pancréatite chronique

6.- Complications des hyperbilirubinémies :

A partir d'un certain taux de bilirubine sanguine libre (180 à 200 mg/l ou 340 µmol/l) non hydrosoluble chez le nourrisson, elle peut s'accumuler dans certaines régions du cerveau : c'est le kernictérus. Etant donné que la molécule de bilirubine indirecte non liée est de faible poids moléculaire, elle passe de ce fait aisément la barrière hémato-encéphalique, contrairement au complexe albumine-bilirubine qui ne franchit pas cette barrière, ce qui protège le cerveau.

Cette accumulation de bilirubine indirecte dans le sang est observée lorsqu'une molécule a une affinité plus grande pour l'albumine que la bilirubine, on dit qu'elle la déplace, ou lorsque la capacité de liaison de l'albumine pour la bilirubine est saturée comme dans le cas d'une hyperbilirubinémie.

La toxicité de la bilirubine non conjuguée pour le cerveau se traduit par l'encéphalopathie bilirubinique « ictère nucléaire ».

Le danger et la symptomatologie témoignent de la fixation de la bilirubine dans des zones cérébrales d'affinité spécifique : les noyaux sous-thalamiques, les noyaux gris centraux, les globus pallidus, certains neurones de la région hippocampique et des cellules cérébelleuses de Purkinj.

La neurotoxicité de la bilirubine chez le nouveau-né n'est pas due à une activité de la molécule qui serait différente de chez l'adulte, mais au manque de protection du nourrisson. La barrière hémato-encéphalique n'a pas encore fini de se développer, ce qui permet à la bilirubine de diffuser librement à travers les capillaires sanguins du cerveau.

Les observations cliniques montrent que l'encéphalopathie de la bilirubine se rencontre souvent chez des nouveau-nés présentant non seulement une hyperbilirubinémie mais aussi une anomalie du transport de l'oxygène, par exemple une anémie. La bilirubine et l'hypoxie étant délétères pour le système nerveux central **(57, 100)**.

6.1.- Encéphalopathie Hyperbilirubinémique Aigue (EHA) :

À la phase aiguë de la neurotoxicité de la bilirubine, s'associent des signes peu spécifiques de trois ordres : conscience et éveil, tonus musculaire et cris et pleurs. Ils peuvent être classés en fonction de la gravité de l'atteinte. Ces signes définissent l'EHA et possèdent une valeur pronostique péjorative **(50)**.

6.2.- Encéphalopathie chronique et ictère nucléaire :

C'est la forme de neurotoxicité la plus sévère, elle est caractérisée par un dysfonctionnement neurologique permanent ou un ictère nucléaire. Il désigne des lésions cérébrales irréversibles causées par une accumulation de bilirubine dans le cerveau. Le risque d'ictère nucléaire est plus élevé chez les nouveau-nés prématurés, gravement malades ou qui reçoivent certains médicaments.

À côté du tableau classique d'ictère nucléaire, des atteintes plus frustres sont décrites sous le nom de BIND (Bilirubin-Induced Neurological Dysfonction). Il s'agit d'une association variable d'une atteinte extrapyramidale, d'un déficit auditif par atteinte de l'intégration du signal auditif au niveau des noyaux cérébraux (neuropathie auditive), d'une paralysie oculo-motrice (verticalité du regard), qui vont perturber les apprentissages et le développement. D'autres anomalies comme une coloration de l'émail participent au diagnostic **(50, 101, 102, 103)**.

Le diagnostic d'ictère nucléaire se fait sur l'association d'antécédents cliniques évocateurs avec des perturbations des potentiels évoqués auditifs, et des hyper signaux des noyaux gris centraux à l'IRM en T1 et T2 pouvant parfois être absents. Malgré les progrès réalisés dans le dépistage et la thérapeutique, le diagnostic d'ictère nucléaire garde une incidence de 0,4 à 2,7 cas pour 100 000 naissances vivantes en Europe et aux États-Unis **(104, 105)**.

C'est dire tout l'intérêt de la surveillance des nouveau-nés ictériques, surveillance cliniquement difficile lorsqu'il existe par exemple une pigmentation raciale de la peau. Au moindre doute, un contrôle sanguin de bilirubine doit être demandé au laboratoire, car il n'y a pas de parallélisme absolu entre l'intensité de la jaunisse et le taux sanguin.

Cependant, il peut presque toujours être évité grâce à un diagnostic précoce et à un traitement adéquat de l'hyperbilirubinémie.

II.- SYNDROME DE GILBERT :

1.- Rappel historique :

En 1901, le gastro entérologue français **Augustin Nicolas Gilbert** et le pédiatre Pierre **Lereboullet** ont décrit une anomalie caractérisée par une légère hyperbilirubinémie non hémolytique non conjuguée sous le nom de cholémie simple familiale. En 1903, avec **Maurice Herscher**, il étudie les pigments biliaires contenus dans le sérum de patients atteints de jaunisse. Il établit que ces pigments proviennent de la dégradation de l'hémoglobine **(109)**.

Ce n'est qu'en 1920 que **Jens Einar Meulengracht** a décrit les principales caractéristiques du syndrome de Gilbert. Plus tard en1939 il a réinventé le syndrome sous l'appellation : Icterus intermittent juvenilis. Depuis lors, plusieurs auteurs ont décrit des entités cliniques similaires à celles rapportée par Gilbert, sans les relier au syndrome original **(108)**.

Tecon, en 1938 a souligné l'importance de différencier l'ictère hémolytique congénital et l'hyperbilirubinémie non hémolytique constitutionnelle **(106)**.

En 1941, **Dameshek** et **Singer** ont déclaré que les cas de Gilbert de cholémie familiale simple étaient, selon toute probabilité, des exemples de jaunisse hémolytique légère. **Hult** considérait les cas de Gilbert comme identiques à ceux décrits plus tard comme une hyperbilirubinémie physiologique par van den Bergh " dysfonctionnement hépatique constitutionnel " par Rozendaal, Comfort et Snell. Aux Pays-Bas, la maladie a de nouveau été décrite par HouPst (1944) sous le nom d'ictère acholurique familial non hémolytique **(107)**.

Arias a décrit un trouble dans lequel huit patients atteints d'une jaunisse chronique non hémolytique présentaient une déficience en glucuronyl transférase **(125)**.

Sleisenger et ses collaborateurs ont décrit une parenté irlandaise dans laquelle une jaunisse à vie se produisait sur quatre générations selon un schéma de transmission dominant de mâle à mâle. L'activité de la glucuronyltransférase hépatique était faible chez les individus atteints **(126)**.



Fig. 4 : Augustin Gilbert **(110)**.

2.- Définition et généralités :

Le syndrome de Gilbert aussi connu sous les noms de : **cholémie familiale**, **hyperbilirubinémie familiale bénigne non conjuguée**, **ictère familial non hémolytique non obstructif**, **dysfonctionnement hépatique constitutionnel** est une affection bénigne héréditaire du métabolisme hépatique. Son mode de transmission est généralement autosomique récessif mais peut également être dominant. Son incidence est estimée à 5-10 % de la population caucasienne **(109,111,112,113)**.

Ce syndrome est dû à un déficit partiel et modéré de l'activité de conjugaison de la bilirubine par l'enzyme uridine diphosphate glucuronosyl (glucuronyl) transférase 1 A1 ou UGT1A1 qui est réduite à 30% de la normale. Par conséquent, son déficit entraîne une augmentation modérée de la bilirubine sérique totale pour des taux inférieurs à 50mg/L avec une nette prédominance de la fraction non conjuguée, en l'absence de maladie hépatocellulaire ou d'hémolyse **(110,114)** .

Les patients atteints du syndrome de Gilbert présentent une variante génétique dans la région promotrice du gène UGT1A1 qui code pour l'UDP-GT (Uridine diphosphate-glucuronyl transférase), cette variante réside dans l'ajout de répétitions supplémentaires de thymine-adénine (TA) dans la région de la boîte TATA du promoteur du gène UGT1A1au lieu des 6 paires normales**.**

La présence de sept répétitions au lieu de six répétitions a été associée à une réduction de l'efficacité de la transcription du gène UGT1A1 et donc la capacité du foie à conjuguer la bilirubine est réduite de 70%, l'augmentation consécutive des concentrations sériques de bilirubine non conjuguée peut entraîner des épisodes intermittents d'ictère léger, non prurigineux qui sont précipités par le jeûne, l'infection et le surmenage **(110,115,116,117)**.

Au-delà du facteur génétique, aucun autre facteur de risque de la maladie de Gilbert n'est à ce jour connu.

Sur le plan clinique, l'apparition de l'ictère chez les patients atteints de la maladie de Gilbert varie d'une personne à une autre. Elle n'est pas responsable à elle seule d'un ictère, mais joue un rôle de cofacteur en favorisant sa persistance et son intensité **(118)**.

Le syndrome de Gilbert est présent à la naissance mais peut rester non diagnostiqué jusqu'à la deuxième décennie de la vie. Les formes à révélation néonatale sont très rares, sauf si associée avec une sténose hypertrophique du pylore. Par conséquent, le polymorphisme associé au syndrome de Gilbert seul ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'hyperbilirubinémie néonatale sévère chez les nouveau-nés sans signes d'hémolyse **(119, 120, 121)**.

Dans sa présentation typique, l'hyperbilirubinémie se manifeste par ictère intermittent léger à l'adolescence généralement diagnostiqué après la puberté. Les hommes sont plus fréquemment touchés que les femmes.

Il est à noter qu'une découverte fortuite des patients atteints du SG est possible lors d'analyses sanguines de routine lorsqu'une une bilirubine sérique élevée est détectée, en particulier à jeun.

Chaque individu peut être exposé au risque de développer la maladie de Gilbert. La transmission étant génétique, la présence de la pathologie dans la famille entraîne un risque accru de la développer également **(115, 122, 123, 124)**.

3.- Diagnostic :

En raison du caractère bénin de la maladie de Gilbert, celle-ci n'est pas systématiquement recherchée. Dans la majorité des cas, le diagnostic de SG est posé de manière fortuite, à l'occasion d'un examen systématique ou d'analyses sanguines de routine.

3.1.- Manifestations cliniques :

La présentation clinique est peu spécifique, en général, une jaunisse légère et asymptomatique est observée pour la première fois à l'adolescence. En effet, sa tendance à être asymptomatique fait que cette maladie peut rester non diagnostiquée pendant de nombreuses années.

Dans sa présentation typique, l'hyperbilirubinémie se manifeste par un subictère fluctuant, visible essentiellement au niveau des conjonctives, le seul symptôme cliniquement reconnu, qui peut être déclenché par certains facteurs **(122, 127, 128, 129, 130)**.

Par ailleurs, de manière peu fréquente, le patient affecté par la maladie de Gilbert peut avoir lors d'une poussée d'autres symptômes tels que **(132, 133)**.

- ✓ Une fatigue plus ou moins intense ;
- ✓ Des douleurs abdominales légères ;
- ✓ Un état de déshydratation ;
- ✓ Un manque de sommeil ;
- ✓ Des céphalées ;
- ✓ Une anorexie ;
- ✓ Des nausées ;
- ✓ Des flatulences ;
- ✓ Une constipation ;
- ✓ Des éructations ;
- ✓ Des vomissements ;
- ✓ Une dépression ;
- ✓ Des difficultés de concentration ;
- ✓ Le syndrome du côlon irritable.

- **Facteurs favorisants :**

Ces symptômes ne sont pas dus à l'élévation de la concentration de la bilirubine dans le sang, ils sont en général secondaires au facteur déclenchant qui a provoqué un léger accroissement du taux de bilirubine et accentuer les symptômes tel que :

- ✓ Un stress ;
- ✓ Un jeûne prolongé ;
- ✓ Une intervention chirurgicale ;
- ✓ La consommation d'alcool ;
- ✓ Le manque de sommeil ;
- ✓ Le surmenage ;
- ✓ Les états infectieux : hépatite virale, grippe, infections respiratoires virales ;
- ✓ La déshydratation ;
- ✓ Les excès alimentaires ;
- ✓ La consommation des excitants : café, thé ;
- ✓ Une alimentation trop épicée ;
- ✓ Une alimentation trop grasse ;
- ✓ Un état de fatigue importante ou un exercice physique intense ;
- ✓ Certains médicaments inhibant l'UDP-glycuronosyltransférase :
  Les glucocorticoïdes, les stéroïdes anabolisants, les salicylates de sodium, l'atazanavir et l'indinavir (deux molécules utilisées dans le traitement du SIDA) et le gemfibrozil (un hypocholestérolémiant).

Lorsque ces facteurs déclenchant sont connus, ils doivent être évités dans la mesure du possible afin de réduire le risque lié à une augmentation du taux de bilirubine dans le sang et à l'apparition des épisodes de jaunisse.

3.2.- Manifestations biologiques :

Le principal critère de diagnostic du SG est l'augmentation du taux de bilirubine sérique non conjuguée, parfois détectée accidentellement dans les tests de laboratoire de routine. Normalement, la bilirubine totale est <17µmol/l (10 mg/l) et la jaunisse devient cliniquement apparente à des niveaux >40µmol/l (23mg/l). La mesure des taux sériques de bilirubine totale avec fractionnement : La BIL directe et la BIL indirecte, est suivie des taux sériques d'aspartate transaminase (ASAT), d'alanine transaminase (ALAT), d'alcaline phosphatase et de γ-glutamyl transférase (GGT) sériques, permettant de différencier ce syndrome d'un dysfonctionnement ou de lésions hépatiques.

Chez les personnes affectées par le SG, la fonction hépatique est habituellement normale. La présence d'une hémolyse est exclue par un hémogramme complet avec examen du frottis, une numération des réticulocytes normale et un test de Coombs direct, les taux de lactate déshydrogénase (LDH) et d'haptoglobine normaux. Cependant, étant donné que l'hyperbilirubinémie non conjuguée isolée a été décrite dans un large éventail de maladies courantes, par exemple les maladies cardiaques avec ou sans décompensation, les maladies biliaires, la pancréatite, l'alcoolisme, la cirrhose, les tumeurs malignes et après une hépatite, il peut parfois être nécessaire de recourir à des procédures diagnostiques de confirmation **(112, 127, 132, 134, 138)**.

3.3.- Autres examens :

Des examens complémentaires sont rarement nécessaires pour établir un diagnostic, car celui-ci est simple. Cependant, les examens suivants sont parfois réalisés pour confirmer le diagnostic du syndrome de Gilbert.

- **Le jeûne :**

Il entraîne généralement une augmentation de 2 à 3 fois de la bilirubine non conjuguée dans le plasma après une réduction de l'apport calorique de 400 kcal/jour pendant 24±48 heures, qui revient à des niveaux normaux dans les 24 heures suivant la reprise d'une alimentation normale.

Cette augmentation était significativement plus élevée chez les patients atteints du syndrome de Gilbert que chez les sujets normaux, mais pas par rapport à l'augmentation observée chez les patients atteints d'hépatite aiguë, qui est le diagnostic différentiel le plus pertinent sur le plan clinique.

Chez les patients souffrant d'hémolyse ou de maladie hépatique les taux de bilirubine non conjuguée augmentent également avec le jeûne mais l'ampleur de l'augmentation est inférieure à celle observée dans le syndrome de Gilbert.

La réduction de l'apport calorique ne peut être utilisée pour diagnostiquer le syndrome de Gilbert à un moment où la bilirubine plasmatique est normale.

Une augmentation similaire de la bilirubine plasmatique est également observée avec les régimes normocaloriques déficients en lipides.

Chez les rats Gunn, il a été démontré que l'administration d'un régime synthétique sans lipides qui fournit un apport protéique et calorique normal, entraîne une augmentation de deux à trois fois de la concentration de bilirubine dans le plasma.

Des résultats similaires ont été rapportés avec la perfusion intraveineuse de glucose ou l'administration d'un régime sans lipides chez des patients atteints du syndrome de Crigler-Najjar de type 2 et de syndrome de Gilbert.

Étant donné que l'ajout de petites quantités de lipides annule presque complètement les effets du jeûne ou d'un apport élevé en glucides, il a été postulé que l'hyperbilirubinémie accrue dans les deux situations est attribuable, au moins en partie, au retrait des lipides.

Les mécanismes qui sous-tendent l'influence de ces différents régimes alimentaires sur l'hyperbilirubinémie non conjuguée n'ont cependant pas été élucidés **(139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146)**.

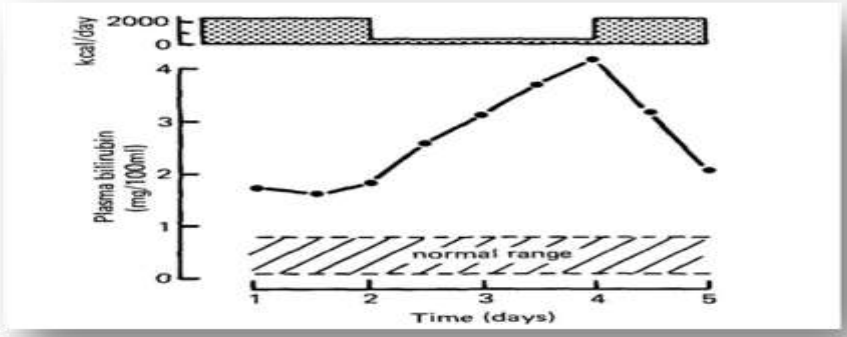


Fig. 5 : Effets d'un régime quotidien de 400 kcal sur la concentration plasmatique de bilirubine chez un individu atteint de syndrome de Gilbert **(147)**.

- **Test à la rifampicine :**

Il est aussi fiable que le test à jeun. L'administration par voie orale de 600 à 900 mg de rifampicine à des adultes à jeun ou non, augmente les taux de bilirubine sérique totale dans les 2 à 4 heures chez les témoins normaux et les personnes atteintes du SG, bien que l'augmentation soit exagérée dans le cas du SG **(148)**.

- **Test au phénobarbital :**

Une diminution de la bilirubine indirecte après administration du phénobarbital évoque un déficit partiel de la conjugaison de la bilirubine **(149, 150)**.

- **Test de provocation à l'acide nicotinique :**

Une augmentation significative de 2 à 3 fois de la bilirubine non conjuguée chez les patients atteints de la maladie de Gilbert est constatée après administration intraveineuse de 50 mg d'acide nicotinique après une nuit de jeûne.

Cependant, ce test n'est pas spécifique et peut être positif dans le cas d'une hyperbilirubinémie non conjuguée quelle qu'en soit la cause, et n'est donc probablement d'aucune utilité pour différencier le SG d'autres entités, notamment les maladies hépatiques chroniques **(151, 152, 153, 154, 155, 156, 157)**.

- **Chromatographie sur couche mince :**

Ce test permet de diagnostiquer le syndrome de Gilbert lorsqu'il montre une proportion significativement plus élevée de bilirubine non conjuguée par rapport aux personnes suivantes ; des personnes souffrant d'hémolyse chronique, de maladie du foie ou des personnes en bonne santé **(112, 158, 159).**

Chez les patients atteints du SG, le fractionnement de la bilirubine sérique totale par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a montré une diminution significative des monoglucuronides de bilirubine (1,1 % contre 6,2 % chez les patients sains) et une augmentation de la bilirubine non conjuguée (98,8 % contre 92,6 % chez les patients sains), reflétant une activité réduite de la bilirubine-UDPGT **(160)**.

Par ailleurs, environ un tiers des personnes atteintes du SG présentent des anomalies mineures de la clairance plasmatique de la bromosulfophtaléine et du vert d'indocyanine. Ces deux colorants étaient autrefois utilisés comme indicateurs de la clairance hépatique

Aucun des deux composés n'est conjugué dans le foie par l'UDPGT, ce qui implique qu'un défaut indéfini dans l'absorption hépatique, le transport intracellulaire ou l'excrétion de la bilirubine peut également exister, au moins dans certains cas **(161,162)**.

Il a également été noté que, bien que l'hémolyse ne soit pas une caractéristique typique du SG, la durée de vie des érythrocytes est plus courte que la normale chez environ 50 % des personnes atteintes. Cela peut suggérer qu'un certain degré d'état hémolytique léger et compensé peut être présent et peut encore augmenter la charge de bilirubine avec laquelle l'UDPGT doit faire face **(163)**.

Ces tests ne sont pas nécessaires au diagnostic. En cas de doute, les tests génétiques peuvent confirmer le diagnostic et déterminent le caractère homozygote ou hétérozygote du génotype, bien qu'ils soient rarement, voire jamais, nécessaire dans la pratique courante des adultes **(164, 165, 166)**.

3.4.- Diagnostic positif :

Le diagnostic du SG est posé à la suite des étapes suivantes **(132)** :

1. Anamnèse : Le médecin interroge le patient sur son mode de vie, ses antécédents familiaux, symptômes et facteurs déclenchant.
2. Examen physique : Le médecin examine la peau, les muqueuses et l'œil du patient afin de déterminer s'il a une jaunisse.
3. Bilan biologique.

Le diagnostic du SG est donc généralement un diagnostic d'exclusion lorsqu'il y a preuve de :

1. Hyperbilirubinémie non conjuguée, souvent notée à plusieurs occasions.
2. Aucun signe d'hémolyse (numération globulaire, numération réticulocytaire, hémogramme, test de Coombs, taux d'haptoglobine et de lactate déshydrogénase normaux).
3. Résultats normaux des tests d'enzymes hépatiques.
4. Une absence d'autres processus pathologiques associés avec une hyperbilirubinémie non conjuguée.

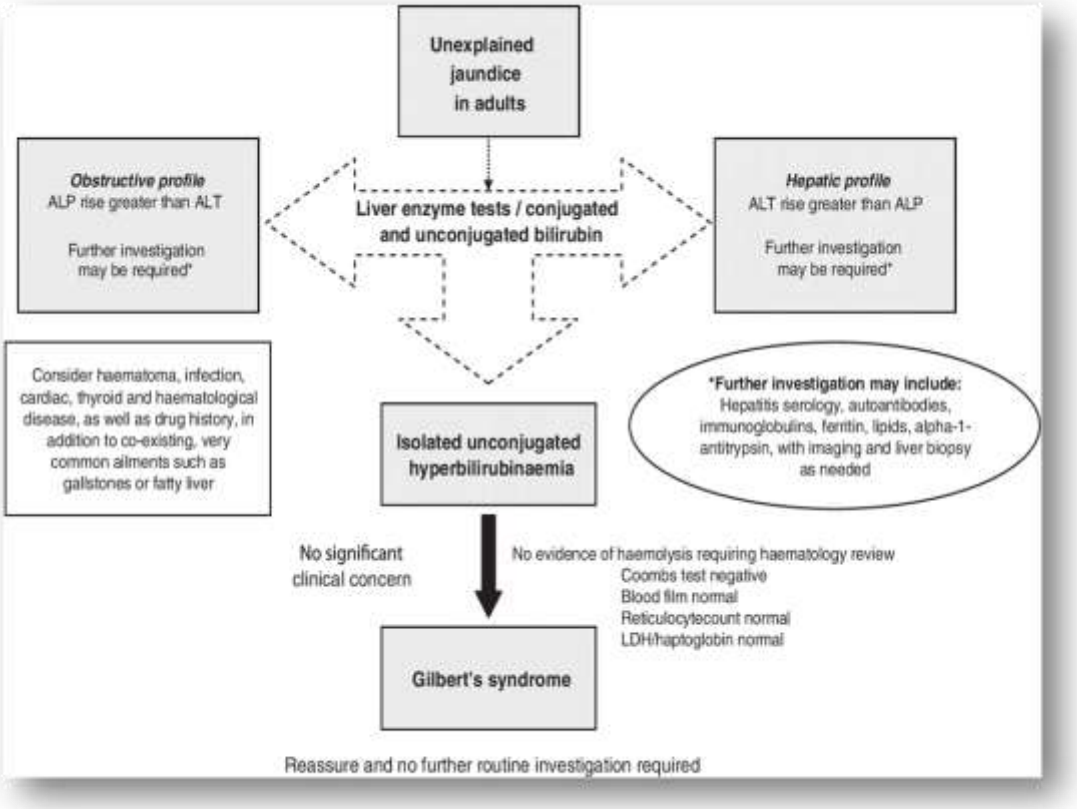


Fig. 6 : Algorithme d'investigation de l'ictère inexpliqué chez l'adulte **(132)**.

3.5.- Diagnostic de certitude :

Les mutations les plus courantes dans le syndrome de Gilbert sont associées à la région promotrice du gène rs8175347 (UGT1A1*28) et à la région codante de l'exon1 rs4148323 (UGT1A1*6).

Le premier est un polymorphisme de séquence A(TA) nTAA situé dans la «TATA Box» du promoteur ; le deuxième est un polymorphisme de restriction G211A au niveau de l'exon 1.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour rechercher les polymorphismes génétiques du gène UGT1A1 celles-ci ont inclus :

- Les techniques basées sur l'électrophorèse sur gel telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) couplée à l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP) et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) ;
- Le séquençage direct ;
- Le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) ;
- Le pyroséquençage ;
- La chromatographie liquide à haute pression en condition dénaturante (dHPLC) **(164, 165).**

3.5.1.- Analyse génotypique du polymorphisme UGT1A1*6 (rs4148323) par PCR-RFLP :

Le fragment d'une longueur de146 pb (paire de bases) de l'exon1 du gène UGT1A1 est amplifié par PCR en utilisant en utilisant une amorce sens (5́AGATACTGTTGATCCCAGTG-3́) et une amorce antisens (5́-CTTCAAGGTGTAAAATGGTC-3́).

Les produits de PCR sont ensuite digérés par l'endonucléase de restriction Ava II. Les produits de digestion sont ensuite visualisés par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide à 8% ou à 12%. Le polymorphisme G211A abolit le site de restriction Ava II, ainsi on obtient une bande de 146pb chez les allèles homozygotes.

En revanche, les allèles de type sauvage sont digérés en deux bandes (128 pb et 18 pb) et les allèles hétérozygotes sont digérés en trois bandes (146 pb, 128 pb et 18 pb) **(437)**.

3.5.2.- Analyse génotypique du polymorphisme UGT1A1*28 (rs8175347) par SSCP et séquençage :

La recherche d'un polymorphisme donné par PCR-SSCP (Polymorphisme de conformation simple brin) fait tout d'abord appel à une PCR pour amplifier la région d'intérêt.

Le produit de PCR est ensuite dénaturé et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant.

Un changement ponctuel de séquence peut entraîner un changement de la structure tertiaire de l'ADN ; il en résulte alors une mobilité différente pour les fragments portant les différents allèles **(438)**.

Aliarab A, et al. ont exploré le polymorphisme rs8175347 par PCR suivie d'une analyse par SSCP réalisée selon la méthode décrite par Hongyo et al. (1993). Pour la PCR, un fragment d'une longueur de 98 pb de la région TATA-box du gène UGT1A1 a été amplifié à l'aide d'une amorce sens (5́-GTCACGTGACACAGTCAAA-3́) et d'une amorce antisens (5́-TTTGCTCCTGCCAGAGGTT-3́). Les produits PCR ont été mélangés avec le formamide et le tampon de charge (Loading dye). Le mélange a été maintenu à 95 °C pendant 5 minutes, puis immédiatement placé dans la glace. Ensuite, les échantillons ont été chargés dans un gel de polyacrylamide à 12 % et séparés par électrophorèse pendant 18 h à 100 V et 15 °C. Les résultats de l'électrophorèse ont été visualisés par coloration au nitrate d'argent. Les nombres de répétitions (TA) dans le promoteur du gène ont été déterminés en mesurant les segments. Les génotypes sont les suivants : (TA) 6/6 (homozygote avec deux allèles à 6 répétitions TA), (TA) 6/7 (hétérozygote avec un allèle à 6 répétitions TA et un allèle à 7 répétitions TA), (TA) 7/ 7 (homozygote avec deux allèles à 7 répétitions TA) **(Fig.7)**. Après analyse de la mutation rs8175347 (UGT1A1*28) par SSCP-PAGE et pour tester l'exactitude de l'expérience, les échantillons ont été séquencés pour déterminer le nombre de répétitions TA **(437)**.

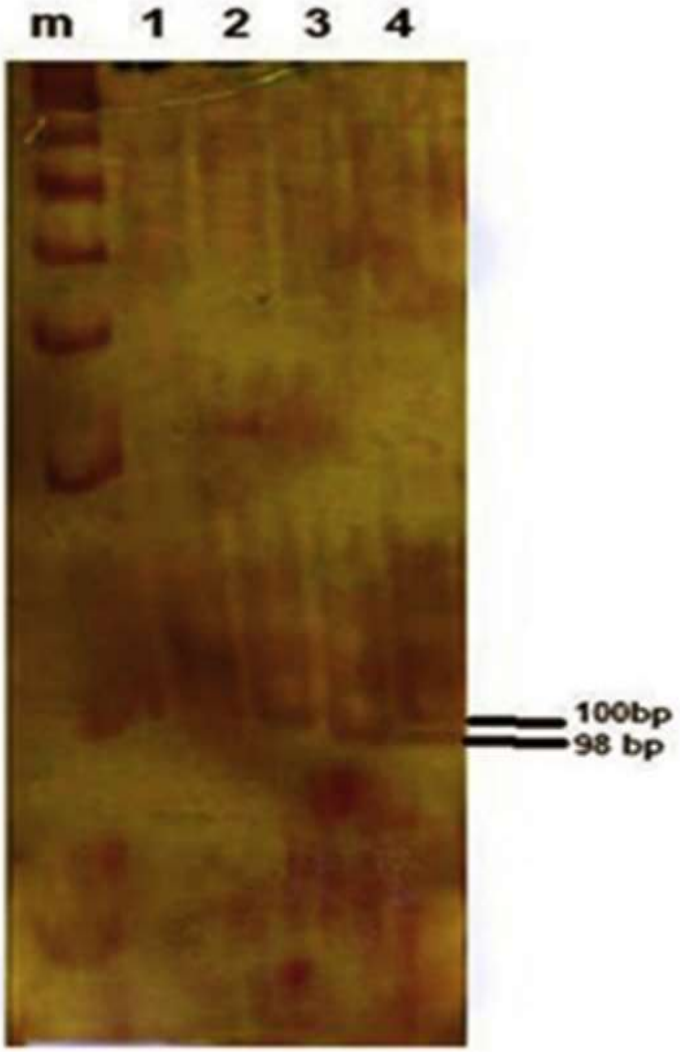


Fig. 7 : Analyse conformationnelle du polymorphisme rs8175347 sur gel de polyacrylamide **(437)** :
m: marqueur de taille100 pb, 1 et 2: mutations homozygotes (TA) 7 / (TA) 7, 3: mutations homozygotes (TA) 6 / (TA) 6, 4: hétérozygote (TA)6/(TA) 7.

3.5.3.- Analyse génotypique des polymorphismes UGT1A1*28 et UGT1A1*6 par pyroséquençage :

Le pyroséquençage est une technique qui a été développée pour détecter les polymorphismes dans le gène UGT1A1 et sa région promotrice.

Cette technique innovante repose sur le séquençage par synthèse, elle est basée sur la libération naturelle de pyrophosphate chaque fois qu'un nucléotide est incorporé sur un brin d'ADN 3' ouvert.

Le pyrophosphate libéré est utilisé dans une réaction de sulfurylase libérant de l'ATP.

L'ATP libéré peut être utilisé par la luciférase dans la conversion de la luciférine en oxyluciférine. La réaction se traduit par l'émission de lumière, qui est collectée par une caméra et enregistrée sous forme de pics appelés pyrogramme.

Le pyroséquençage est une technique à haut débit avec une grande précision. Sukasem et al. ont développé et évalué cette méthode pour détecter les polymorphismes UGT1A1*28 et UGT1A1*6 chez des patients thaïlandais atteints d'un cancer colorectal.

Les résultats des pyrogrammes représentatifs pour chaque génotype sont indiqués sur la **figure 8**.

Les données de séquence identifiées par pyroséquençage ont été validées par séquençage par électrophorèse capillaire. Les résultats ont montré que les génotypes étaient concordants à 100 % entre pyroséquençage et la méthode de séquençage par électrophorèse capillaire. **(439,440)**

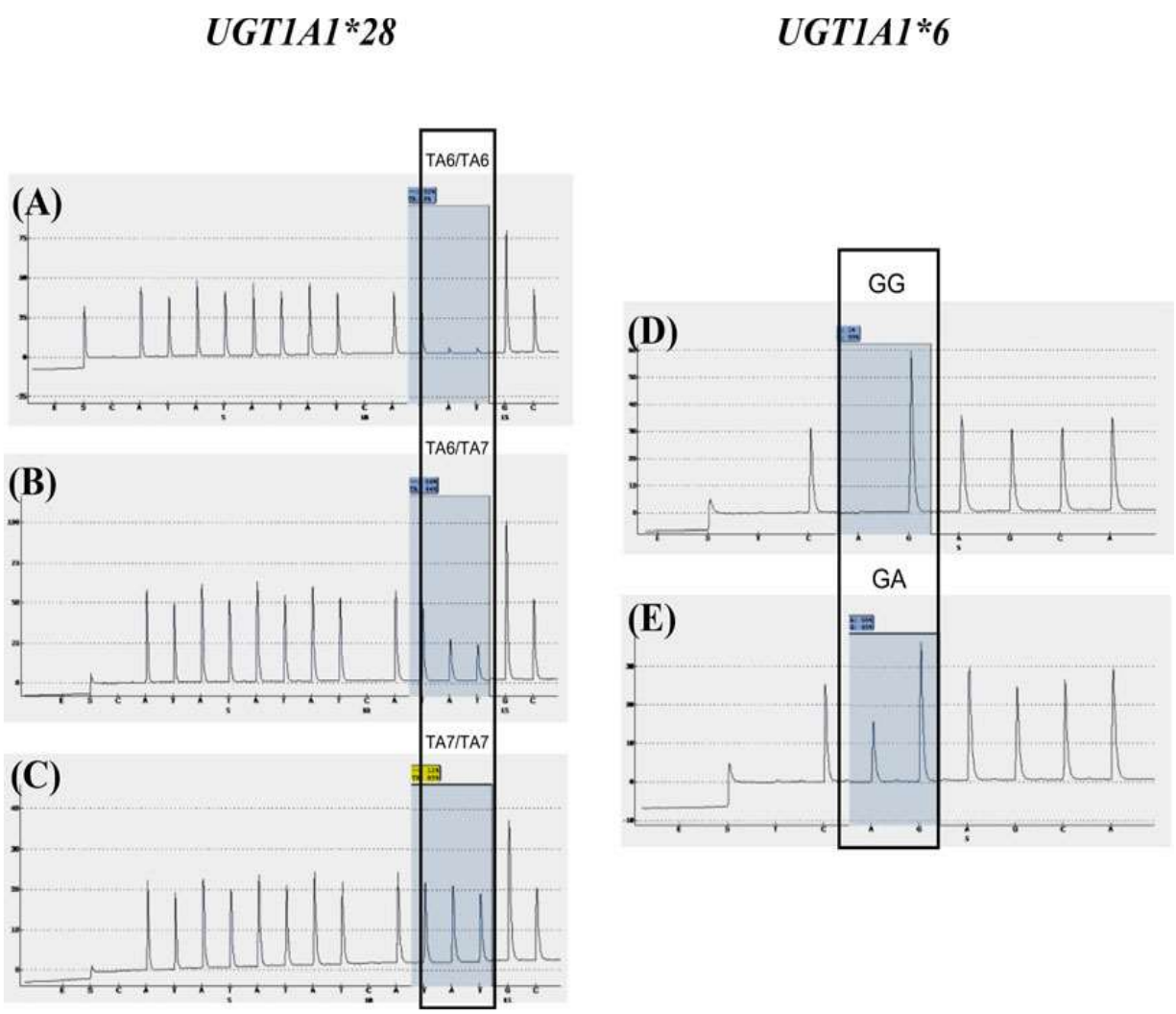


Fig. 8 : Histogramme de pyroséquençage dans le gène UGT1A1 par logiciel de pyroséquençage. (A) Type sauvage TA6/TA6, (B) hétérozygoteTA6/TA7, (C) homozygote TA7/TA7, (D) type sauvage G/G, (E) hétérozygote G/A **(439)**.

3.5.4.- Analyse par dHPLC (chromatographie liquide à haute performance en conditions dénaturantes) :

La dHPLC permet de détecter, dans un fragment obtenu par PCR, l'existence d'une variation allélique. Les seuls fragments manifestant l'existence d'un polymorphisme seront alors séquencés afin de localiser ce polymorphisme **(438)**.

Pirulli D et al. ont évalué l'application de cette technique pour la détection des variants dans la région promotrice du gène UGT1A1 chez les sujets atteints du SG.

Le promoteur UGT1A1 a été analysé par dHPLC et séquençage direct chez 20 patients diagnostiqués SG sur la base des critères standards (hyperbilirubinémie non conjuguée légère chronique, une fonction hépatique normale et l'absence de signes d'hémolyse) et chez 20 contrôles sains avec des concentrations de bilirubine dans les intervalles de référence.

Les molécules hétéroduplexes apparaissent lorsqu'une variation de l'état hétérozygote est présente dans un fragment d'ADN après dénaturation et réhybridation du produit PCR. La dHPLC est basée sur la rétention différentielle des molécules homoduplexes et hétéroduplexes dans des conditions de dénaturation thermique partielle.

Les résultats de l'analyse par dHPLC ont montré la présence de deux pics bien résolus (Fig. 9A) pour le caractère hétérozygote (TA)6/(TA)7, confirmée par séquence directe. La présence d'un pic est caractéristique des homozygotes (TA)6/(TA)6 ou (TA)7/(TA)7 (Fig. 9, B et C). Pour différencier les deux génotypes homozygotes, une deuxième analyse doit être effectuée avec le produit PCR mélangé à un contrôle homozygote (TA)6/(TA)6. Le caractère homozygote pour (TA)7 a été révélée par un double pic (Fig. 9D), alors qu'aucun changement dans le chromatogramme montrant un seul pic n'a été détecté pour les homozygotes (TA) 6.

Les résultats dHPLC ont montré une correspondance à 100 % avec ceux obtenus par séquençage direct **(165, 441)**.

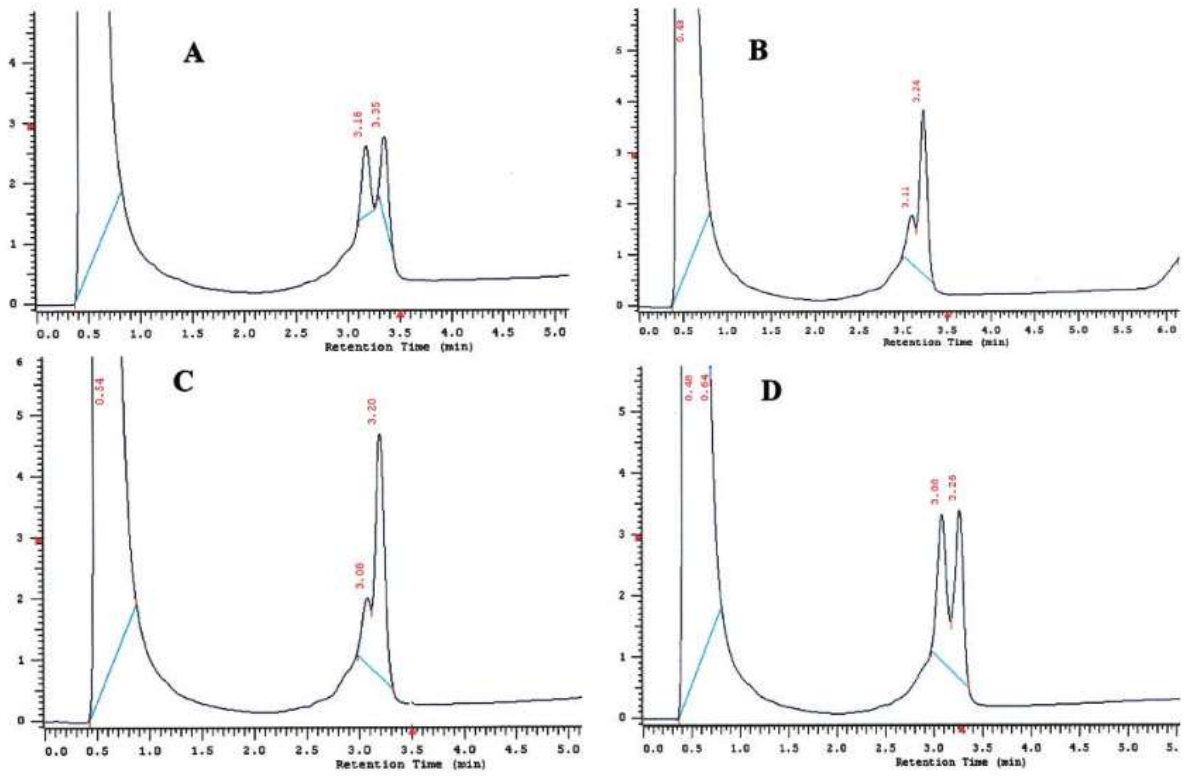


Fig. 9 : Chromatogrammes obtenus après amplification de la région promotrice du gène UGT1A1 chez des sujets présentant des génotypes différents en fonction du nombre de répétitions (TA) **(441)**.

3.5.5.- Analyse par PCR en temps réel :

La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (ex.Taqman assay) **(167)**.

A.- Analyse par transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) :

JURGEN BORLAK et al. ont développé un test de génotypage par PCR en temps réel pour le diagnostic moléculaire du syndrome de Gilbert chez des sujets sains. Le test est basé sur le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Ainsi, le test PCR contrôle la quantification de la fluorescence des colorants de liaison à l'ADN qui s'hybrident aux séquences cibles. Cette approche permet d'analyser spécifiquement tous les principaux polymorphismes d'insertion de TA dans la région promotrice «TATA Box » du gène UGT1A1.

Ce test a ensuite été utilisé pour génotyper une cohorte de 266 personnes non apparentées du sud de l'Allemagne qui ont participé à des essais cliniques de phase I, et les variantes alléliques ont été associées aux niveaux de bilirubine sérique.

Cette technique a permis une détermination rapide, à grande échelle et rentable du SG **(164)**.

B.- Analyse génotypique du polymorphisme UGT1A1*28 par discrimination allélique par PCR en temps réél (TaqMan, LightCycler) :

Le test TaqMan 5`-nucléase est une méthode largement utilisée pour la quantification PCR en temps réel. La conception des sondes spécifiques au génotype permettent une analyse rapide du génotype par discrimination allélique.

La technologie *Taqman* est basée sur l'activité 5`-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR.

Ehmer Ursula et al. ont développé une méthode de génotypage du syndrome de Gilbert qui utilise la discrimination allélique par TaqMan PCR dans le but d'identifier, chez les patients recevant un traitement anticancéreux par irinotécan, les porteurs homozygotes de l'UGT1A1*28 à risque de toxicité. Cette méthode a été utilisée pour génotyper deux cent quatre-vingt-onze (291) patients suspectés de maladie de Gilbert et les résultats ont été confirmés par séquençage direct.

La discrimination allélique TaqMan pour le génotypage UGT1A1*28 est une méthode rapide, à haut débit et rentable pour le génotypage du syndrome de Gilbert ; cependant le séquençage direct de la région promotrice UGT1A1, bien que longue, reste la méthode de référence pour le génotypage du variant UGT1A1*28 **(166,167)**.

3.6.- Diagnostic différentiel :

Depuis l'identification du gène codant pour l'UDP-GT, un certain nombre de mutations affectant l'expression de ce gène ont été identifiées.

Ces mutations peuvent être classées en trois groupes : les mutations qui entraînent une production réduite de l'enzyme normale, les mutations qui donnent lieu à la synthèse d'une enzyme structurellement anormale et dysfonctionnelle et les mutations qui abolissent complètement l'expression de l'allèle affecté.

Le syndrome de Gilbert et le syndrome de Crigler-Najjar de type I et II sont des hyperbilirubinémies non hémolytiques non conjuguées héréditaires qui résultent des mutations du gène UGT1A1 et altèrent la conjugaison de la bilirubine **(93,137,169)**.

La combinaison de mutations affectant la région codante du gène et de mutations du promoteur qui réduisent l'expression du gène explique le large spectre clinique des hyperbilirubinémies familiales non conjuguées, qui va du syndrome de Gilbert cliniquement négligeable, au syndrome de Crigler-Najjar de type I grave et souvent mortel.

Ces deux syndromes étant cliniquement très différents, leurs manifestations cliniques vont de l'hyperbilirubinémie asymptomatique épisodique et légère dans le cas du SG, à l'ictère nucléaire, aux lésions cérébrales irréversibles et à la mort dans le cas du SCNI **(44, 170, 172, 259)**.

Génétiquement, les défauts moléculaires de ces trois syndromes (SG, SCNI, SCNII) sont causés par des mutations dans le même locus du gène UGT1A1.

Dans le cas du syndrome de Gilbert, deux bases sont insérées dans le promoteur du gène, et l'activité enzymatique est réduite à 30%. Cependant, les mutations de type I et II du SCN conduisent à l'échange d'acides aminés, à des changements du cadre de lecture ou à l'arrêt des codons se traduisant soit par une activité enzymatique inférieure à 1% dans le SCNI soit par une activité enzymatique inférieure à 10% dans le syndrome de Crigler-Najjar de type II. Dans le SCN II l'hyperbilirubinémie est beaucoup plus légère que celle du type I et se complique rarement d'un ictère nucléaire ce qui fait qu'il peut être cliniquement identique au syndrome de Gilbert (**173, 174, 175, 177)**.

Les taux de bilirubine non conjuguée chez les patients atteints du SG ne dépassent généralement pas 40 mg/l, tandis qu'ils s'élèvent entre 100 et 250 mg/l dans le SCN II avec présence de glucuronates dans la bile et sont supérieures à 200 mg/l dans le SCN I avec une bile incolore.

La réponse à l'administration du phénobarbital ou d'autres agents inducteurs d'enzymes permet de distinguer entre les SCNII et SCNI. Les patients SCN I sont réfractaires au phénobarbital alors que chez les patients SCN II les niveaux de bilirubine sérique sont généralement réduits de 30 à 80 % **(42,57)**.

Tableau II : Les caractéristiques différentielles entre le syndrome de Gilbert et le syndrome de Crigler-Najjar type 1 et 2 **(42,127)**.

	SCN I	SCN II	SG
Histologie hépatique	Normale	Normale	Normale
Bilirubine indirecte	Très élevée	Elevée	Légèrement élevée
Activité enzymatique UDP-GT	Absente	Fortement diminuée	Diminuée
Effet du phénobarbital sur le taux de la bilirubine sérique	Aucun	Réduction	Réduction
Hérédité	Autosomique récessive	Autosomique récessive	Autosomique récessive Autosomique dominante
Indicateur de la fonction hépatique	Normaux	Normaux	Normaux
Prévalence	Rare	Rare	Fréquente
Traitement	Photothérapie, carbonate de calcium, transplantation hépatique	Photothérapie, carbonate de calcium, transplantation hépatique	Non nécessaire
Pronostic	Ictère nucléaire fréquent	Habituellement bénin, ictère nucléaire rare	Bénin

4.- Aspect génétique :

L'Uridine diphosphoglucuronosyl transférase (UGT) constitue une superfamille de transférases, subdivisée selon l'homologie de leurs structures en 3 familles dénommées (UGT1, UGT2A et UGT2B).

Chez l'homme un seul gène code pour la totalité des UGT1. Il est localisé sur le bras long du chromosome 2 en position q37 et comprend 16 exons. Un épissage alternatif conduit à 9 isoformes numérotés d'UGT1A1 à UGT1A9 et présentent en commun les 4 derniers exons et différent uniquement par le premier exon. L'isoforme UGT1A1 est une enzyme hépatique, qui catalyse essentiellement la réaction de la glucuronoconjugaison de la bilirubine.

Le gène UGT1A1 est le siège de plusieurs variations qui peuvent affecter l'activité ou l'expression enzymatique. Ces dernières sont à l'origine de troubles métaboliques liés à la glucuronoconjugaison de la bilirubine tels que le syndrome de Gilbert.

L'identification du locus de l'UDP-GT1 (UGTA1), qui code pour une famille d'isoformes de l'UGTA1, a permis d'élucider le mécanisme de transmission héréditaire de ce trouble.

Plusieurs variations du gène UGT1A1 ont été décrites notamment : UGT1A1*28, UGT1A1*93 et UGT1A1*6.

Le génotype le plus courant du syndrome de Gilbert est le polymorphisme homozygote [A(TA)7TAA] dans le promoteur du gène UGT1A1 qui entraîne une diminution de l'activité de l'UDP-GT1 **(178,179,180,181)**.

4.1.- Le complexe multigénique UGT :

Les UDP-glucuronosyltransférases forment une famille d'enzymes membranaires situées dans le réticulum endoplasmique et catalysent les réactions de glucuronidation. Ces enzymes catalysent le transfert du groupement glucuronyl de l'acide uridine 5'-diphosphoglucuronique vers le groupe fonctionnel d'un substrat spécifique pour former des composés glucuronidés qui sont plus solubles dans l'eau et facilement excrétés dans la bile ou dans les urines.

Les gènes UGT sont classés en fonction du degré de similarité des acides aminés entre les isoformes en plusieurs familles et sous-familles de gènes UGT hautement homologues.

Deux familles d'UGT humaines UGT1A et UGT2B glucuronident une large gamme de substrats ; les enzymes UGT1A conjuguent les œstrogènes, la bilirubine et les composés xénobiotiques tandis que les enzymes UGT2B glucuronident les acides biliaires, les androgènes et les médicaments. Cependant, la spécificité des substrats se chevauche entre les membres des deux familles.

Contrairement à la famille UGT1A où il y a un seul gène qui code pour toutes les UGT1, la famille UGT2B est composée de plusieurs gènes indépendants codant pour sept enzymes UGT humaines fonctionnelles connues et regroupées sur le chromosome 4. Ils sont principalement impliqués dans le métabolisme des stéroïdes.

La caractérisation de la structure des gènes et le clonage moléculaire des ADNc ont permis d'identifier 16 protéines UGT fonctionnelles chez l'homme.

Les protéines UGT sont composées de 527-530 résidus d'acides aminés, pour un poids moléculaire de 50-57 kDa.

Le gène codant pour la totalité des UGT1comprend 16 exons, un épissage alternatif conduit à 9 isoformes (UGT1A1, UGT1A3-1A10) et 4 pseudo-gènes.

Nous nous concentrons ici sur l'UGT1A1, la principale UGT qui glucuronide la bilirubine.

Le gène UGT1A1 est constitué de 5 exons et est localisé à l'extrémité du bras long du chromosome 2 (2q37). Il fait partie de la famille des gènes et pseudogènes UGT1A ayant tous en commun les exons 2 à 5 à l'extrémité 3', la spécificité de substrat étant uniquement liée à l'exon 1. L'exon 1 du gène UGT1A1 est celui situé le plus près du groupe des exons 2 à 5. Il possède son propre promoteur qui est une boîte TATA.

Les exons 1a et 1d codent pour la région variable de la bilirubine UGT1A1 (UGT1*1) et UGT1A2 (UGT1*2) respectivement. L'UGT1*1 étant responsable de la quasi-totalité de la conjugaison de la bilirubine et l'UGT1*2 jouant un rôle minime, voire nul. L'expression de l'UGT1A1 dépend d'une région promotrice située en 5' par rapport à chaque exon 1 qui contient une boîte TATAA.

Une altération de la glucuronidation de la bilirubine peut donc résulter de mutations dans l'exon 1a, son promoteur ou les exons communs **(115,175,181,182,183,184. 185,186,187,188,189,191,192,193,194,195)**.

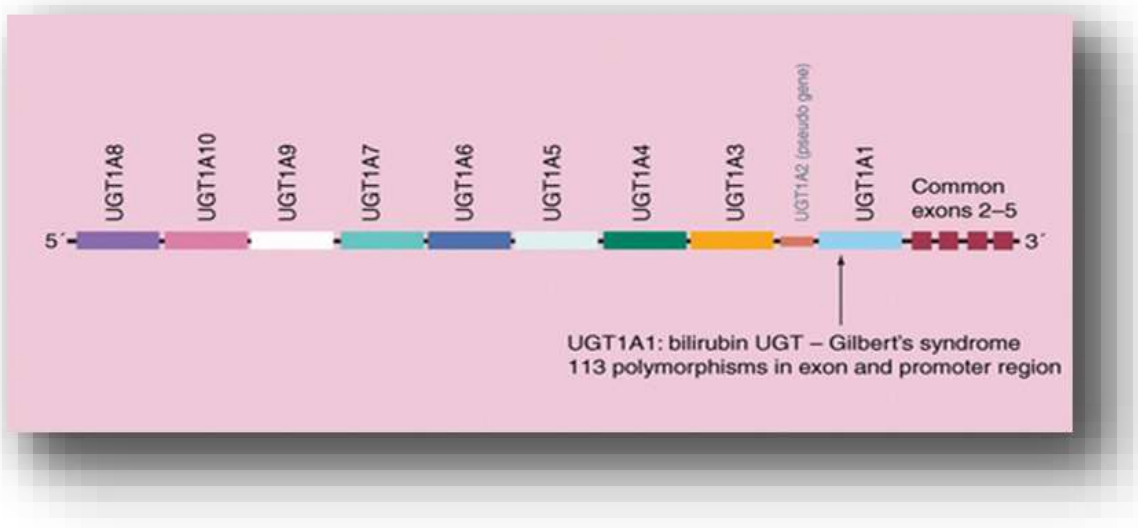


Fig. 10 : Représentation graphique du locus du gène humain UGT1A codant pour les enzymes de glucuronidation UGT1A **(196)**.

4.2.- Les mutations du promoteur et de l'exon 1 du gène UGT1A1 :

De nombreuses anomalies de séquence ont été rapportées comme réduisant de manière significative mais partielle l'activité transcriptionnelle du gène ou l'activité enzymatique de la protéine produite à l'origine du syndrome de Gilbert.

Le type sauvage de la boîte TATA comporte six répétitions de TA et s'écrit conventionnellement A(TA) 6TAA selon la nomenclature de la Human Genome Variation Society.

Une variante génétique dans la région du promoteur du gène UGT1A1 est associée au syndrome de Gilbert. Il s'agit de l'insertion d'une paire de bases thymine-adénine (TA) supplémentaire dans la séquence normale A (TA) 6TAA de la boîte TATA, ce qui signifie que la séquence A (TA) 6TAA devient A (TA) 7TAA. L'allèle variant qui en résulte est appelé UGT1A1*28 avec 30 % de l'activité enzymatique normale de l'UDP-GT.

Il a été constaté que les promoteurs contenant sept répétitions de thymine adénine (TA) présentaient une activité plus faible que les six répétitions de type sauvage, et que les taux de bilirubine sérique des personnes homozygotes (7/7) ou même hétérozygotes (6/7) pour sept répétitions, étaient plus élevés que ceux des personnes possédant les six répétitions de type sauvage (6/6) car l'activité transcriptionnelle est inversement proportionnelle au nombre de répétitions (TA). Plus le nombre de répétitions (TA)n augmente, plus l'activité de l'UGT1A1 diminue **(115,117, 169, 194, 197, 198, 199, 200)**.

À ce jour, 130 variantes génétiques de l'UGT1A1 ont été signalées à des fréquences variables selon les ethnies.

Dans de nombreuses populations, le variant UGT1A1*28 est la modification génétique la plus fréquente à l'origine du SG. Bien que des polymorphismes similaires de l'UGT1A1 existent dans tous les groupes ethniques et entraînent le même effet physiologique, les fréquences de ces mutations ne sont pas les mêmes dans toutes les populations.

Chez les Caucasiens et les Afro-Américains, la fréquence de l'allèle A (TA) 7TAA est d'environ 35 à 40 %, mais elle est beaucoup plus faible chez les Asiatiques, notamment les Chinois (16%), les Coréens (13 %) et les Japonais (11 %).

Dans les groupes de population d'origine non européenne, outre A(TA) 7TAA, il existe également d'autres polymorphismes du promoteur du gène UGT1A1 / A(TA) 5TAA et A(TA) 8TAA/ ou leur combinaison.

Les variants à 5 ou 8 répétitions (UGT1A1 *36 / 5TA et *37 / 8TA) sont beaucoup moins fréquents chez les Caucasiens (près de 0 %) et sont principalement identifiés chez les personnes d'origine africaine **(169, 201, 202, 203, 204)**.

Un autre polymorphisme sous la forme d'une mutation faux-sens dans la zone codante du gène UGT 1A1 associé au SG a été rencontré dans les populations asiatiques.

Il s'agit d'une une transition G→A au niveau du nucléotide 211, celle-ci fait que l'arginine remplace la glycine en position 71 du produit protéique correspondant (mutation G71R).

Cette mutation est appelée UGT1A1*6 elle est à l'origine d'une réduction de l'activité enzymatique de l'UGT1A1 à 30-80 % du type sauvage.

Il est à noter que le polymorphisme du promoteur TA est rarement rencontré dans les populations asiatiques.

Étant donné que d'autres polymorphismes ont été associés au syndrome de Gilbert, il est important de savoir que l'absence de l'allèle UGT1A1*28 n'exclut pas cette affection **(205, 206)**.

Tableau III : Nomenclature des allèles UGT1A1, localisation et phénotypes associés **(207,224)**

Allèle UGT1A1	Variante	Localisation	Activité enzymatique	Phénotype associé
UGT1A1 1*	$(TA)_6$ TAA	Promoteur	Normale	Type sauvage
UGT1A1 28*	$(TA)_7$ TAA	Promoteur	Réduite	Syndrome de Gilbert
UGT1A1 36*	$(TA)_5$ TAA	Promoteur	Augmentée	Aucun
UGT1A1 37*	$(TA)_8$ TAA	Promoteur	Réduite	Crigler-Najjar, type II
UGT1A1 6*	c.211G>A ; G71R	Exon 1	Réduite	Syndrome de Gilbert
UGT1A1 27*	g.686C>A ; P229Q	Exon 1	Réduite	Syndrome de Gilbert

4.3.- Transmission du SG :

Le syndrome de Gilbert peut avoir différents modes de transmission. Lorsque la maladie est causée par la modification de l'UGT1A1*28 dans la région promotrice du gène UGT1A1, elle est transmise selon le mode autosomique récessif, ce qui signifie que les deux copies du gène dans chaque cellule présentent la mutation.

Les parents d'une personne atteinte d'une maladie autosomique récessive sont tous deux porteurs d'une copie du gène muté, mais ils ne présentent généralement pas de signes ni de symptômes de la maladie.

Lorsque l'affection est causée par une mutation faux-sens dans le gène UGT1A1, elle est transmise selon un modèle autosomique dominant, ce qui signifie qu'une copie du gène altéré dans chaque cellule est suffisante pour provoquer la maladie. Ce cas est plus fréquent dans les populations asiatiques **(127, 201, 204)**.

5.- Prise en charge :

La maladie de Gilbert est une pathologie totalement bénigne qui évolue favorablement sans complications, sans réel retentissement sur l'état de santé avec un bon pronostic. L'utilisation de médicaments n'est donc pas ou rarement justifiée pour son traitement.

Cependant, en cas d'hyperbilirubinémie, des médicaments qui abaissent le taux de bilirubine peuvent être administrés.

Chez un nouveau-né, le SG n'a pas de rôle significatif dans l'ictère néonatal simple mais lorsqu'il est associé à d'autres facteurs tels que le déficit en G6PD, l'incompatibilité ABO et la sphérocytose héréditaire il peut jouer un rôle dans la potentialisation de l'hyperbilirubinémie avec ses complications de l'encéphalopathie bilirubinique.

Dans ce cas en fonction du taux de bilirubine dans le sang, plusieurs options seront envisagées.

De la simple surveillance à la photothérapie, une exsanguino-transfusion ou un traitement pharmacologique peuvent s'avérer nécessaires **(21, 31, 132, 208, 209)**.

5.1.- La photothérapie :

La photothérapie reste le traitement standard et de référence chez le nouveau-né ictérique.

Elle permet à la fois de prévenir l'hyperbilirubinémie grave chez les nourrissons présentant une concentration de bilirubine sérique totale (BST) modérément élevée et d'entreprendre le traitement des nourrissons déjà atteints d'une hyperbilirubinémie grave.

Elle consiste à exposer la peau de l'enfant à une lumière de spectre bleu (spectre 420-490 nm) pour photo-isomériser la bilirubine non conjuguée en des formes plus hydrosolubles qui peuvent être rapidement excrétées par le foie et les reins sans glucuro-conjugaison **(210, 211, 212)**.

5.2.- L'exsanguino-transfusion :

L'exsanguino-transfusion (EST) constitue le traitement de dernier recours, elle peut rapidement enlever la bilirubine de la circulation sanguine.

Elle permet l'échange volume à volume de **1,5** à **2** masses sanguines d'un individu par du sang d'un donneur compatible exempt de bilirubine à travers un cathéter veineux ombilical ou d'autres types d'accès si disponibles **(213)**.

5.3.- Les inducteurs de l'UDP-GT :

5.3.1.- Le phénobarbital :

Le phénobarbital étant un antiépileptique barbiturique, mais son administration est aussi indiquée pour réduire le taux de bilirubine particulièrement élevée. En effet, le phénobarbital est un inducteur enzymatique qui agit en favorisant la synthèse et l'activité de l'enzyme glucuronosyl-transférase **(150, 214, 215)**.

5.3.2.- Le clofibrate :

Une molécule hypolipémiante qui est à la fois un puissant inducteur de la glucuronyltransférase et de la protéine de transport intrahépatocytaire de la bilirubine **(210)**.

5.4.- Mesures hygiéno-diététiques :

Une bonne hygiène de vie permet de limiter l'apparition des manifestations liées à l'ictère.

En effet, même si les patients se portent bien sur le plan général, ils peuvent rapporter une altération de la qualité de vie et de l'image de soi.

Certains événements sont susceptibles de déclencher ou d'exacerber les symptômes d'où l'intérêt de les éviter et d'adopter un style de vie permettant de garder les niveaux de bilirubine sous contrôle.

Le respect des mesures suivantes est recommandé : **(110, 116, 190)**

- Boire beaucoup d'eau : une bonne hydratation permet d'éviter la déshydratation, un des facteurs déclenchant des épisodes d'ictère.
- Modérer la consommation des graisses (saumon, beurre, noix, cacahuètes)
- Eviter de pratiquer un sport trop intensivement
- Une meilleure gestion du stress : la pratique régulière des techniques de relaxation
- Eviter certains médicaments susceptibles d'inhiber l'UDP-GT et de précipiter l'apparition des épisodes d'ictère
- Eviter les jeunes prolongés

III.- BILIRUBINE ET EFFET ANTIOXYDANT :

La bilirubine a longtemps été considérée comme cytotoxique en raison de ses propriétés hydrophobes et neurotoxiques.

Ce n'est que depuis la fin des années 1980 que certaines études émergentes ont suggéré que la bilirubine, et en particulier la bilirubine non conjuguée possède d'importantes propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices, neuroprotectrices et cytoprotectives puissantes qui protègent contre les maladies associées au stress oxydatif **(216, 217, 218)**.

Le stress oxydatif est un état pathologique causé par un excès d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) à des niveaux plus élevés que la capacité des processus antioxydants de l'organisme.

La formation excessive des ERO est favorisée par des facteurs liés au mode de vie dont : le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité ainsi que par des facteurs endogènes comme l'inflammation.

La formation des ERO survient donc à l'occasion de situations d'hypoxie ou d'hyperoxie qui induisent un stress cellulaire. C'est au cours du processus de la réduction du O_2 en H_2O_2 que se forment les intermédiaires incomplètement réduits de l'oxygène par transfert d'électrons.

Ils sont représentés par l'anion radical superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que le radical hydroxyl (OH^-) qui est l'espèce la plus nuisible du stress oxydant.

Ces ERO ainsi produites, sont responsables des effets négatifs d'oxydation réalisés sur un grand nombre de molécules : acides nucléiques, protéines, lipides, sucres, etc. Par conséquent, ils seraient à l'origine d'anomalies d'expression des gènes et des récepteurs membranaires, prolifération ou mort cellulaire, troubles immunitaires, mutagenèse.

Ils ont également été impliqués dans la cause du vieillissement, le développement des maladies cardio-vasculaires et des cancers.

De nombreuses affections humaines ou animales incluent donc un stress oxydant local ou général dans leur pathogenèse au même titre que l'inflammation à laquelle il est souvent associé.

Pour prévenir la formation d'oxydants ainsi que pour réparer les dommages oxydatifs aux tissus et aux macromolécules, l'organisme possède un arsenal complexe de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques.

Les antioxydants enzymatiques sont représentés par la superoxyde dismutase (SOD), la gluthathion peroxydase (GPx) et la catalase (Cat).

Quant aux défenses non enzymatiques, elles impliquent une variété de composants à la fois d'origine endogène et exogène.

Elles comprennent :

- **Les micronutriments alimentaires** : Vitamine C, Vitamine E, Vitamine A.
- **Les antioxydants d'origine végétale** : Les polyphénols, les flavonoïdes, les caroténoïdes.
- **Les protéines antioxydantes** : L'albumine, les protéines de choc thermique (HSP).
- **Les protéines de transport et de stockage** : La transferrine, la ferritine, la céruloplasmine.
- **Les oligo-éléments** : sélénium, cuivre, zinc.
- **Le système antioxydant endogène** : Glutathion (GSH), la bilirubine, l'acide urique, l'ubiquinone (coenzyme Q10). **(219**, **220**, **221**, **222, 223, 226, 227**, **228, 229**, **230, 231)**.

1.- Pouvoir antioxydant de la bilirubine :

La bilirubine compte parmi les principaux antioxydants du plasma. Stocker et al sont les premiers à avoir démontré son pouvoir antioxydant à des concentrations de l'ordre du micromolaire contre les radicaux peroxyls **(216)**.

Le principal effet antioxydant de la bilirubine est dérivé de sa propriété réductrice chimique. Sur la base de ses propriétés lipophiles, la bilirubine agit en réduisant les espèces lipophiles réactives de l'oxygène telles que les peroxydes lipidiques, elle est donc capable de protéger les lipides membranaires contre l'oxydation. Il s'est avérée que cette molécule possède d'autant de capacité antioxydante que d'autres antioxydants, principalement hydrophiles, tels que le glutathion, la vitamine C et la vitamine E.

Lorsque la bilirubine elle-même est oxydée par les espèces réactives de l'oxygène, il revient à son précurseur biliverdine qui est ensuite recyclé en bilirubine par la biliverdine réductase aux dépens du NADPH.

Ce cycle d'oxydoréduction biliverdine bilirubine amplifie considérablement la puissance antioxydante ce qui explique la capacité des concentrations faibles de la bilirubine à surmonter des concentrations 105 fois plus élevées de ERO. Par conséquent, il y a une réduction des molécules réactives les ERO en molécules non réactives.

Autre que la bilirubine, une activité antioxydante a été conférée à d'autres molécules notamment la biliverdine réductase (BVR) qui catalyse la réduction de la biliverdine en bilirubine, l'isoforme HO-1, l'enzyme limitante de la dégradation de l'hème en bilirubine et le CO, qui agissent d'une façon indirecte.

Des preuves suggèrent que ces 3 métabolites expriment également des propriétés anti-athéromateuses, il est cependant difficile de séparer l'importance de chaque composante dans la protection vasculaire **(232, 233, 234, 235, 236, 237, 238)**.

2.- Bilirubine et maladies auto immunes :

Au cours des dernières années, les ERO (ROS) ont été impliquées dans la pathogenèse de maladies auto-immunes. Leur accumulation conduit à l'apoptose et des modifications structurelles des auto-antigènes qui entraînent de nouvelles spécificités.

Cette accumulation déclenche à son tour diverses cellules inflammatoires provoquant la libération de divers interleukines inflammatoires, cytokines et chimiokines qui accentuent et amplifient l'état inflammatoire chez les patients atteints de ces maladies.

La bilirubine a des effets immunomodulateurs, en diminuant la libération de modèles moléculaires associés aux dommages.

Les effets cytoprotecteurs de la bilirubine sont activés de plusieurs façons au-delà de son activité anti-oxydante directe, y compris l'inhibition des gènes pro-apoptotiques et la régulation des gènes anti-apoptotiques.

2.1.- Maladies inflammatoires chronique de l’intestin (MICI) :

Le rôle protecteur de la bilirubine a été signalé dans les MICI. Celles-ci englobent la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU), elles impliquent une inflammation chronique du tractus gastro-intestinal **(239**, **240**, **241**, **242**, **243, 244, 247)**.

Dans une étude de cohorte réalisée chez les caucasiens sur l'association entre les variantes du gène promoteur de l'UGT1A1 et une diminution du risque de maladie de Crohn (MC), les résultats ont montré que l'homozygotie UGT1A1*28 causant le syndrome de Gilbert chez environ 50 % des porteurs peut protéger du développement de la MC. Dans une autre cohorte néerlandaise de patients atteints de MICI, les résultats indiquent que l'homozygotie pour l'allèle UGT1A1*28 a exercé un effet protecteur contre le développement de la maladie de Crohn, ainsi que sur le développement des manifestations extra-intestinales de la maladie.

Semblable aux résultats de MC, des niveaux réduits de bilirubine sérique totale ont été trouvés chez des patients atteints de CU **(245, 246)**.

2.2.- Lupus érythémateux systémique (LES) :

Le LES est une maladie auto-immune systémique qui se manifeste par des symptômes d'atteinte de plusieurs organes, notamment la vascularite, la néphropathie, la polysérosite, l'arthrite ou l'atteinte du système nerveux central (SNC). En raison de son caractère multiorganique et de sa réponse inflammatoire systémique, le LES est clairement reconnu comme un facteur de risque pour le développement de l’athérosclérose. L'effet protecteur de la bilirubine pourrait être dû à son action anti-inflammatoire, à sa puissante propriété antioxydante qui inhibe les dommages causés par l'oxydation des ERO et entrave la production d'auto-anticorps, et à sa puissante activité immunomodulatrice qui induit l'apoptose des cellules immunitaires. Des études ont démontré que les sujets présentant des taux de bilirubine sérique plus élevés tels que ceux atteints du syndrome de Gilbert, pourraient être protégés contre le développement du LES **(248, 249, 250, 251, 252, 253)**.

2.3.- La polyarthrite rhumatoïde (PR) :

La PR est une maladie auto-immune systémique d'étiologie inconnue, caractérisée par l'infiltration de cellules inflammatoires et de fibroblastes synoviaux dans les articulations. Elle entraîne une destruction progressive et irréversible du cartilage et des os. Il a été établi que le stress oxydatif joue un rôle important dans la pathogenèse de cette maladie.

Au cours de l'inflammation, les cellules activées par le système immunitaire dans la synoviale enflammée de la PR peuvent générer une masse d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La production excessive des ERO déclenche les réponses pro-inflammatoires ainsi que les dommages causés aux lipides, aux protéines et à l'ADN ce qui conduit à la production d'auto-anticorps.

La bilirubine est un puissant antioxydant capable de piéger les ERO et possède également des activités anti-inflammatoires et immunosuppressives en inhibant la prolifération des cellules inflammatoires, en induisant l'apoptose des cellules inflammatoires réactives, et en réduisant les cytokines pro-inflammatoires.

L'effet protecteur de la bilirubine sur le risque de PR serait expliqué par la diminution du stress oxydatif dû à l'élimination des radicaux peroxyles, et par sa liaison à l'albumine sérique qui va empêcher l'oxydation in vitro des acides gras liés à l'albumine **(216, 255, 256, 257, 258, 259, 260)**.

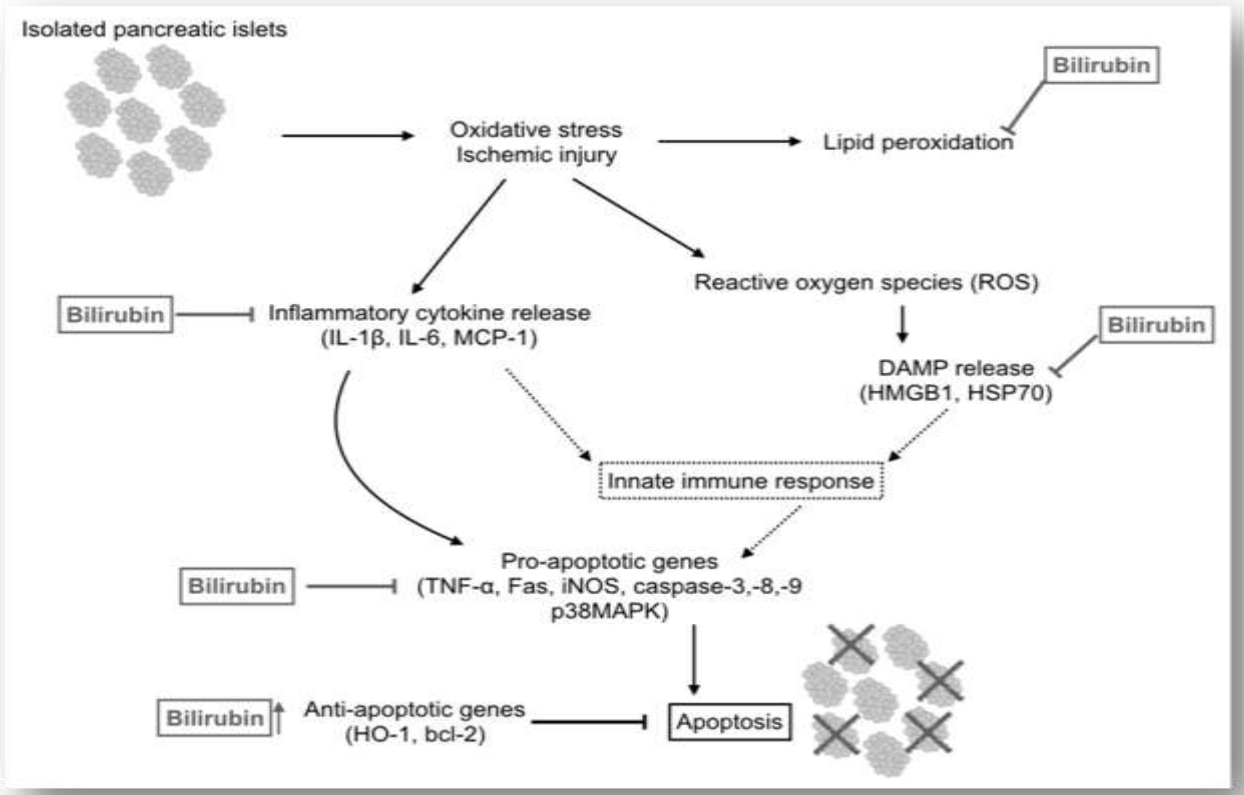


Fig. 11 : Effets cytoprotecteurs de la bilirubine **(287)**.

3.- Bilirubine et protection cardiovasculaire :

Une grande attention a été portée ces dernières années sur les substances antioxydantes qui pourraient prévenir les maladies cardio-vasculaires (MCV).

La bilirubine a un potentiel anti-athérogénique en inhibant l'oxydation des lipides qui contribueraient à la formation de plaques d'athérome et s'opposerait ainsi au développement des MCV.

L'oxydation induite par les radicaux libres des LDL peut induire une inflammation, un dysfonctionnement endothélial et une activation plaquettaire. Le LDL oxydé induit également des réponses inflammatoires dans les macrophages qui agissent comme un déclencheur du développement de l'athérosclérose.

En effet, une bilirubine sérique plus élevée est associée à une diminution du cholestérol circulant, des triglycérides, du cholestérol LDL et VLDL **(261, 262, 272)**.

D'après les résultats d'études de cohortes, l'hyperbilirubinémie observée chez les sujets atteints du SG est associée à un risque réduit de maladie cardiovasculaire, ce qui appuie le concept de bilirubine comme antioxydant cardioprotecteur **(263, 264, 265, 270)**.

D'autres études ont décrit une association entre de faibles taux de bilirubine et les maladies coronariennes **(271, 471)**.

Il a même été constaté que les taux de bilirubine plasmatique étaient inversement proportionnels aux facteurs de risque connus de maladies coronariennes, tels que le tabagisme, le cholestérol LDL, le diabète et l'obésité.

Une association positive de bilirubine sérique avec le cholestérol HDL et des ratios élevés de HDL / LDL a été documentée chez des personnes atteintes de SG.

Cette association a été confirmée par l'étude prospective British Regional Heart Study **(266, 267**, **268, 269)**.

Chez des sujets atteints de SG, une réduction significative de la protéine C-réactive (CRP) a été rapportée par rapport à des témoins sains, et les niveaux de CRP se sont révélés être corrélés négativement avec les taux plasmatiques de bilirubine **(274)**.

Chez ces mêmes sujets, les résultats d'une précédente étude ont montré que l'épaisseur du tissu adipeux épicardique (EAT) était fortement inférieure à celle du groupe témoin. Ce tissu libère des cytokines inflammatoires, des hormones et des chimiokines , sa faible épaisseur serait à l'origine d'une faible libération de cytokines pro-inflammatoires expliquant ainsi les effets cardioprotecteurs **(275)**.

La bilirubine inhibe également l'inflammation en empêchant l'infiltration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire via l'inhibition des molécules d'adhésion par le piégeage des intermédiaires de signalisation des ERO **(276, 277)**.

D’autres études indiquent qu’une hyperbilirubinémie modérée non conjuguée comme dans le SG pourrait réduire l'hyperréactivité plaquettaire induite par le stress oxydatif et le risque de thrombose qui représentent un facteur de risque pertinent dans les MCV **(261)**.

Récemment, des études ont rapporté que les niveaux de bilirubine étaient inversement associés à l’obésité, au syndrome métabolique, au diabète, et à l'hypertension.

Comme la réduction de poids est connue pour réduire plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire, il est intéressant de noter que chaque diminution de pourcentage de la perte de poids était associée à une augmentation linéaire de la concentration sérique de bilirubine **(278, 279, 280, 281, 282)**.

L’ensemble de toutes ces études considèrent clairement la bilirubine comme une molécule endogène ayant un rôle pharmacologique protecteur grâce à ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et ainsi anti-athéromateuses.

4.- Bilirubine et cancers :

Le rôle du stress oxydatif dans la pathogenèse du cancer est bien établi ; les dommages causés à l’ADN, aux protéines et lipides par une production accrue des ERO initient ou favorisent le développement du cancer.

Étant donné que la bilirubine est un antioxydant endogène puissant, des taux sériques de bilirubine plus faibles réduisent la capacité anti oxydante systémique, ce qui entraîne une altération de la capacité de défense contre les dommages induits par le stress oxydatif.

Par conséquent, il est très probable que les associations entre des taux sériques de bilirubine plus faibles et un risque accru de cancer soient médiées par une diminution des activités anti oxydantes**.**

Une association négative entre le taux de bilirubine sérique et le développement de cancer a été rapportée.

Cette même association a été décrite avec le cancer du poumon et du côlon notamment chez les sujets atteints du syndrome de Gilbert **(216, 283, 284)**.

4.1.- Cancer du poumon :

Il a été rapporté que le tabagisme est négativement associé aux niveaux de bilirubine.

L'arrêt du tabac est donc suivi d'une augmentation de la concentration de bilirubine qui a été associée à un risque plus faible de cancer du poumon.

Dans une vaste étude prospective sur la population coréenne qui a été suivie pendant 10 ans, les taux de bilirubine sériques ont systématiquement montré un effet protecteur sur le risque de développement d'un cancer du poumon chez les fumeurs et les non-fumeurs **(285, 286)**.

4.2.- Cancer colorectal :

Des résultats d'études ont indiqué que la BNC possède des propriétés antimutagènes.

Il a également été signalée que la BNC pouvait induire l'apoptose cellulaire dans les lignées cellulaires cancéreuses du côlon ; elle traverse facilement les membranes cellulaires, pénètre dans les cellules cancéreuses du côlon et inhibe la prolifération des cellules tumorales, ce qui suggère qu'un niveau élevé de la BNC pourrait prédire de bons résultats.

La bilirubine sérique a aussi largement été étudiée en tant qu'indicateur pronostique utile de la mortalité liée à une maladie non hépatique dans divers cancers, y compris le CCR **(287, 288, 289, 290, 291)**.

4.3.- Cancer de l'endomètre :

Etant donné que l'UGT 1A1 participe à l'inactivation de l'œstradiol (E2) et de ses métabolites oxydés, il a été démontré que ces métabolites contribuent au développement du cancer de l'endomètre.

Dans ce sens, les résultats d'une étude cas-témoins ont indiqué qu'une activité UGT1A1 plus faible représentée par UGT1A1*28, était associée à un risque plus faible de cancer de l'endomètre en réduisant l'excrétion du 2-hydroxyestradiol ce qui signifie que l'UGT1A1 joue un rôle critique dans le catabolisme de l'œstrogène **(292, 293)**.

4.4.- Lymphome de Hodgkin :

Les résultats d'une étude analysant des patients pour les variantes de la glutathion S-transférase, du cytochrome P450 et de l'UGT1A1 ont révélé une association entre l'hyperbilirubinémie et un meilleur pronostic du lymphome de Hodgkin **(294)**.

4.5.- Autres cancers :

Il a été démontré dans une étude antérieure qu'un taux élevé de la bilirubine pourrait protéger contre le cancer de la vessie en augmentant l'élimination des carcinogènes de l'épithélium de la vessie **(295)**.

Une autre étude sur le carcinome nasopharyngé (CNP) a montré que la bilirubine indirecte pouvait inhiber les métastases CNP en inhibant la production d'ERO, et agissait comme un facteur pronostique favorable **(296)**.

5.- Bilirubine, diabète et syndrome métabolique :

L'hyperglycémie et le diabète induisent un stress oxydatif conduisant à un dysfonctionnement des cellules endothéliales qui est une caractéristique des complications vasculaires diabétiques.

Des études ont en effet montré une prévalence significativement plus faible de maladie cardiovasculaire chez les patients diabétiques atteints du syndrome de Gilbert.

Le rôle protecteur de la bilirubine dans le diabète est principalement attribué à l'activité antioxydante qui pourrait atténuer les dommages cellulaires et tissulaires induits par les ERO.

Des études expérimentales sur des modèles animaux ont suggéré que la bilirubine pourrait protéger les cellules bêta des lésions oxydatives et améliorer la sensibilité à l'insuline.

Il a également été démontré que des niveaux plus élevés de bilirubine augmentent la mobilisation du glucose dans les cellules, conduisant à une utilisation biologique plus efficace du glucose et il existe des preuves indiquant qu'une bilirubine élevée est capable de réduire l'incidence du diabète sucré et du syndrome métabolique.

En effet des résultats récents ont montré que les taux de bilirubine sérique sont inversement associés au syndrome métabolique et l'inflammation systémique chez les adultes, les enfants et les adolescents.

De plus, l'obésité abdominale a été corrélée à de faibles taux de bilirubine sérique.

L'obésité étant un facteur de risque pour le développement du diabète de type 2, elle est corrélée à l'inflammation systémique et s'accompagne d'un état d'oxydation élevé.

Des études japonaises ont indiqué que la bilirubine est négativement associée au peptide C, à l'hémoglobine glyquée et au diabète de type 2 (DT2) chez les personnes d'âge moyen et les personnes âgées **(278**, **297**, **298**, **299**, **300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311**, **312)**.

6.- Bilirubine et neuroprotection :

La bilirubine s'est révélée conférer des caractéristiques antioxydantes neuroprotectrices lors de sa production.

Il a été montré que la bilirubine présente une puissante activité antioxydante et protège contre les dommages des radicaux libres sur les cellules neuronales in vitro.

Lorsqu'elle sert d'antioxydant, la bilirubine est de nouveau oxydée en biliverdine, où elle peut être à nouveau utilisée par biliverdine réductase pour régénérer la bilirubine.

Cette boucle d'oxydo-réduction (redox) bilirubine-biliverdine pourrait expliquer pourquoi la bilirubine a des effets antioxydants si puissants lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations physiologiques dans les cultures de cellules neuronales.

Il a donc été proposé que l'hyperbilirubinémie néonatale non conjuguée physiologique se développe évolutivement comme mécanisme de protection des tissus néonataux qui autrement seraient plus susceptibles d'être endommagés par le stress oxydatif

La bilirubine joue un rôle important dans le développement et la prévention des dysfonctionnements neurologiques et doit donc être prise en compte dans la prise en charge du patient en soins intensifs **(313, 314, 315, 316, 317)**.

7.- Bilirubine et accidents vasculaires cérébraux (AVC) :

La bilirubine a été connue pour exercer un effet neuroprotecteur par le biais de mécanismes impliqués dans le développement de l'AVC.

Un AVC ischémique survient lorsqu'un vaisseau sanguin alimentant le cerveau est obstrué, ce qui produit des conditions hypoxiques-ischémiques en aval et une augmentation du stress oxydatif .Dans ces conditions, la formation de bilirubine est amplifiée de manière significative en raison de l'induction de HO-1.

La bilirubine est l'antioxydant endogène le plus puissant qui augmente dans les accidents vasculaires cérébraux. Des études ont montré que des taux sériques élevés de bilirubine mesurés au moment de la présentation clinique étaient en corrélation positive avec la gravité de l'AVC, la bilirubine est par conséquent un marqueur pouvant influencer la survenue et le pronostic de l'AVC ischémique.

D'autres études ont révélé que la bilirubine totale circulante est négativement liée au risque d'AVC ischémique.

La bilirubine sérique a également été proposée comme un marqueur utile pour différencier l'AVC cardio-embolique d'autres sous-types d'AVC **(318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328)**.

8.- Bilirubine et maladies infectieuses (Covid-19) :

Il a récemment été établi un lien entre l'hyperbilirubinémie et la gravité du SARS-CoV-2, une maladie infectieuse virale récente qui a suscité une grande attention de la part des communautés médicales et scientifiques.

Cette maladie est causée par le coronavirus-2 (SARS-CoV-2) et se présente sous la forme de grappes de pneumonies et du syndrome respiratoire aigu sévère.

Les résultats d'une étude de cas ont indiqué qu'un patient atteint du SG et infecté par le SARS-CoV-2 a montré une amélioration clinique rapide et un séjour hospitalier court par rapport à un autre patient également infecté par Covid-19 considéré comme témoin.

Il a en effet été prouvé que la bilirubine exerce de puissants effets antioxydants qui pourraient atténuer le stress oxydatif induit par la Covid-19.

Il a de plus été rapporté que la bilirubine a des effets cardio-protecteurs, améliore la fonction endothéliale et provoque la libération d'oxyde nitrique (NO), prévenant ainsi le dysfonctionnement endothélial et les complications cardiovasculaires dans le COVID-19, comme le montre l'hypertension artérielle (HTA) dans le cas du Covid-19 par rapport au patient SG avec Covid-19.

D'autres auteurs ont signalé que des taux élevés de bilirubine atténuent les troubles métaboliques par l'inhibition et l'atténuation du système rénine-angiotensine (SRA).

Par conséquent, un taux élevé de bilirubine sérique chez les patients atteints du SG peut atténuer les lésions pulmonaires aiguës et le développement du syndrome de détresse respiratoire (SDR) par l'atténuation de la vasoconstriction pulmonaire et de l'hyper inflammation induites par l'Angiotensine II.

Ainsi, des taux élevés de bilirubine sérique chez les patients atteints du SG peuvent atténuer le développement d'une tempête de cytokines pendant la progression de la Covid-19 en inhibant la libération d'interleukine IL-6, de facteur de nécrose tumorale TNF-α et d'IL-1β.

Il est intéressant de noter que la glycémie à jeun était augmentée au moment de l'admission en raison de l'insulino-résistance induite par le SRAS-CoV-2 et d'un dysfonctionnement transitoire des cellules β du pancréas.

Cependant, la glycémie à jeun semble être plus basse chez le patient Covid-19 avec SG, puisque la bilirubine non conjuguée élevée dans le SG améliore la glycémie à jeun et l'hyperinsulinémie par l'activation du récepteur alpha activé par les peroxysomes (PPAR-α) **(329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337)**.

9.- Bilirubine et autres troubles :

Chez les patients souffrant de migraine, il a été constaté que la bilirubine sérique est inversement liée à la protéine C-réactive (CRP).

Chez les patients atteints du VIH, un taux de bilirubine sérique élevé peut réduire la réponse au stress oxydatif.

Dans les maladies respiratoires telles que la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) qui est une maladie inflammatoire associée au stress oxydatif,

Il a été démontré que des concentrations sériques plus élevées de bilirubine sont associées à un risque plus faible d'exacerbation aiguë de la (MPOC) et à une meilleure fonction pulmonaire.

Dans le trouble dépressif ou le stress oxydatif a été considéré comme le mécanisme physiopathologique, la bilirubine sérique constitue un paramètre biochimique important pour évaluer les états dépressifs et peut améliorer leur prise en charge.

Dans des modèles de rat comportant des plaies créées à la fois par des rats sains et des rats diabétiques l'application de bilirubine topique a entraîné une diminution significative de la taille des plaies par rapport aux témoins.

Les effets positifs de la bilirubine topique sur la cicatrisation des plaies ont été corrélés à une réduction de l'activité oxydative et à une modulation de l'environnement inflammatoire de la plaie par une régulation négative de l'interleukine-1β, du TNF-α et de la molécule d'adhésion intercellulaire-1, et une régulation positive de l'interleukine-10 **(338, 339, 340, 341, 342, 343)**.

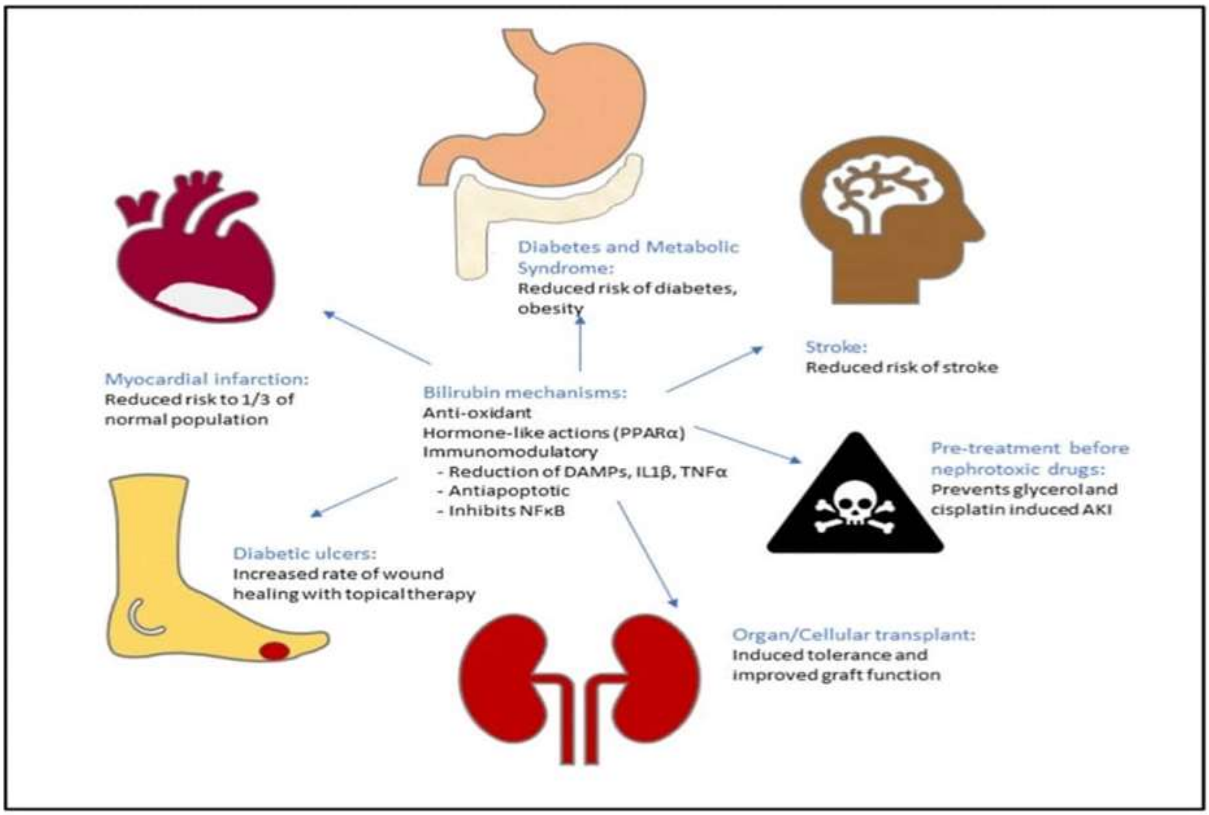


Fig. 12 : Applications cliniques potentielles de la bilirubine **(287)**.

IV.- SYNDROME DE GILBERT ET METABOLISME DES MEDICAMENTS :

La glucuronidation médiée par les UDP-GT est une voie métabolique importante qui facilite non seulement l'élimination de nombreux métabolites endogènes tels que la bilirubine mais également des xénobiotiques, y compris les médicaments.

Dans les cas de déficience en UGT1, les médicaments entrent en compétition avec la bilirubine pour l'enzyme, ce qui entraîne une augmentation de la bilirubine sérique indirecte.

En raison de cette altération de la glucuronidation observée dans le syndrome de Gilbert, plusieurs médicaments et substances cancérigènes doivent être étroitement surveillés.

Le syndrome de Gilbert peut donc devenir apparent lorsqu'une personne affectée prend certains médicaments qui nécessitent l'enzyme impliquée dans le traitement de la bilirubine dans le foie. En conséquent, ces patients présentent un risque potentiellement plus élevé pour certaines toxicités médicamenteuses.

Il existe un certain nombre de médicaments qui dépendent de la glucuronidation, y compris une large gamme de médicaments anti-épileptiques (lamotrigine, rétigabine, zonisamide, topiramate), les stéroïdes anabolisants, les glucocorticoïdes, les androgènes, le gemfibrozil, la rifampicine, la cimétidine, le chloramphénicol, la streptomycine, le salicylate de sodium, l'ampicilline, l'éthinylestradiol, l'ibuprofène, l'anesthésique propofol, le kétoprofène, les sulfamides, les statines, etc.

L'utilisation du paracétamol, de l'irinotécan, ou de l'atazanavir chez les patients atteints du syndrome de Gilbert peut être associée à des effets secondaires indésirables fréquents de la pharmacothérapie.

En raison d'un risque accru de toxicité et d'effets secondaires, un ajustement des doses de ces médicaments doit être établi chez les personnes atteintes du SG **(11, 132, 164, 196, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352)**.

1.- Analgésiques :

1.1.- Paracétamol :

À dose thérapeutique, le paracétamol est éliminé à 90% par voie urinaire après glucuronoconjugaison principalement via les UDP-GT, et sulfuronoconjugaison au niveau des hépatocytes. Les 10% restant sont métabolisés par la voie alternative du Cytochrome P450 en N- acétyl p-benzoquinone imine (NAPQI). Ces composés hautement hépatotoxiques sont ensuite rapidement détoxifiés par liaison au glutathion réduit puis éliminés dans les urines après conjugaison à la cystéine ou à l'acide mercaptopurique.

La diminution de l'activité enzymatique entraîne des taux élevés de bilirubine et peut activer diverses voies métaboliques conduisant à des quantités plus élevées de métabolites potentiellement hépatotoxiques de l'acétaminophène.

Les patients atteints de SG pourraient être plus sensibles aux effets secondaires inattendus lors de la prise d'acétaminophène.

En 1999, deux groupes hétérogènes de patients atteints du syndrome de Gilbert ont été décrits en fonction du métabolisme du paracétamol, qui était normal dans le premier groupe, tandis que dans l'autre, la glucuronidation était inférieure à 50 %.

Par la suite, les résultats d'un certain nombre d'études n'ont pas révélé de caractéristiques du métabolisme du paracétamol chez les patients atteints du syndrome de Gilbert, ce qui a conduit les auteurs à penser que le paracétamol est un substrat d'une autre isoforme de l'UGT. Ainsi, un déficit en bilirubine UDP-GT mis en évidence par un ictère, peut s'accompagner d'un déficit en glucuronidation d'autres composés. Dans ces cas, la jaunisse peut être un déterminant phénotypique de la bioactivation accrue de l'acétaminophène (APAP).

Des résultats d'études dont celle de Schmid et Hammaker ont suggéré que la glucuronidation du paracétamol était normale, alors que d'autres auteurs ont trouvé que la clairance du paracétamol était diminuée chez les patients atteints du SG.

Des études sur des microsomes hépatiques humains et des hépatocytes en culture indiquent que l'UGT1A1, l'UGT1A6, l'UGT1A9 et l'UGT2B15 sont impliquées dans la glucuronidation de l'acétaminophne.

L'UGT1A6 est important à de faibles concentrations d'APAP, tandis que l'UGT1A9 et l'UGT1A1 contribuent le plus à des doses toxiques.

Il est actuellement admis que l'UGT1A6 et dans une moindre mesure l'UGT1A9, sont les isoenzymes qui interviennent principalement dans le métabolisme du paracétamol, plutôt que l'UGT1A1. Par conséquent, les résultats des études modernes indiquent que le paracétamol est sans danger pour les patients atteints du syndrome de Gilbert à des doses normales **(346, 354, 355, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364)**.

1.2.- La morphine :

La morphine est un analgésique opioïde indiqué dans le traitement des douleurs aiguës et chroniques modérées à sévères, il est principalement métabolisé dans le foie par glucuronidation par l'enzyme UGT2B7 et dans un moindre degré par l'UGT1A3.

Il a été rapporté le cas d'un patient atteint de la maladie de Gilbert qui a reçu une anesthésie à prédominance de morphine pour une chirurgie cardiaque, il était excessivement obtus dans la période post-opératoire.

Il est postulé que le défaut responsable de la conjugaison inadéquate de la bilirubine qui est caractéristique de la maladie de Gilbert peut également être responsable d'un effet prolongé de la morphine puisque les deux composés sont probablement métabolisés de façon similaire par conjugaison dans le foie. Cependant, cette conception a été abandonnée sur la base des dernières études, prouvant que dans le syndrome de Gilbert, seule l'UGT1A1 est défectueuse et non l'UGT2B7. Il n'y a donc aucun effet négatif sur la glucuronidation de la morphine **(365, 366, 367)**.

2.- Anesthésiants :

La prise en charge anesthésique des patients atteints du syndrome de Gilbert est un véritable défi. Il est important que les anesthésistes tiennent compte de la diminution de l'activité de la glucuronosyltransférase chez ces patients lorsqu'ils les soumettent à l'anesthésie afin d'éviter une toxicité per-opératoire.

De nombreux médicaments anesthésiques sont métabolisés ou bio-transformés par diverses enzymes, dont la glucuronosyl-transférase, dans le foie. Sa déficience entraîne une accumulation potentielle de ces médicaments, ce qui entraîne une toxicité anesthésique avec des conséquences catastrophiques.

L'anesthésie régionale doit être la technique préférée, car elle préserve probablement le flux sanguin hépatique tant que la normotension est maintenue, si une anesthésie générale est nécessaire, il est préférable d'utiliser des agents à action brève ou à métabolisme extra-hépatique **(368, 369, 370, 371)**.

2.1.- Le propofol :

Il a été préféré à la thiopentone ou à la kétamine car sa clairance est supérieure au débit sanguin hépatique, ce qui suggère une voie d'excrétion extra-hépatique offrant ainsi une plus grande marge de sécurité. De plus, la thiopentone et la kétamine altèrent la fonction hépatique de manière dose-dépendante **(372, 373)**.

2.2.- L'atracurium :

Il a été préféré en raison de ses voies métaboliques alternatives, son élimination est indépendante de l'état des fonctions rénale et hépatique du malade, il se dégrade spontanément et rapidement grâce à deux facteurs : une réaction chimique spontanée au pH sanguin (réaction de dégradation d'Hofmann) et une hydrolyse ester indépendante des pseudocholinestérases **(374)**.

Le mivacurium et **le cis-atracurium** sont d'autres alternatives plus sûres en raison de leurs voies métaboliques similaires **(375)**.

2.3.- Les agents inhalés :

2.3.1.- L'halothane :

Il doit être évité pendant l'anesthésie car il s'agit d'un métabolisme hépatique élevé à 20 % et il a le potentiel de provoquer un ictère postopératoire.

2.3.2.- Le sévoflurane et **l'isoflurane :**

Ils subissent respectivement 2% et 0,2% de métabolisme hépatique.

Tous les agents volatils diminuent le débit sanguin total du foie, et cette diminution est maximale avec l'halothane et minimale avec l'isoflurane.

Pour les raisons mentionnées ci-dessus, l'isoflurane est l'agent anesthésique volatil le plus préféré dans le syndrome de Gilbert **(376)**.

3.- Anti-rétroviraux :

L'hyperbilirubinémie est fréquemment observée chez les patients lors d'un traitement par des antirétroviraux inhibiteurs de protéase utilisés dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'hépatite virale chronique tels que l'atazanavir ou l'indinavir **(377, 378)**.

3.1.- Atazanavir :

L'atazanavir, n'est pas un substrat important pour la glucuronidation, mais il est capable d'inhiber les protéines UGT, notamment UGT1A1, UGT1A3 et UGT1A4.

En présence du variant UGT1A1*28, il a été démontré que les patients traités par l'atazanavir développaient des degrés variables d'hyperbilirubinémie.

Une étude portant sur 106 patients séropositifs traités par l'atazanavir a montré une augmentation significative des taux de bilirubine sérique associée à la présence d'UGT1A1*28, UGT1A3*2 ainsi que d'UGT1A7*12 et UGT1A7*3 **(196, 379, 380)**.

3.2.- Idinavir :

Une hyperbilirubinémie non conjuguée se développe chez 25 % des patients recevant de l'indinavir.

Le métabolisme de l'indinavir se produit principalement par l'isoenzyme 3A4 du cytochrome P450.Cependant, l'identification d'un métabolite glucuronide de l'indinavir suggère que ce médicament peut également servir de substrat à l'UGT.

On pense que l'inhibition compétitive de l'UGT1A1 est le mécanisme à l'origine de l'ictère et, en effet, il a été constaté que les personnes atteintes du SG présentaient des taux plus élevés de bilirubine non conjuguée lorsqu'elles étaient traitées par ce médicament **(378,381)**.

4.- Anti-tumoraux :

Les agents anti-néoplasiques utilisés en oncologie ont des effets secondaires toxiques. Une altération du métabolisme de ces médicaments peut entraîner des toxicités graves, voire mortelles.

Récemment, des effets indésirables d'agents anti-cancéreux ont été observés chez les patients atteints de SG en raison d'une réduction de la glucuronidation du médicament ou de la bilirubine.

Certains agents chimio-thérapeutiques semblent être la principale préoccupation lors de la prise en charge d'un patient atteint de SG.

Le plus documenté d'entre eux est l'irinotécan, un médicament anti-cancéreux, qui est métabolisé via l'isoforme UGT1A1 **(383, 384)**.

4.1.- Méthotrexate :

Une attention est portée lors des traitements par méthotrexate, qui est un inhibiteur enzymatique d'UGT1A1 dont l'effet semble accentué en cas de syndrome de Gilbert.

À des doses plus élevées, le méthotrexate peut inhiber de manière compétitive la conjugaison et l'excrétion de la bilirubine.

Il en résulte une hyperbilirubinémie, une concentration plasmatique de méthotrexate plus élevée et une excrétion plus lente **(383, 387)**.

4.2.- Tocilizumab :

Le Tocilizumab est un anticorps monoclonal utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR), il peut induire une hyperbilirubinémie chez les patients atteints de PR en particulier chez ceux qui présentent les génotypes UGT1A1*6/*6, *6/*28 et *28/*28.

De par son potentiel d'inhiber la glucuronidation médiée par l'UGT1A1, le Tocilizumab peut influencer non seulement le métabolisme de la bilirubine, mais aussi la détoxification des médicaments dépendante de l'UGT1A1 augmentant ainsi le risque d'effets indésirables pendant le traitement de la PR **(388, 389)**.

4.3.- Inhibiteurs de la tyrosine kinase :

4.3.1.- Le pazopanib :

Il est indiqué chez l'adulte en traitement de 1ère ligne des cancers du rein avancé, il peut affecter les personnes atteintes d'un SG en augmentant la bilirubine. Des études concluent que le pazopanib peut être un inhibiteur de l'UGT1A1 **(383)**.

4.3.2.- Le sorafénib :

Il est indiqué dans le traitement du carcinome hépatocellulaire. Les patients présentant les allèles UGT1A1*28 homozygote et qui sont sous sorafénib peuvent présenter une augmentation de la bilirubine plasmatique en raison d'une exposition plus élevée au sorafénib **(383)**.

4.4.- Irinotécan :

L'irinotécan (camptothécine) est un inhibiteur de l'enzyme topoisomérase I qui interrompt la réplication de l'ADN dans les cellules cancéreuses, ce qui entraîne la mort cellulaire.

Il présente une activité anti tumorale prometteuse dans diverses tumeurs expérimentales tel que les cancers digestifs (le cancer gastrique, le cancer colorectal), le cancer du poumon ainsi que les cancers gynécologiques **(390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398)**.

Le polymorphisme du gène UGT1A1 et le risque de toxicité de l'irinotécan chez les personnes atteintes du cancer colorectal :

La chimiothérapie à base d'irinotécan est un traitement standard de première ou de deuxième intention pour le traitement du cancer colorectal métastatique. Cependant, il a des toxicités limitant la dose vu que sa marge thérapeutique est étroite. Ces effets sont principalement la leucopénie, la thrombocytopénie et la diarrhée qui peut être grave et ne répond pas de manière adéquate aux agents anti-diarrhéiques classiques ce qui nécessite souvent l'arrêt ou la réduction de la dose du médicament **(399, 400, 401)**.

L'irinotécan est métabolisé par une estérase pour former un métabolite actif, le SN-38, avec une activité anti-tumorale 100 fois plus élevée et 100 à 1000 fois plus cytotoxique que la molécule mère **(390, 402)**.

Le SN-38 est ensuite conjugué par l'UGT1A1 pour donner le SN-38 glucuronide (SN-38G) qui va être excrété dans la bile ; lequel est hydrolysé en SN38 et en acide glucuronique dans l'intestin grêle par la ß-glucuronidase bactérienne provoquant ainsi une diarrhée **(403, 404)**.

Une étude ayant confirmé que l'enzyme UGT1A1 est une enzyme clé dans le métabolisme et l'inactivation du SN-38 a suggéré que la fonction et le polymorphisme du gène UGT1A1 comme dans le syndrome de Gilbert sont étroitement liés à la toxicité de l'irinotécan **(405)**.

Les taux de glucuronidation du SN-38 sont en effet significativement plus faibles chez les personnes homozygotes et hétérozygotes pour l'allèle variant (TA) 7TAA par rapport au génotype sauvage **(400, 406)**.

La toxicité létale peut entraîner l'échec de la chimiothérapie à base d'irinotécan chez les patients atteints de CCR métastatique, et des preuves pharmacologiques cliniques ont révélé que la toxicité induite par la chimiothérapie de l'irinotécan est liée à l'exposition au SN-38 et aux polymorphismes génétiques du gène UGT1A1 **(407)**.

Des études ont montré qu'il existe des différences significatives dans la distribution du polymorphisme du gène UGT1A1 dans différents groupes ethniques, ce qui pourrait entraîner des différences dans les effets indésirables induits par l'irinotécan dans différents groupes ethniques **(408, 409, 410, 411)**.

Dans la population chinoise d'ethnie Han, la prévalence des mutations UGT1A1*28 était significativement plus faible par rapport aux populations américaines et européennes, et la question de savoir si les mutations UGT1A1*28 peuvent être utilisées comme prédicteur de la toxicité de l'irinotécan reste à étudier dans cette population **(385, 386)**.

Par conséquent, le schéma thérapeutique de l'irinotécan doit être individualisé pour différents groupes ethniques. Afin de réduire la prévalence de la toxicité de l'irinotécan,

certains auteurs ont donc suggéré le dépistage du polymorphisme du promoteur de l'UGT1A1 chez les patients atteints de cancer **(399)**.

Concernant la prédisposition à la toxicité de l'irinotécan par l'UGT1A1*28, des résultats contradictoires ont été rapportés.

Dans une étude portant sur 66 patients les variants UGT1A1*28 n'ont pas permis de prédire tous les cas de neutropénie associée à l'irinotécan et dans une autre étude, UGT1A1 * 28 a été suggéré comme biomarqueur pour la prédiction de la neutropénie induite par l'irinotécan et des toxicités dans le CCR chez les Caucasiens **(406, 412)**.

Il a été démontré dans une cohorte de 75 patients que l'UGT1A1*28 avait un impact sur la neutropénie induite par l'irinotécan mais pas sur la toxicité gastro-intestinale, alors que d'autres auteurs ont observé chez 95 patients traités par l'irinotécan une association significative entre UGT1A1*28 et diarrhée mais pas de neutropénie **(414, 415)**.

Les auteurs d'une autre étude n'ont pas observé d'association entre les effets secondaires induits par l'irinotécan et l'UGT1A1*28 et ont à l'inverse rapporté une tendance opposée sur la base de six patients atteints de SG sans aucun événement indésirable observé **(416)**.

Plus de 50 types d'altérations des locus du gène UGT1A1 ont été signalés dans des études antérieures et la relation entre les polymorphismes des gènes UGT1A1*28, UGT1A1*6 et les effets indésirables de l'irinotécan est importante, UGT1A1*6/ *28 peut être utile comme marqueur pour prévenir les effets indésirables graves de l'administration d'irinotécan **(405, 417, 418)**.

Dans les populations asiatiques ou l'incidence des mutations UGT1A1*6 atteint 20 %, principalement chez les Asiatiques de l'Est, l'UGT1A1* 6 est également un facteur de risque important associé à une neutropénie sévère et il est important pour la prédiction de la toxicité sévère chez les patients recevant un traitement par l'irinotécan, alors que chez les caucasiens le rôle potentiel de l'UGT1A1* 6 n'a pas été bien clarifié concernant le traitement par l'irinotécan **(419, 420, 421)**.

La protéine UGT1A7 est une autre variante qui présente une activité spécifique environ cinq fois plus élevée avec le SN-38 que l'UGT1A1.

Les single nucleotide polymorphism (SNP) au locus du gène UGT1A7 modifient l'activité enzymatique et/ou la transcription. L'UGT1A7*12 (57T / G), une variante de la boîte TATA) entraîne une réduction de 70% de l'activité transcriptionnelle et UGT1A7 *12 s'est avéré se produire en déséquilibre de liaison avec UGT1A7 * 3.

Des études d'association SNP ont en outre montré une association d'UGT1A7 * 12 homozygote dans 75% avec UGT1A1 * 28 homozygote. Dans ce contexte, une étude récente a démontré que la combinaison de variantes de l'UGT1A1 et de l'UGT1A7 peut être utilisée pour prédire la toxicité de l'irinotécan **(422, 423)**.

Dans une étude sur le traitement à faible dose d'irinotécan chez 105 patients atteints d'un CCR génotypés, aucune association de toxicité avec l'UGT1A1*28 seul n'a été détectée, alors que les variants de l'UGT1A7 seuls étaient associés à la diarrhée, à la thrombocytopénie et aux réductions de dose. Lorsque les marqueurs étaient combinés, l'haplotype était supérieur pour la prédiction de la thrombocytopénie, de la leucocytopénie et des réductions de dose de médicament dans cette étude.

Dans une autre étude, l'UGT1A7 a également été identifié comme marqueur de toxicité chez les patients atteints d'irinotecan.

Par ailleurs chez des rats Gunn, il a été montré que les UGT intestinales et pas seulement les UGT hépatiques telles que l'UGT1A1 semblent être critiques pour la toxicité induite par l'irinotécan **(424, 425, 426, 427)**.

Il est à noter qu'il serait intéressant de développer des stratégies pour induire une activité de glucuronidation et ceci a été observé par l'exposition au café même en présence des polymorphismes de SG **(428)**.

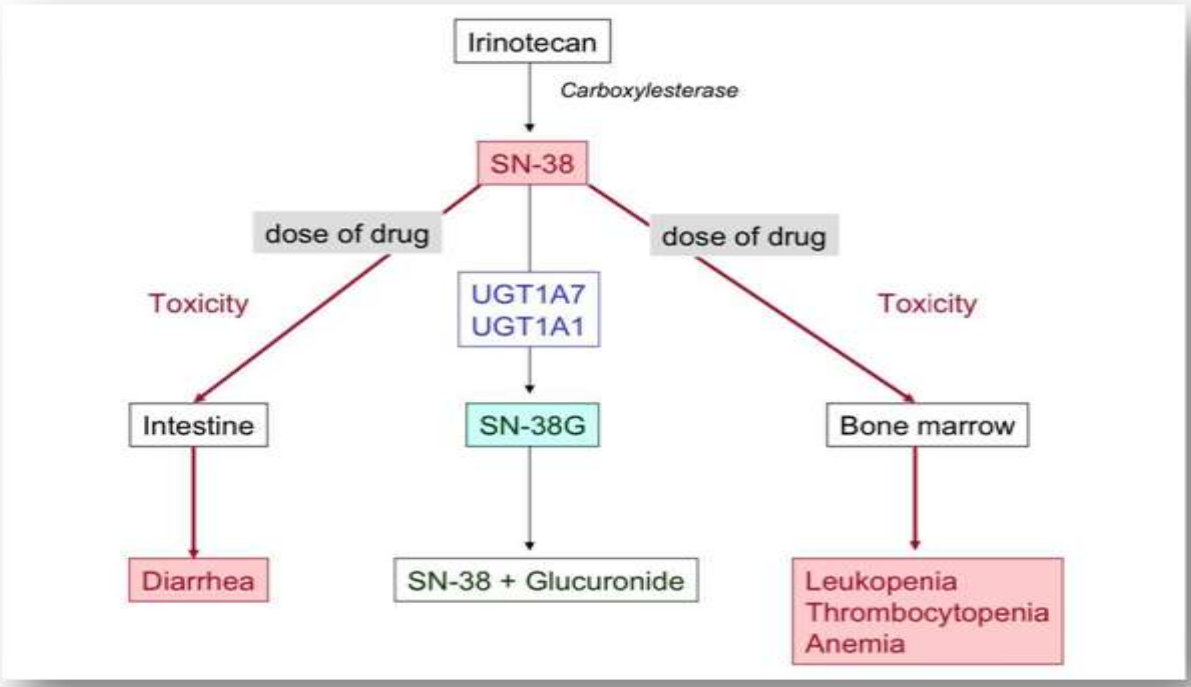


Fig. 13 : Métabolisme et risque de toxicité dans le traitement par l'irinotécan **(225)**.

5.- Autres médicaments :

L'éthinylestradiol : il est glucuronidée par l'UGT1A1 humaine et il est aussi un inhibiteur compétitif de l'UGT1A1 humaine, il provoque souvent un ictère dans la maladie de Gilbert **(384)**.

Le benzoate d'œstradiol : Suite à son administration orale chez 8 patients atteints du syndrome de Gilbert, diverses anomalies de la formation et de la conjugaison des œstradiols et des œstrogènes ont été observés ; à en juger par l'excrétion urinaire de ces métabolites **(359)**.

Le menthol : administré par voie orale , une glucuronidation significativement retardée a été démontrée chez les patients atteints du syndrome de Gilbert par rapport aux témoins normaux **(359)**.

L'isotrétinoïne utilisée pour traiter l'acné, il est prouvé qu'il réduit significativement la bilirubine sanguine chez les patients atteints du syndrome de Gilbert au cours des 10 premières semaines de traitement **(357, 413)**.

Influence pharmacologique connue des variants d'UGT1A1 réduisant d'au moins 30 % la clairance hépatique	
Atazanavir	Ézétimibe
Étoposide	Irinotécan
Impact modéré à mineur des variants d'UGT1A1 sur le principe actif ou ses métabolites pouvant révéler des effets indésirables ou induire des interactions médicamenteuses	
Aspirine	Losartan
Buprénorphine	R-méthadone
Carvédilol	Moxifloxacine
Cérivastatine	Naltrexone
Clozapine	Paracétamol
Delta-9-tétrahydrocannabinol	Phénytoïne
Desvenlafaxine	Raloxifène
Édaravone	Raltégravir
Épigallocatéchine gallate	Acide salicylique
Estradiol	Simvastatine
Éthinylestradiol	Tétrahydrocannabinol
Fulvestrant	L-thyroxine
Furosémide	Warfarine
Lévofloxacine	

Fig. 14 : Médicaments dont le métabolisme peut être modifié en cas de syndrome de Gilbert **(428)**.

Chapitre III :

Méthodologie de l’étude

1.- Objectifs de l'étude :

1.1.- Objectifs principaux :

- Établir la relation entre l'augmentation sérique de la bilirubine libre et les mutations ou polymorphismes du gène UGT1A1 codant l'enzyme de conjugaison de la bilirubine.
- Évaluer le retentissement de l'augmentation sérique modérée de la bilirubine libre sur d'autres paramètres biochimiques et sur l'état clinique des patients.

1.2.- Objectifs secondaires :

- Etudier le polymorphisme du gène UGT1A1 dans la population algérienne (UGT1A1*28, UGT1A1*6).
- Analyser la relation du polymorphisme de l'UGT1A1 et la susceptibilité à certaines maladies liées au stress oxydatif (diabète sucré, maladies cardiovasculaires)
- Estimer le taux d'incidence du syndrome de Gilbert dans la population générale.

2.- Matériels et méthodes :

2.1.- Type, lieu et période de l'étude :

2.1.1.- Type de l'étude :

Il s'agit d'une étude descriptive, observationnelle, prospective et transversale.

2.1.2.- Lieu et champ de l'étude :

L'étude est réalisée au niveau du laboratoire de biochimie de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran et du laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire de l'Etablissement Universitaire d'Oran.

Les malades ont été recrutés à travers le territoire national au niveau des services de gastrologie, d'hématologie, de pédiatrie des centres suivants :

- Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran (HMRUO)
- Hôpital Militaire Régional Universitaire de Constantine (HMRUC)
- Hôpital Central de l'armée (HCA)
- Centre hospitalo-universitaire d'Oran (CHUO)
- Etablissement hospitalier universitaire d'Oran (EHUO)
- Cabinets médicaux privés

2.1.3.- Période de l'étude :

La durée de cette étude est de 4 ans s'étalant de Janvier 2020 à Décembre 2023.

2.2.- Population d'étude :

Cette étude a porté sur 2 groupes de patients présentant et/ ou aux antécédents d'hyperbilirubinémie libre isolée, suspectés cliniquement du syndrome de Gilbert.
Le groupe de patients n˚1 est représenté par les adultes et le groupe de patients n˚2 est représenté par les enfants.

2.2.1.- Critères d'inclusion :

- **Groupe 1 :**
  - Patients présentant une hyperbilirubinémie libre isolée (BRB totale ≥ 12 mg/L, BRB indirecte ≥ 8mg/L)
  - Patients aux antécédents d'hyperbilirubinémie libre isolée
  - Patients suspectés cliniquement du syndrome de Gilbert
  - Patient algérien
  - Tout sexe confondu
  - Age ≥ 18ans
  - Consentement éclairé à participer à l'étude
- **Groupe 2 :**
  - Nouveaux nés présentant un ictère à bilirubine libre non hémolytique (BRB totale ≥ 17mg/L)
  - Enfants de patients du groupe 1, aux antécédents d'ictère néonatal à bilirubine libre non hémolytique
  - Enfants présentant une hyperbilirubinémie libre isolée non hémolytique (BRB totale ≥ 12mg/L, BRB indirecte ≥ 8mg/L)
  - Patient algérien
  - Tout sexe confondu
  - Age : de la naissance à 17ans
  - Consentement éclairé de l'autorité parentale à participer à l'étude

2.2.2.- Critères de non inclusion :

Les critères de non inclusion sont les mêmes pour les deux groupes de patients, n'ont pas été inclus dans cette étude les patients présentant :

- Une hyperbilirubinémie libre de cause hémolytique
- Une hyperbilirubinémie conjuguée
- Une hyperbilirubinémie mixte.

2.2.3.- Critères d'exclusion :

Les patients des deux groupes dont l'analyse génétique n'a pas révélé de résultat (absence de bande à l'électrophorèse).

2.2.4.- Le consentement :

Pour l'étude génétique, un formulaire de consentement qui comporte les nom et prénom, la date, le lieu de naissance et l'adresse du patient doit être signé et daté par le patient ou l'autorité parentale (Annexes I et II).

2.2.5.- Les renseignements personnels :

Nous avons établi une fiche de renseignements (questionnaire) pour chaque groupe de patients (Groupe n°1 et Groupe n°2).
Les informations collectées par un interrogatoire direct des patients ou de l'autorité parentale d'une part et l'examen clinique complet effectué par le médecin traitant d'autre part sont reportées sur la fiche de recueil, pré-établie.
Les informations sont recueillies par un interrogatoire direct des patients qui dure entre 15 et 20 mn.
La complétude des données a nécessité le recours au dossier médical et au médecin traitant (examen radiologique, bilans biologiques antérieurs…).
L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide des logiciels SPSS**23** (Statistical Package for the Social Sciences. Version 23) et **S**TATISTICA**10.**

La fiche de renseignements pour le groupe de patients n°1 (Annexe III) comporte Douze (12) volets portant sur :

[1] Identification du patient :
Nom et Prénom, âge au moment du prélèvement, sexe, origine géographique, numéro de téléphone.

[2] Facteurs anthropométriques :
Les caractéristiques anthropométriques recueillies sont : la taille, le poids au moment de l'entretien.

L'indice de masse corporelle (IMC ou BMI) appelé aussi indice de Quételet, est une grandeur qui permet d'estimer la corpulence d'une personne. Il est défini par le rapport poids (kg)/taille (m^2).

L'interprétation de l'IMC selon OMS 2014 **(442)** :

- Insuffisance pondérale définie par un IMC< 18,5kg/m^2
  - ✓ Insuffisance pondérale sévère <16,5kg/m^2
  - ✓ Insuffisance pondérale modérée 16,00kg/m^2 – 16,99kg/m^2
  - ✓ Insuffisance pondérale légère 17,00 kg/m^2 – 18,49kg/m^2
- Corpulence normale définie par un IMC entre 18,50 kg/m^2 – 24,99 kg/m^2
- Surpoids défini par un IMC ≥ 25 kg/m^2
  - ✓ Pré- obésité se situant entre 25kg/m^2 – 29,99kg/m^2
  - ✓ Obésité définie par un IMC ≥30 kg/m^2
    - Obésité classe I : 30kg/m^2 – 34,99kg/m^2
    - Obésité classe II : 35kg/m^2 – 39,99kg/m^2
    - Obésité classe III : ≥40kg/m^2

[3] Motif de la demande d'analyse :
Bilan de routine, visite systématique, symptômes évocateurs, suspicion du syndrome de Gilbert

[4] Antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie ou d'ictère :
Notion d'hyperbilirubinémie familiale

[5] Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie ou d'ictère :
Age d'apparition ou de découverte

[6] Facteur déclenchant l'hyperbilirubinémie ou l'ictère :
Hyperbilirubinémie chronique ou intermittente, secondaire à un évènement, un facteur

[7] Symptomatologie clinique :
Symptômes révélateurs, symptômes associés.

[8] Exploration radiologique :
Exploration(s) demandées(s).

[9] Antécédents personnels médicaux :
Maladies hépatiques, maladies hématologiques, pathologies chroniques, autre(s).

[10] Traitement :
Traitement éventuel, traitement durant le mois précédant le prélèvement, types de traitement.

[11] Consommation de tabac

[12] Consommation d'alcool

La fiche de renseignements pour le groupe de patients n°2 (Annexe IV) comporte six (6) volets portant sur :

[1] Identification du patient :
Nom et Prénom, âge au moment du prélèvement, sexe, origine géographique, numéro de téléphone des parents.

[2] Motif de la demande d'analyse :
Bilan de contrôle.

[3] Parents :
Groupe sanguin père, groupe sanguin mère, consanguinité.

[4] Antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie ou d'ictère :
Notion d'hyperbilirubinémie chez les parents, hyperbilirubinémie et/ou ictère néonatal dans la fratrie.

[5] Type d'allaitement reçu chez les nouveau-nés :
Allaitement maternel exclusif, artificiel, mixte.

[6] Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie ou d'ictère chez les enfants :
Age d'apparition ou de découverte, notion d'ictère néonatal.

2.2.6.- Calcul du nombre de sujets nécessaire (NSN) :

Le nombre de sujets nécessaire à l'étude NSN ou la taille de l'échantillon est calculée selon la formule :

$$NSN = \frac{t^2 \times (\mathrm{p}) \times (1 - \mathrm{p})}{e^2}$$

- **t** : écart type réduit =1.96
- **e** : degré de précision de 3%.
- **p** : prévalence = 0,03

Le gène UGT1A1 qui code pour l'enzyme de conjugaison de la bilirubine est le siège de plusieurs variations pouvant affecter l'activité ou l'expression enzymatique. Ces dernières sont à l'origine de troubles métaboliques liés à la conjugaison de la bilirubine tels que le syndrome de Gilbert.

Le génotype le plus courant du syndrome de Gilbert est UGT1A1*28, c'est un polymorphisme homozygote [A(TA) 7TAA] dans le promoteur du gène UGT1A1 (UGT1A1*28) qui entraîne une diminution de l'activité UGT1A1 et se traduit par une augmentation de la bilirubine libre.

L'UGT1A1*28 a été identifié comme la mutation la plus fréquente chez les sujets caucasiens, sa prévalence est de 3 à 10%.

Il a été retenu le nombre de **199 patients**.

2.3.- Matériels :

2.3.1- Les prélèvements biologiques :

Les prélèvements sanguins ont été effectués sur deux tubes différents :

- Un à deux tubes sec, le matin à jeun.
- Un ou deux tubes stériles de 5ml contenant de l'EDTA (Éthylène diamine-tétra acétique) utilisé comme anticoagulant et comme inhibiteur des nucléases, la quantité de sang prélevée varie selon le groupe de patient étudié, il n'est pas nécessaire d'être à jeun.

Le sérum recueilli sur tube sec, après centrifugation, a servi au dosage des différents paramètres biochimiques.

Le sang total recueilli sur tube EDTA a servi au bilan hématimétrique et à l'extraction de l'ADN en vue de l'analyse génétique.

Les dosages biochimiques et le bilan hématimétrique ont été effectués le jour du prélèvement.

En cas de non disponibilité d'un paramètre biochimique donné au moment du prélèvement, les échantillons sont aliquotés et conservés à - 20°C.

L'extraction de l'ADN est réalisée sur sang frais ou sur sang conservé à -20°C.

2.3.2- Matériels utilisés :

2.3.2.1.- Equipements :

Pour l'étude biologique, le matériel suivant a été utilisé :

- Centrifugeuse Hettich Rotofix 32A
- Réfrigérateur /congélateur à -20°C
- Autoanalyseurs :
  -Cobas Integra 400 plus Roche Diagnostics
  -AU 480 Beckman Coulter
  -XN- 1000 Sysmex

Pour l'étude génétique, le matériel suivant a été utilisé :

- Centrifugeuse Sigma 3-18K
- Micro-centrifugeuse eppendorf Centrifuge 5702
- Bac à glace
- Bain marie HumAqua 5
- Agitateur type vortex
- Agitateur magnétique chauffant
- pH-mètre
- Balance de précision
- Réfrigérateur/congélateur à - 20ºC
- Spectrophotomètre Agilent Technologies Cary 60 UV-VIS
- Thermocycleur BIO-RAD C 1000 Touch
- Cuve à électrophorèse horizontale BIORAD (dimension gel d'agarose 20x25cm)
- Cuve à électrophorèse horizontale Minigel (dimension gel d'agarose 10x8cm)
- Molecular Imager BIO-RAD Gel Doc XR+

2.3.2.2.- Consommables et réactifs (Annexes V et VI) :

- Préparation des réactifs (Annexe VII)
- Préparation du gel d'agarose (Annexe VIII)

2.4.- Méthodes :

Tous les patients ont bénéficié d'un bilan hématimétrique, un bilan biochimique et une analyse génétique en vue de rechercher les polymorphismes du gène UGT1A1 les plus couramment décrits dans le syndrome de Gilbert.

2.4.1.- Bilan hématimétrique :

Les prélèvements réalisés sur EDTA ont permis la mesure du taux d'hémoglobine et la numération des réticulocytes. Ces mesures ont été faites sur appareil Sysmex XN-1000.

2.4.2.- Bilan biochimique :

2.4.2.1.- Substrats et enzymes :

Les substrats et enzymes ont été mesurés sur les deux analyseurs Cobas Integra 400 plus de Roche Diagnostics et AU 480 de Beckman Coulter (Annexe IX).

1.- Glucose :

Le glucose est dosé par la méthode de référence enzymatique à l'hexokinase (Annexe IX.a)

Valeurs usuelles chez l'adulte : 0,74g/L- 1,06g/L

2.- Acide urique :

L'acide urique est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique (Annexe IX.b)

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : 34mg/L- 70mg/L
- Femmes : 24mg/L- 57mg/L

3.- Triglycérides :

Les triglycérides sont dosés par une méthode colorimétrique enzymatique (Annexe IX.c)

Valeurs usuelles chez l'adulte : < 1,5g/L

4.- Cholestérol :

Le cholestérol est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique (Annexe IX.d)

Valeurs usuelles chez l'adulte : < 2g/L

5.- HDL c :

Le HDLc est dosé par une méthode colorimétrique enzymatique homogène (Annexe IX.e)

Interprétation des résultats **:** selon National Cholesterol Education Program (NCEP) guidelines **(443)**.

- HDLc<0,40g/L facteur de risque élevé de maladies coronaires
- HDLc>0,60g/L facteur de risque faible de maladies coronaires

6.- LDL c :

Le LDLc est déterminé par la formule de Friedwald

Cholestérol total(g/L) – (HDLc (g/L) + Triglycérides(g/L)/5)

Interprétation des résultats : selon National Cholesterol Education Program-Adults treatment group (NCEP-ATP) pour le diagnostic et le traitement des patients souffrant d'hypercholestérolémie, les valeurs guides pour l'estimation du risque de maladies coronariennes **(444)**.

Adultes :

- Optimal :< 1g/L
- Presque optimal/légèrement élevé : 1-1,29 g/L
- Limite supérieure : 1,30- 1,59 g/L
- Élevé : 1,60- 1,89 g/L
- Risque très élevé :> 1,9 g/L

7.- Calcul du ratio HDLc/LDLc :

8.- Fer :

Le fer est dosé par une méthode colorimétrique (Annexe IX.f)

Valeurs usuelles chez l'adulte : 33 µg/dL- 193 µg/dL

9.- UIBC (Unsaturated Iron Binding Capacity) :

L'UIBC ou la Capacité Latente de Fixation de la transferrine (CLF) est dosée par une méthode colorimétrique (Annexe IX.g)

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : 125µg/dL- 345µg/dL
- Femmes : 135µg/dL- 392µg/dL

10.- TIBC (Total Iron Binding Capacity) :

La TIBC ou la Capacité Totale de Fixation du Fer (CTF) est calculée selon la formule suivante :

TIBC (µg/dL)= Fer (µg/dL)+ UIBC (µg/dL)

Valeurs usuelles chez l'adulte : 250 µg/dL – 400 µg/dL

11.- CS (Coefficient de saturation de la Transferrine) :

Le CS est calculé selon la formule suivante :

CS (%)= (Fer / TIBC) x100

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : 20- 40%
- Femmes : 15- 35%

12.- Albumine :

L'albumine est dosée par une méthode colorimétrique en point final (Annexe IX.h)
Valeurs usuelles chez l'adulte : 35g/L- 52g/L

13.- Protéines totales :

Les protéines totales sont dosées par une méthode colorimétrique (Annexe IX.i)

Valeurs usuelles chez l'adulte : 60g/L- 80g/L

14.- Bilirubine totale :

Elle est dosée par une méthode colorimétrique par diazoréaction (Annexe IX.j)

Valeurs usuelles :

- Adultes : jusqu'à 12mg/L
- Enfants ≥ 1 mois : jusqu'à 10mg/L

15.- Bilirubine directe :

La bilirubine directe est dosée par une méthode colorimétrique par diazoréaction (Annexe IX.k)

Valeurs usuelles chez l'adulte : ≤ 2mg/L

16.- Bilirubine indirecte :

La bilirubine indirecte est déduite par calcul :

Bilirubine indirecte (mg/L)= Bilirubine totale (mg/L)- Bilirubine directe (mg/L)

Valeurs usuelles : < 10mg/L

17.- Aspartate amino transférase ASAT :

L'ASAT est dosé par une méthode enzymatique cinétique en UV standardisée, méthode recommandée par l'IFCC International Federation of Clinical Chemistry utilisant le pyridoxal phosphate comme activateur (Annexe IX.l)

Valeurs usuelles chez l'adulte :
Hommes : jusqu'à 50U/L
Femmes : jusqu'à 35U/L

18.- Alanine amino transférase ALAT :

L'ALAT est dosé par une méthode enzymatique cinétique en UV standardisée, méthode recommandée par l'IFCC International Federation of Clinical Chimistry utilisant le pyridoxal phosphate comme activateur (Annexe IX.m)

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : jusqu'à 50U/L
- Femmes : jusqu'à 35U/L

19.- Phosphatase alcaline PAL :

La Phosphatase alcaline est dosée par une méthode colorimétrique standardisée, méthode recommandée par l'IFCC utilisant le 2-amino-2-méthyl-1-propanol comme tampon et les cations de magnésium et de zinc (Annexe IX.n)

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : jusqu'à 50U/L
- Femmes : jusqu'à 35U/L

20.- Gamma glutamyl transférase GGT :

La γ-Glutamyltransférase est dosée par une méthode colorimétrique enzymatique utilisant le L-γ-glutamyl carboxy-3 nitro-4 anilide comme substrat (Annexe IX.o)

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : 8-61 U/L
- Femmes : 5-36 U/L

21.- Lactate déshydrogénase LDH :

La lactate déshydrogénase est dosée par une méthode enzymatique en UV conforme aux recommandations de l'IFCC (Annexe IX.p)

Valeurs usuelles chez l'adulte : jusqu'à 250U/L

2.4.2.2.- Protéines spécifiques :

Les dosages de la CRP, la transferrine, la céruléoplasmine et l'haptoglobine ont été effectués par des méthodes immunoturbidimétriques sur Cobas Integra (Annexe X).

1.- CRP :

Valeurs usuelles chez l'adulte : < 5mg/L

2.- Transferrine :

Valeurs usuelles chez l'adulte : 2g/L- 3,6g/L

3.- Céruléoplasmine :

Valeurs usuelles chez l'adulte :

- Hommes : 0,15g/L- 0,30g/L
- Femmes : 0,16g/L- 0,45g/L

4.- Haptoglobine :

Valeurs usuelles chez l'adulte : 0,3g/L-2g/L

2.4.3.- Analyse génétique :

L'exploration des polymorphismes du gène UGT1A1 (UGT1A1*28 et UGT1A1*6) a été réalisée par une technique de biologie moléculaire.

L'étude de l'UGT1A1*6 s'est faite par PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) ; elle consiste à réaliser une amplification suivie d'une digestion enzymatique.

L'étude de l'UGT1A1*28 s'est faite par PCR suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 8%.

2.4.3.1.- Préparation de l'ADN :

L'extraction de l'ADN est la première étape de l'analyse génétique.

En fonction de la quantité de sang ayant pu être prélevée, nous avons extrait l'ADN de nos échantillons selon deux procédés :

1. La méthode classique saline utilisant le NaCl appelée également technique de relargage par les sels ou salting out : cette technique a servi pour les échantillons dont le volume de sang est suffisant de 5 à 10ml.
2. La méthode basée sur l'utilisation de colonnes résines échangeuses d'ions à l'aide d'un kit d'extraction commercial QIAamp DNA Mini (QIAGEN) : cette technique a été réservée aux volumes de sang réduits soit moins de 5ml.

A.- Extraction de l'ADN par la technique salting out :

Le principe de cette technique consiste à précipiter les protéines et les autres contaminants à partir du lysat cellulaire en utilisant de hautes concentrations en sels. Les débris cellulaires et les enzymes sont éliminés par centrifugation. L'ADN est précipité par de l'alcool **(447)**.

La préparation de l'ADN par cette technique passe par les étapes suivantes :

- La lyse des cellules et la digestion des membranes cellulaires et nucléaires pour libérer l'ADN ;
- La précipitation et l'élimination des protéines et des autres acides nucléiques ;
- La précipitation et la récupération de l'ADN.

Les modalités de préparation de réactifs utilisés pour l'extraction d'ADN sont décrites dans l'annexe 7.

Le protocole suivi pour l'extraction d'ADN a comporté plusieurs étapes qui sont décrites dans l'annexe XI.

B.- Extraction de l'ADN par le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN) :

Les réactifs sont prêts à l'emploi, son principe repose sur la propriété des acides nucléiques de s'adsorber de manière sélective à la silice fixée sur un support. Les solutions de lavage permettent de se débarrasser des débris cellulaires et des contaminants tels que l'hémoglobine, les protéines ou les ions Fe^{2}. L'ADN est ensuite élué de la membrane de silice dans un tampon.

La préparation de l'ADN par cette technique passe par les étapes suivantes **(446)** :

- La lyse des cellules ;
- La fixation de l'ADN génomique du lysat cellulaire à la membrane d'une colonne de centrifugation QIAamp Mini ;
- Le lavage de la membrane ;
- L'élution de l'ADN génomique à partir de la membrane.

L'extraction de l'ADN est réalisée conformément au protocole fourni par le fabricant, les étapes sont décrites dans l'annexe XII.

2.4.3.2.- Contrôle de la qualité et quantification de l'extrait d'ADN :

La quantification de l'ADN extrait a été faite par une méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm d'une dilution au 1/50ème ou 1/100ème de la solution d'ADN à analyser.

Cette mesure est basée sur la propriété des acides nucléiques d'absorber la lumière dans l'UV grâce aux cycles aromatiques qui composent leurs bases. Les bases puriques et pyrimidiques absorbent fortement à 260nm **(448,449)**.

Sachant que :

Une unité de densité optique à 260nm correspond à une **solution d'ADN double brin à 50µg/mL**

La concentration d'ADN est obtenue selon l'équation suivante :

Équation 1 : concentration de l'ADN par spectrophotométrie

$$[Concentration\ (\mu g/ml) = 50\ (facteur\ de\ dilution) \times DO\ (260nm)]$$

Une seconde mesure de la DO à 280 nm permet de s'assurer de l'absence d'une éventuelle contamination par les protéines et d'apprécier la pureté de l'ADN extrait en calculant le rapport :

DO260nm/DO280nm

- Un rapport compris entre 1,7 et 2 correspond à une solution pure d'ADN ;
- Un rapport inférieur à 1,7 est le signe d'une contamination par des protéines ;
- Un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par l'ARN.

2.4.3.3.- Conservation :

L'ADN a été conservé à -20˚C jusqu'au moment de l'analyse.

La solution d'ADN est stable :

- 6mois à +2-8˚C

- 1an à -20˚C

- ≥ 7ans à -80˚C

Il est à noter que des cycles successifs de congélation/décongélation entrainent des cassures des acides nucléiques de grande taille (>10kb) c'est pourquoi il est nécessaire de réaliser des fractions aliquotes pour la conservation.

2.4.3.4.- Amplification des cibles : réaction de polymérisation en chaine (PCR)

1.- Définition :

La PCR est une méthode d'amplification enzymatique permettant de fabriquer plusieurs copies d'un segment spécifique d'ADN.

2.- Principe :

L'amplification d'ADN par PCR consiste en la production in vitro de copies de séquences d'ADN spécifiques par une ADN Polymérase thermostable isolée de la bactérie Thermus aquaticus (Taq). Cette bactérie a été isolée à partir de sources thermales chaudes et sa polymérase possède la propriété de résister à plusieurs expositions successives à de hautes températures (jusqu'à 100°C).

Cette étape d'amplification est indispensable à l'obtention d'une quantité importante d'ADN **(450,451,452)**.

3.- Les composés utilisés :

• L'ADN matrice. Il contient la séquence d'ADN à amplifier
• Deux amorces d'ADN en excès : ce sont deux fragments d'ADN simple brin de courte taille (18-30 nucléotides) complémentaires à chacune des extrémités 3' de l'ADN.
• Une ADN polymérase thermostable résistante à une température élevée (jusqu'à 100°C)
• Les quatre désoxy-nucléosides triphosphates en excès (dNTP) : dATP ; dCTP ; dGTP ; dTTP
• Le chlorure de magnésium
• Une solution tampon contenant du chlorure de potassium et du chlorure de sodium

4.- Les étapes de la PCR :

La PCR repose sur un processus cyclique de trois (3) étapes **(Fig. 15)** réalisées successivement dans un appareil automatisé appelé thermocycleur **(Fig. 16)**, celles-ci sont détaillées dans l'annexe XIII.

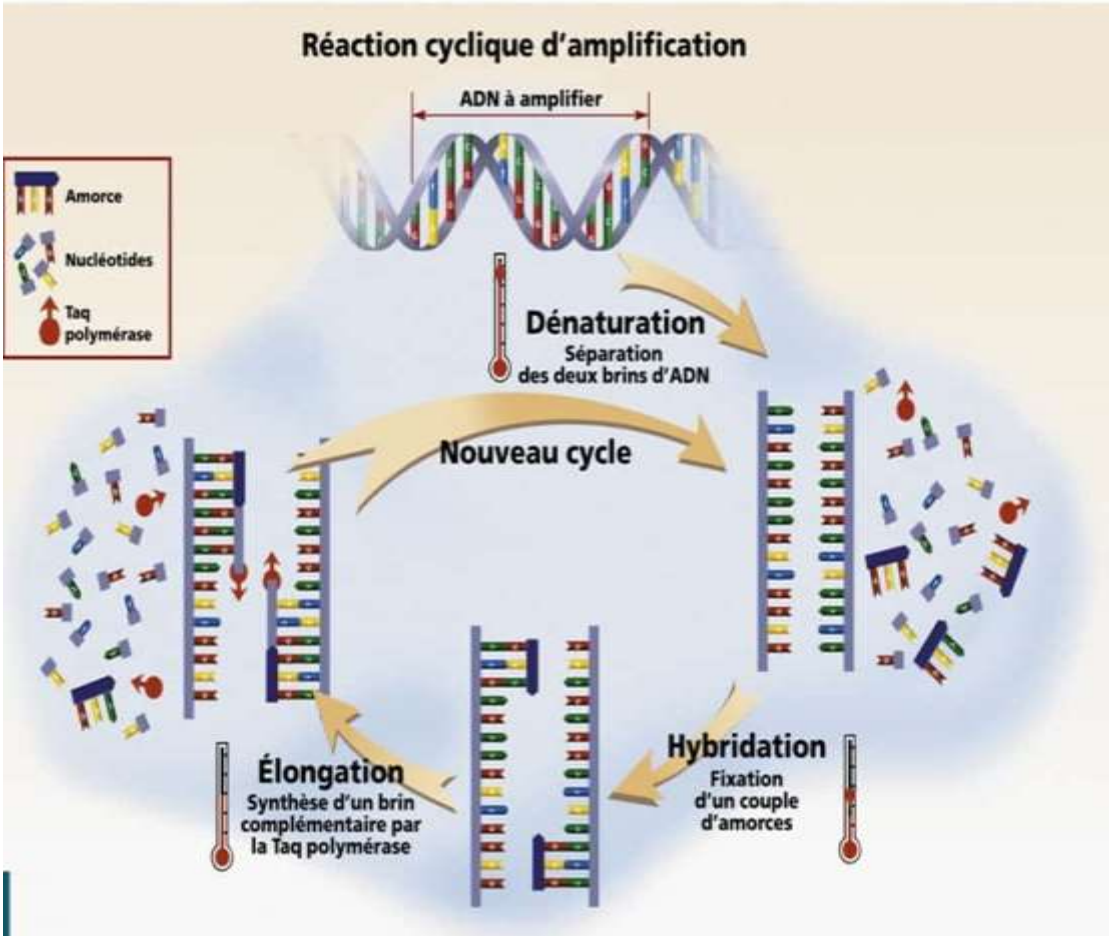


Fig. 15 : Les étapes de la PCR



Fig. 16 : Thermocycleur BIO-RAD C 1000 Touch
(Laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire EHUO)

5.- Optimisation de la PCR en fonction de la séquence à amplifier :

L'optimisation repose sur plusieurs critères, comme le choix des amorces, la température de fusion ou la concentration en $MgCl_2$:

- **Choix des amorces** :

– Taille : 20 à 30 pb.

– Amorces de séquences doivent être complémentaires du fragment à amplifier.

- **Concentration de la Taq polymérase**

Il est inutile d'utiliser trop d'enzyme : pour 25µl de réaction, 0,1 à 0,2 µl suffisent. Une quantité trop importante d'enzyme aboutit souvent à un bruit de fond important (bandes parasites) ou une inhibition de la réaction.

- **Température de fusion**

La température de fusion (Tm) des amorces doit être suffisamment élevée (au minimum 55°C). Idéalement, plus le Tm d'une amorce est élevé, moins le risque d'hybridation non spécifique est important.

- **Concentration en chlorure de magnésium** :

Il y a une relation inverse entre la quantité de dNTPs utilisée et la concentration de $MgCl_2$ (les dNTPs chélatent une partie des ions Mg^{2+} ; une augmentation des dNTPs provoque donc une diminution de la concentration en Mg libres).

- **Concentration de dNTPs**:

La concentration de chaque dNTPs doit être identique afin d'éviter les risques d'incorporation erronée (mis-incorporation des nucléotides : erreur de la Taq polymérase).

6.- Aspects pratiques de l'amplification par PCR :

L'analyse PCR peut être divisée en trois phases : une phase comportant les manipulations qui précèdent l'amplification (pré-PCR), la réaction d'amplification proprement dite, et une autre phase pour les étapes suivant l'amplification (post-PCR) ; le processus se déroulant ainsi à sens unique dans des compartiments distincts et séparés.

6.1.- La pré-PCR :

La pré-PCR implique les trois préparations suivantes :

a) La préparation des réactifs :

- Reconstitution et dilution des amorces à 10 µM
- Reconstitution et dilution des dNTP à 10 mM.
- Reconstitution du marqueur de taille.

b) La préparation des échantillons d'ADN :

Les échantillons d'ADN préalablement extraits et conservés à -20°c sont décongelés à température ambiante. En fonction de leur concentration initiale, certains échantillons d'ADN seront dilués.
Pour notre travail, nous avons fixé la concentration d'ADN à 80ng/µl. La dilution des échantillons se fera selon la formule : **Ci Vi = Cf Vf**

Ci : est la concentration de la solution mère d'ADN
Vi : est le volume à prendre de la solution mère
Cf : est la concentration de la solution fille d'ADN
Vf : est le volume final généralement de 50 µl.

c) La préparation des milieux réactionnels «Mix PCR» :

La préparation du Mix est réalisée sous hotte stérile.
Le volume à préparer est calculé selon le nombre d'échantillons et du contrôle négatif. Nous avons préparé pour chaque séquence à amplifier un Mix PCR selon le protocole suivant.

Tableau IV : Composition du milieu réactionnel pour la PCR du polymorphisme UGT1A1 *28

Mix PCR	Concentration initiale Ci	Concentration finale Cf	Volume nécessaire
DNTP	10 mM	0.4 mM	1 µl
P1	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
P2	10 µM	0.5 µM	1.25 µl
TP	5X	1X	5 µl
$MgCl_2$	25 mM	2.5 mM	2.5 µl
Taq polymérase	5 U / µl	1 U	0.2 µl
Echantillon d'ADN	100 ng	4 ng	1 µl
H_2O dd		QSP 25 µl	

Tableau V : Composition du Mix PCR du polymorphisme UGT1A1 *6

Mix PCR	Concentration initiale	Concentration finale	Volume nécessaire
DNTP	10 mM	0.4 mM	1 µl
P1	10 µM	0.4 µM	1 µl
P2	10 µM	0.4 µM	1 µl
TP	5X	1X	5 µl
$MgCl_2$	25 mM	2.5 mM	2.5 µl
Taq polymérase	5 U / µl	1 U	0.2 µl
Echantillon d'ADN	100 ng	4 ng	1 µl
H_2O dd		QSP 25 µl	

6.2.- La PCR proprement dite :

Les tubes à PCR sont placés dans le thermocycleur qui sera mis en marche selon les programmes PCR préalablement introduits pour les deux polymorphismes du gène UGT1A1 (UGT1A1*6 ou UGT1A1*28) (Tableau VI).

Tableau VI : Programme du thermocycleur PCR du gène UGT1A1

SNPs	UGT1A1*28		UGT1A1*6	
Etape	**Température**	**Temps**	**Température**	**Temps**
Activation	94°	5 mn	95°	5 mn
Dénaturation	95°	30 sec	94°	30 sec
Hybridation	57°	30 sec	55°	15 sec
Elongation	72°	30 mn	72°	1 mn
Nombre de cycles	34X		34X	
Elongation finale	72°	5 mn	72°	5 mn

6.3.- La post-PCR (contrôle de qualité) :

La post-PCR permet de contrôler la réaction d'amplification et les produits de PCR ; elle nécessite l'utilisation de contrôles positifs et négatifs, ainsi que la visualisation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose.

- **Le contrôle positif :**

Un ADN témoin connu a été utilisé pour vérifier les bonnes conditions de préparation du mélange réactionnel, d'amplification et de détection.

Si, après amplification le résultat est négatif, la réaction d'amplification n'a pas eu lieu pour une raison déterminée (présence d'inhibiteur d'enzyme), il faut recommencer la réaction. Si le résultat est positif, la réaction d'amplification a bien eu lieu.

- **Le contrôle négatif :**

C'est une préparation « Mix PCR » sans ADN ajouté révélant ainsi une éventuelle contamination si une bande devait être visualisée.

- **Visualisation des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :**

Les amplicons sont visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en présence de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/µL, agent intercalant des acides nucléiques. Un marqueur de taille de 50pb est analysé simultanément pour permettre la détermination de la taille des brins **(Fig. 17)**.

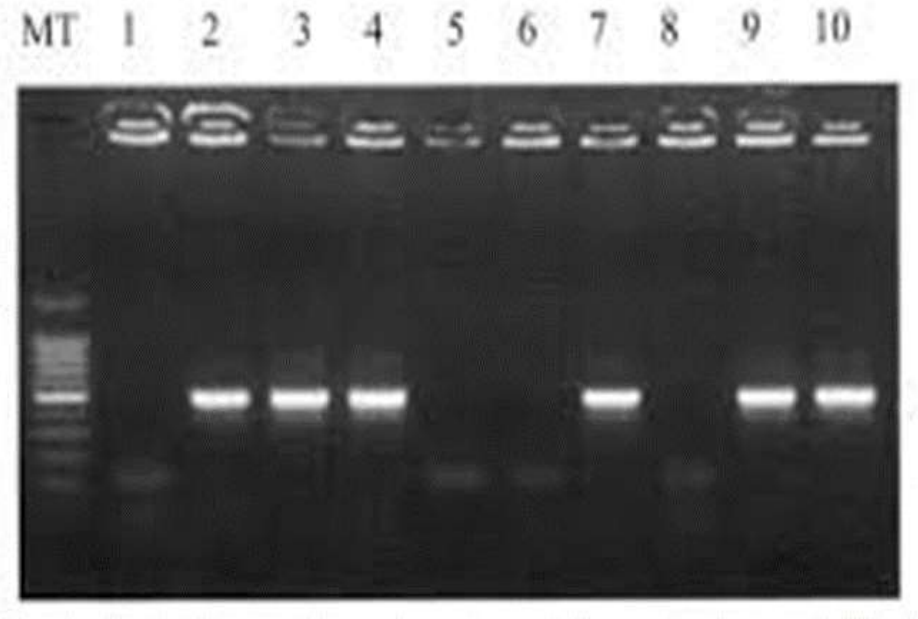


Fig. 17 : Visualisation des produits d'amplification

Ceci nous a permis de valider la réaction en vérifiant la présence des bandes d'ADN et la taille correspondant à celle du gène amplifié.

2.4.3.5.- Analyse des produits de PCR contrôlés :

La technique utilisée pour l'analyse des produits d'amplification diffère en fonction du polymorphisme recherché.
La variation mineure de séquences nucléotidiques du polymorphisme UGT1A1*6 font de la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) la technique choisie ; elle consiste à réaliser une digestion enzymatique suivie d'une migration électrophorétique des produits de digestion.

Tableau VII : Polymorphisme du gène UGT1A1 (UGT1A1*6)

SNPS	Localisation	Substitution nucléotidique	Résultat
UGT1A1*6 211G>A (rs4148323)	Exon 1	G211A	G71R

L'étude du polymorphisme l'UGT1A1*28 étant une répétition d'une paire de base au niveau de la région promotrice (TATA BOX), sa mise en évidence ne peut pas se faire par une restriction enzymatique, pour cela, nous avons optimisé une électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 8%.

Tableau VIII : Polymorphisme du gène UGT1A1 (UGT1A1*28)

SNPS	Localisation	Substitution nucléotidique	Résultat
UGT1A1*28 **(rs8175347)**	Région Promoteur	TA repeat	A(TA) 7TAA

1.- Analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) :

1.1.- Définition :

Le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) est une technique en biologie moléculaire permettant de différencier les variations mineures de séquences nucléotidiques dans des fragments homologues d'ADN **(453)**.

1.2.- Principe de la restriction enzymatique :

La technique repose sur la spécificité des endonucléases de restriction, qui sont hautement spécifiques de la séquence et ne coupent l'ADN double brin qu'à leurs sites de reconnaissance.

L'action des enzymes de restriction produit des longueurs variables de molécules d'ADN homologues contenant des variations de séquence mineures ou des polymorphismes et les fragments clivés dans l'ADN digéré peuvent être séparés par des techniques électrophorétiques **(454)**.

La restriction enzymatique a été réalisée sur le polymorphisme UGT1A1*6 du gène UGT1A1. Les enzymes de restriction utilisés sont résumés dans le tableau IX

Tableau IX : Restriction enzymatique du polymorphisme UGT1A1*6

SNPs	Séquences d'amorce	Restriction enzyme	Fragments (pb)
UGT1A1*6	F/ AGATACTGTTGATCCCAGTG	Ava II	N: G: 128, 18
	R/ CTTCAAGGTGTAAAATGGTC		M: A: 146

1.3.- Protocole expérimental :

a.- Préparation d'un Mix de digestion avec l'AVA II :

Tableau X : Composition du Mix de digestion du polymorphisme UGT1A1*6

Nucléase free water H_2O dd		12.5 µl
10X Buffer G	1X	2 µl
PCR ampli mère ADN	0.1-0.5 µg	5 µl
AVA II		0.5 µl
		20 µl

H_2O dd : eau distillée désionisée

b.- Incubation au bain marie à 37°C pendant toute la nuit

c.- Electrophorèse sur gel Agarose à 4 % à 110 volts pendant 45 mn avec révélation à l'UV.

Tableau X bis : Profil de restriction du polymorphisme UGT1A1*6

Profils	GG (Sauvage)	AA (Muté)	AG (Hétéro)
146 pb		—	—
128 pb	—		—
18 pb	—		—

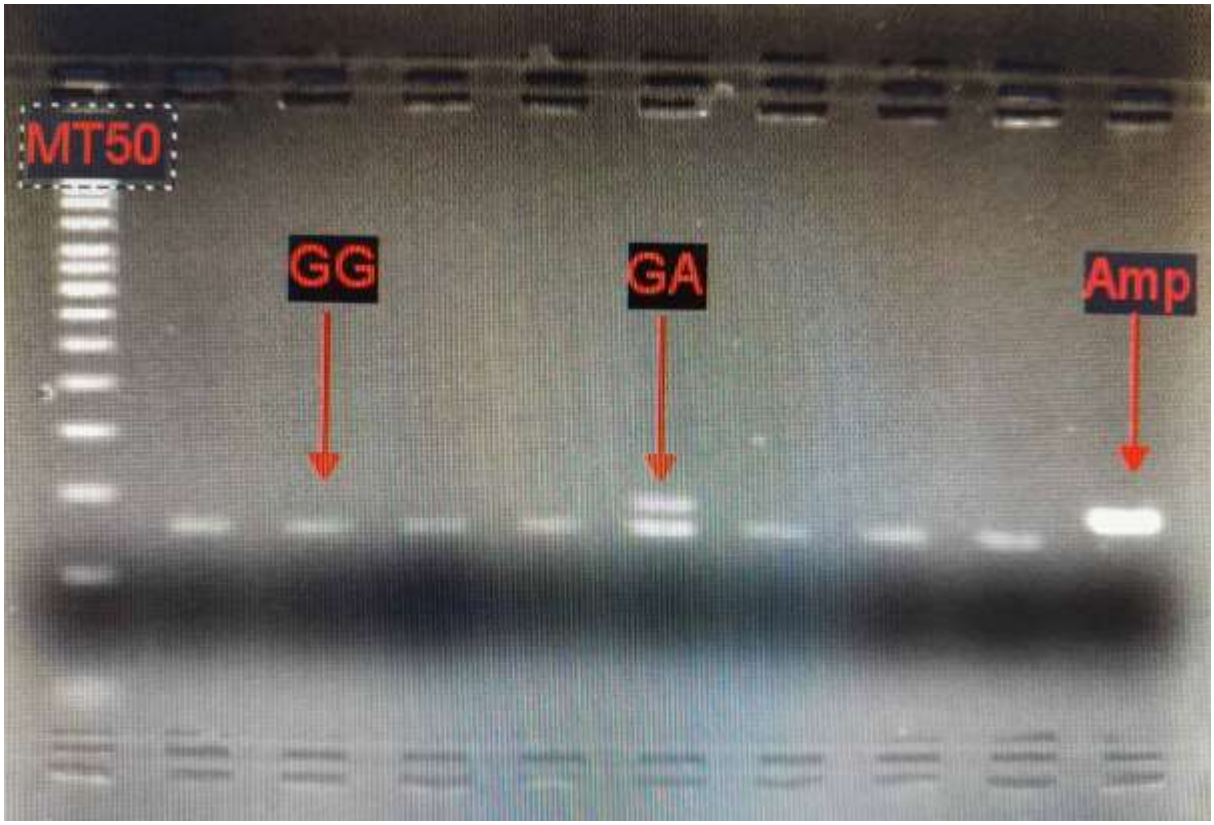


Fig. 18 : Visualisation des produits de restriction

2.- Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 8% :

2.1.- Principe :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de biologie moléculaire couramment utilisée pour séparer et analyser les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Elle repose sur le principe de la migration des acides nucléiques à travers un gel d'agarose, sous l'effet d'un champ électrique appliqué. Les acides nucléiques chargés négativement migrent vers l'anode (électrode positive) à travers le gel, les fragments plus petits se déplaçant plus rapidement que les plus grands. À la fin de l'électrophorèse, les fragments sont séparés en bandes distinctes en fonction de leur taille, ce qui permet leur visualisation.

Pour réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose, nous avons besoin d'un gel d'agarose, d'une source d'alimentation électrique, de tampons électrophorétiques pour immerger le gel et de colorants permettant de visualiser les fragments d'ADN **(455)**.

2.2.- Les étapes de l'électrophorèse :

a) Préparation du gel d'agarose :

L'agarose est un polymère gélifiant à base d'agar-agar purifié composé essentiellement de galactose non ramifié. Le gel d'agarose polymérisé forme un réseau régulier dont la taille des mailles varie en fonction du pourcentage d'agarose.

La concentration en agarose détermine la résolution de la séparation : plus la concentration est élevée, plus la matrice du gel est dense et mieux elle peut séparer les fragments d'ADN de tailles proches.

Nous avons préparé des gels d'agarose à différentes concentrations : 2% pour le contrôle des produits d'amplification, 4% pour visualiser les produits de digestion enzymatique et 8% pour analyser le polymorphisme UGT1A1 *28 qui est un fragment d'ADN dont la taille est 71pb à l'état sauvage et 73pb lorsqu'il est muté.

Les étapes de préparation du gel d'agarose à 8% sont décrites dans l'annexe 8.

b) Migration électrophorétique :

Le support contenant le gel est placé dans une grande cuve d'électrophorèse (dimension gel d'agarose 20x25cm) contenant du tampon spécifique de migration permettant le passage du courant entre les deux électrodes.

Le tampon Tris-borate est le plus utilisé, sous forme de mélange Tris-borate-EDTA à pH= 8,1 (tampon TBE).

L'ADN est préalablement mélangé au bleu de Bromophénol (bleu de charge) puis déposé dans les puits prévus à cet effet. Un courant électrique est appliqué entre les deux électrodes, ce qui provoque le déplacement de l'ADN vers le pôle positif.

Une fois que les échantillons sont chargés, une tension électrique est appliquée aux extrémités du gel. Les fragments d'ADN migrent vers l'anode à travers le gel en fonction de leur taille.

c) Révélation :

Après l'électrophorèse, le gel est retiré du dispositif, et les bandes d'ADN sont visualisées. La visualisation et la documentation du gel a été réalisée grâce à un appareil émettant des UV destiné à cet effet (Molecular Imager BIO-RAD Gel Doc XR+) **(Fig. 19)**.



Fig. 19 : Molecular Imager BIO-RAD Gel Doc XR+
(Laboratoire de cytogénétique et de biologie moléculaire EHUO)

Cet appareil permet d'analyser les gels d'agarose colorés avec des colorants tels que le bromure d'éthidium BET, qui interagit avec l'ADN et émet de la fluorescence sous une lumière UV.

L'intensité de la fluorescence dépend de la taille de l'ADN et de sa quantité. Il est donc normal que les fragments de grande taille apparaissent plus fortement marqués que ceux de petites tailles.

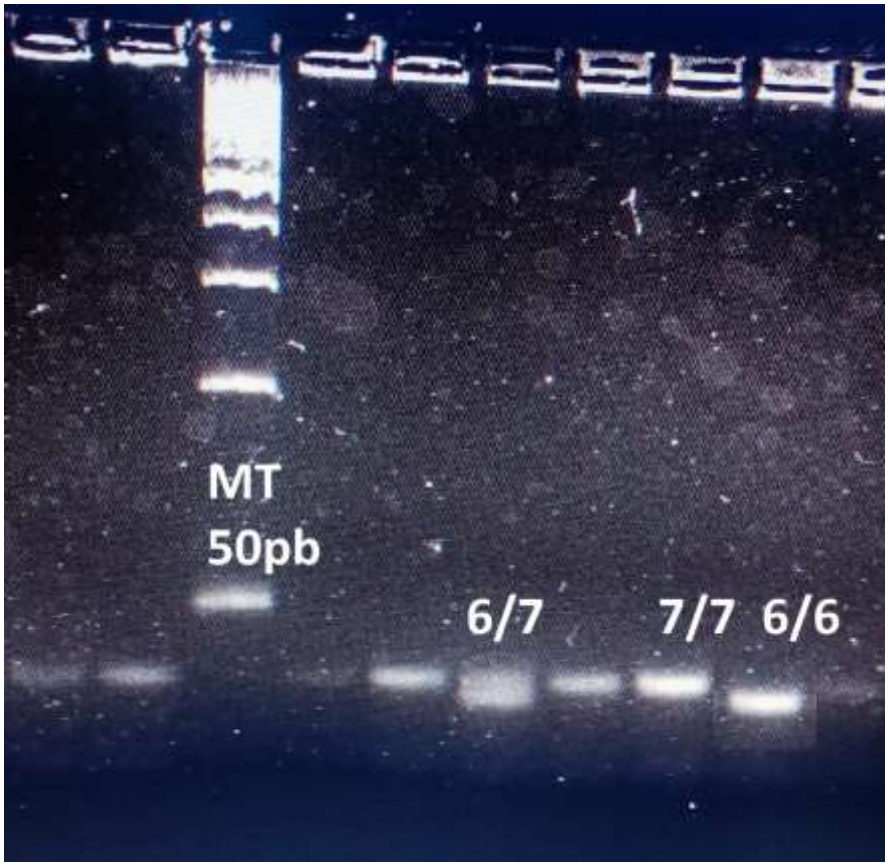


Fig. 20 : Visualisation des fragments d'ADN 71pb (sauvage) et 73pb du polymorphisme UGT1A1 *28.

2.5.- Traitement et analyse statistique des données :

L'analyse statistique des données récoltées sur support Excel a été effectuée à l'aide du logiciel $SPSS_{23}$ (Statistical Package for the Social Sciences. Version 23).

Un tri à plat a permis de corriger les données incohérentes et de compléter les données manquantes.

L'analyse descriptive des données est basée sur la transformation des variables : par regroupement en utilisant soit le codage, soit des transformations conditionnelles pour la mise en tableau et l'analyse.

L'analyse descriptive des variables se fait par le calcul des fréquences, des caractéristiques de tendance centrale ou de dispersion : la moyenne (m), la médiane (me), la variance (σ^2), l'écart type (σ).

Nous avons procédé à une vérification de la distribution de nos variables en appliquant le test Shapiro-Wilk de normalité.

Les variables quantitatives à distribution normale ou Gaussienne sont présentées en moyenne ± écart type ($m \pm \sigma$).

Les variables quantitatives de distribution non normale sont présentées en médiane (me) avec l'interquartile range IQR (écart interquartile de 25 à 75 %) [IQ1 – IQ3].

La détermination des fréquences pour les variables qualitatives sont présentées en pourcentage.

Les tests utilisés sont :

- **Le test U Mann- Whitney :** utilisé pour la comparaison de deux moyennes de distribution non gaussienne.
- **Le test t de Student :** utilisé pour la comparaison de deux moyennes dont la distribution est normale.
- **Le test de Khi 2 de Pearson :** utilisé pour rechercher la relation entre deux variables qualitatives (la comparaison de deux pourcentages).
- **Le test ANOVA** et **le test Kruskal-Wallis :** utilisés pour la comparaison de plusieurs moyennes.
- **Le test de corrélation rho de Spearman :** utilisé pour déterminer l'association entre deux variables quantitatives.

Le test t ou le test Mann- Whitney ont permis de tester les différences de variables biochimiques et cliniques entre les sous-groupes GS.

La corrélation rho de Spearman a permis d'estimer la relation entre la bilirubine non conjuguée et les variables biochimiques et cliniques.

Dans l'interprétation des résultats, les différences et les corrélations sont considérées comme significatives si le seuil était de $p<0,05$.

Les données génétiques sont analysées par :

- **La fréquence génotypique** : elle est calculée en divisant le nombre d'individus de chaque génotype par la population totale de l'échantillon.
- **La fréquence allélique** : elle est calculée en divisant le nombre de fois ou l'allèle d'intérêt est observé dans une population par le nombre total de copies de tous les allèles à ce locus génétique particulier dans la population.

Chapitre IV :

Résultats de l’étude

La population d'étude est composée de patients présentant une hyperbilirubinémie libre isolée non hémolytique, des patients aux antécédents hyperbilirubinémie libre isolée non hémolytique et des patients cliniquement suspectés du syndrome de Gilbert, colligés prospectivement à partir des services de gastro-entérologie, d'hématologie et de pédiatrie à travers le territoire national (Hôpitaux Militaires Universitaires d'Oran et de Constantine, Hôpital central de l'armée d'Alger, CHUO, EHUO) ainsi que des cabinets médicaux privés.

L'étude compte 199 patients répartis en deux groupes (Groupe 1 et Groupe 2).

— Le groupe 1 est représenté par les adultes, il compte 151 patients.
— Le groupe 2 est représenté par les enfants, il compte 48 patients.

I.– Analyse des patients du groupe 1 :

1. – Analyse descriptive des patients :

1.1. – Caractéristiques générales des patients :

1.1.1.– Répartition selon les indicateurs de lieu :

- **Lieu de recrutement :**

Tableau XI : Répartition des cas (Groupe 1) selon les indicateurs de lieu de recrutement (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Lieu de recrutement	Nombre	%
HMRUO	96	63,6
EHUO	18	11,9
Cabinets médicaux privés	29	19,2
HCA	1	0,7
HMRUC	7	4,6
Total	151	100

On estime à 63,6% le nombre de patients recrutés au niveau de l'HMRUO, 19,2% au niveau des cabinets médicaux privés et 11,9 % au niveau de l'EHUO.

- **Service de recrutement :**

Tableau XII : Répartition des cas (Groupe 1) selon les services de recrutement (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Service de recrutement	Nombre	%
Gastrologie	78	51,6
Hématologie	28	18,5
UMC	16	10,6
Médecine interne	1	0,7
Cardiologie	1	0,7
Néphrologie	1	0,7
Laboratoire de biochimie HMRUO	26	17,2

La moitié de nos patients proviennent du service de gastrologie (51,6%). Le reste des patients a été recrutée de cinq (5) autres services dont les plus représentatifs sont le service d'hématologie (18,5%) et les urgences médico-chirurgicales (10,6%). Les services de médecine interne (1 cas), de cardiologie (1 cas) et de néphrologie (1 cas) ne représentent que 2,1% des cas.

Une proportion non négligeable des patients soit 17,2% des cas ont été recrutés directement au niveau du laboratoire de biochimie de l'HMRUO ; cette catégorie de patients peut comprendre les patients recueillis lors de la validation des résultats, le personnel hospitalier et/ou les personnes ayant un lien de parenté avec le personnel, ainsi que des personnes externes.

- **Origine géographique :**

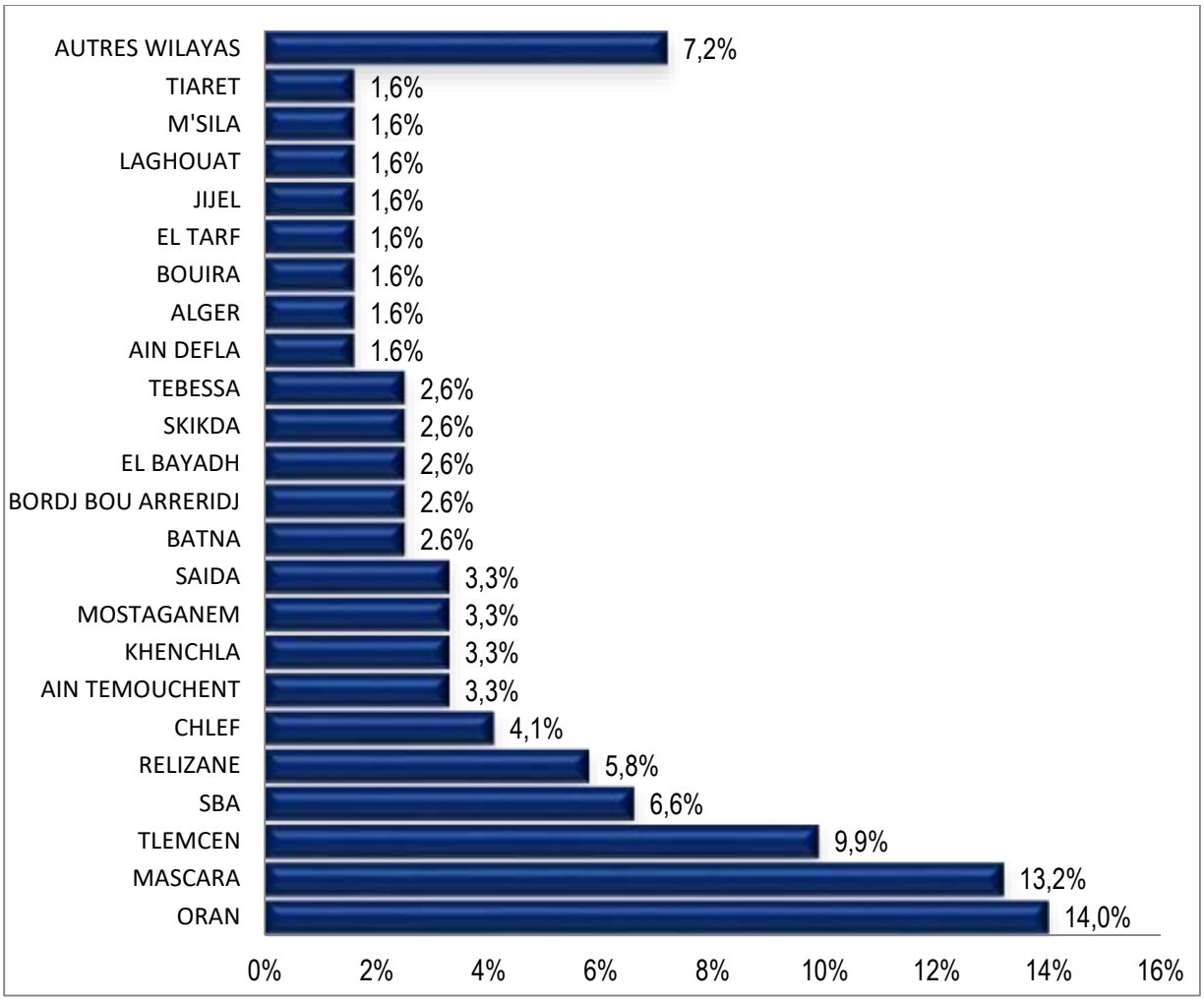


Fig. 21 : Répartition des cas (Groupe 1) selon la wilaya d'origine (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Les patients étudiés sont originaires de 32 des 48 wilayas du territoire national, où les wilayas d'Oran (14%), Mascara (13,2%), Tlemcen (9,9%), Sidi Bel Abbès (6,6%) et Relizane (5,8%) sont les plus représentées.

1.1.2.– Répartition selon l'âge et le sexe :

- **Moyenne d'âge et sexe :**

Tableau XIII : Description des cas (Groupe 1) selon la moyenne d'âge et le sexe (Janvier 2020– Décembre 2023)

Sexe	Nombre	%	Age médian ± [Q1-Q3]	Age moyen ± Ecart type
Masculin	110	72,8	33 ± [25,5-40,5]	34,7 ± 12,9
Féminin	41	27,2	37 ± [27,0-57,2]	43,1 ± 19,6
Total	151	100	33 ± [27-46]	37,1 ± 15,4
Sex ratio 2,68				

Une prédominance masculine est observée avec un sex ratio égal à 2,7, ce qui signifie qu'il y'a 2,7 fois plus d'homme dans notre population d'étude de cas.
L'âge médian des patients est de 33 ± [27-46] et l'âge moyen est de 37,1 ± 15,4 ans avec des extrêmes de 17 ans à 90 ans.

- **Tranches d'âge :**

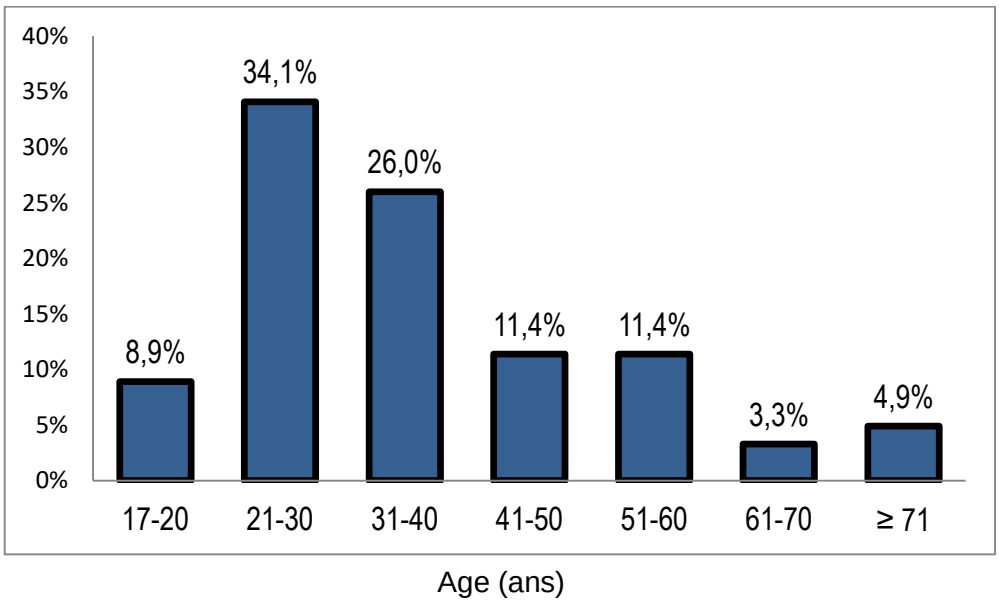


Fig. 22 : Répartition des cas (Groupe 1) selon la tranche d'âge (Janvier 2020 –Décembre 2023)

La classe modale correspond au pic de fréquence qui se situe entre 21 et 30 ans avec 34,1% des cas : la tendance de l'âge des cas ne suit pas une loi de distribution normale.

- **Tranches d'âge et sexe :**

Tableau XIV : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'âge et le sexe (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Age (ans)	Sexe masculin		Sexe féminin		Sex Ratio
	Nombre	%	Nombre	%	
17 – 20	8	8,9	3	8,8	2,66
21 – 30	31	34,8	11	32,3	2,82
31 – 40	28	31,4	4	11,8	7,0
41 – 50	10	11,2	4	11,8	2,5
51 – 60	8	8,9	6	17,6	1,33
61 – 70	3	3,4	1	2,9	3,0
≥ 71	1	1,1	5	14,7	0,2
Total	89	100	34	100	2,62

Le pic de fréquence de l'âge des cas est identique chez les hommes et les femmes, il se situe autour de 21 – 30 ans.

1.1.3.– Indice de Masse Corporelle :

Tableau XV : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'IMC (Janvier 2020 – Décembre 2023)

IMC (kg/m²)	Nombre	%
Insuffisance pondérale [< 18,5]	8	6,9
Corpulence normale [18,50–24,99]	63	54,3
Surpoids [25–29,99]	38	32,8
Obésité [≥30]	7	6
Total	116	100

Les données de l'IMC sont indiquées dans les dossiers de 116 patients. L'indice de masse corporelle moyen de ces patients est de 24,2 ± 3,9 kg/m² avec un minimum de 16,3 kg/m² et un maximum de 34,9 kg/m². La majorité des patients sont de corpulence normale (54,3%).

Seulement 6% d'entre eux sont obèses. Près de 33 % des cas sont en surpoids.

- **Indice de Masse Corporelle et sexe :**

Tableau XVI : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'âge et le sexe (Janvier 2020 – Décembre 2023)

IMC (kg/m²)	Sexe masculin		Sexe féminin		Total		P
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	
Insuffisance pondérale [< 18,5]	6	7,0	2	6,4	8	6,9	0,93
Corpulence normale [18,50–24,99]	47	55,3	16	51,6	63	54,3	
Surpoids [25–29,99]	27	31,8	11	35,5	38	32,8	
Obésité [≥30]	5	5,9	2	6,4	7	6	
Total	85	100	31	100	116	100	

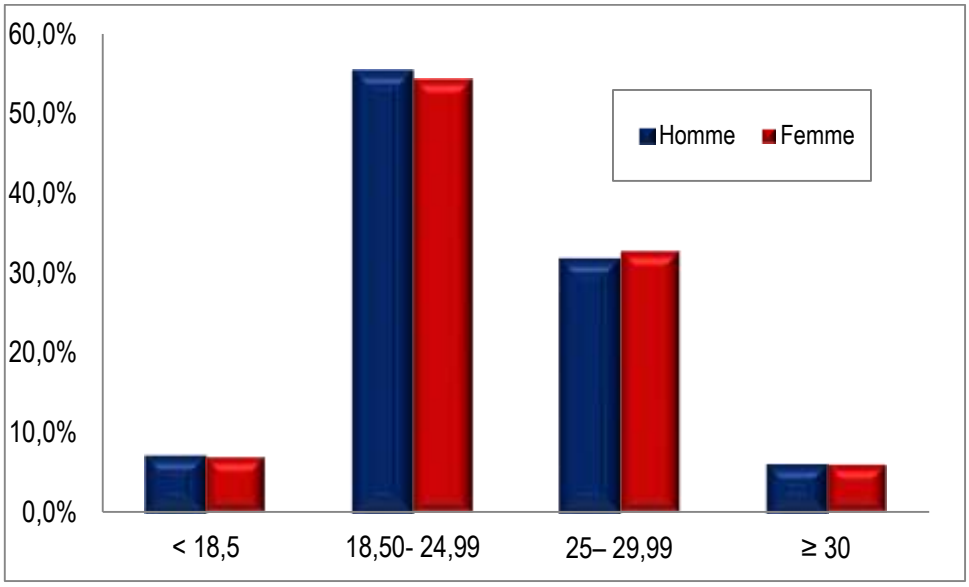


Fig. 23 : Indice de masse corporelle des patients (Groupe 1) selon le sexe (Janvier 2020 – Décembre 2023)

L'indice de masse corporelle moyen est de 24,2 ± 3,7 kg/m² chez les hommes, et de 24,1 ± 4,1 kg/m² chez les femmes.

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux sexes pour l'IMC.

1.2.– Caractéristiques cliniques des patients :

1.2.1.– Antécédents des patients :

1.2.1.1.– Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie :

Soixante-seize pour cent (76%) des patients déclarent avoir des antécédents personnels d'hyperbilirubinémie lors du recueil des données. L'âge moyen d'apparition de l'hyperbilirubinémie chez ces patients est de 25,0 ± 15,6 ans avec des extrêmes de 0 ans à 77 ans.

1.2.1.2. – Antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie :

Tableau XVII : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Antécédents d'hyperbilirubinémie	Nombre	%
Présence	55	46,6
Absence	63	53,4
Degré parenté (n=55)		
1er degré	38	69,1
2ème degré	36	65,4
3ème degré	8	14,5
4ème degré	3	5,4
Parenté 1er degré (n=38)		
Père	14	36,8
Mère	10	26,3
Enfants	14	36,8
Parenté 2ème degré (n=36)		
Frère	15	41,7
Sœur	15	41,7
Grand parent	6	16,7
Parenté 3ème degré (n=8)		
Oncles, tantes	7	87,5
Neveux, nièces	1	12,5
Parenté 4ème degré (n=3)		
Cousins germains	3	100
Lien de parenté	**Nombre**	**%**
Ligne directe (grands-parents, parents et enfants)	24	43,6
Ligne collatérale (frères et sœurs, oncles)	21	38,2
Ligne directe et ligne collatérale	10	18,2

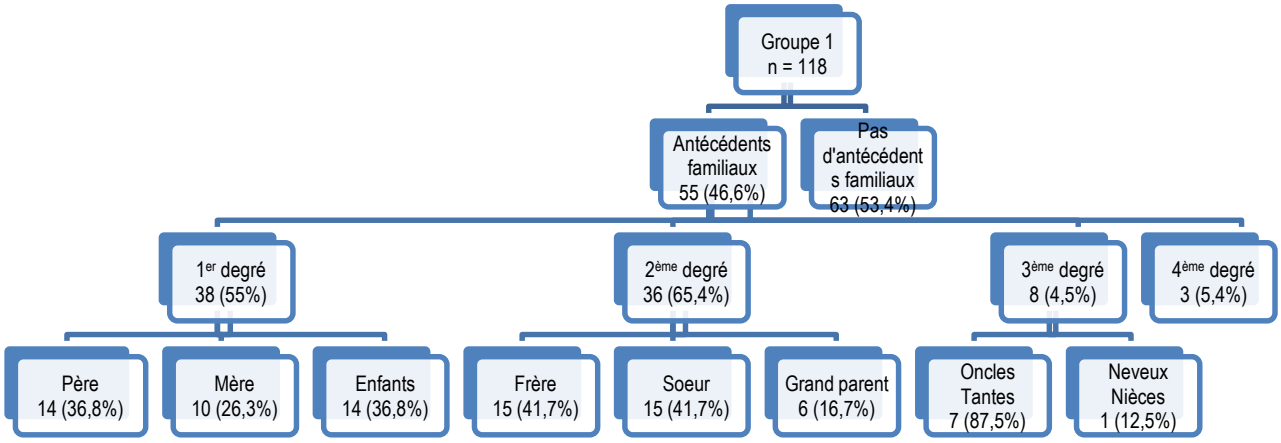


Fig. 24 : Digramme des degrés de parenté chez les patients présentant des antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie

Les données sur les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie sont indiquées dans les dossiers de 118 patients.

Les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie sont présents chez 55 patients (46,6%), les degrés de parenté les plus retrouvés chez ces patients sont le premier degré (38 cas) et le deuxième degré (36 cas). Les parents au troisième degré (8 cas) et au quatrième degré (3 cas) sont nettement plus faibles.

Le père et les enfants sont les parents au premier degré les plus touchés avec une fréquence similaire de 36,8% (14 cas chacun), suivis par la mère 26,3% (10 cas). Les frères et sœurs sont retrouvés avec une fréquence égale de 41,7% (15 cas chacun) des parents au deuxième degré, les grands parents ne représentent que 16% (6 cas).

La quasi-totalité de la parenté au 3ème degré est représentée par les oncles et tantes (7 cas) et la totalité de la parenté au 4ème degré est représentée par les cousins germains (3 cas).

1.2.2. – Symptomatologie clinique :

Les données sur la symptomatologie clinique sont indiquées dans les dossiers de 112 patients.
La majorité de ces patients sont symptomatiques (88,9%). L'hyperbilirubinémie libre évocatrice du syndrome de Gilbert se caractérise par un ensemble de signes cliniques. Elle est dominée par une asthénie et un ictère isolé(s) ou associé(s) à d'autres symptômes cliniques.

- **Signes évocateurs :**

Tableau XVIII : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les signes évocateurs (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Signes évocateurs	Nombre (n=112)	%
Asthénie	72	64,3
Douleurs abdominales	47	42
Ictère	49	43,8
Subictère conjonctival	25	22,3
Nausées, vomissements	21	18,7
Vertiges	10	8,9
Céphalées	10	8,9
Amaigrissement	6	5,3
Perte d'appétit	4	3,6
Autres	8	7,1

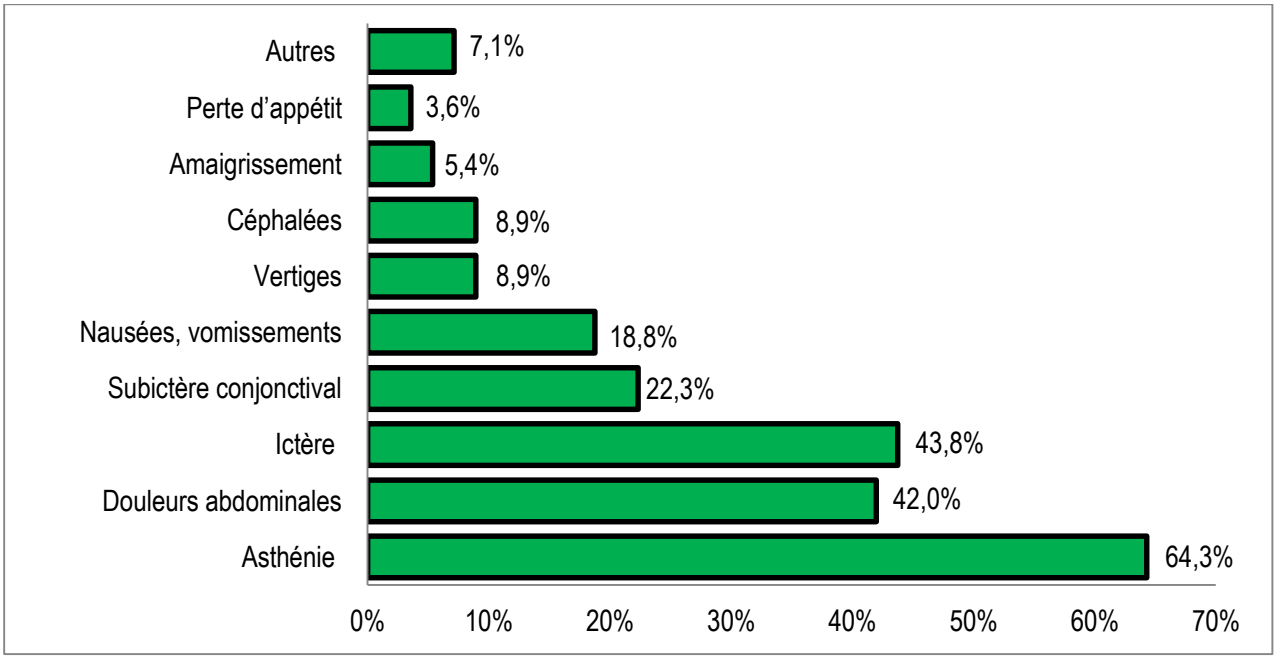


Fig. 25 : Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les signes cliniques évocateurs (Janvier 2020 – Décembre 2023)

L'asthénie est le symptôme le plus fréquent mentionné par nos patients (64,3%).

L'ictère est également fréquemment retrouvé chez nos patients (43,8%). Ces deux manifestations les plus fréquentes et constantes du syndrome de Gilbert peuvent être isolés ou associés à d'autres symptômes tels que des douleurs abdominales (42%), des nausées et vomissements (18,7%), des vertiges et des céphalées (8,9%), un amaigrissement (5,3%), une perte d'appétit (3,6%).

Une autre symptomatologie (7,1%) peut faire apparaitre des signes moins spécifiques pouvant être révélateurs mais à des proportions moindres, comme des diarrhées persistantes suivies de constipation (3,6%), une anxiété et une irritabilité (1,8%) et parfois une déshydratation (0,9%) et une intolérance aux graisses (0,9%).

1.2.3. – Motifs de la demande d'analyse et circonstances de découverte :

Tableau XIX : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les motifs de la demande d'analyse (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Motifs de la demande d'analyse	Nombre (n=131)	%
Suspicion du syndrome de Gilbert	36	27,5
Ictère	31	23,7
Asthénie	18	13,7
Subictère conjonctival	13	9,9
Douleurs abdominales	12	9,1
Antécédents d'hyperbilirubinémie	8	6,1
Découverte fortuite	42	32,0

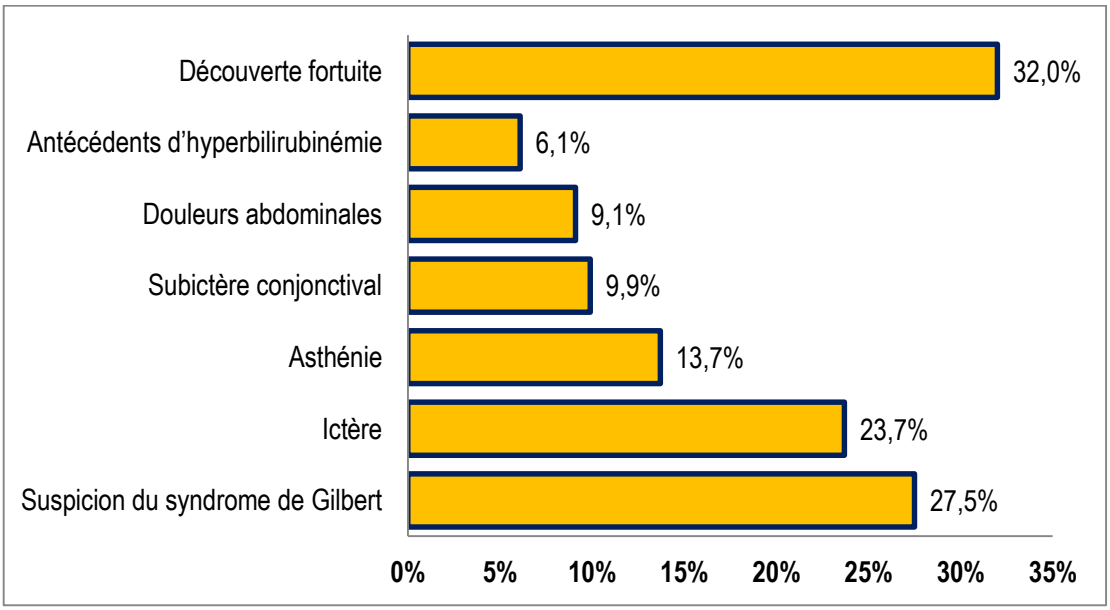


Fig. 26 : Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les motifs de demande d'analyse (Janvier 2020 –Décembre 2023)

Un ensemble de motifs ont conduit les cliniciens à demander l'analyse génétique en vue de déterminer l'étiologie de l'hyperbilirubinémie observée chez nos patients. La suspicion du syndrome de Gilbert est un motif fréquent (27,5%).

Les symptômes cliniques de nos patients sont également des motifs de demande d'une exploration génétique dont l'ictère (23,7%), l'asthénie (13,7%), le subictère conjonctival (9,9%) et les douleurs abdominales (9,1%).

La découverte fortuite d'une hyperbilirubinémie libre isolée est le motif le plus fréquent (32%). Cette découverte fortuite regroupe les bilans demandés à l'occasion de la visite systématique du personnel, un bilan préopératoire pour une chirurgie, un bilan de contrôle de routine.

1.2.4.– Facteurs déclenchant l'hyperbilirubinémie :

Tableau XX : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les facteurs déclenchant l'hyperbilirubinémie (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Facteurs déclenchant (n=120)	Nombre (n=120)	%
Présents	92	76,7
Absents	28	23,3
Nature du facteur déclenchant (n=92)		
Jeune prolongé > 12h	32	34,8
Stress	49	53,3
Surmenage	56	60,9
Exercice physique intense	13	14,1
Déshydratation	7	7,6
Menstruations chez la femme	2	2,2
Accouchements	2	2,2

La grande majorité des patients déclarent que l'hyperbilirubinémie est déclenchée par la présence d'un ou de plusieurs facteurs (76,7%). Le reste des patients (23,3%) n'a pas signalé de facteur associé à l'hyperbilirubinémie.

Les facteurs les plus fréquents et les plus incriminés dans l'apparition de l'hyperbilirubinémie chez nos patients sont le surmenage (60,9%), le stress (53,3%) et le jeune prolongé comme le jeune du mois de Ramadan (34,8%).

D'autres facteurs sont également associés au déclenchement de l'hyperbilirubinémie comme l'exercice physique intense (14,1%), la déshydratation (7,6%), les menstruations (2,2%) et les accouchements (2,2%) chez la femme.

1.2.5. – Comorbidités :

Tableau XXI : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les comorbidités (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Comorbidités (n=120)	Nombre (n=120)	%
Présentes	37	30,8
Absentes	83	69,2
Comorbidités (n=120)		
Diabète	8	6,7
Hypertension artérielle	11	9,2
Hypothyroïdie	4	3,3
Maladies hématologiques (β thalassémie, thrombopénie, hémochromatose, maladie de Biermer)	5	4,2
Maladie cœliaque	1	0,8
Arthrose	3	2,5
Spondylarthrite ankylosante	1	0,8
Rhumatisme articulaire aigu	1	0,8
Stéatose hépatique	2	1,7

La majorité des patients n'ont pas de pathologies associées à l'hyperbilirubinémie (69,2%). Cependant, des comorbidités sont retrouvés chez 30,8% d'entre eux soit 37 cas.

Parmi l'ensemble des maladies retrouvées :

— L'hypertension artérielle (9,2%) et le diabète (6,7%) sont les plus fréquentes.
— Les maladies hématologiques représentent 4,2% des cas dont la β thalassémie (1 cas), une thrombopénie (2 cas), l'hémochromatose (1 cas) et la maladie de Biermer (1 cas).
— Les maladies inflammatoires sont présentes chez 4,1% des patients, elles regroupent l'arthrose chez 3 cas, la spondylarthrite ankylosante et le rhumatisme articulaire aigu avec une fréquence similaire (1 cas chacun).
— L'hypothyroïdie est beaucoup moins fréquente que les précédentes pathologies, elle représente 3,3% des patients soit 4 cas.
— La maladie du foie gras ou stéatose hépatique ; une maladie associée au syndrome métabolique ne représente que 1,7% des patients soit 2 cas seulement.
— Les maladies auto-immunes dont la maladie cœliaque ; une intolérance alimentaire, est retrouvée chez seulement 1 patient.

1.2.6.– Explorations radio-endoscopiques :

Tableau XXII : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon l'exploration radio-endoscopique (Janvier 2020–Décembre 2023)

Imagerie médicale (n=125)	Nombre (n=125)	%
Avec exploration	67	53,6
Sans exploration	58	46,6
Exploration radio-endoscopique (n=67)		
Echographie abdomino-pelvienne	65	97,0
Endoscopie digestive haute	4	6
Scanner abdomino-pelvien	2	3
IRM hématique	2	3

La moitié des patients (53,6%) ont bénéficié d'explorations radio-endoscopiques. Parmi les explorations radio-endoscopiques réalisées chez nos patients, l'échographie abdomino-pelvienne représente le nombre le plus élevé (65).

L'endoscopie digestive haute est également retrouvée mais en nombre moins important (4). Certains patients ont eu recours au scanner abdomino-pelvien (2) et à l'IRM hépatique (2).

- **Résultats de l'exploration radiologique :**

Tableau XXIII : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les résultats de l'exploration radiologique (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Résultats de l'exploration radiologique	Nombre (n=67)	%
Sans particularité, foie normal	59	88,0
Légère hépatomégalie	2	3
Foie de surcharge	1	1,5
Gastrite chronique	4	6
Légère splénomégalie	3	4,5

Les résultats des explorations radiologiques ne montrent aucune particularité dans la plupart des cas (88%).

Certaines explorations ont révélé une légère splénomégalie (4,5%), une légère hépatomégalie (3%) et une gastrite chronique (6%).

Un seul résultat a montré un foie de surcharge (1,5%).

1.2.7.- Consommation de tabac :

La majorité des patients sont des non-fumeurs (85%). Les fumeurs représentent 15% des cas.

1.2.8.- Consommation d'alcool :

La grande majorité des patients ne consomme pas d'alcool (97,5%). Les consommateurs d'alcool représentent 2,5% des cas.

2.- Etude du profil biologique des patients :

2.1.- Profil de l'hémolyse :

Tableau XXIV : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan d'hémolyse (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Median ± range	Mean ± σ (range)	Valeurs usuelles
Hémoglobine (g/dL)	14,20 ± [13,02-15,2]	14,04 ± 1,69 (9,0- 18,40)	12-18
Taux de réticulocytes (Valeur absolue : éléments/mm^3)	55920,0 ± [41935,0- 72803,0]	65822,3 ± 52733,3 (7154,0 -559000,0)	<120.000
Haptoglobine (g/L)	0,87± [0,53-1,63]	0,96 ± 0,63 (0,0- 3,09)	0,3-2
LDH (U/L)	183,70 ± [158,65-223,25]	205,80 ± 88,87 (96,20- 776,0)	<250

Le bilan hématimétrique de la population étudiée retrouve :

- Un taux médian d'hémoglobine de 14,20 g/dL. L'hémoglobine est dans l'intervalle de référence normale chez la majorité de la population étudiée (88,9%). Des taux inférieurs à 12 g/dL sont retrouvés chez seulement 11,1% des patients.

- Un taux médian de réticulocytes de 55920,0 élèments/mm^3. Les taux de réticulocytes sont inférieurs à 120.000 éléments/mm^3 chez la quasi-totalité de la population d'étude (95,3%). Des taux supérieurs à 120.000 éléments/mm^3 sont observés chez 6 cas seulement soit 4,7%.

Les paramètres biochimiques du bilan d'hémolyse retrouvent :

- Un taux médian d'haptoglobine de 0,87 g/L. Les taux d'haptoglobine se situent dans l'intervalle des valeurs normales chez la grande majorité des patients (83,3%).Des valeurs inferieures à 0,3 g/L sont retrouvées chez seulement 11,1% soit 16 patients et des valeurs supérieures à 2 g/L sont observées chez les reste des patients (5,5%).

- Un taux médian de LDH de 183,70 U/L. Les taux de LDH sont normaux chez la grande majorité de la population étudiée (83,9%) et des taux élevés sont observés chez le reste des patients (16,1%).

2.2.- Profil hépatique :

Tableau XXV : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan hépatique (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Median ± range	Mean ± σ (range)
BRB T (mg/L)	17,48 ± [12,7-26,6]	20,83 ± 12,26 (2,97- 69,29)
BRB D (mg/L)	4,84 ± [3,5-6,41]	4,99 ± 2,50 (0,88- 24,02)
BRB I (mg/L)	11,99 ± [8,23 -19,49]	15,83 ± 11,62 (1,85- 64,53)
ASAT (U/L)	20,45 ± [16,10-24,25]	22,53 ± 10,68 (10,50- 84,30)
ALAT (U/L)	15,40 ± [11,9- 22,63]	19,48 ± 13,60 (0,50- 96,90)
PAL (U/L)	72 ± [59-88,3]	78,93 ± 31,37 (34,0- 232,0)
GGT (U/L)	18,50 ± [13,1-29,9]	29,88 ± 50,18 (6,10- 583)
TP (g/L)	73,20 ± [70,50-76,82]	73,30 ± 5,0 (52,90- 87,90)
ALB (g/L)	48,50 ± [45,33-52,01]	48,14 ± 5,34 (27,58- 59,48)

Une hyperbilirubinémie totale BRB T ≥12mg/L est retrouvée chez la majorité de nos patients au moment du prélèvement (75,5%) avec un taux médian de bilirubine totale de 17,48 mg/L, un taux médian de bilirubine directe de 4,84 mg/L et un taux médian de bilirubine indirecte de 11,99 mg/L. Cette hyperbilirubinémie totale est à fraction BRB libre (BRB Indirecte ≥8mg/L) chez la majorité des patients (76,2%).

- Les enzymes de la cytolyse hépatique sont dans l'intervalle des valeurs normales (ASAT< 50U/L, ALAT < 50U/L) chez la quasi-totalité de la population étudiée (98% et 96% respectivement) avec une valeur médiane d'ASAT de 20,45 U/L et une valeur médiane d'ALAT de 15,40 U/L.

- Les enzymes de la fonction biliaire montrent des valeurs normales de PAL et de GGT chez presque la totalité de la population étudiée (92,7% et 95,4% respectivement) avec une valeur médiane de PAL de 72 U/L et une valeur médiane de GGT de 18,50 U/L.

- Les capacités de synthèse hépatique sont évaluées par l'albumine et les protides totaux. Celles-ci montrent un taux médian d'albumine de 48,50 g/L et un taux médian de protides de 73,20 g/L. La grande majorité de la population étudiée a une albuminémie normale (83,9%) et une protidémie normale (98,7%). Un seul cas d'hypoalbuminémie < 35g/L a été retrouvé et une hyperprotidémie > 83g/L a été observée chez deux patients seulement.

2.3.- Profil lipidique :

Tableau XXVI : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan lipidique (Janvier 2020–Décembre 2023)

Paramètres	Median ± range	Mean ± σ (range)
Triglycérides (g/L)	0,95 ± [0,64-1,30]	1,05 ± 0,56 (0,02- 3,31)
Cholestérol total (g/L)	1,58 ± [1,32- 1,83]	1,61 ± 0,39 (0,81- 3,36)
HDL-cholestérol (g/L)	0,45 ± [0,37-0,53]	0,46 ± 0,13 (0,18- 0,77)
LDL-cholestérol (g/L)	0,95 ± [0,70-1,16]	0,96 ± 0,31 (0,40-2,54)
Ratio HDL:LDL	0,50 ± [0,39-0,63]	0,53 ± 0,24 (0,18- 1,82)

Le bilan lipidique de la population étudiée retrouve un taux médian de triglycérides de 0,95 g/L, un taux médian de cholestérol total de 1,58 g/L, un taux médian de HDL-cholestérol de 0,45 g/L et un taux médian de LDL-cholestérol de 0,95 g/L.
Le ratio HDL : LDL a une valeur médiane de 0,50.

Tableau XXVII : Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les valeurs d'interprétation des paramètres du bilan lipidique (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Valeurs usuelles	Nombre	%
Triglycérides (g/L)	<1,5	125	83,3
	≥1,5	25	16,7
Cholestérol total (g/L)	<2	129	85,4
	≥2	22	14,6
HDL-cholestérol (g/L)	<0,40	49	32,9
	≥0,40	100	67,1
LDL-cholestérol (g/L)	<1,30	127	84,1
	≥1,30	24	15,9

Comme le montre le tableau XXVII, la majorité de la population étudiée ont des taux de triglycérides dans l'intervalle des valeurs normales (83,3%). L'hypertriglycéridémie est rencontrée chez seulement 16,7% des cas.

Une cholestérolémie normale (<2g/L) est retrouvée chez la majorité des patients (85,4%) et l'hypercholestérolémie apparait seulement 14,6% d'entre eux.

Une prédominance du taux de HDL-cholestérol ≥0,40g/L est observée chez nos patients (67,1%) contre un taux de HDL-cholestérol <0,40g/L chez 32,9%.

Un taux de LDL-cholestérol <1,30g/L est retrouvé chez la majorité de la population étudiée (84,1%) contre un taux de LDL-cholestérol ≥1,30g/L chez le reste de la population (15,9%).

2.4.- Profil inflammatoire :

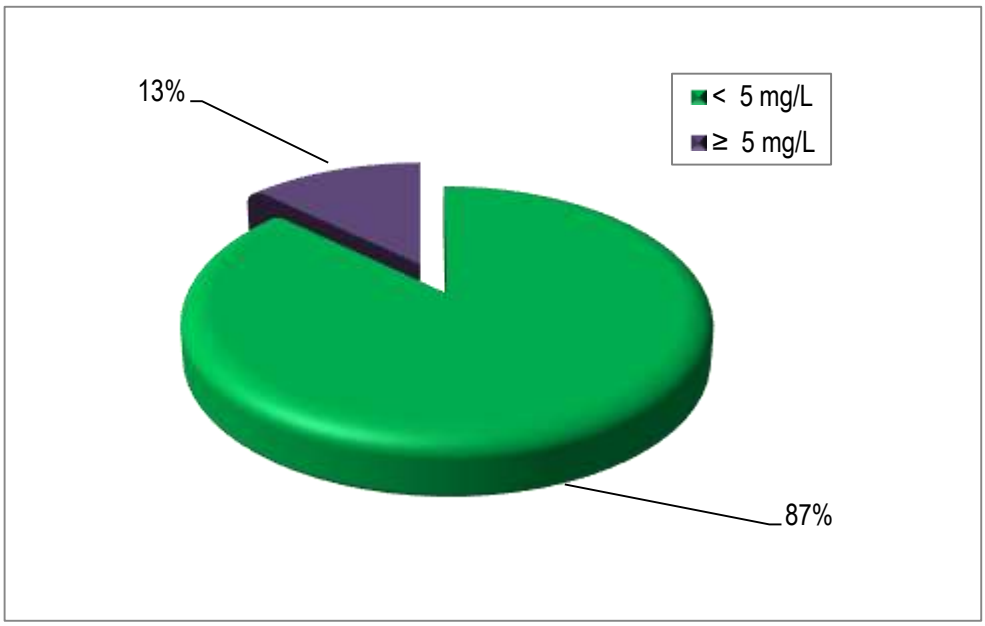


Fig. 27 : Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux de CRP (Janvier 2020 –Décembre 2023)

La prévalence du taux de CRP <5 mg/L est de 87,1% soit 128 cas contre 12,9% pour des taux ≥ 5mg/L.

Tableau XXVIII : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux de CRP (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètre	Median ± range	Mean ± σ (range)
CRP (mg/L)	0,63 ± [0,33- 2,07]	5,73 ± 25,72 (1,65- 115)

La valeur médiane de la CRP est de 0,63 mg/L avec un intervalle interquartile de 0,33 à 2,07 mg/L alors que sa valeur moyenne est de 5,73 mg/L.

2.5.- Profil antioxydant :

2.5.1.- Bilan ferrique et protéines antioxydantes :

Tableau XXIX : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon les paramètres du bilan ferrique et les protéines antioxydantes (Janvier 2020 –Décembre 2023)

Paramètres	Median ± range	Mean ± σ (range)
Fer (µg/dL)	106,50 ± [82,5-130,2]	109,35 ± 41,70 (25,60- 284,40)
UIBC (µg/dL)	229,65 ± [188,13-264,0]	229,26 ± 60,22 (103,7- 435,0)
TIBC (µg/dL)	337,75 ± [305,7-363,85]	336,60 ± 51,78 (182,70- 503,10)
CS (%)	30,84 ± [24,2-38,75]	32,34 ± 11,99 (7,17- 72,40)
Transferrine (g/L)	2,37 ± [2,18-2,65]	2,43 ± 0,39 (1,52 – 3,57)
Céruloplasmine (g/L)	0,22 ± [0,19-0,26]	0,24 ± 0,07 (0,15- 0,55)

Le bilan ferrique de la population étudiée retrouve une valeur médiane de fer sérique de 106,50 µg/dL, une valeur médiane de capacité libre de fixation de la transferrine (UIBC) de 229,65 µg/dL et une valeur médiane de coefficient de saturation de la transferrine (CS) de 30,84 %.

Une sidérémie normale (33-193 µg/dL) est observée chez la plupart des patients (96%), une sidérémie élevée > 193 µg/dL apparait chez 3,3% de la population d'étude soit cinq patients seulement. Un seul cas d'hyposidérémie < 33 µg/dL a été retrouvé.

Le coefficient de saturation de la transferrine est normal (20-40%) chez la majorité de la population étudiée (66,6%). Une valeur du CS< 20% est observée chez 13,8% des patients et un CS> 40% chez 19,6% d'entre eux.

Les protéines antioxydantes retrouvent un taux médian de transferrine de 2,37 g/L et un taux médian de céruloplasmine de 0,22 g/L. Les valeurs de transferrine se situent dans l'intervalle des valeurs normales (2,2-3,6 g/L) chez la majorité des patients (88,8%) et des taux <2 g/L sont retrouvés chez seulement 11,2% d'entre eux.

Des taux de Céruloplasmine <0,30 g/L sont retrouvés chez la grande majorité des patients (89%) contre des taux > 0,30 g/L chez 11% des cas.

2.5.2.- Acide urique :

Tableau XXX : Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux d'acide urique (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Acide urique (mg/L)	Nombre	%
<70	134	89,3
≥70	16	10,7
Total	150	100
Median ± range	51,69 ± [41,0 -58,0]	
Mean ± σ (range)	52,32 ± 16,48 (20,33-159,02)	

L'acide urique chez 150 patients étudiés a un taux médian de 51,69 mg/L. En majorité, 89,3 % des patients ont une uricémie normale (<70 mg/L). L'hyperuricémie (≥70mg/L) est retrouvée chez seulement 10,7% des cas soit 16 patients.

2.6.- Glucose :

Tableau XXXI : Répartition de la population d'étude (Groupe 1) selon les taux de glycémie (Janvier 2020 – Décembre 2023

Glucose (g/L)	Nombre	%
<1,10	109	75,7
≥1,10	35	24,3
Total	144	100
Median ± range	0,95 ± [0,85 -1,09]	
Mean ± σ (range)	1,04 ± 0,39 (0,55- 3,30)	

La glycémie de 144 patients a un taux médian de 0,95 g/L avec un intervalle interquartile de 0,85 à 1,09 g/L. Une glycémie <1,10 g/L est retrouvée chez la majorité des patients (75,7%).

Par contre, une hyperglycémie (≥1,10g/L) est observée chez le reste des patients (24,3%).

Tableau XXXII : Récapitulatif des caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques, biomarqueurs du métabolisme des lipides et de l'inflammation de la population étudiée (Groupe 1) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Patients (n)	Valeurs usuelles
Age (ans)	33 ± [27-46] n123	–
Sexe (H/F) (n)	110/41 n151 (*Sex* ratio = 2,7)	–
IMC (kg/m^2)	24,2 ± 3,9 n116	18,5 - 25
BRB T (mg/L)	17,48 ± [12,7-26,6] n151	<12
BRB I (mg/L)	11,99 ± [8,23 -19,49] n151	<10
ASAT (U/L)	20,45 ± [16,10-24,25] n151	<50
ALAT (U/L)	15,40 ± [11,9- 22,63] n151	<50
PAL (U/L)	72 ± [59-88,3] n151	40-129
GGT (U/L)	18,50 ± [13,1-29,9] n151	8-61
TP (g/L)	73,20 ± [70,50-76,82] n150	60-80
ALB (g/L)	48,50 ± [45,33-52,01] n149	35-52
Glucose (g/L)	0,95 ± [0,85-1,09] n144	0,74-1,06
Triglycérides (g/L)	0,95 ± [0,64-1,30] n150	<1,5
Cholestérol total (g/L)	1,58 ± [1,32- 1,83] n151	<2
HDL-c (g/L)	0,45 ± [0,37-0,53] n149	>0,4
LDL-c (g/L)	0,95 ± [0,70-1,16] n149	<1,30
Ratio HDL : LDL	0,50 ± [0,39-0,63] n149	–
CRP (mg/L)	0,63 ± [0,33- 2,07] n147	<5
Acide urique (mg/L)	51,69 ± [41,0 -58,0] n150	34-70
Fer (µg/dL)	106,50 ± [82,5-130,2] n150	33-193
CS (%)	30,84 ± [24,2-38,75] n138	20-40
Transferrine (g/L)	2,37 ± [2,18-2,65] n125	2-3,6
Céruloplasmine (g/L)	0,22 ± [0,19-0,26] n146	0,15-0,30

3.- Etude moléculaire des patients :

3.1.- Etude du polymorphisme (TA)n(rs8175347) :

3.1.1.- Génotypage et répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347):

Tableau XXXIII : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon le génotypage et la répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype	Nombre	%
(TA)n(rs8175347)	n=151	100
TA7/ TA7	127	84,1
TA6/ TA7	17	11,3
TA6/ TA6	2	1,3
Pas de bande	5	3,3
Allèles	**Nombre**	**%**
TA6	21	7,2
TA7	271	92,8

Comme le montre le tableau XXXIII, il y a une prédominance du génotype homozygote muté TA7/TA7 dans la population étudiée (84,1%) soit 127 cas. Le génotype hétérozygote TA6/TA7 est retrouvé chez 11,3 % de notre population soit 17 patients. Le génotype homozygote sauvage TA6/TA6 apparait chez deux patients seulement.

Le génotypage (TA)n(rs8175347) n'a pas été possible pour les cinq patients restant car aucune bande n'a été visualisée lors de la séparation électro phorétique. Les conditions d'amplification validées par l'utilisation d'un contrôle interne nous ont conduit à attribuer cela à un défaut d'extraction de l'ADN.

La distribution allélique du rs8175347 montre une nette prédominance de l'allèle TA7 dans notre population (92,8%).

3.1.2.- Répartition des génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) selon le sexe :

Tableau XXXIV : Répartition des génotypes (TA)n(rs8175347) selon le sexe (Groupe 1) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype (TA)n(rs8175347)	Sexe masculin		Sexe féminin		Total		P
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	
TA7/ TA7	93	73,2	34	26,8	127	100	0,519
TA6/ TA7	11	64,7	6	35,3	17	100	
Total	104		40		144		

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux sexes pour le génotype TA7/TA7 du polymorphisme (TA)n(rs8175347).

3.2.- Génotypage et répartition des allèles du polymorphisme G211A (rs4148323) :

Tableau XXXV : Description de la population d'étude (Groupe 1) selon le génotypage et la répartition des allèles du polymorphisme G211A (rs4148323) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype	Nombre	%
G211A (rs4148323)	**n=151**	**100**
(GG)	140	92,7
(GA)	1	0,7
(AA)	0	0
Pas de bande	10	6,6
Allèles	**Nombre**	**%**
G	281	99,6
A	1	0,4

Le génotype homozygote sauvage GG est retrouvé chez la quasi-totalité de notre population d'étude (92,7%) soit 140 cas.

Un seul cas hétérozygote GA a été retrouvé. Le génotype homozygote muté AA n'apparait chez aucun de nos patients.

Le génotypage G211A (rs4148323) n'a pas été possible pour dix patients car aucune bande n'a été visualisée lors de la séparation électro phorétique. Les conditions d'amplification validées par l'utilisation d'un contrôle interne nous ont conduit à attribuer cela à un défaut d'extraction de l'ADN.

4.- Etude des facteurs de risque cardiovasculaire des patients avec syndrome de Gilbert confirmé (TA7/ TA7) :

Nous avons étudié le risque cardiovasculaire chez les patients génotypés GS (**TA7/TA7)**. Pour cela, nous avons exclu les patients génotypés **TA6/ TA6**, **TA6/ TA7** et les patients n'ayant pas pu être génotypés.
Au total, cette population d'étude comporte 127 patients.

Tableau XXXVI : Caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques, biomarqueurs du métabolisme des lipides et de l'inflammation des patients GS TA7/ TA7 (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Patients (n=127)	Valeurs usuelles
Age (ans)	31± [26-45]	–
Sexe (H/F)	93/34	–
IMC (kg/m^2)	24,24 ± 3,97	18,5 - 25
BRB T (mg/L)	19,12 ± [13,50-26,58]	< 12
BRB D (mg/L)	4,89 ± [3,61-6,38]	≤ 2
BRB I (mg/L)	13,12 ± [8,59-19,51]	<10
ASAT (U/L)	20,30 ± [15,70-23,90]	<50
ALAT (U/L)	15,10 ± [11,70-22,3]	<50
PAL (U/L)	72 ± [59,60-87,20]	40-129
GGT (U/L)	17,40 ± [12,90-28,70]	8-61
TP (g/L)	73,25 ± [70,4-76,56]	60-80
ALB (g/L)	48,87 ± [45,69-52,23]	35-52
Glucose (g/L)	0,95 ± [0,85-1,08]	0,74-1,06
Triglycérides (g/L)	0,92 ± [0,61-1,22]	<1,5
Cholestérol total (g/L)	1,54 ± [1,30-1,80]	<2
HDL-c (g/L)	0,45 ± [0,37-0,53]	>0,4
LDL-c (g/L)	0,90 ± [0,70-1,13]	<1,30
Ratio HDL : LDL	0,50 ± [0,41-0,64]	
CRP (mg/L)	0,56 ± [0,33-1,99]	<5
Acide urique (mg/L)	52,15 ± [41,41-58,75]	34-70
Fer (µg/dL)	106,45 ± [86,37-130,32]	33-193
CS (%)	31,50 ± [24,80-39,50]	20-40
Transferrine (g/L)	2,37 ± [2,17-2,64]	2-3,6
Céruloplasmine (g/L)	0,22± [0,19-0,26]	0,15-0,30

Une prédominance masculine est observée avec un sex ratio égal à 2,7, ce qui signifie qu'il y'a 2,7 fois plus d'homme dans population d'étude des cas de GS.
L'âge médian des patients est de 31± [26-45] et l'âge moyen est de 36,5 ± 15,7 ans avec des extrêmes de 17 ans à 90 ans.
La valeur médiane de la CRP est de 0,56 mg/L avec un intervalle interquartile de 0,33 à 1,99 mg/L alors que sa valeur moyenne est de 3,38 mg/L.

4.1.- Etude du statut antioxydant et de l'inflammation des patients GS (TA7/ TA7) :

Les taux de bilirubine sérique étant physiologiquement plus élevés chez les hommes que chez les femmes, nous avons étudié séparément les patients au génotype TA7/ TA7 selon le sexe.

De plus, les effets associés à l'âge liés à une hyperbilirubinémie légère ont été observés dans des études antérieures par rapport aux indicateurs de santé métabolique chez les hommes et les femmes, nous avons donc également étudié l'effet de l'âge dans notre étude.

4.1.1.- Analyse des biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation dans deux sous-groupes d'âge :

Tableau XXXVII : Caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques et biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation des patients GS dans deux sous-groupes d'âge (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	GS Age <35 ans (n=66)	GS Age ≥ 35 ans (n=41)	Seuil p
Age (ans)	27 ± [22-30]	55 ± [41,50-59]	<0,001
IMC (kg/m^2)	22,74 ± 3,38	26,72 ± 3,65	<0,001
BRB I (mg/L)	16,33 ± [10,50-25,88]	10,41 ± [6,98-16,22]	<0,001
ASAT (U/L)	19,80 ± [15,77-22,77]	21,90 ± [16,95-24,54]	0,101
ALAT (U/L)	14,50 ± [11,12-20,22]	17,90 ± [11,85-25]	0,115
GGT (U/L)	15,45 ± [12,35-20,77]	21,80 ± [15,10-39,82]	0,001
Acide urique (mg/L)	51,02 ± [44,12-57,02]	53,40 ± [41,79-59,12]	0,339
CRP (mg/L)	0,49 ± [0,36-2,03]	0,55 ± [0,29-1,64]	<0,001
Fer (µg/dL)	109,60 ± [88,05-136,65]	95,15 ± [79,77-122,27]	0,077
CS (%)	32,32 ± [25,94-40,70]	29,60 ± [23,25-38,73]	0,235
Transferrine (g/L)	2,39 ± [2,12-2,68]	2,37 ± [2,17-2,47]	0,335
Céruloplasmine (g/L)	0,20 ± [0,18-0,23]	0,23 ± [0,22-0,27]	<0,001

Les individus du sous-groupe GS le plus âgé (n=41, âge médian de 55 ans) ont un IMC plus élevé (26,72 vs 22,74, p <0,001), des valeurs de GGT (21,80 vs 15,45, p <0,05), de CRP (0,55 vs 0,49, p <0,001) et Céruloplasmine (0,23 vs 0,20, p <0,001) plus élevées par rapport au sous-groupe GS le plus jeune (n=66, âge médian de 27 ans). Cependant, ils ont présenté des niveaux de BRB indirecte (UCB) plus faibles par rapport au sous-groupe GS le plus jeune (10,41 vs 16,33, p<0,001).

Les sujets du sous-groupe GS le plus âgé ont tendance à avoir une sidérémie plus faible (p=0,077) que les sujets du sous-groupe plus jeune.

4.1.2.- Analyse des biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation selon le sexe :

Tableau XXXVIII : Caractéristiques démographiques, paramètres biochimiques et biomarqueurs du stress oxydatif et de l'inflammation des patients GS selon le sexe (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Hommes GS (n=93)	Femmes GS (n=34)	Seuil p
Age (ans)	31 ± [24-40]	38 ± [27-57,50]	0,111
IMC (kg/m²)	24,23 ± 3,70	24,26 ± 4,75	0,830
BRB T (mg/L)	21,67 ± [15,26-28,37]	13,34 ± [9,78-18,75]	<0,001
BRB Directe (mg/L)	5,20 ± [3,97-6,54]	3,95 ± [2,60-4,91]	0,003
BRB I (mg/L)	15,53 ± [9,97-22,13]	9,27 ± [7,04-12,80]	<0,001
Hémoglobine (g/dL)	14,80 ± [13,82-15,47]	12,90 ± [12,00-13,50]	<0,001
ASAT (U/L)	21,10 ± [16,70-24,54]	17,50 ± [14,87-20,82]	0,006
ALAT (U/L)	16,40 ± [12,60-24,40]	12,20 ± [9,17-16,72]	<0,001
GGT (U/L)	18,90 ± [13,35-30,90]	14,65 ± [11,65-26,75]	0,038
Acide urique (mg/L)	54,92 ± [45,77-63,17]	41,21 ± [35,53-52,37]	<0,001
CRP (mg/L)	0,49 ± [0,28-1,72]	0,80 ± [0,36-2,88]	0,021
Fer (µg/dL)	110,40 ± [90,27-131,45]	88,85 ± [64,45-125,40]	0,007
CS (%)	33,80 ± [27,70-40,70]	27,13 ± [19,05-36,78]	0,007
Transferrine (g/L)	2,35 ± [2,13-2,60]	2,47 ± [2,27-2,74]	0,075
Céruloplasmine (g/L)	0,21 ± [0,19-0,24]	0,27 ± [0,22-0,30]	<0,001

Les sujets GS de sexe masculin ont montré des niveaux de BRB totale (21,67 vs 13,34, p<0,001), de BRB indirecte (15,53 vs 9,927, p<0,001) plus élevées que les sujets de sexe féminin. Ils ont également présenté des valeurs plus élevées d'hémoglobine (14,80 vs 12,90, p<0,001), d'ASAT (21,10 vs 17,50, p<0,05), d'ALAT (16,40 vs 12,20, p<0,001), de GGT (18,90 vs 14,65, p<0,05), d'acide urique (54,92 vs 41,21, p<0,001), de Fer sérique (110,40 vs 88,85, p<0,05) et de coefficient de saturation de la transferrine CS (33,80 vs 27,13, p<0,05) par rapport aux femmes.

Cependant, des valeurs plus faibles de CRP (0,49 vs 0,80, p<0,05) et de Céruloplasmine (0,21 vs 0,27, p<0,001) ont été constatées chez les hommes atteints du GS par rapport aux femmes.

Les sujets GS de sexe masculin ont tendance à avoir des valeurs plus faibles de Transferrine (p=0,075).

4.1.3.- Corrélations entre les concentrations de bilirubine indirecte (UCB) et les marqueurs du stress oxydatif dans la population étudiée GS (TA7/ TA7) :

Tableau XXXIX : Corrélations entre UCB et les marqueurs liés au stress oxydatif dans la population étudiée (TA7/ TA7) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Coefficient r	Seuil p
IMC (kg/m^2)	-0,147	0,142
CRP (mg/L)	-0,236	<0,05
Acide urique (mg/L)	0,070	0,438
FER	0,307	<0,05
CS	0,264	<0,05
Transferrine	0,079	0,411
Céruloplasmine	-0,433	<0,05

Dans l'ensemble de la population GS TA7/TA7 étudiée, les concentrations d'UCB ont montré des corrélations négatives et significatives avec la CRP (r=-0,236, p<0,05), et la Céruloplasmine (r= -0,433, p<0,05) et des corrélations positives et significatives avec le Fer (r=0,307, p<0,05) et le coefficient de saturation de la transferrine (r=0,264, p<0,05).

4.1.4.- Corrélations entre les concentrations de bilirubine indirecte (UCB) et les marqueurs liés au stress oxydatif dans les sous-groupes d'âge :

Tableau XL : Corrélations entre UCB et les marqueurs liés au stress oxydatif dans les sous-groupes d'âge (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Age < 35 ans (n=66)		Age ≥ 35 ans (n=41)	
	Coefficient r	Seuil p	Coefficient r	Seuil p
IMC (kg/m^2)	0,048	0,705	0,029	0,864
CRP (mg/L)	-0,002	0,985	-0,090	0,581
Acide urique (mg/L)	0,172	0,166	-0.052	0,748
FER (µg/dL)	0,29	<0,05	0,331	<0,05
CS (%)	0,24	0,062	0,348	<0,05
Transferrine (g/L)	0,022	0,866	0,129	0,461
Céruloplasmine (g/L)	-0,237	0,055	-0,287	0,073

Dans le sous-groupe plus âgé, les concentrations d'UCB ont montré des corrélations positives et significatives avec le Fer (r=0,331, p<0,05) et le coefficient de saturation de la transferrine (r=0,348, p<0,05) et une corrélation négative mais non significative avec la Céruloplasmine (r= -0,287, p=0,073).

Dans le sous-groupe plus jeune, les corrélations d'UCB ont été retrouvées avec les mêmes paramètres ; positive et significative avec le Fer (r= 0,29, p<0,05), positive avec le coefficient de saturation de la transferrine (r=0,24, p=0,062) et négative avec la Céruloplasmine (r= -0,237, p=0,055).

4.1.5.- Corrélations entre les concentrations des deux types de bilirubine (BRB totale et BRB indirecte) et d'autres facteurs de risque cardiovasculaire selon le sexe :

Tableau XLI : Corrélations entre les deux types de bilirubine (BRB T, BRB I) et d'autres facteurs de risque cardiovasculaire selon le sexe
(Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Hommes GS (n=93)				Femmes GS (n=34)			
	BRB T		BRB I		BRB T		BRB I	
	r	p	r	p	r	p	r	p
IMC (kg/m²)	-0,256	0,021	-0,246	0,032	-0,011	0,958	0,047	0,82
CRP (mg/L)	-0,121	0,252	-0,120	0,257	-0,347	0,044	-0,323	0,062
ASAT (U/L)	0,005	0,959	0,003	0,979	0,264	0,131	0,323	0,062
ALAT (U/L)	-0,144	0,167	-0,148	0,156	0,149	0,399	0,211	0,23
GGT (U/L)	-0,208	0,046	-0,211	0,042	0,140	0,429	0,187	0,289
BRB T (mg/L)	–	–	0,984	0,001	–	–	0,962	0,001
BRB I (mg/L)	0,984	0,001	–	–	0,962	0,001	–	–

Une forte corrélation significative est retrouvée entre la bilirubine totale et la bilirubine indirecte chez les deux sexes.

Chez les hommes ; une corrélation négative statistiquement significative est retrouvée pour l'IMC ($r= -0,256$, $p<0,05$) et la GGT ($r= -0,208$, $p<0,05$) avec la bilirubine totale et la bilirubine indirecte.

Chez les femmes ; une corrélation négative statistiquement significative est retrouvée entre la CRP ($r= -0,347$, $p<0,05$) et la bilirubine totale.

4.2.- Etude du bilan lipidique et de la glycémie à jeun des patients GS (TA7/ TA7) :

4.2.1.- Analyse des biomarqueurs du métabolisme lipidique et de la glycémie à jeun dans deux sous-groupes d'âge :

Tableau XLII : Bilan lipidique et glycémie à jeun des patients GS dans deux sous-groupes d'âge (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Age <35 ans (n=66)	Age ≥35 ans (n=41)	Seuil p
Triglycérides (g/L)	0,79 ± [0,52-1,13]	1,02 ± [0,80-1,26]	0,008
Cholestérol total (g/L)	1,39 ± [1,26-1,63]	1,79 ± [1,44-1,95]	< 0,001
HDL-c (g/L)	0,46 ± [0,39-0,56]	0,42 ± [0,37-0,51]	0,192
LDL-c (g/L)	0,80 ± [0,65-1,00]	1,13 ± [0,90-1,24]	< 0,001
Ratio HDL: LDL	0,53 ± [0,45-0,71]	0,41 ± [0,33-0,51]	< 0,001
Glucose (g/L)	0,93 ± [0,84-1,02]	0,99 ± [0,85-1,19]	0,023

Les sujets du sous-groupe GS le plus âgé (n=41) ont des valeurs de Triglycérides (1,02 vs 0,79, p <0,05), de Cholestérol total (1,79 vs 1,39, p <0,001), de LDL-c (1,13 vs 0,80, p <0,001) ainsi qu'une glycémie (0,99 vs 0,93, p <0,05) plus élevées par rapport au sous-groupe GS le plus jeune (n=66).

Cependant, ils ont présenté un Ratio HDL : LDL plus faible par rapport au sous-groupe GS le plus jeune (0,53 vs 0,41, p<0,001).

Aucune différence n'est observée entre les deux sous-groupes pour le HDL-c.

4.2.2.- Analyse des biomarqueurs du métabolisme lipidique et de la glycémie à jeun selon le sexe :

Tableau XLIII : Bilan lipidique et glycémie à jeun des patients GS selon le sexe (Janvier 2020 –Décembre 2023)

Paramètres	Hommes GS (n=93)	Femmes GS (n=34)	Seuil p
Triglycérides (g/L)	0,92 ± [0,61-1,22]	0,92 ± [0,61-1,19]	0,947
Cholestérol total (g/L)	1,45 ± [1,27-1,70]	1,77 ± [1,51-2,04]	<0,001
HDL-c (g/L)	0,44 ± [0,36-0,50]	0,50 ± [0,41-0,61]	0,007
LDL-c (g/L)	0,84 ± [0,70-1,00]	1,11 ± [0,93-1,23]	<0,001
Ratio HDL:LDL	0,52 ± [0,43-0,66]	0,44 ± [0,38-0,54]	0,077
Glucose (g/L)	0,95 ± [0,85-1,05]	0,94 ± [0,85-1,10]	0,949

L'analyse des biomarqueurs du métabolisme lipidique des sujets GS selon le sexe retrouve des valeurs plus élevées de Cholestérol total (1,77 vs 1,45, p<0,001), de HDL-c (0,50 vs 0,44, p<0,05) et de LDL-c (1,11 vs 0,84, p<0,001) chez les femmes.

Le Ratio HDL:LDL a tendance à être plus élevé chez les hommes (0,52 vs 0,44, p=0,077).

Aucune différence entre les deux sexes n'est observée pour les Triglycérides et pour la glycémie.

4.2.3.- Corrélations des concentrations des deux types de bilirubine (BRB totale et BRB indirecte) avec la glycémie à jeun et le bilan lipidique selon le sexe :

Tableau XLIV : Corrélations des deux types de bilirubine (BRB T et BRB I) avec la glycémie à jeun et le bilan lipidique selon le sexe (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Hommes GS (n=93)				Femmes GS (n=34)			
	BRB T		BRB I		BRB T		BRB I	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Glucose (g/L)	-0,263	0,012	-0,286	0,006	0,093	0,614	0,028	0,88
Triglycérides (g/L)	-0,183	0,081	-0,172	0,102	-0,155	0,382	-0,73	0,681
Cholestérol total (g/L)	-0,193	0,064	-0,168	0,107	-0,398	0,02	-0.312	0,073
HDL-c (g/L)	0,069	0,516	0,067	0,526	0,094	0,604	0,124	0,491
LDL-c (g/L)	-0,179	0,087	-0,151	0,149	-0,456	0,007	-0,395	0,021
Ratio HDL:LDL	0,198	0,059	0,170	0,105	0,371	0,037	0,331	0,064

Chez les hommes ; la glycémie a une corrélation négative statistiquement significative avec la bilirubine totale et la bilirubine indirecte ($p<0,05$).

Chez les femmes ; la bilirubine totale montre une corrélation négative statistiquement significative avec le Cholestérol total ($r= -0,398$, $p<0,05$) et une corrélation positive statistiquement significative avec le Ratio HDL:LDL ($r= 0,371$, $p<0,05$) alors que la bilirubine indirecte retrouve une corrélation négative statistiquement significative avec le LDL-c ($r= -0,395$, $p<0,05$).

II.- Analyse des patients du groupe 2 :

1.- Analyse descriptive des patients :

1.1.- Caractéristiques générales des patients :

1.1.1.- Répartition selon les indicateurs de lieu :

- **Lieu de recrutement :**

Tableau XLV : Répartition des cas (Groupe 2) selon les indicateurs de lieu de recrutement (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Lieu de recrutement	Nombre	%
HMRUO	32	66,6
CHUO	12	25
Cabinets médicaux privés	3	6,3
HMRUC	1	2,1
Total	48	100

On estime à 66,6% le nombre de patients recrutés au niveau de l'HMRUO et 25% au niveau du CHUO.

Le reste des patients soit 8,4% des cas a été recruté au niveau de cabinets médicaux privés (3 cas) et de l'HMRUC (1 cas).

- **Service de recrutement :**

Tableau XLVI : Répartition des cas (Groupe 2) selon les services de recrutement (Janvier 2020 –Décembre 2023)

Service de recrutement	Nombre	%
Pédiatrie	42	87,5
Gastrologie	3	6,2
Hématologie	1	2,1
Laboratoire de biochimie HMRUO	2	4,2
Total	48	100

La majorité de nos patients proviennent du service de pédiatrie (87,5%). Le reste des patients a été recruté des services de gastrologie (3 cas), d'hématologie (1 cas) ainsi qu'au niveau du laboratoire de biochimie de l'HMRUO (2 cas).

Les patients recrutés au niveau du laboratoire de biochimie de l'HMRUO (2 cas) sont des patients ayant un lien de parenté avec les patients du groupe 1.

- **Origine géographique :**

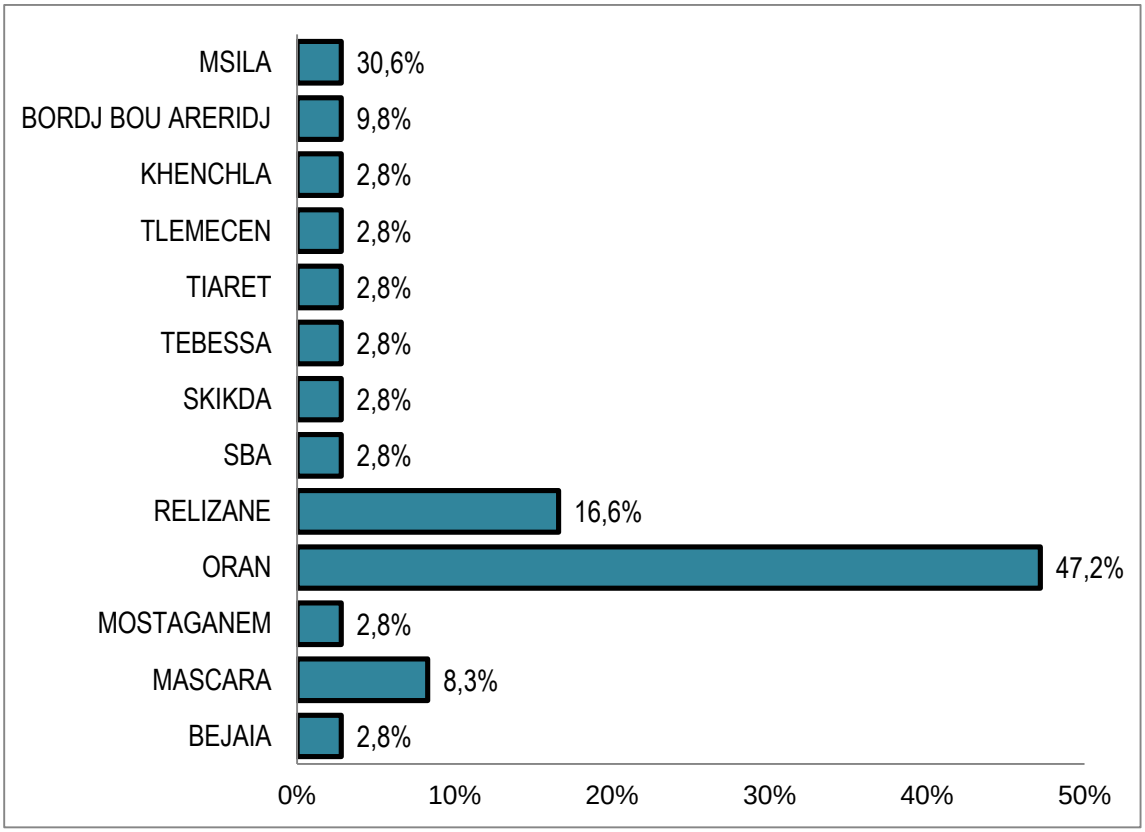


Fig. 28 : Répartition des cas (Groupe 2, n=48) selon la wilaya d'origine (Janvier 2020 –Décembre 2023)

Les patients étudiés sont originaires de 13 des 48 wilayas du territoire national. La wilaya d'Oran est la plus représentée (47,2%) suivie des wilayas de Relizane (16,6%) et de Mascara (8,3%).

Les autres wilayas (Mostaganem, Sidi Bel Abbès, Tlemcen, Tiaret, Bejaia, Tebessa, M'sila, Khenchela, Bordj Bou Arreridj et Skikda) sont retrouvées à fréquence égale (2,8%) soit un patient pour chaque wilaya.

1.1.2.- Répartition selon l'âge et le sexe :

- **Tranches d'âge et sexe :**

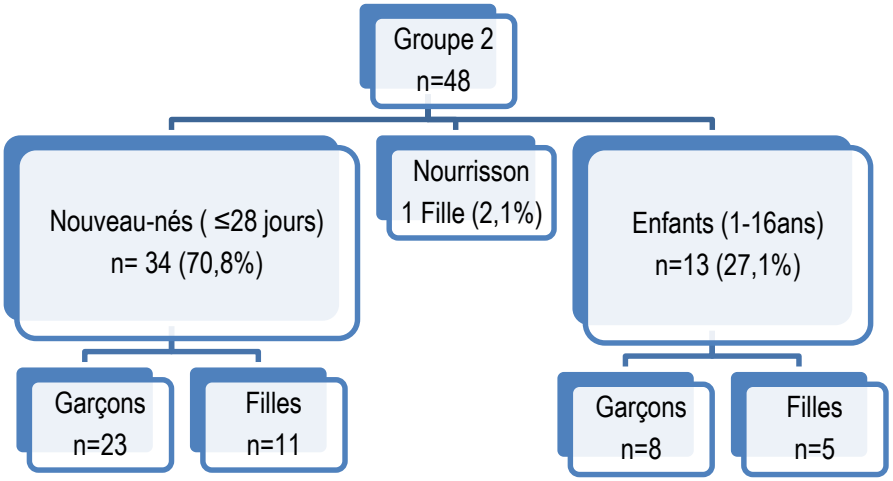


Fig. 29 : Répartition des cas (Groupe 2) selon l'âge et le sexe
(Janvier 2020 – Décembre 2023)

Le pic de fréquence de l'âge se situe chez les nouveaux-nés (≤28 jours) avec 70,8% des cas.

Tableau XLVII : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon l'âge et le sexe
(Janvier 2020 – Décembre 2023)

Tranches d'âge	Sexe masculin		Sexe féminin		Sex Ratio	P
	Nombre	%	Nombre	%		
Nouveaux-nés (≤28 jours)	23	74,2	11	64,7	2,1	0,463
Nourrissons (>28 jours - <1 an)	0	0	1	5,9	/	
Enfants (1-16 ans)	8	25,8	5	29,4	1,6	
Total	31	100	17	100	1,8	

Une prédominance masculine est observée avec un sex ratio égal à 1,8, ce qui signifie qu'il y'a 1,8 fois plus de garçons dans la population d'étude de cas.

Le pic de fréquence de l'âge des cas est identique chez les deux sexes, il se situe chez les nouveaux-nés (≤28 jours).

1.1.3.- Consanguinité parentale :

Tableau XLVIII : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon la consanguinité parentale (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Consanguinité parentale	Nombre	%
Présence	5	14,7
Absence	29	85,3
Total	34	100

Les données sur la consanguinité parentale des patients étudiés sont indiquées sur les dossiers de 34 patients. Des antécédents de consanguinité parentale ont été signalés chez seulement 14,7% de la population étudiée.

1.2.- Caractéristiques cliniques des patients :

1.2.1.- Antécédents des patients :

1.2.1.1.- Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie :

Plus de la moitié de nos patients ont des antécédents personnels d'hyperbilirubinémie (63,4%).

- **Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie par tranches d'âge :**

Tableau XLIX : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les antécédents personnels d'hyperbilirubinémie par tranches d'âge (Janvier 2020–Décembre 2023)

Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie	Nouveaux-nés (≤28 jours)	Nourrissons (>28 jours - <1 an)	Enfants (1-16 ans)
Avec antécédents	15	0	11
Sans antécédents	12	1	2
Total	27	1	13

Chez les enfants (1-16 ans), nous n'avons pas été informé sur la notion d'antécédents personnels d'hyperbilirubinémie chez 3 cas. Pour le reste des enfants (13 cas), la quasi-totalité ont des antécédents personnels d'hyperbilirubinémie (11 cas). L'âge médian d'apparition de l'hyperbilirubinémie chez ces patients est de 4 ans et demi.

Le seul patient appartenant au sous-groupe des nourrissons (>28 jours - <1 an) que nous avons reçu n'a pas d'antécédents personnels d'hyperbilirubinémie.

Chez les nouveaux-nés (≤28 jours), nous n'avons pas été informé sur la notion d'antécédents personnels d'hyperbilirubinémie chez 20,6% de ces patients soit 7 cas. Pour le reste des nouveaux-nés (27 cas), les antécédents personnels d'hyperbilirubinémie sont présents chez 44,1% des cas et ils sont absents chez 35,3% d'entre eux.

L'âge médian d'apparition de l'hyperbilirubinémie chez les nouveaux-nés est de 3 jours.

1.2.1.2.- Antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie :

Les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie sont retrouvés chez 35,9% des patients.

Tableau L : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Antécédents d'hyperbilirubinémie	Nombre	%
Présence	14	35,9
Absence	25	64,1
Total	39	100
Degré parenté (n=14)		
1er degré	8	57,1
2ème degré	9	64,3
3ème degré	3	21,4
Parenté 1er degré (n=8)		
Père	3	37,5
Mère	5	62,5
Parenté 2ème degré (n=9)		
Frère	3	33,3
Sœur	1	11,1
Grand parent	5	55,5
Parenté 3ème degré (n=3)		
Oncles, tantes	3	100
Lien de parenté	**Nombre**	**%**
Ligne directe (grands-parents et parents)	8	57,1
Ligne collatérale (frères et sœurs, oncles)	4	28,6
Ligne directe et ligne collatérale	2	14,3

Les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie sont présents chez 14 patients, les degrés de parenté les plus retrouvés chez ces patients sont le deuxième degré (9 cas) et le premier degré (8 cas). La parenté au 3ème degré apparait chez trois (3) patients.

La lignée directe est la plus touchée par l'hyperbilirubinémie (8 cas) dont la mère et les grands parents sont retrouvés à fréquence similaire (5 cas). La lignée directe associée à la ligne collatérale a été retrouvée chez 2 cas seulement.

1.2.2.- Motifs de la demande d'analyse et circonstances de découverte selon les tranches d'âge :

1.2.2.1.- Motifs de la demande d'analyse chez les nouveau-nés (≤28 jours) :

Tableau LI : Les motifs de la demande d'analyse chez les nouveau-nés (≤28 jours) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Motifs de la demande d'analyse	Nombre (n=28)	%
Ictère à BRB libre	20	71,4
Risque infectieux	5	17,8
Détresse respiratoire	4	14,3
Incompatibilité ABO probable	4	14,3
Prématurité simple	2	7,1
Autres	4	14,3

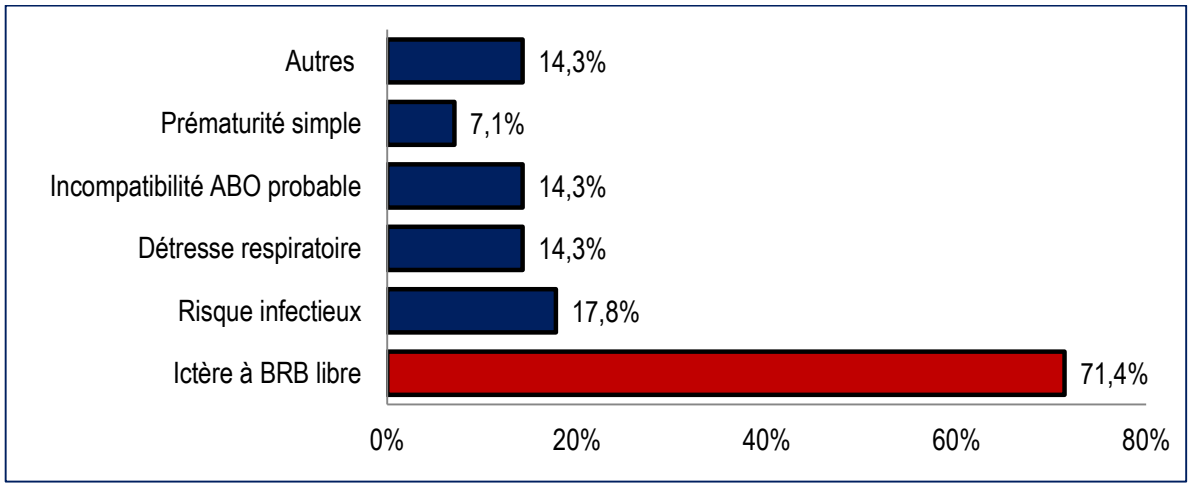


Fig. 30 : Répartition des nouveau-nés (≤28 jours) de la population d'étude (Groupe 2) selon les motifs de la demande d'analyse (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Les motifs d'une demande d'analyse biologique chez les nouveau-nés sont multiples. L'ictère à bilirubine libre représente le motif le plus fréquemment retrouvé (71,4%). Le risque infectieux est observé chez 17,8% des patients suivis de la détresse respiratoire et la probabilité d'une incompatibilité ABO qui sont retrouvées à fréquence égale (14,3%).

D'autres motifs ont été observés chez 14,3% des patients soit 4 cas ; il s'agit de bilans demandés à l'occasion d'une macrosomie, d'un syndrome polymalformatif, d'une cardiopathie congénitale, d'antécédents d'hépatite B chez la mère.

1.2.2.2.- Motifs de la demande d'analyse chez les nourrissons (>28 jours- <1 an) :

Les motifs d'une demande d'un bilan biologique chez l'unique patient de cette classe d'âge sont l'exploration d'un ictère à bilirubine libre, d'une hypoglycémie ainsi que la suspicion d'une hypothyroïdie.

1.2.2.3.- Motifs de la demande d'analyse chez les enfants (1-16 ans) :

Tableau LII : Les motifs de la demande d'analyse chez les enfants (1-16 ans) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Motifs de la demande d'analyse	Nombre (n=13)	%
Ictère	6	46,1
Asthénie	5	38,5
Douleurs abdominales	2	15,4
Vomissements	2	15,4
Perte d'appétit	2	15,4
Contexte familial d'hyperbilirubinémie	6	46,1
Découverte fortuite	3	23,1

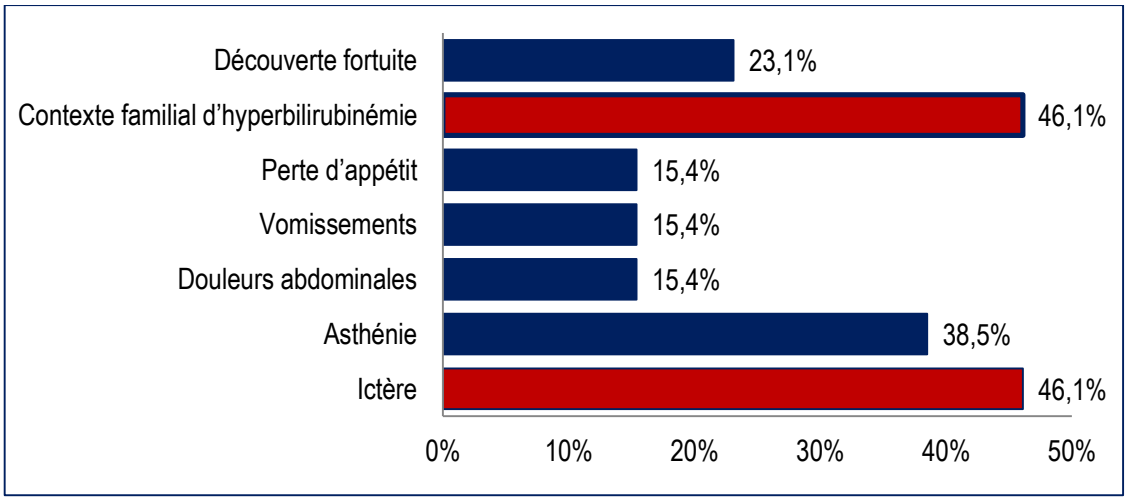


Fig. 31 : Répartition des enfants (1-16 ans) de la population d'étude (Groupe 2) selon les motifs de la demande d'analyse (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Un ensemble de motifs ont conduit les cliniciens à demander l'analyse génétique en vue de déterminer l'étiologie de l'hyperbilirubinémie observée chez les enfants (1-16 ans). Le contexte familial d'hyperbilirubinémie et la présence de l'ictère sont les motifs les plus fréquents (6 cas).

Les autres symptômes cliniques de nos patients sont également des motifs de demande d'une exploration génétique dont l'asthénie (5 cas), les douleurs abdominales (2 cas), les vomissements (2 cas) et la perte d'appétit (2 cas).

La découverte fortuite d'une hyperbilirubinémie libre isolée est un autre motif retrouvé chez 3 cas. Cette découverte fortuite regroupe les bilans demandés pour le contrôle d'un diabète type 1 déséquilibré, la prise en charge d'une aplasie médullaire sévère ainsi que la prise en charge d'une cétose diabétique.

1.2.3.- Type d'allaitement reçu chez les nouveau-nés :

Tableau LIII : Description du type d'allaitement chez les nouveau-nés (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Type d'allaitement	Nombre	%
Allaitement maternel exclusif	7	20,6
Allaitement artificiel	9	26,5
Allaitement mixte (maternel et artificiel)	1	2,9
Allaitement inconnu	17	50
Total	34	100

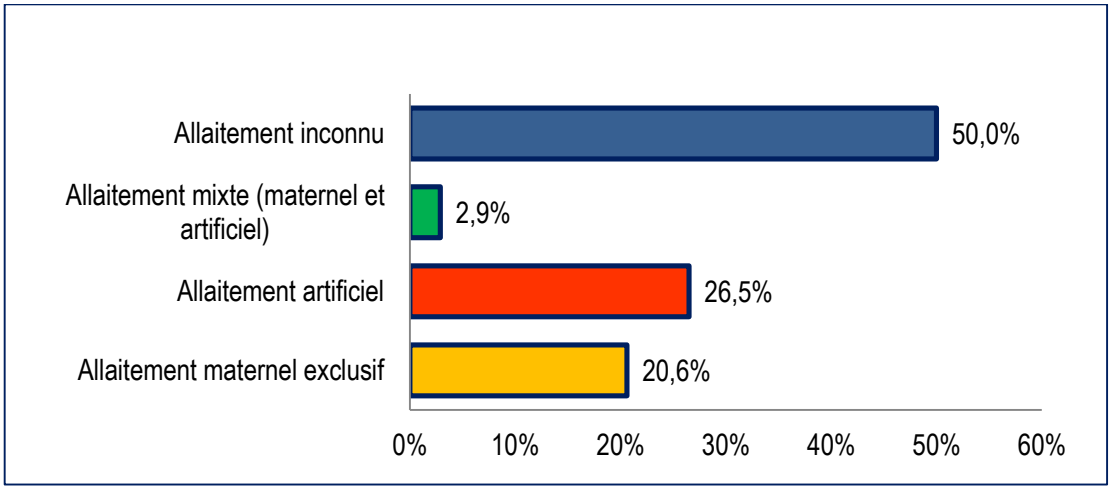


Fig. 32 : Répartition des nouveau-nés selon le type d'allaitement (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Le type d'allaitement n'est pas connu chez la moitié des nouveaux-nés (17 cas). Chez l'autre moitié de ces patients, l'allaitement artificiel est le plus fréquent (9 cas) suivi de l'allaitement maternel exclusif (7 cas).

2.- Etude du profil biologique des patients :

2.1.- Profil de l'hémolyse :

Tableau LIV : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les paramètres du bilan d'hémolyse (Janvier 2020–Décembre 2023)

Paramètres	Median ± range	Mean ± SD	Valeurs usuelles
Hémoglobine (g/dL)	14,90 ± [12,7-17,1]	14,94 ± 3,46	**0–15 j :** 15,5-21,5 **15 j– 2 mois :** 12-16,5 **2 mois–1 an :** 10,4-13 **1–16 ans :** 11-14,5
Taux de réticulocytes (Valeur absolue : éléments/mm^3)	83600,0 ± [51334,5 -196750]	117040,4 ± 91555,33 (23439,0 - 308100,0)	<120.000

Le bilan hématimétrique de la population pédiatrique étudiée retrouve :

• Un taux moyen d'hémoglobine de 14,94 g/dL. Les valeurs d'hémoglobine sont dans l'intervalle des valeurs de référence en fonction de l'âge pédiatrique chez la majorité des nouveaux-nés (81,2%) et chez la totalité des enfants. Seulement 18,7% des cas de nouveaux-nés soit 6 patients dont l'âge est compris de (0-15j) ont des taux inférieurs à 15,5 g/dL. Une seule valeur d'hémoglobine inférieure à 12 g/dL est retrouvée chez un patient dont l'âge est compris (28 jours- 2mois).

• Un taux médian de réticulocytes de 83600,0 éléments/mm^3. Les taux de réticulocytes sont inférieurs à 120.000 éléments/mm^3 chez la majorité de la population pédiatrique étudiée (64,3%). Des taux supérieurs à 120000 éléments/mm^3 sont observés chez 35,7% des cas.

2.2.- Profil hépatique :

Tableau LV : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon les paramètres du bilan hépatique (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Median ± range	Mean ± SD (range)
BRB T (mg/L)	106,28 ± [27,72 – 150,13]	100,36 ± 66,67 (3,40- 256,0)
BRB D (mg/L)	5,76 ± [3,47 -7,94]	6,72 ± 5,30 (0,85- 28,02)
BRB I (mg/L)	97,39 ± [17,55 -144,5]	92,47 ± 65,98 (1,79- 250,66)
ASAT (U/L)	31,80 ± [19,9-51,3]	38,54 ± 24,81 (9,50- 104,30)
ALAT (U/L)	13,45 ± [10,75-18,72]	15,75 ± 7,75 (6,8- 39,3)
PAL (U/L)	185 ± [95,0-262,2]	199,89 ± 126,20 (28,0- 475,4)
GGT (U/L)	17 ± [12,0 -57,0]	49,73 ± 69,29 (9,5- 246,7)
TP (g/L)	64 ± [56,9-70,27]	64,35 ± 8,51 (54,00- 78,80)
ALB (g/L)	44,50 ± [42,5-47,39]	44,39 ± 4,01 (35,21- 51,16)

Dans notre population d'étude pédiatrique ; la bilirubine totale a un taux médian de 106,28 mg/L, la bilirubine directe a un taux médian de 5,76 mg/L et la bilirubine indirecte a un taux médian de 97,39 mg/L.

Une hyperbilirubinémie totale BRB T ≥17mg/L est retrouvée chez la totalité des nouveaux-nés (≤28 jours) au moment du prélèvement (100%). Cette hyperbilirubinémie totale est à fraction BRB libre (BRB Indirecte ≥8mg/L) chez la totalité des nouveaux-nés (≤28 jours).

Une hyperbilirubinémie BRB T ≥12mg/L est retrouvée chez la majorité des enfants (1-16 ans) au moment du prélèvement (9 cas). Le reste des patients ont une BRB T <12mg/L (4 cas).

Dans notre population d'étude pédiatrique ; les enzymes de la cytolyse hépatique ASAT, ALAT ont des valeurs médianes d'ASAT de 31,80 U/L et d'ALAT de 13,45 U/L.

Les valeurs d'ALAT sont toutes dans l'intervalle des valeurs normales en fonction de l'âge pédiatrique ; (ALAT < 50U/L) chez la totalité des patients appartenant aux deux tranches d'âge nouveaux-nés et nourrissons, (ALAT < 40U/L) chez la totalité des enfants (1-16 ans).

Pour les valeurs d'ASAT, à l'exception d'une seule valeur, elles sont toutes dans l'intervalle des valeurs normales en fonction de l'âge pédiatrique. Tous les patients dont l'âge est de 0 à 10 jours ont des valeurs d'ASAT<150U/L, chez les patients âgés de 10 jours à 2 ans, une seule valeur d'ASAT est retrouvée supérieure à la limite de référence (ASAT>80U/L). Les patients âgés de plus de 2 ans ont tous des valeurs normales (ASAT<40U/L).

Dans notre population d'étude pédiatrique ; les enzymes de la fonction biliaire retrouvent une valeur moyenne de PAL de 199,89 U/L et une valeur médiane de GGT de 17 U/L.

Les valeurs de PAL et de GGT sont toutes dans l'intervalle des valeurs de référence en fonction de l'âge pédiatrique excepté deux valeurs qui sont supérieures à limite de référence (PAL >320 U/L, PAL >390 U/L) et (GGT >147 U/L, GGT> 32 U/L).

-Les capacités de synthèse hépatique sont évaluées par le dosage de l'albumine et des protides totaux. Ceux-ci montrent un taux moyen d'albumine de 44,39 g/L et un taux moyen de protides de 64,35 g/L.

Les protidémies de nos patients sont toutes dans l'intervalle des valeurs de référence en fonction de l'âge pédiatrique à l'exception d'une valeur (TP<44 g/L) dans le sous-groupe des nouveaux nés. Les taux d'albumine sont pratiquement tous normaux selon l'âge sauf 4 cas de nouveau-nés qui ont une albuminémie augmentée (ALB>39 g/L).

- **Répartition de la bilirubine totale selon les tranches d'âge :**

Tableau LVI : Répartition de la bilirubine totale (Groupe 2) selon les tranches d'âge pédiatriques (Janvier 2020 – Décembre 2023)

BRB totale (mg/L)	Nouveaux-nés (≤28 jours)	Nourrissons (>28 jours - <1 an)	Enfants (1-16 ans)	P
Moyenne ±SD	126,79 ± 46,70	105,77	34,88± 67,25	0,0001
Médiane ± range	123,16 ± [98,16 -163,48]		14,43 ± [8,57 – 25,33]	

Une différence significative de la bilirubine totale sérique est observée dans notre population d'étude pédiatrique entre les trois tranches d'âge.

Tableau LVII : Récapitualtif des caractéristiques démographiques, paramètres biologique de la population étudiée (Groupe 2) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Paramètres	Patients (n)	Valeurs usuelles
Age	Nouveaux-nés (≤28 jours) n34: 5±[3 - 8] jrs Nourrissons (>28 jours -<1 an) n1: 30 jours Enfants (1-16 ans) n13 : 9 ± [5,5- 14,5] ans	
Sexe (M/F) (n)	31/17 n48 (*Sex* ratio = 1,8)	
Hémoglobine (g/dL)	14,94 ± 3,46 n43	**0-15 j :** 15,5-21,5 **15 j- 2 mois :** 12-16,5 **2 mois-1 an :** 10,4-13 **1-16 ans :** 11-14,5
Taux de réticulocytes (élèments/mm^3)	83600,0 ± [51334,5 -196750] n31	<120000
BRB T (mg/L)	106,28 ± [27,72 – 150,13] n48	<12
BRB D (mg/L)	6,72 ± 5,30 (0,85- 28,02) n48	Nouveaux-nés : <6 Nourissons/Enfants : <2
BRB I (mg/L)	97,39 ± [17,55 -144,5] n48	<10
ASAT (U/L)	31,80 ± [19,9-51,3] n48	**0-10 j :** 47-150 **10j-24 mois :** 9-80 **>24 mois :** 13-40
ALAT (U/L)	13,45 ± [10,75-18,72] n48	**< 5 j :** 6-50 **<12 mois :** 13-45 **1-3 ans :** 5- 45 **4-16 ans :** 10- 40
PAL (U/L)	199,89 ± 126,20 (28,0- 475,4) n48	**< 24 mois :** 15-420 **2-10 ans :** 100-320 **10- 16 ans :** 100-390
GGT (U/L)	17 ± [12,0 -57,0] n48	**0-1 mois :** 13-147 **1-2 mois :** 12-123 **2-4 mois :** 8-90 **4 mois-10 ans :** 5-32 **10- 15 ans :** 5-24
TP (g/L)	64,35 ± 8,51 (54,00- 78,80) n48	**0-15 j :** 44-76 **15 j-12 mois :** 51-73 **1-2 ans :** 56-75 **3-16 ans :** 60-80
ALB (g/L)	44,39 ± 4,01 (35,21- 51,16) n48	**0-15 j :** 30-39 **15 j-12 mois :** 22-48 **1-16 ans :** 36-52

3.- Etude moléculaire des patients :

3.1.- Etude du polymorphisme (TA)n(rs8175347) :

3.1.1.- Génotypage et répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347):

Tableau LVIII : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon le génotypage et la répartition des allèles du polymorphisme (TA)n(rs8175347) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype	Nombre	%
(TA)n(rs8175347)	n=48	100
TA7/ TA7	22	45,8
TA6/ TA7	10	20,8
TA6/ TA6	16	33,3
Allèles	**Nombre**	**%**
TA6	42	43,7
TA7	54	56,2

Sur l'ensemble de la population pédiatrique génotypée (TA)n(rs8175347), le génotype homozygote muté TA7/TA7 est retrouvé chez 22 cas soit près de la moitié de la population (45,8%). Le génotype homozygote sauvage TA6/TA6 apparait chez 16 patients et le génotype hétérozygote TA6/TA7 chez 10 patients.

La distribution allélique du rs8175347 montre une répartition presque égale entre les deux allèles TA6 : 43,7% et TA7 : 56,2%.

3.1.2.- Répartition des génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) selon le sexe :

Tableau LIX : Répartition des génotypes (TA)n(rs8175347) selon le sexe (Groupe 2) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype (TA)n(rs8175347)	Sexe masculin		Sexe féminin		Total		P
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	
TA7/ TA7	14	63,6	8	36,4	22	100	0,899
TA6/ TA7	6	60	4	40	10	100	
TA6/ TA6	9	56,2	7	43,7	16	100	
Total	29		19		48		

Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre le sexe masculin et le sexe féminin pour le génotype TA7/TA7.

3.1.3.- Répartition de la bilirubine totale selon les génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) :

Tableau LX : Répartition de la bilirubine totale selon les génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) dans la population d'étude (Groupe 2, n=48) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

BRB totale (mg/L)	TA6/TA6	TA6/TA7	TA7/TA7	P
Moyenne ±SD	143,38 ± 47,68	94,96 ± 72,79	72,20 ± 61,55	0,007
Médiane ± range	140,20 ± [114,9-172,04]	93,08 ± [18,29-165,11]	63,00 ± [15,36-11,00]	
BRB totale maximale	256,00	199,40	213,50	

Les valeurs de bilirubine totale retrouvées dans notre population d'étude pédiatrique montrent une différence significative entre les trois génotypes (TA6/TA6, TA6/TA7, TA7/TA7) du polymorphisme (TA)n(rs8175347).

3.2.- Génotypage du polymorphisme G211A(rs4148323) :

Tableau LXI : Description de la population d'étude (Groupe 2) selon le génotypage du polymorphisme G211A (rs4148323) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype	Nombre	%
G211A (rs4148323)	n=48	100
(GG)	43	89,6
(GA)	0	0
(AA)	0	0
Pas de bande	5	10,4

Le génotype homozygote sauvage GG est retrouvé chez la quasi-totalité de notre population pédiatrique étudiée (89,6%) soit 43 cas. Aucun cas des génotypes homozygote muté AA et hétérozygote GA n'a été retrouvé.

Le génotypage G211A (rs4148323) n'a pas été possible pour 5 patients car aucune bande n'a été visualisée lors de la séparation électro phorétique.

3.3.- Corrélation entre le génotype et l'allaitement maternel exclusif :

Tableau LXII : Description des nouveau-nés exclusivement allaités selon le génotypage du polymorphisme (TA)n(rs8175347) (Janvier 2020 – Décembre 2023)

Génotype	Nombre
(TA)n(rs8175347)	n=7
TA7/ TA7	4
TA6/ TA7	2
TA6/ TA6	1

Chez les nouveau-nés dont l'allaitement est maternel exclusif (7 cas), le génotype homozygote muté TA7/TA7 est retrouvé chez 4 cas. Le génotype homozygote sauvage TA6/TA6 apparait chez 1 cas seulement et le génotype hétérozygote TA6/TA7 chez 2 d'entre eux.

III.- Critères pour le calcul de l'incidence du GS dans la population générale :

Tableau LXIII : Procédés de calcul de l'incidence brute et standardisée du Syndrome de Gibert en population générale

Age (ans)	Population de référence Année 2022	Population Année Pop 2022 × 4	Nombre de cas
0-4	912 400	3 649 600	10
5-9	752 224	3 008 896	4
10-14	811 656	3 246 624	2
15-19	847 752	3 391 008	9
20-24	933 956	3 735 824	16
25-29	907 384	3 629 536	22
30-34	798 460	3 193 840	18
35-39	707 784	2 831 136	5
40-44	641 016	2 564 064	8
45-49	514 124	2 056 496	4
50-54	425728	1 702 912	1
55-59	336 816	1 347 264	10
60-64	225 436	901 744	2
65-69	189 892	759 568	2
70-74	150 596	602 384	4
75-79	98 324	393 296	1
80+	91 100	364 400	1
Total	2 336 176	9 344 704	119

Le taux d'incidence du GS a été calculé pour la Wilaya d'Oran. Pour cela, nous avons exclu les patients qui ont été recrutés en dehors de cette Wilaya.

Le calcul de l'incidence annuelle dans la population générale du syndrome de Gibert a nécessité la structure de la population moyenne par tranches d'âges quinquennales de la Wilaya d'Oran qui est 2 336 176 habitants.

L'étude s'est déroulée sur 4 ans de Janvier 2020 à Décembre 2023, colligeons ainsi tous les cas admis et diagnostiqués dans la Wilaya d'Oran au cours de cette période. L'année de référence pour le calcul de cette incidence est la population allant du 1er janvier 2022 à 31 Décembre 2022 ; cette même population est exposée pendant 4 ans, ce qu'on appelle le risque personnes × Année.

Les calculs ont permis d'aboutir aux résultats du taux d'incidence brut (TIB) estimé à 5,49 pour 100 000 du SG et un taux standardisé (TIS) de 3,0 pour 1000 000 dans la Wilaya d'Oran, présenté sur le **Tableau LXIV.**

Tableau LXIV : Taux d'incidence du GS estimé au niveau de la population de la Wilaya d'Oran à partir d'une population de référence Année 2024

Age (ans)	Population mondiale OMS	Taux brut pour 100 000	Taux standardisé Pour 1000 000
0-4	12000	0,270	0,324
5-9	10000	0,130	0,130
10-14	9000	0,060	0,054
15-19	9000	0,270	0,243
20-24	8000	0,430	0,344
25-29	8000	0,610	0,488
30-34	6000	0,560	0,336
35-39	6000	0,180	0,108
40-44	6000	0,310	0,186
45-49	6000	0,190	0,114
50-55	5000	0,060	0,030
5559	4000	0,740	0,296
60-64	4000	0,220	0,088
65-69	3000	0,260	0,078
70-74	2000	0,660	0,132
75-79	1000	0,250	0,025
80+	1000	0,270	0,027
Total	100 000	5,490	3,003

.

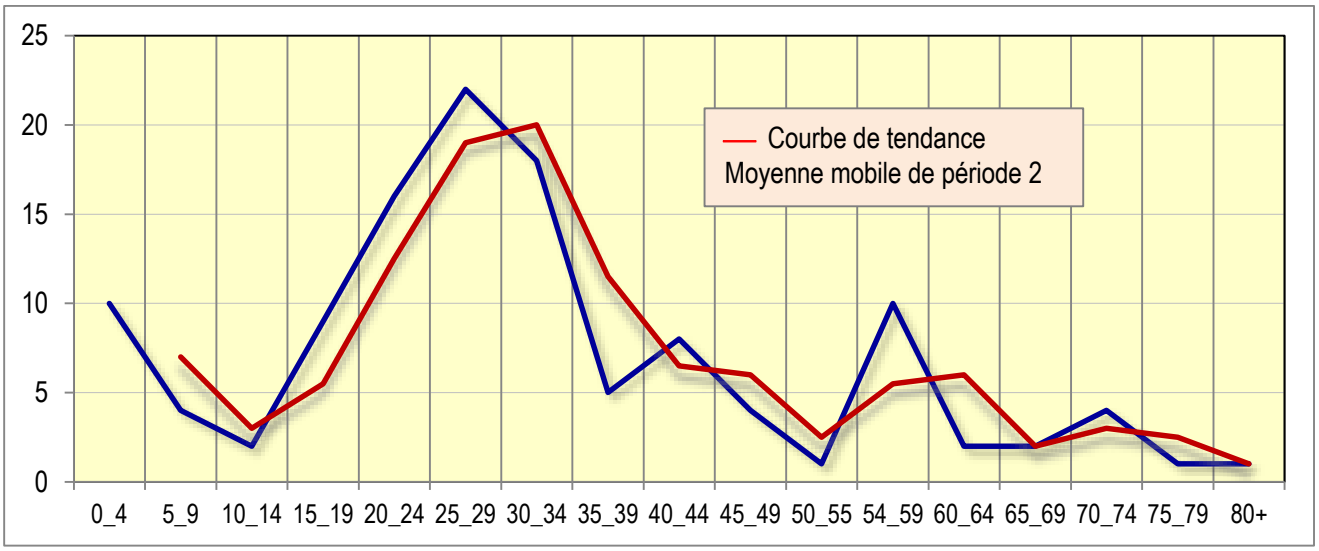


Fig. 33 : Courbe de tendance de moyenne mobile du GS
Estimation obtenue sur la population de la Wilaya d'Oran

Le pic de fréquence des cas GS (courbe bleue) ou classe modale selon l'âge dans la Wilaya d'Oran apparait dans les tranches allant de 25–34 ans. La courbe tendance (Courbe rouge de tendance de la moyenne mobile de période 2) des cas attendue dans les prochaines années est superposable à celle retrouvée dans notre étude.

Chapitre V :

Discussion

Sur l'ensemble des patients atteints d'hyperbilirubinémie libre isolée, aux antécédents d'hyperbilirubinémie libre isolée, colligés à partir des services de gastro-entérologie, d'hématologie et de pédiatrie à travers le territoire national (HMRUO, HMRUC, HCA, CHUO, EHUO) ainsi que des cabinets médicaux privés,199 patients sont inclus dans l'étude selon les critères d'éligibilité, prospectivement au cours de la période allant de Janvier 2020 à Décembre 2023.

Les patients sont répartis en deux groupes d'étude selon leur âge ; le groupe 1 représente la population d'étude adulte, il compte 151 patients. Le groupe 2 représente la population d'étude pédiatrique, il compte 48 patients.

1.- Caractéristiques générales des patients du groupe 1 :

1.1.- Répartition selon le sexe :

Une nette prédominance masculine est constatée dans notre population d'étude avec un *sex* ratio de 2,7. Ceci rejoint les données de la littérature dans le monde (115, 129, 432, 480). Cette dissimilitude entre les hommes et les femmes peut s'expliquer par la présence d'une plus grande charge de bilirubine par kilogramme de poids corporel chez les hommes ou l'inhibition de la glucuronidation enzymatique de la bilirubine par les stéroïdes androgènes ou les deux (115).

1.2.- Répartition selon l'âge :

L'âge moyen de la totalité des patients (n=151) est de 37,1 ± 15,4 ans avec des extrêmes de 17 ans à 90 ans. L'âge moyen des patients GS (n=127) est de 36,5 ± 15,7 ans. Ceci se rapproche des résultats obtenus dans d'autres pays (6,431).

L'âge médian de la totalité des patients (n=151) est de 33 ans et l'âge médian des patients GS (n=127) est de 31 ans ceci rejoint les résultats d'une étude australienne ou l'âge médian était de 30 ans (430).

Nous constatons que l'âge moyen de nos patients est différent de l'âge médian. Cela s'explique par la tendance de l'âge des cas qui ne suit pas une loi de distribution normale.

Tableau LXV : Comparaison de l'âge des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Age moyen ± σ (ans)
Wagner KH, Autriche (6)	37,0 ± 13,7
Wallner M, Autriche (274)	36,5 ± 13,4
Boon AC, Australie (431)	32,6 ± 11,2
Notre étude, Algérie	n=151 : 37,1 ± 15,4
	n=127 : 36,50 ± 15,71
Etudes et Auteurs	Age médian (ans)
Kundur AR, Australie (430)	30 ± 27
Notre étude, Algérie	n=151 : 33
	n=127 : 31

- **Répartition selon la tranche d'âge :**

Dans notre étude, l'incidence de l'hyperbilirubinémie la plus élevée se situait dans les deux tranches d'âge de 21 à 30 ans et de 31 à 40 ans (34,1%, 26%) ceci se rapproche de l'étude de Sun L et al. (470) où l'incidence la plus élevée du GS se situait dans les deux tranches d'âge allant de 21 à 30 ans (25,42%) et de 41 à 50 ans (28,81%).

Dans l'étude de Preisig D et al. (480), l'incidence maximale du GS se situait dans la tranche d'âge de 15 à 30 ans ce qui est également proche de nos résultats.

1.3.- Répartition selon l'origine géographique :

La répartition des cas de notre série à travers le territoire national, a révélé une prédominance des wilayas de l'ouest du pays ou les wilayas d'Oran et Mascara sont les plus représentées. Cette situation pourrait simplement résulter d'un biais de recrutement, lié à la localisation géographique de notre établissement hospitalier.

1.4.- Indice de Masse Corporelle :

L'indice de masse corporelle moyen des patients (n=151) est le même que l'indice de masse corporelle moyen des patients GS (n=127), il est de 24,2 ± 3,9 kg/m^2. Dans notre étude, l'IMC des patients était dans les normes ce qui rejoint les données de la littérature dans d'autres pays ou l'IMC varie entre 21,9 et 23,4 kg/m^2.

Tableau LXVI : Comparaison de l'IMC des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	IMC moyen ± σ (kg/m^2)
Wagner KH, Autriche (6)	23,0 ± 3,10
Kamal S, Egypte (190)	23,4 ± 2,36
Wallner M, Autriche (274)	23,2 ± 3,18
Boon AC, Australie (431)	22,3 ± 2,78
Tapan S, Turquie (461)	21,9 ± 1,7
Notre étude, Algérie	24,2 ± 3,9

Wagner KH et al. (6) et Kamal S et al. (190) ont montré un IMC plus faible chez les sujets GS par rapport à un groupe témoin, ce que nous n'avons pas pu vérifier dans notre étude car nous n'avons pas comparé nos patients à des témoins.

Nous avons constaté que les valeurs d'IMC de nos sujets GS dans les deux sous-groupes d'âge (</≥ 35 ans) sont proches des valeurs retrouvées dans l'étude de Wagner KH et al. (6). Ces mêmes auteurs ont montré que le sous-groupe GS plus âgé (≥ 35 ans) présentait un IMC inférieur de 13 % à celui du groupe témoin.

Le surpoids et particulièrement l'obésité, sont des facteurs de risque de diverses maladies chroniques (486,487) et puisque le poids et la composition corporelle changent avec l'âge (488), il est apparu que le phénotype GS avec un poids corporel inférieur dans la 4ème à la 6ème décennie de vie, contribue de manière significative à la réduction du risque de maladie cardiovasculaire (MCV) et de mortalité toutes causes confondues, par rapport aux témoins (489).

Aucune différence liée au sexe n'a été observée chez nos patients GS alors que les résultats de l'étude de Wagner KH et al. (6) ont montré un IMC plus faible (6 % plus bas dans le groupe GS hommes, 10 % plus bas dans le groupe GS femmes par rapport aux témoins). Nous n'avons pas comparé nos patients GS à des sujets témoins mais nous pouvons constater que l'IMC de nos sujets GS femmes s'éloigne de celle retrouvée dans l'étude de Wagner KH et al. (6).

Aucune corrélation entre les concentrations d'UCB et l'IMC n'a été observée chez la totalité de nos patients GS contrairement à ce qui a été retrouvé par Wagner KH et al. (6) ainsi que Wallner M et al. (479). Par contre, nous avons trouvé une corrélation significative chez les sujets GS de sexe masculin aussi bien avec la bilirubine totale qu'avec la bilirubine indirecte.

Les relations entre la bilirubine circulante et l'IMC ont été décrites auparavant, ainsi une réduction de l'IMC a été documentée chez les sujets GS (6,462) et des résultats d'études antérieures ont montré un IMC plus faible chez les personnes présentant une bilirubine circulante élevée (463, 464).

Par conséquent, nous pensons que l'IMC est influencé par le phénotype GS. De plus, les sujets GS de sexe masculin et les sujets GS âgés de 35 ans et plus tendraient à avoir un IMC plus faible ce qui pourrait jouer un rôle important dans l'effet cardioprotecteur.

2.- Caractéristiques cliniques des patients du groupe 1 :

2.1.- Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie et âge d'apparition :

Dans notre étude, les antécédents personnels d'hyperbilirubinémie ont été retrouvés chez plus de la moitié des cas et l'âge moyen d'apparition de l'hyperbilirubinémie chez ces patients est de 25 ans.

Cela concorde avec les données de la littérature qui ont rapporté que le syndrome de Gilbert est le plus souvent reconnu dans la deuxième ou la troisième décennie de la vie, et qu'il est rarement diagnostiqué avant la puberté (129).

D'autres auteurs ont également indiqué qu'un ictère clinique, a été accidentellement observé chez la majorité des patients atteints du GS, pendant la puberté ou au début de la vie adulte (110, 190, 481).

Cela semble être attribuable aux changements pubertaires de la concentration plasmatique de bilirubine d'une part. D'autre part, il a été suggéré que certains sujets atteints du GS naissent avec des quantités variables d'activité enzymatique UGT1A1 qui peuvent soutenir la conjugaison de la bilirubine pendant la petite enfance, mais n'est pas suffisant pour une conjugaison complète à l'âge adulte (190, 496).

Par ailleurs, Sun L et al. (470) ont indiqué que l'âge moyen du diagnostic du GS était de 33,5 ans. Nous considérons l'âge moyen de nos patients GS (36,5 ans) comme âge du diagnostic positif du GS car ils ont été diagnostiqués pour la première fois lors de notre étude, et nous constatons une similarité entre les deux études.

2.2.- Antécédents familiaux d'ictère :

Dans notre étude, les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie sont retrouvés chez 46,6% des cas dont les frères et sœurs sont plus fréquemment touchés que les parents. Dans une étude anglaise, il a été rapporté que la proportion des frères et sœurs atteints d'une hyperbilirubinémie non conjuguée (27,5%) était supérieure à celle des parents atteints (16,6%) (129).

Dans notre série, la présence d'une hyperbilirubinémie non conjuguée dans un pourcentage aussi élevé de frères et sœurs (83,4%) et de parents (63,1%) suggère fortement que ce trouble est d'origine héréditaire.

La nature familiale de cette affection a été reconnue pour la première fois par Gilbert et Lereboullet en 1901 (481). Son mode de transmission n'est pas clair. Comme des résultats d'études précédentes ont montré qu'il existe des formes légères et d'autres plus graves du syndrome de Gilbert, ce mode de transmission change selon la forme du GS (200).

Il a été suggéré une transmission héréditaire autosomique récessive dans la forme légère qui est causée ou associée par une insertion homozygote de 2 pb au niveau de la séquence promotrice TATA en amont du gène UGT1A1. Alors que les formes plus graves et plus rares qui sont dues à une mutation dans la région codante du gène UGT1A1 sont à transmission dominante (200).

Pour cela, il a été postulé que la maladie de Gilbert (GS) est héritée selon un mode autosomique dominant avec une pénétrance incomplète (115, 129, 200, 355).

2.3.- Manifestations cliniques :

Concernant la symptomatologie clinique des patients de l'étude, nous constatons que la majorité des patients sont symptomatiques (88,9%). Nos patients ont signalé une asthénie plus ou moins intense (64,3%), un ictère récidivant (43,8%), un subictère conjonctival (22,3%). Ces signes peuvent être isolés ou associés à d'autres symptômes tels que, des douleurs abdominales (42%), des nausées et vomissements (18,7%), des vertiges et des céphalées (8,9%), un amaigrissement (5,3%), une perte d'appétit (3,6%).

L'ictère tout comme le subictère peut être la seule manifestation clinique chez nos patients comme ils peuvent s'accompagner des autres symptômes dont l'asthénie et les douleurs abdominales sont les plus fréquentes.

La fatigue, qui est le symptôme le plus couramment mentionné par nos patients, était d'intensité variable selon les cas, pouvant être sévère jusqu'à incapacitante. Ceci rejoint ce qui a été rapporté par Cleary KJ et al (122), Valesini G et al (133) dans leurs études sur le syndrome de fatigue chronique chez des sujets atteints du syndrome de Gilbert. Ils ont en conclu que le GS est un facteur prédisposant ou perpétuant le syndrome de fatigue chronique.

Foulk et al. (436) ont eux aussi souligné la fatigue comme étant le symptôme le plus fréquent chez des patients souffrant du GS et ils ont noté également que les symptômes gastro-intestinaux étaient aussi fréquents. Ces auteurs ont pensé que les symptômes étaient secondaires à l'anxiété liée à l'annonce d'une maladie hépatique chronique alors que d'autres auteurs n'ont pas trouvé de lien entre les symptômes comme la fatigue et un résultat isolé d'hyperbilirubinémie (456).

Powell LW al. (129) ont décrit la douleur ou la gêne abdominale, la fatigue ou le malaise comme étant les symptômes les plus courants en dehors de la jaunisse ceci rejoint ce qui a été constaté dans notre série.

Gitlin N (432) a retrouvé les symptômes suivants chez des patients atteints de la maladie de Gilbert : une jaunisse asymptomatique récurrente, une asthénie, une distension abdominale et il a noté en plus un malaise en proportion non négligeable (66 %) alors que dans notre série, le malaise n'a pratiquement pas été sinon très peu signalé, quelques patients seulement ont déclaré un malaise secondaire à l'asthénie profonde qu'ils ressentaient.

D'autres manifestations cliniques moins courantes ont été retrouvées chez nos patients comme des nausées et vomissements, des diarrhées et constipation, une déshydratation, une perte d'appétit. Ceci concorde avec les données de la littérature (129,190).

L'intolérance aux graisses, un autre signe clinique moins spécifique a été constaté à moindre proportion chez nos patients, conformément ce qui a été rapporté par Preisig D et al. (480) et qui l'ont cité en plus de la fatigue et des douleurs abdominales hautes comme étant des symptômes initiaux non spécifiques du GS.

Jusqu'à présent, il n'y a pas de consensus sur le fait que des symptômes puissent être associés ou non à l'ictère. Certains auteurs estiment que les poussées d'ictère sont souvent accompagnées d'asthénie (457), alors que d'autres auteurs ont affirmé que les poussées d'ictère ne sont accompagnées d'aucun autre symptôme que l'ictère lui-même.

L'interprétation qui a été proposée par certains études et auteurs est que les symptômes seraient des manifestations de l'angoisse lorsque le patient découvre son ictère (458).

La cause des manifestations gastro-intestinales n'est pas claire non plus, elles pourraient être dues à une vidange gastrique perturbée (459) ou à une cinétique de la bilirubine altérée dans le GS (460) ou à une insuffisance de l'enzyme UGT1A1 qui est nécessaire à la glucuronidation et à l'élimination de certains métabolites alimentaires tels que le N-hydroxy-PhI (186,283).

2.4.- Motifs de la demande d'analyse et circonstances de découverte :

Dans notre étude, les motifs les plus fréquents d'une demande d'analyse génétique en vue de déterminer l'étiologie de l'hyperbilirubinémie libre observée chez nos patients sont la suspicion clinique du syndrome de Gilbert, l'ictère et la découverte fortuite d'une hyperbilirubinémie libre isolée. Ceci est très proche de l'étude de Preisig D et al (480) qui a rapporté que l'ictère ou une hyperbilirubinémie constatée en laboratoire représentaient les principales raisons du bilan de diagnostic positif du GS.

2.5.- Facteurs déclenchant l'hyperbilirubinémie :

Les facteurs les plus incriminés dans l'apparition de l'hyperbilirubinémie non conjuguée et de l'ictère chez nos patients sont le surmenage, le stress et le jeune prolongé comme le jeune du mois de Ramadan.

Selon l'étude de Kamal S et al. (190) le jeune du mois de Ramadan est un facteur de risque important d'ictère chez les sujets GS. Dans une autre étude, il a été montré une exacerbation de l'hyperbilirubinémie non conjuguée par le jeûne religieux (128).

Selon Monaghan G et al. (200) le jeûne peut servir de test diagnostique du GS. Ce diagnostic peut être confirmé par une élévation de la bilirubinémie totale comprise entre 25 et 50 µmol/ après 24 heures de jeûne ou une élévation de la bilirubinémie libre de plus de 90 % dans les 48 heures suivant le début du jeûne. Cependant les mécanismes à la base de cette approche diagnostique ne sont pas encore bien compris (355).

Ce test n'a pas été réalisé chez nos patients mais il a été rapporté une récidive de l'ictère ou son accentuation pendant le mois de Ramadan.

En dehors du jeune prolongé l'exercice physique intense, la déshydratation, les cycles de menstruations et les accouchements chez la femme ont été cités comme des facteurs précipitant d'hyperbilirubinémie libre non conjuguée et d'ictère clinique chez nos patients. Ceci est conforme à ce qui a été rapporté dans la littérature (127, 129,190).

2.7.- Comorbidités :

Dans notre étude, plus de la moitié des patients n'ont pas de pathologies associées à l'hyperbilirubinémie. Le diabète, l'hypertension artérielle et les maladies inflammatoires ont été retrouvés en faible pourcentage chez nos patients.

Ceci se rapproche des résultats de l'étude de Kamal S et al. (190) qui ont indiqué un faible nombre de diabète sucré et d'hypertension chez des sujets atteints du GS. Cependant, ces auteurs ont signalé la présence de ces comorbidités avec des taux similaires à ceux de la population générale ce que nous n'avons pas pu vérifier dans notre étude étant donné que nous n'avons pas comparé nos patients à des sujets témoins.

Un seul cas d'intolérance alimentaire qui est la maladie cœliaque a été retrouvé chez nos patients ; alors que les résultats de l'étude de Kamal S et al. (190) ont noté d'une part, la présence des troubles d'intolérance alimentaire tels que la maladie cœliaque et l'intolérance au lactose en nombre plus important que le diabète et l'hypertension artérielle, et d'autre part, qu'ils étaient significativement plus élevés chez les sujets atteints du syndrome de Gilbert que chez les sujets témoins.

Hwang HJ et al. (476) ont montré que les taux de bilirubine totale étaient plus élevés chez les hommes sans MCV que chez les hommes atteints de MCV ; de même qu'il a été rapporté par Novotny et Vitek (265) une relation inverse entre la bilirubine sérique et l'athérosclérose chez les hommes.

Vitek L et al. (482) ont indiqué une faible prévalence de la cardiopathie ischémique chez les personnes atteintes de GS ; et ils ont même supposé que l'hyperbilirubinémie chronique est plus importante que l'élévation des taux de HDL- cholestérol dans la protection contre la cardiopathie ischémique.

D'autres auteurs ont montré une prévalence plus faible de complications vasculaires chez les patients diabétiques et atteints de GS (298).

Ceci peut s'expliquer en partie par les puissantes propriétés antioxydantes de la bilirubine qui seront à l'origine d'un statut antioxydant circulant accru de ces personnes.

2.8.- Exploration radiologique :

Dans notre étude, l'exploration radiologique à la recherche d'anomalies structurelles hépatiques a été réalisée chez la moitié des patients et les résultats ont montré un foie normal sans aucune particularité dans la plupart des cas. Parmi les examens radiologiques réalisés, l'échographie abdomino-pelvienne représente le nombre le plus élevé. Nous avons aussi constaté que dans certains cas, et toujours à la recherche de l'origine de l'hyperbilirubinémie libre récurrente et intermittente, certains patients ont eu recours en plus de l'échographie abdomino-pelvienne à l'endoscopie digestive haute, au scanner abdomino-pelvien et à l'IRM hépatique.

Alors que dans l'étude de Preisig D et al. (480) aucun des examens radiologiques réalisés chez nos patients n'a été retrouvé ; la recherche d'anomalies hépatiques a fait appel à la scintigraphie hépatique et à l'histologie. Cependant leurs résultats n'ont mis en évidence aucune anomalie conformément aux nôtres.

2.9.- Consommation de tabac :

Le tabagisme a été associé à des concentrations plus faibles de bilirubine sérique dans des études antérieures (285,465). Des études ont montré que les fumeurs avaient des concentrations de bilirubine plus faibles que les non-fumeurs et les ex-fumeurs et que la quantité et la durée du tabagisme étaient inversement associées à la bilirubine totale, directe et indirecte (285,467).

L'induction de l'UGT1A1 par la nicotine et/ou d'autres constituants de la fumée de tabac, a été suggérée comme mécanisme de réduction de la bilirubine chez les fumeurs (468).

Dans notre étude, la majorité des patients sont des non-fumeurs (85%) et ceci nous a permis d'écarter cette cause aux fluctuations des concentrations de bilirubine sérique.

2.10.- Consommation d'alcool :

Nous nous sommes intéressés de savoir si nos patients consomment de l'alcool car les effets de la consommation d'alcool sur les concentrations de bilirubine ont été signalés par certaines études auparavant (465).

Selon O'Malley et al. (466), la consommation aigue d'alcool entraîne une augmentation de la bilirubine sérique chez les non-fumeurs.

L'éthanol pourrait interférer avec l'activité de l'uridine diphosphate glucuronyltransférase, par augmentation de l'excrétion de la bilirubine non conjuguée dans la bile en diminuant son pool intrahépatique, peut-être en modulant la fluidité de la membrane hépatique. Ou bien, il pourrait renforcer le mécanisme physiologique de déconjugaison hépatique des glucuronides de bilirubine.

La quasi-totalité des patients de notre étude ne consomme pas d'alcool et ceci nous a permis de l'écarter comme une cause éventuelle à l'hyperbilirubinémie observée chez nos patients.

3.- Caractéristiques biologiques des patients du groupe 1 :

3.1.- Bilan d'hémolyse :

La mesure du taux d'hémoglobine, de la numération des réticulocytes, de l'haptoglobine et de la LDH nous ont permis d'éliminer une cause hémolytique à l'hyperbilirubinémie libre chez nos patients.

Les valeurs d'hémoglobine retrouvées chez nos patients se situaient dans l'intervalle des valeurs de référence et se rapprochent des valeurs rapportées dans la littérature (190, 430, 469).

En accord avec l'étude de Cure MC et al. (469), les niveaux d'hémoglobine des hommes atteints du GS se sont avérés significativement plus élevés que ceux des femmes atteintes du GS ce qui suggère que la différence entre les sexes dans les valeurs d'hémoglobine est aussi retrouvée dans le GS.

Comme la bilirubine est le produit final de dégradation de l'hémoglobine, il serait intéressant de noter que les patients atteints du GS qui ont des niveaux d'hémoglobine élevés sont censés avoir des valeurs plus élevées de bilirubine indirecte (UCB).

Tableau LXVII : Comparaison de l'hémoglobine des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Hémoglobine moyenne (g/dL)
Kamal S, Egypte (190)	13,31
Cure MC, Turquie (469)	13,8
Notre étude, Algérie	14,04
Etudes et Auteurs	**Hémoglobine médiane (g/dL)**
Kundur AR, Australie (430)	14,1
Notre étude, Algérie	14,2

La numération des réticulocytes et la LDH retrouvés chez nos patients sont normaux, en accord avec les critères d'éligibilités des patients GS de l'étude de Tapan S et al. (461).

La valeur moyenne de LDH de nos patients est comparable aux données de la littérature (274,461), notre valeur se rapproche mieux de l'étude turque (461) qui n'a pas montré de différence significative pour ce paramètre entre les patients et les témoins. Cependant, nous notons que les valeurs de notre étude et celles de la littérature restent dans l'intervalle des valeurs de référence.

Les valeurs d'haptoglobine retrouvées chez nos patients (0,87 g/L) se situaient dans l'intervalle des valeurs de référence (0,3-2 g/L), ceci est une preuve supplémentaire de l'absence d'une hémolyse.

Tableau LXVIII : Comparaison de la LDH des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	LDH moyenne (U/L)
Wallner M, Autriche (274)	178
Tapan S, Turquie (461)	223
Notre étude, Algérie	205,8

3.2.- Bilan hépatique :

Les niveaux de bilirubine totale (BRB T) et de bilirubine non conjuguée UCB (BRB I) de nos patients étaient au-delà des valeurs de référence et sont dans les fourchettes des concentrations rapportées dans la littérature.

Nous avons trouvé une forte corrélation significative entre la bilirubine totale et la bilirubine indirecte chez nos patients GS des deux sexes. La conjugaison de la bilirubine diminue en raison du déficit de l'enzyme uridine diphosphate-glucuronosyl transférase (UGT1A1), ce qui provoque une augmentation de la bilirubine indirecte. C'est donc l'élévation de la bilirubine non conjuguée UCB (BRB I) de nos patients qui est à l'origine de l'élévation de la bilirubine totale.

Nous avons trouvé que les sujets GS de sexe masculin ont des niveaux de BRB T et de BRB I plus élevés que les sujets de sexe féminin, ceci est en accord avec la littérature (480, 481,469) et nous amène à conclure que la différence entre les sexes dans le GS est également retrouvée pour les taux de bilirubine.

Par ailleurs, les niveaux d'UCB étaient significativement plus élevés dans le sous-groupe GS le plus âgé ce qui ne rejoint pas l'étude de Wagner KH et al. (6) qui n'a pas trouvé de différence d'UCB liée à l'âge. Nous attribuons cela à la différence des moyennes d'âge observée chez les GS ≥ 35 ans entre notre étude (52,71 ± 13,23) et celle de Wagner KH et al. (6) (50,2 ± 10,0).

Tableau LXIX : Comparaison de la bilirubine totale et de la bilirubine non conjuguée des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	BRB T (mg/L)	BRB I (mg/L)
Wagner KH, Autriche (6)	/	18,01 ± 6,78 *
Cure MC, Turquie (469)	20 ± 7	14 ± 6
Tapan S, Turquie (461)	16,60 ± 2,51 *	14,50 ± 2,51 *
Wallner M, Autriche (274)	/	16,61 ± 7,51 *
Notre étude, Algérie	20,83 ± 12,26	15,83 ± 11,62
Etudes et Auteurs	**BRB T médiane (mg/L)**	
Kundur AR, Australie (430)	13,45*	
Notre étude, Algérie	17,48	

Facteur de conversion* : mg/L x 1,71 = µmol/L

Les valeurs de l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma-glutamyl transférase retrouvées chez nos patients sont comparables aux valeurs rapportées dans la littérature (6, 190, 263, 461, 470, 479). Ces valeurs se situaient toutes dans l'intervalle des valeurs de référence suggérant l'absence de pathologie hépatique sous-jacente.

En accord avec les résultats de l'étude de Wagner KH et al. (6), nous avons trouvé que les sujets GS de sexe masculin ont des valeurs plus élevées d'ASAT, d'ALAT et de GGT ce qui suggère que la différence entre les sexes dans le GS est également retrouvée pour les taux de transaminases (ASAT, ALAT) et de gamma-glutamyl transférase (GGT).

Comme il a été montré dans l'étude de Wagner KH et al. (6), aucune différence entre les deux sous-groupes d'âge GS n'a été observé pour les valeurs d'ASAT et d'ALAT. Par contre, nous avons trouvé que les sujets GS du sous-groupe le plus âgé présentaient des valeurs de GGT plus élevées.

En accord avec ce qui a été retrouvé par Hwang HJ et al. (476), aucune corrélation n'a été observée pour les transaminases (ASAT, ALAT) avec les deux types de bilirubine (BRBT, BRB I) chez les deux sexes GS. Par contre, notre étude a montré une corrélation significative de la GGT avec la bilirubine indirecte ainsi qu'avec la bilirubine totale chez les sujets GS de sexe masculin.

Tableau LXX : Comparaison des enzymes de la cytolyse hépatique et de la fonction biliaire des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	ASAT (U/L)	ALAT (U/L)	PAL (U/L)	GGT (U/L)
Wagner KH, Autriche (6)	27 ± 8,85	23,7 ± 11,2	/	24,4 ± 25,9
Kamal S, Egypte (190)	23,18 ± 4,83	20,16 ± 4,83	80,36 ± 10,85	/
Tapan S, Turquie (461)	21 ± 8	10 ± 4	116 ± 34	20 ± 4
Sun L, Chine (470)	23 ± 16,9	23,4 ± 20,8	102,4 ± 70,7	26 ± 33,2
Wallner M, Autriche (479)	26,7 ± 7,35	25,5 ± 14,4	70,1 ± 17,3	22,2 ± 14,4
Bulmer AC, Australie (263)	36 ± 14,1	19,3 ± 7,9	/	16,7 ± 8,6
Wallner M, Autriche (274)	28 ± 9,33	23,9 ± 13,7	/	27,9 ± 14,4
Notre étude, Algérie	22,53 ± 10,68	19,48 ± 13,60	78,93 ± 31,37	29,88 ± 50,18

Les protéines totales et l'albumine de nos patients se situent dans la fourchette normale et sont proches des valeurs rapportées par certains auteurs (190,470). Ceci est une preuve supplémentaire de l'absence d'anomalie hépatique.

Tableau LXXI : Comparaison de la protidémie et de l'albuminémie des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	TP (g/L)	ALB (g/L)
Sun L, Chine (470)	72,9 ± 7,8	46,4 ± 5,1
Kamal S, Egypte (190)	77,26 ± 5,39	41 ± 5,3
Notre étude, Algérie	73,30 ± 5,0	48,14 ± 5,34

3.3.- Bilan lipidique :

Les résultats du bilan lipidique retrouvés chez nos patients sont comparables aux résultats des études citées ci-dessous.

Nous pouvons déjà constater que les valeurs du bilan lipidique de nos patients ainsi que celles décrites par ces études sont dans les normes : Cholestérol total < 2g/L, Triglycérides < 1,5g/L. Concernant le HDL-cholestérol et le LDL-cholestérol, et d'après les valeurs guides pour l'estimation du risque de maladies coronariennes selon NCEP (443,444) ; nous pouvons d'emblée considérer que le LDL-c est optimal (< 1g/L) et que le HDL-c n'est pas un facteur de risque élevé de maladies coronaires (>0,40g/L).

Tableau LXXII : Comparaison du bilan lipidique (valeurs médianes) des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Cholestérol total (g/L)	Triglycérides (g/L)	HDL-cholestérol (g/L)	LDL-cholestérol (g/L)
Kundur AR, Australie (430)	1,76 **	0,79***	0,56**	0,94**
Notre étude, Algérie	1,58	0,95	0,45	0,95

Tableau LXXIII : Comparaison du bilan lipidique (moyennes) des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Cholestérol total (g/L)	Triglycérides (g/L)	HDL-cholestérol (g/L)	LDL-cholestérol (g/L)	Ratio HDL:LDL
Tapan S, Turquie (461)	1,73 ± 0,28	0,87 ± 0,31	0,49 ± 0,09	1,08 ± 0, 25	/
Wallner M, Autriche (274)	1,97 ± 0,52	0,90 ± 0,39	0,61 ± 0,14	1,13 ± 0,45	/
Bulmer AC, Australie (263)	1,67 ± 0,33	0,93 ± 0,55	0,69 ± 0,07	0,79 ± 0,25	0,95 ± 0,31
Notre étude, Algérie	1,61 ± 0,39	1,05 ± 0,56	0,46 ± 0,13	0,96 ± 0,31	0,53 ± 0,24

Facteurs de conversion :
Cholestérol total** : mmol/L x 0,3866 = g/L
HDL-cholestérol** : mmol/L x 0,3866 = g/L
LDL-cholestérol** : mmol/L x 0,3866 = g/L
Triglycérides*** : mmol/L x 0,885= g/L

Des résultats sur les données lipidiques chez les patients GS ont été documentés au cours des dernières années. Par exemple, une réduction du cholestérol total circulant (461), du LDL-c (472), des triglycérides (473) et un rapport HDL/LDL élevé (263) ont été rapportés.

L'étude de Wallner M et al. (274) a montré que le cholestérol total, les triglycérides et le LDL-c sont significativement réduits chez les sujets GS par rapport aux sujets témoins. Dans notre étude, nous n'avons pas comparé nos patients à un groupe témoin mais nous pouvons constater que les résultats du cholestérol total, triglycérides et LDL-c de nos patients ne s'éloignent pas de l'étude de Wallner M et al. (274) ceci nous laisserait penser à une réduction de ces paramètres chez nos patients.

Nos résultats de cholestérol total et de triglycérides se rapprochent plus de ceux de l'étude de Bulmer AC et al. (263), ces derniers n'ont pas montré de différence significative du bilan lipidique (cholestérol total, triglycérides, HDL-c, LDL-c) entre les sujets GS et les témoins. Nous attribuons cela à leur effectif relativement réduit comparé au notre et à celui de l'étude de Wallner M et al. (274)

Par contre, Bulmer AC et al. (263) ont montré que le ratio HDL:LDL dans le groupe GS avait tendance à être plus élevé que dans le groupe témoin. Nous constatons que le ratio HDL:LDL de nos patients est plus bas que celui retrouvé par ces auteurs et ceci est attribuable à la différence des valeurs d'HDL et LDL de nos patients par rapport aux leurs d'une part, et d'autre part nous n'avons pas pu interpréter ce ratio par rapport à des témoins.

L'étude de Kundur AR et al. (430) a confirmé une amélioration du statut lipidique (LDL réduit, HDL augmenté) des patients GS en comparaison aux témoins. Les résultats de notre étude ont montré que les valeurs LDL-c de nos patients rejoignent celles de l'étude de Kundur AR et al. (430) alors que les taux de HDL-c sont légèrement inférieurs aux valeurs observées de leurs patients GS ainsi qu'aux valeurs de leurs témoins. Ces résultats nous laissent conclure à une réduction de LDL-c chez nos patients. Nos résultats sont également en accord avec d'autres données de la littérature qui ont rapporté une amélioration du statut lipidique chez les personnes atteintes du GS (5, 274, 431).

Par ailleurs, Tapan et al. ont observé une diminution des niveaux de LDL denses et de LDL oxydés chez les personnes atteintes de GS (461). Le mécanisme par lequel la bilirubine non conjuguée pourrait induire une hypocholestérolémie chez les personnes atteintes de GS n'est pas encore compris ; cependant, il pourrait impliquer une modulation de la fonction endocrine ou l'activation du récepteur des hydrocarbures aryliques (AhR) (5).

L'analyse des biomarqueurs du métabolisme lipidique selon l'âge a montré des valeurs de triglycérides, de cholestérol total, de LDL-c significativement plus élevées chez les sujets du sous-groupe GS le plus âgé. Cette observation concorde avec l'étude de Wallner M et al. (274). Ces mêmes auteurs ont montré que le cholestérol total, les triglycérides et le LDL-c de leurs sujets GS et de leurs témoins ont augmenté avec l'âge mais ils sont restés inférieurs à ceux des témoins du même âge.

Bien que nous n'ayons pas comparé nos sujets GS à des témoins, nous constatons que les taux de cholestérol total, de triglycérides et de LDL-c se rapprochent de ceux de l'étude de Wallner M et al. (274).

Par conséquent, nous pensons que les sujets GS seraient protégés de la dyslipidémie liée à l'âge.

Les sujets GS de sexe masculin ont montré des taux plus faibles de cholestérol total, de LDL-c et de HDL-c et un ratio HDL:LDL qui a tendance à être plus élevé. Nous pourrions penser à un meilleur statut lipidique chez les hommes mais les corrélations observées chez les femmes GS; négative entre la bilirubine totale et le cholestérol total, négative entre la bilirubine UCB et le LDL-c ainsi que la corrélation positive avec le Ratio HDL:LDL ne nous permettent pas de démontrer un effet spécifique au sexe concernant les biomarqueurs du métabolisme lipidique.

3.4.- Bilan inflammatoire :

Nous constatons que les valeurs de CRP des patients GS se rapprochent plus de valeurs décrites dans l'étude de Cure MC et al. (469).

Tableau LXXIV : Comparaison de la CRP des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	CRP moyenne (mg/L)
Cure MC, Turquie (469)	2
Wallner M, Autriche (274)	1,3
Notre étude, Algérie	n=127 : 3,38

Cure MC et al (469) ont trouvé qu'il n'y avait pas de corrélation entre la bilirubine totale, la bilirubine indirecte et la CRP. Cependant, ces mêmes auteurs ont indiqué de plus faibles taux de CRP dans le groupe de patients atteints du GS que dans le groupe témoin. Dans notre étude, nous n'avons pas comparé la CRP de nos patients GS à un groupe témoin ; mais contrairement à Cure MC et al. (469), nous avons trouvé une corrélation négative et significative entre la bilirubine non conjuguée et la CRP.

Nos résultats concordent également avec l'étude de Hwang HJ et al. (476) qui a montré qu'une bilirubine élevée a été associée à de faibles taux de CRP.

De plus, et en accord avec ces mêmes auteurs, nous avons trouvé une corrélation significative entre la CRP et la bilirubine totale chez les sujets GS de sexe féminin.

La CRP est un marqueur diagnostique largement utilisé pour évaluer l'état d'inflammation, nos résultats peuvent donc indiquer une inflammation moindre et seraient également en accord avec d'autres données de la littérature qui ont rapporté une réduction de l'inflammation chez les personnes atteintes de GS (5, 274, 431).

La bilirubine est connue pour être un antioxydant puissant qui diminue la peroxydation lipidique et le processus d'inflammation chronique (474) et l'effet protecteur des concentrations élevées de bilirubine contre la maladie cardiaque athéroscléreuse a été rapporté dans de nombreuses études (323, 475).

Il a été suggéré que la bilirubine jouerait ce rôle protecteur dans la progression de l'athérosclérose en inhibant l'induction liée au facteur de nécrose tumorale- α (TNF-α) de trois molécules d'adhésion endothéliale (490) et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (491, 492).

Le mécanisme à l'origine d'une baisse de l'inflammation chez les sujets GS est une diminution des cytokines pro-inflammatoires. La cytokine IL-6 peut être supprimée chez les patients GS en raison de l'effet antioxydant de la bilirubine. Comme la cytokine IL-6 induit la libération hépatique de CRP dans la circulation, des concentrations plus faibles d'IL-6 ont été signalées chez les sujets GS (6,274).

De plus, des niveaux plus faibles de CRP et également d'IL-6 ont été liés à un risque plus faible de MCV (477) et de diabète (478) cela montre d'avantage l'importance de ces biomarqueurs dans la contribution à la protection cardiovasculaire chez les individus présentant des taux de bilirubine non conjuguée légèrement élevés.

Nos résultats sont également en accord avec un certain nombre d'études qui ont rapporté des taux diminués de hs-CRP ainsi qu'une corrélation négative et significative entre l'UCB et la hs-CRP chez les patients atteints du GS (6,430, 461) suggérant de manière importante la pathogenèse réduite de l'athérogénèse dans le GS.

Dans notre étude, nous avons étudié l'effet de l'âge associé à l'inflammation et lié à l'hyperbilirubinémie chronique de nos patients et nous avons constaté que chez les sujets GS plus âgés, traditionnellement considérés comme présentant un risque plus élevé de MCV, les taux de CRP étaient significativement plus élevés que chez les sujets GS plus jeunes. Dans l'étude de Wallner M et al (274) et pour le sous-groupe du même âge, les taux de CRP étaient nettement inférieurs aux nôtres (1,4 vs 5,33). Nos résultats ne nous permettent pas de déduire d'une faible induction de l'inflammation liée à l'âge.

Nous avons également constaté des valeurs plus faibles de CRP chez les hommes atteints du GS par rapport aux femmes, nous attribuons cette différence aux valeurs plus élevées d'UCB chez les sujets GS de sexe masculin.

Ainsi, nous pensons qu'un faible taux de CRP sérique chez les sujets GS peut être dû aux effets anti-oxydants et anti-inflammatoires du métabolisme de la bilirubine.

3.4.- Bilan ferrique et protéines antioxydantes :

3.4.1.- Bilan ferrique :

Le fer sérique chez nos patients est plus bas que celui retrouvé dans l'étude de Wallner M et al. (479) mais les deux valeurs restent dans la fourchette normale (33-193 µg/dL).

Ces mêmes auteurs ont montré que les sujets GS présentaient des concentrations plus élevées de fer par rapport au groupe témoin. Nous ne pouvons pas en juger dans notre étude ; premièrement nous n'avons pas comparé nos patients à des témoins et deuxièmement, même si le fer de nos patients et celui de l'étude de Wallner M et al. (479) restent dans l'intervalle normale, nous avons constaté que les deux valeurs s'éloignent.

Tableau LXXV : Comparaison du Fer (Iron) des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Fer moyen (µg/dL)
Wallner M, Autriche (479)	180,56 ± 46,51*
Notre étude, Algérie	109,35 ± 41,70

Facteur de conversion :
Fer (Iron)* = µmol/L × 5,59 = µg/dL

Cependant, en accord avec l'étude de Wallner M et al. (479), la bilirubine UCB de nos patients GS était positivement et significativement corrélée avec le fer. Cette même corrélation a été observée dans les deux sous-groupes d'âge GS (< 35 ans, ≥ 35 ans).

Alors que Monaghan G et al. (200) ont trouvé une corrélation significative entre la bilirubine totale et le fer chez les femmes mais pas chez les hommes.

Wallner M et al. (479) ont analysé dans leur étude la relation entre la bilirubine non conjuguée et les catabolites de l'hème oxygénase (HO) et ils ont suggéré que cette association entre la bilirubine et le fer est due à une boucle de rétroaction positive de la bilirubine sur l'activation de l'HO. Ils ont supposé que la bilirubine pourrait activer l'HO indirectement en augmentant la fragilité des globules rouges libérant de l'hème, qui est ensuite dégradé en fer, CO et finalement en bilirubine.

Ainsi, cette boucle serait accentuée dans le GS où les concentrations de bilirubine sont augmentées de manière indépendante.

En étudiant l'effet de l'âge sur le fer sérique dans le GS, nous avons constaté que les sujets du sous-groupe le plus âgé ont tendance à avoir une sidérémie plus faible que les sujets du sous-groupe plus jeune. De plus, les sujets GS de sexe masculin ont montré des niveaux plus élevés de Fer sérique que les sujets de sexe féminin.

Ceci est attribuable à la différence des valeurs d'UCB observés chez les GS selon le sexe ainsi que dans les deux sous-groupes d'âge.

Le CS de nos patients est dans l'intervalle normal (20-40%) en accord avec ce qui a été retrouvé dans l'étude de Monaghan G et al. (200).

Nous avons trouvé une corrélation positive et significative de l'UCB avec le coeffficient de saturation de la transferrine (CS) chez nos patients GS alors que Monaghan G et al. (200) ont trouvé une corrélation significative entre la bilirubine totale et le CS chez les femmes GS seulement.

Sachant que le CS est saturé au tiers de sa capacité par le fer sérique, et puisque nous avons observé une corrélation significative du fer de nos patients GS avec l'UCB, nous nous attendons alors à trouver le même résultat avec le CS.

Monaghan G et al. (200) ont pensé que la corrélation chez les femmes entre la bilirubine totale à la fois avec le CS et le fer serait due à d'autres facteurs génétiques et environnementaux affectant les taux sériques de CS et de fer qui affecteront à leur tour la bilirubine sérique totale. Ces auteurs ont même suggéré que les sujets GS avec un faible CS pourraient avoir une certaine protection contre le développement des symptômes du GS.

Aucune différence liée à l'âge chez les sujets GS n'a été observée pour le CS ; par contre, la même corrélation avec l'UCB a été observée dans le sous-groupe GS plus âgé.

Les sujets GS de sexe masculin ont montré des niveaux de plus élevés de CS par rapport aux femmes et ceci est attribuable au fer sérique plus élevé chez les GS hommes.

3.4.2.- Protéines antioxydantes :

Les protéines antioxydantes de nos patients se situent dans l'intervalle des valeurs normales de chaque paramètre : la transferrine est comprise dans l'intervalle (2,2-3,6 g/L) et la céruloplasmine est <0,30 g/L.

La céruloplasmine a montré une corrélation négative et significative avec la bilirubine UCB de nos patients GS et cette même corrélation a été retrouvée dans le sous-groupe GS plus jeune.

Les individus du sous-groupe GS le plus âgé ont des valeurs plus élevées de céruloplasmine par rapport au sous-groupe GS le plus jeune et des taux plus élevés ont également été constatés chez les femmes GS.

La transferrine n'a montré aucune corrélation avec la bilirubine UCB. Aucune différence liée au sexe et à l'âge n'a été observée chez nos sujets GS pour la transferrine.

La transferrine et la céruloplasmine font partie des nombreuses défenses antioxydantes dont dispose notre organisme pour réguler la production des espèces oxygénées activées (EOA).

Les EOA (radicaux libres, peroxyde d'hydrogène et l'oxygène singulet) étant potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent oxyder les lipoprotéines et initier des processus de peroxydation (497).

Ces protéines de transport et de stockage du fer et du cuivre empêchent donc ces métaux de transition de participer à la réaction de Fenton, génératrice de radicaux libres (226).

Nous avons analysé ces marqueurs du statut antioxydant pour élucider les mécanismes qui peuvent lier la bilirubine à la protection contre les maladies liées au stress oxydatif (diabète, Maladie cardiovasculaires) observées chez les personnes atteintes du GS.

Aucune donnée de la littérature sur la transferrine et la céruloplasmine chez les sujets GS n'a été documentée jusqu'à ce jour. Par contre d'autres paramètres du statut antioxydant de ces patients ont été explorés et rapportés.

Trolox, ou acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique, est un analogue hydrophile de la vitamine E. Comme cette dernière, il s'agit d'un antioxydant, qui est utilisé en biologie et en biochimie pour limiter les dommages dus au stress oxydant.

Bulmer AC et al. (263) ont étudié le statut antioxydant de leurs patients GS par la capacité antioxydante équivalente au Trolox (TEAC) et la capacité de réduction ferrique du plasma (FRAP) et ils ont même mesuré l'oxydation du sérum induite par le cuivre (Cu^{2+}). Ces auteurs ont montré un TEAC plus élevé, un FRAP plus élevé et une sensibilité du sérum à l'oxydation améliorée chez les individus GS avaient par rapport aux témoins.

Wagner KH et al. (6) ont eux aussi étudié la capacité antioxydante totale via le test (FRAP) et le Glutathion (GSH) comme antioxydant et ils ont trouvé des valeurs de FRAP significativement plus élevées dans le groupe GS ainsi qu'une corrélation négative de l'UCB avec le GSH.

Des résultats similaires pour la capacité antioxydante totale ont été rapportés chez les sujets GS (482, 498). Copur B et al. (498) ont également montré une corrélation positive du statut antioxydant total avec la bilirubine UCB.

Ces données indiquent une capacité antioxydante totale plus élevée dans le plasma des adultes ayant des concentrations élevées d'UCB ce qui confère à leur sang une résistance plus élevée aux ROS.

L'absence de données documentées sur la transferrine et la céruloplasmine chez les sujets GS et la non comparaison de nos patients à des témoins ne nous permet pas de discuter de leurs effets dans le GS.

Cependant, la corrélation observée entre l'UCB et la céruloplasmine chez nos patients GS nous laisse penser à une éventuelle contribution de ce marqueur dans l'amélioration du statut antioxydant observé chez les sujets GS.

3.5.- Acide urique :

Les valeurs de l'acide urique retrouvées chez nos patients sont comparables aux valeurs rapportées par l'étude de Wagner KH et al. (6) et l'étude de Kundur AR et al. (430). Cependant, toutes les valeurs décrites dans la littérature ainsi que les nôtres se situaient dans l'intervalle des valeurs de référence.

Dans les études citées ci-dessous, il n'y avait aucune différence significative dans les concentrations d'acide urique entre les sujets GS et le groupe témoin. Nous n'avons pas pu vérifier cela dans notre étude étant donné que nous n'avons pas comparé nos patients à un groupe témoin.

Tableau LXXVI : Comparaison de l'acide urique des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Acide urique moyen (mg/L)
Wagner KH, Autriche (6)	54,8**
Bulmer AC, Australie (263)	41*
Notre étude, Algérie	52,32
Etudes et Auteurs	Acide urique médian (mg/L)
Kundur AR, Australie (430)	52,08*
Notre étude, Algérie	51,69

Facteur de conversion :
Acide urique : µmol/L x 0,168 = mg/L*
mg/dL x 10 = mg/L **

Le rôle de l'acide urique sérique en tant que facteur de risque indépendant pour les maladies associées au stress oxydatif fait l'objet d'un débat permanent.

Depuis des décennies, on émet l'hypothèse que les propriétés antioxydantes de l'acide urique pourraient être protectrices contre le vieillissement, le stress oxydatif et les lésions cellulaires oxydatives (485). Cependant, des études ont démontré que la concentration d'acide urique sérique était corrélée de manière indépendante à l'hypertension, à la résistance à l'insuline et aux facteurs de risque du syndrome métabolique. Il est concevable que dans ces conditions son activité antioxydante soit surmontée par les effets pro-oxydants et pro-inflammatoires de l'accumulation des ROS (483,484).

Dans notre étude nous n'avons pas trouvé de corrélation entre les concentrations de bilirubine non conjuguée et l'acide urique chez les sujets GS. Nous avons également étudié l'effet de l'âge lié à l'hyperbilirubinémie chronique de nos patients GS sur les biomarqueurs du stress oxydatif et nous n'avons pas trouvé de différence significative pour l'acide urique entre les deux sous-groupes d'âge.

Cependant, comme les résultats retrouvés dans l'étude de Wagner KH et al. (6), nous avons constaté une différence significative des concentrations d'acide urique entre les sujets GS de sexe masculin et les sujets de sexe féminin mais nous suggérons que ceci est attribuable aux valeurs d'acide urique naturellement plus élevées chez les hommes plutôt qu'à la condition GS.

D'après nos résultats, l'acide urique qui est similaire à la bilirubine, et considéré comme un autre antioxydant endogène puissant dans le sang, ne semble pas être affecté par le GS, malgré les concentrations de bilirubine chroniquement élevées dans le sang.

3.6.- Glucose :

Les valeurs de glucose retrouvées chez nos patients se situaient dans l'intervalle des valeurs de référence et se rapprochent des valeurs rapportées par certains auteurs (263, 430, 461).

Ces mêmes auteurs n'ont pas trouvé de différence pour le glucose entre les sujets GS et les sujets témoins, ceci n'a pas pu être vérifié dans notre étude car nous n'avons pas comparé nos patients à des témoins.

Tableau LXXVII : Comparaison de la glycémie des cas avec la littérature

Etudes et Auteurs	Glucose moyen (g/L)
Bulmer AC, Australie (263)	1,10*
Tapan S, Turquie (461)	0,87*
Notre étude, Algérie	1,04
Etudes et Auteurs	Glucose médian (g/L)
Kundur AR, Australie (430)	0,86*
Notre étude, Algérie	0,95

Facteur de conversion* :
Glucose : mmol/L x 0,1802 = g/L

Hwang HJ et al. (476) ont trouvé une corrélation négative significative du glucose avec la bilirubine totale chez les femmes, alors que dans notre étude, cette même corrélation a été retrouvée chez les sujets GS de sexe masculin et elle a été observée en plus avec la bilirubine indirecte.

Nous avons constaté que chez les sujets GS plus âgés, traditionnellement considérés comme présentant un risque plus élevé de MCV, les taux de glucose étaient significativement plus élevés que chez les sujets GS plus jeunes mais étant donné que ces valeurs restent dans les normes (< 1,10 g/L), nous pensons tout de même que cela est en faveur d'un moindre risque cardiovasculaire du glucose lié à l'âge chez les sujets GS.

Comme il a été signalé auparavant, la bilirubine a des effets bénéfiques en termes de prévention du diabète sucré de type 2 et de ses complications (279). Il a même été signalé que la bilirubine procurait une protection contre le syndrome métabolique, et qu'elle était associée négativement au surpoids et à l'obésité (4, 278, 281, 308,310).

Ce rôle protecteur de la bilirubine contre le diabète sucré et ses complications revient aux fonctions de la biliverdine réductase (BLVRA), une enzyme responsable de l'hydrogénation de la biliverdine en bilirubine (279). Selon Lerner-Marmarosh N et al. (495), la BLVRA possède en plus d'autres fonctions affectant la signalisation cellulaire, elle diminue ainsi la signalisation de l'insuline et agit comme un régulateur négatif de l'absorption du glucose.

Des associations négatives entre les concentrations de bilirubine sérique et des tests de tolérance au glucose anormaux ont été signalées dès 1996 (493).

Ohnaka K et al. (307) ont montré une association inverse hautement significative entre la bilirubine sérique et l'hémoglobine glyquée (HbA1c) chez les hommes et les femmes. Ces mêmes auteurs ont suggéré que des concentrations plus élevées de bilirubine sérique confèrent une protection contre le développement du diabète de type 2.

D'autres auteurs ont signalé de faibles taux de produits de glycation avancée (AGE) chez les sujets atteints du GS par rapport à la population normobilirubinémique (494).

Inoguchi et al. ont été les premiers à indiquer que les patients diabétiques qui présentent un GS concomitant ont un taux de prévalence de complications vasculaires plus faible que les diabétiques normobilirubinémiques (298).

Ces données concordent avec notre observation d'une faible prévalence du diabète chez nos patients. Ainsi, nous suggérons que le GS est une condition à la prévention du diabète sucré ainsi qu'un moindre risque cardiovasculaire lié au glucose.

4.- Etude moléculaire des patients du groupe 1 :

Les résultats d'études génomiques cliniques antérieures ont révélé que certains polymorphismes étaient associés avec une hyperbilirubinémie dans différentes populations (204, 206, 470, 499).

Les mutations les plus fréquentes du syndrome de Gilbert qui ont été décrites sont associées à la région promotrice du gène UGT1A1 (rs8175347) et à la région du codon de l'exon 1 (rs4148323) (437).

Certaines études ont suggéré que les variants rs4148323 et rs8175347 pourraient constituer un facteur de risque de développement du GS en Asie et en Europe, respectivement (206,499).

Concernant le polymorphisme du promoteur, nos résultats ont montré une prédominance de l'homozygote muté TA7/TA7, ce qui est comparable au génotype rapporté dans diverses populations caucasiennes, afro-américaines ainsi que chez les personnes d'origine africaine (7,9).

La recherche de la mutation G211A (rs4148323) parmi les sujets de notre étude n'a retrouvé aucun cas d'homozygote (AA). Un seul cas d'hétérozygote GA a été retrouvé et nous avons constaté qu'il était associé au génotype TA7/TA7. Ce polymorphisme décrit comme la cause du GS chez les asiatiques, est très rare dans les populations caucasiennes et afro-amércaines (17).

Nos résultats sont donc en accord avec le génotype GS rapporté chez les caucasiens plutôt que chez les populations asiatiques (169, 202).

Nos résultats rejoignent également ceux de l'étude Kamal S et al. (190) qui ont montré que le génotype GS le plus fréquemment détecté dans la population égyptienne est le polymorphisme homozygote TA7/TA7.

Par contre, Aliarab A et al. (437) ont montré que la fréquence de rs4148323 était supérieure à celle de rs8175347 chez les personnes atteintes du GS dans la province du Golestan au nord de l'Iran et ils ont attribué cela à la forte prévalence du syndrome dans la population asiatique.

En même temps la fréquence des allèles TA6 et TA7 et celle des allèles G et A retrouvées par ces auteurs s'éloigne des fréquences que nous avons retrouvées. Ceci est à la nature des mutations associées au GS dans leur population d'étude et dans la nôtre.

Le GS serait moins fréquent chez la femme que chez l'homme (115, 200) mais nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux sexes pour le génotype TA7/TA7 du polymorphisme (TA)n(rs8175347) et ceci est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature (200,437,458,481).

Dans la population algérienne aucune étude de ce genre n'a été rapportée jusqu'à présent, nos résultats nous laissent penser que le polymorphisme associé au GS dans la population algérienne est le génotype TA7/TA7 du polymorphisme (TA)n(rs8175347).

5.- Caractéristiques générales des patients du groupe 2 :

5.1.- Répartition selon l'âge et le sexe :

Une prédominance masculine est observée dans notre population d'étude des cas pédiatriques avec un sex ratio de 1,8. Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté par des études précédentes (16, 502). Nous expliquons cette dissimilitude entre les deux sexes de la même manière que pour la population d'étude des cas du groupe 1 (115).

Cependant, bien que des effets hormonaux aient été suggérés comme étant en partie responsables des taux de bilirubine plus élevés dans le sexe masculin, certains auteurs pensent que la biologie sous-jacente reste floue (500, 501).

Dans notre étude, l'incidence de l'hyperbilirubinémie la plus élevée se situait dans la tranche d'âge des nouveaux-nés (≤28 jours) alors que dans l'étude de Moyer AM et al. (16) elle est retrouvée chez les enfants (1- 18 ans) de même que dans l'étude de Skierka JM et al. (17) qui a mentionné que les enfants (1-17 ans) représentaient plus de la moitié de leur population d'étude pédiatrique.

5.2.- Répartition selon l'origine géographique :

Comme il a été constaté pour les patients du groupe 1, la répartition des cas pédiatriques de notre étude à travers le territoire national, a révélé une prédominance des wilayas de l'ouest du pays où les wilayas d'Oran et Relizane sont les plus représentées. Cette situation pourrait simplement résulter d'un biais de recrutement, lié à la localisation géographique de notre établissement hospitalier.

5.3.- Consanguinité parentale :

Des antécédents de consanguinité parentale ont été constatés chez seulement 14,7% de notre population étudiée. Ce taux est nettement plus faible que celui rapporté par Heydari MR et al. (502) qui ont constaté que 61 % des parents de leurs patients étaient consanguins.

Un seul cas de nos patients génotypés GS (TA7/TA7) avait des parents consanguins à la différence de Kamal S et al. (190) qui ont signalé la présence de consanguinité avec un taux de 67 % chez des sujets atteints de GS mais ils ont attribué cela au taux relativement plus élevés de GS retrouvé en milieu rural.

Nous pensons que la différence des taux de consanguinité constatée dans notre étude est due à la taille de notre effectif qui est relativement réduit par rapport à aux études sus-citées.

6.- Caractéristiques cliniques des patients du groupe 2 :

6.1.- Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie et âge d'apparition :

Nous avons constaté que la quasi-totalité des patients appartenant au sous-groupe des enfants (1-16 ans) ont des antécédents personnels d'hyperbilirubinémie dont l'âge médian d'apparition est de 4 ans et demi.

La plupart des enfants génotypés GS TA/TA7 (8/10) ont eu des antécédents personnels d'hyperbilirubinémie qui s'est manifestée pour certains d'entre eux dans la petite enfance.

Cela ne concorde pas avec les données la littérature qui ont rapporté que le syndrome de Gilbert est le plus souvent reconnu dans la deuxième ou la troisième décennie de la vie, et qu'il est rarement diagnostiqué avant la puberté (129).

Nous pensons que cette observation mérite d'être vérifiée sur une plus grande population de cas d'enfants (1-16 ans).

6.2.- Antécédents familiaux d'ictère :

L'hyperbilirubinémie familiale qui a été retrouvée chez le tiers de nos patients suggère que ce trouble est d'origine héréditaire et nous avons constaté que la proportion des frères et sœurs atteints d'une hyperbilirubinémie non conjuguée était inférieure à celle des parents atteints à la différence de ce qui a été constaté dans le groupe 1 et dans l'étude de Powell LW et al. (129). Cependant, la parenté au 1er degré et la parenté au 2ème degré apparaissent à fréquence presque similaire dans les deux groupes de patients.

Bien que le nombre de patients présentant des antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie soit faible, le génotype GS TA7/TA7 a été retrouvé chez la plupart d'entre eux (10/14). À l'inverse, le génotype TA7/TA7 a été retrouvé chez de nombreux patients en l'absence d'antécédents familiaux (11/25), ce qui souligne l'utilité du dépistage moléculaire lorsque le contexte clinique est évocateur, même en l'absence d'antécédents familiaux.

Etant donné qu'il s'agit du même défaut génétique recherché dans cette population d'étude de cas que pour le groupe 1, le mode de transmission pour cette affection est le même que celui évoqué dans le groupe 1.

6.3.- Motifs de la demande d'analyse et circonstances de découverte :

Chez les nouveau-nés de notre étude, l'ictère à bilirubine libre (précoce ou prolongé) est le motif le plus fréquent en vue de déterminer la possibilité d'une forme héréditaire d'hyperbilirubinémie associée au GS. Ceci est en accord avec les critères d'éligibilité d'un certain nombre d'études (16, 18, 502, 503).

Chez les enfants que nous avons étudié, les antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie et l'ictère sont les motifs les plus fréquents d'une demande d'analyse génétique en vue de rechercher le GS, ceci est en accord avec l'étude de Moyer AM et al. (16). Nous avons également constaté que les manifestations cliniques représentaient un autre motif de la recherche génétique du GS, la symptomatologie étant la même que celle évocatrice du GS chez les adultes et en même temps retrouvée chez les patients du groupe 1. Par ailleurs, en accord avec ce qui a été observé dans le groupe 1 et avec l'étude de Preisig D et al. (480), la découverte fortuite d'une hyperbilirubinémie libre isolée est apparue comme une autre raison de diagnostic positif du GS.

7.- Caractéristiques biologiques des patients du groupe 2 :

7.1.- Bilan d'hémolyse :

Le taux d'hémoglobine normal ainsi que la numération normale des réticulocytes retrouvés chez nos patients, nous ont permis d'éliminer une cause hémolytique à l'hyperbilirubinémie libre .

7.2.- Bilan hépatique :

Une différence significative de la bilirubine totale sérique est observée dans notre population d'étude pédiatrique entre les trois tranches d'âge. En accord avec l'étude de Moyer AM et al. (16), nous avons constaté que la concentration moyenne de bilirubine totale diminuait avec l'âge. Cette différence est attribuable à l'origine multifactorielle de l'hyperbilirubinémie naturellement observée chez les nouveau-nés.

Les valeurs de l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma-glutamyl transférase, l'albumine et les protides totaux retrouvés chez nos patients se situaient toutes dans l'intervalle des valeurs de référence suggérant l'absence de pathologie hépatique sous-jacente.

8.- Etude moléculaire des patients du groupe 2 :

Des études antérieures ont montré une origine génétique à l'hyperbilirubinémie non conjuguée pédiatrique dans diverses régions du monde, particulièrement en néonatologie où les causes sont multifactorielles (503).

La recherche des variants rs4148323 et rs8175347 les plus associés au GS en Asie et en Europe respectivement chez nos patients a montré le polymorphisme du promoteur TA7/TA7 chez près de la moitié de notre population d'étude. Aucun cas du polymorphisme de l'exon 1 homozygote muté (AA) ni hétérozygote (GA) n'ont été retrouvés.

En accord avec ce que nous avons trouvé dans le groupe 1 et avec ce qui a été rapporté dans la littérature (200, 437, 458, 481) , nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux sexes pour le génotype TA7/TA7 du polymorphisme (TA)n(rs8175347).

Dans notre étude, nous avons étudié la prévalence du polymorphisme (TA)n(rs8175347) chez tous les patients pédiatriques présentant une hyperbilirubinémie libre et nous avons constaté que le génotype homozygote muté TA7/TA7 a été retrouvé chez le tiers des nouveau-nés (12/34) et chez la majorité des enfants (10/13), alors que le génotype retrouvé chez le seul nourrisson est l'hétérozygote TA6/TA7.

Chez les nouveau-nés et les enfants, la fréquence du polymorphisme (TA)n(rs8175347) a fait l'objet d'un certain nombre d'études précédentes dans différentes populations.

La prédominance du génotype TA7/TA7 retrouvé chez les enfants de notre étude est en accord avec les résultats de l'étude de Moyer AM et al. (16).

Les résultats de l'étude de Agrawal SK et al. (503) ont rapporté, chez les nouveau-nés d'Inde du Nord, une fréquence plus élevée du polymorphisme du promoteur (TA)n(rs8175347) chez les sujets hyperbilirubinémiques que chez les témoins.

Laforgia et al. ont constaté une fréquence significativement plus élevée du génotype TA7/TA7 chez les nouveau-nés italiens présentant des concentrations de BRB sérique totale de 130 mg/L par rapport aux témoins dont les valeurs de BRB sérique totale ne dépassaient pas cette concentration (504).

D'autres études cas-témoins menées sur des nouveau-nés turcs n'ont montré aucune différence significative du génotype TA7/TA7 entre les bébés atteints d'ictère et les témoins (505,506).

Comme nous n'avons pas comparé les nouveau-nés de notre étude à des témoins, nous ne pouvons pas établir un lien entre le degré de l'hyperbilirubinémie et le génotype TA7/TA7. Cependant, ces données et les résultats que nous avons trouvés dans le groupe 1 suggèrent l'association entre le génotype TA7/TA7 et l'hyperbilirubinémie libre isolée ou l'ictère chez les nouveau-nés et les enfants.

Par ailleurs, nous avons observé une différence significative de la bilirubine totale de tous nos patients entre les trois génotypes (TA6/TA6, TA6/TA7, TA7/TA7). Ceci n'est pas en accord avec l'étude de Agrawal SK et al. (503). Nous pourrions expliquer cela en partie par une différence dans les critères d'inclusion. D'une part, comme les nouveau-nés de notre étude représentent l'effectif le plus élevé de notre population il est évident que le génotype TA6/TA6 soit associé à d'autres causes d'hyperbilirubinémie.

Dans notre étude, nous avons voulu analyser le lien entre le polymorphisme (TA)n(rs8175347) et l'ictère chez les nouveau-nés allaités exclusivement mais l'absence des données sur l'allaitement chez la moitié des nouveau-nés ne nous l'a pas permis.

Cependant, comme il a été démontré par Zaja O et al. (445) que le génotype TA7/TA7 est un facteur de risque important de développement d'une hyperbilirubinémie non physiologique précoce chez les nouveau-nés allaités, il nous parait important de signaler que nous avons constaté le génotype TA7/TA7 chez 4 cas/ sur 7 cas allaités exclusivement au lait maternel.

Notre étude présente certaines limites. La non disponibilité de certains réactifs nécessaires au dosage des paramètres biologiques étudiés pendant la période de recrutement nous a empêché d'établir un profil biologique complet de tous les patients. En plus de cela, le manque de moyens humains et matériels ne nous a pas permis de réaliser une étude cas-témoins, faute de quoi nous n'avons pas pu déterminer la prévalence du GS dans la population générale. De plus, compte tenu de la nature de notre étude, nous n'avons pas pu apprécier les différences dans les caractéristiques cliniques et biologiques des patients GS par rapport à des témoins de notre population.

Chapitre VI :

Conclusion et perspectives

Considérée auparavant comme un déchet associé aux maladies du foie, la compréhension de la bilirubine a beaucoup évolué. La bilirubine sérique est désormais considérée comme un biomarqueur et un indicateur prédictif important de l'état de santé.

L'augmentation légère de la bilirubine libre typiquement observée dans le GS est associée à une amélioration de l'état clinique qui est reflétée par une protection contre diverses maladies. L'étude des différents profils biologiques permet de mieux comprendre les bénéfices apportés par une hyperbilirubinémie.

Le GS est une entité cliniquement ignorée, sous-estimée et insuffisamment étudiée, notamment en Algérie, où il n'a jamais été étudié auparavant. Les patients ne consultent pas ou consultent tardivement à cause de l'ictère très modéré et de la pauvreté des signes cliniques associés et la très bonne tolérance des symptômes. Cette maladie pose un vrai problème de diagnostic, surtout chez les nouveau-nés, en raison de la diversité des diagnostics différentiels.

La présente étude a permis d'établir une association entre une hyperbilirubinémie libre et certains paramètres biologiques, de caractériser les polymorphismes génétiques en cause dans le GS spécifiques à notre population et de dresser un profil biologique des patients atteints du GS. La plupart de nos résultats rejoignent les données de la littérature.

Nos résultats montrent qu'une bilirubinémie circulante élevée, en particulier dans le cas du GS, est associée à une diminution des concentrations des biomarqueurs du métabolisme lipidique et de l'inflammation et une tendance à la baisse de l'IMC.

De plus, les sujets âgés, généralement plus à risque, sont plus susceptibles d'être protégés contre la dyslipidémie liée à l'âge ainsi que d'un moindre risque cardiovasculaire lié au glucose.

Ces résultats suggèrent que la bilirubine est un hypolipémiant physiologique qui protège des maladies cardiovasculaires. Des études complémentaires pourraient contribuer à une compréhension détaillée du rôle fonctionnel de la bilirubine dans les mécanismes liés à la pathogenèse du développement de ces maladies chez l'homme.

La faible prévalence du diabète sucré parmi nos sujets suggère un effet bénéfique de la bilirubine sur le diabète. Des recherches plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer si ce phénomène protecteur s'étend à toutes les formes de diabète sucré.

La recherche des mutations génétiques a montré que le polymorphisme (TA)n(rs8175347) du gène UGT1A1 (UGT1A1*28) est le variant génétique associé au GS dans notre population. Son taux d'incidence brut (TIB) est estimé à 5,49 pour 100.000 habitants dans la wilaya d'Oran avec une prédominance chez les hommes.

Les résultats présentés dans la population d'étude pédiatrique ont montré que le taux de détection du variant UGT1A1 compatible avec le GS dépendait de l'âge, avec un taux plus faible chez les nouveau-nés que chez les enfants plus âgés.

Ces résultats soulignent la difficulté de prédire la contribution du polymorphisme (TA)n(rs8175347) du gène UGT1A1 à l'hyperbilirubinémie chez les nouveau-nés chez qui l'hyperbilirubinémie est souvent multifactorielle. Des études cas-témoins sur un plus large effectif sont nécessaires pour établir un lien entre la sévérité de l'hyperbilirubinémie néonatale et le génotype GS au sein de notre population.

La forte prévalence du GS parmi nos sujets et à travers le monde souligne l'importance du diagnostic moléculaire en Algérie et devrait nous inciter à évoquer systématiquement cette affection bénigne aussi bien chez les adultes que chez les enfants afin d'éviter des investigations complémentaires aussi inutiles que coûteuses.

Cette étude nous a permis de changer la perception des personnes présentant une hyperbilirubinémie légère et il est désormais clair qu'il n'y a aucune raison de qualifier les personnes atteintes de GS de « patients ». Au contraire, le GS représente probablement un avantage sélectif en raison des puissants effets bénéfiques de la bilirubine, qui protègent contre diverses maladies de la civilisation.

A l'instar de notre travail de thèse, plusieurs perspectives seraient utiles à une meilleure compréhension des liens entre la bilirubine et les différents profils biologiques ainsi qu'à une meilleure connaissance du GS dans notre pays, à savoir :

- Réaliser des études similaires avec d'autres paramètres biologiques permettra d'identifier d'autres associations de la bilirubine libre avec ces paramètres au sein de notre population et de mieux comprendre les différents facteurs étiologiques des maladies du stress oxydatif.

- Réaliser des études cas-témoin chez les adultes serait nécessaire afin d'évaluer le statut clinique et biologique des patients GS au sein de notre population.

- Réaliser des études cas-témoin chez les nouveau-nés serait fondamental afin d'identifier un seuil d'hyperbilirubinémie libre pour le diagnostic génétique du GS.

- Instaurer le diagnostic moléculaire du GS devant toute hyperbilirubinémie libre isolée non hémolytique permettra d'identifier les patients à haut risque de toxicité induites par certaines chimiothérapies anti-cancéreuses.

- Instaurer des registres cliniques du GS permettra une meilleure connaissance de ce syndrome dans les différentes régions de notre pays.

- La création d'un réseau national réunissant des pédiatres, des gastro-entérologues et autres cliniciens et des biologistes serait d'un grand apport dans la prise en charge des GS et des hyperbilirubinémies.

- Un axe de recherche très intéressant pourrait constituer une assise pour les futurs projets de recherche pour les candidats en post-graduation et ce, dans le cadre de la recherche d'inhibiteurs partiels de l'UGT1A1 visant à augmenter légèrement les concentrations de bilirubine non conjuguée afin de protéger contre le développement des maladies du stress oxydatif.

Chapitre VII :

Références bibliographiques

1. Vitek L, Tiribelli C. Bilirubin: The yellow hormone? Journal of Hepatology 2021; 75(6):1485-1490. doi: 10.1016/j.jhep.2021.06.010

2. Vitek L. Bilirubin as a predictor of diseases of civilization. Is it time to establish decision limits for serum bilirubin concentrations? Archives of Biochemistry and Biophysics 2019; 672:108062. doi: 10.1016/j.abb.2019.108062

3. Vitek L, Tiribelli C. Gilbert's syndrome revisited. Journal of Hepatology 2023; 79(4):1049-1055. doi: 10.1016/j.jhep.2023.06.004

4. Novák P, Jackson AO, Zhao GJ, Yin K. Bilirubin in metabolic syndrome and associated inflammatory diseases: New perspectives. Life Sciences 2020; 257:118032. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118032

5. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: A review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. Progress in Lipid Reserch 2013; 52(2):193-205. doi: 10.1016/j.plipres.2012.11.001

6. Wagner KH, Khoei NS, Hana CA, Doberer D, Marculescu R, Bulmer AC, Hörmann-Wallner M, Mölzer C. Oxidative Stress and Related Biomarkers in Gilbert's Syndrome: A Secondary Analysis of Two Case-Control Studies. Antioxidants 2021;10(9):1474. doi: 10.3390/antiox10091474

7. Maruo Y, Nakahara S, Yanagi T, Nomura A, Mimura Y, Matsui K, Sato H, Takeuchi Y. Genotype of UGT1A1 and phenotype correlation between Crigler-Najjar syndrome type II and Gilbert syndrome. J Gastroenterol Hepatol 2016; 31(2):403-8. doi: 10.1111/jgh.13071.

8. Nkiruka R Ukibe, Chioma Theresa Onwe, C.E. Onah, Ezinne G. Ukibe, Blessing C. Ukibe, Victory Ezennia Ukibe and Emmanuel Ifeanyi Obeagu. Advances in Laboratory Diagnosis and Clinical Management of Gilbert Disease: A Comprehensive Review. IAA Journal of Scientific Research 2024; 11(1): 1-6.doi: 10.59298/IAAJSR/2024/112.5288

9. Chaouch L, Mahjoubi I, Louati I, Mrad R, Douzi K, Ghanem A, Abbes S. . Polymorphismes alléliques du gène UDP-Glucuronosyltransferase 1A1dans une population tunisienne. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis 2011 ; 88 (1-4) : 71-76.

10. Grant LM, Faust TW, Thoguluva Chandrasekar V, et al. Gilbert Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470200/

11. Khaitovych MV, & Turchak DV. JILBER'S SYNDROME: CLINICAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS. Review Medical Science of Ukraine (MSU) 2020; 16(4). doi: 10.32345/2664-4738.4.2020.9

12. Culley CL, Kiang TK, Gilchrist SE, Ensom M H. Effect of the UGT1A1*28 Allele on Unconjugated Hyperbilirubinemia in HIV-Positive Patients Receiving Atazanavir: A Systematic Review. Annals of Pharmacotherapy 2013; 47(4): 561–572. doi:10.1345/aph.1r550

13. Lankisch TO, Behrens G, Ehmer U, Möbius U, Rockstroh J, Wehmeier M, Strassburg CP. Gilbert's syndrome and hyperbilirubinemia in protease inhibitor therapy – An extended haplotype of genetic variants increases risk in indinavir treatment. Journal of Hepatology 2009; 50(5) : 1010–1018. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.030

14. Boyer J-C, Etienne-Grimaldi M-C, Thomas F, Quaranta S, Picard N, Loriot M-A, … Le Guellec C. Intérêt du génotypage de l'UGT1A1 dans le cadre du traitement des cancers digestifs par irinotécan. Bulletin Du Cancer 2014; 101(6): 533–553. doi:10.1684/bdc.2014.1933

15. Quaranta S, Thomas F. Pharmacogénétique des médicaments anticancéreux : état des connaissances et des pratiques — recommandations du Réseau national de pharmacogénétique (RNPGx). Thérapie (2017); 72(2): 193–204. doi:10.1016/j.therap.2016.09.008

16. Moyer AM, Skierka JM, Kotzer KE, Kluge ML, Black JL, Baudhuin LM. Clinical UGT1A1 Genetic Analysis in Pediatric Patients: Experience of a Reference Laboratory. Molecular Diagnosis & Therapy 2017 ; 21(3): 327–335. doi:10.1007/s40291-017-0265.

17. Skierka JM, Kotzer KE, Lagerstedt SA, O'Kane DJ, Baudhuin LM. UGT1A1 Genetic Analysis as a Diagnostic Aid for Individuals with Unconjugated Hyperbilirubinemia. The Journal of Pediatrics 2013 ; 162(6): 1146–1152.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2012.11.042

18. Doumas BT, Wu T-W. The Measurement of Bilirubin Fractions in Serum. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 1991; 28(5-6):415–445.

19. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review. Liver International 2008; 28(5): 592–605.

20. Nader Rifai, Andrea Rita Horvath, Carl T. Wittwer. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics 2018, Sixth edition.

21. Kamisako T, Kobayashi Y, Takeuchi K, Ishihara T, Higuchi K, Tanaka Y, Adachi Y. Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. Journal of Gastroenterology 2000; 35(9):659–664.

22. Bosma PJ, Seppen J, Goldhoorn B, Bakker C, Oude Elferink RP, Chowdhury JR, Chowdhury NR, Jansen PL. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man. J Biol Chem 1994; 269(27):17960-4.

23. Memon N, Weinberger BI, Hegyi T, Aleksunes LM. Inherited Disorders of Bilirubin Clearance. Pediatric Research 2015; 79(3):378–386.

24. Baudin B. Exploration biochimique du foie en 2017.Revue francophone des laboratoires 2017 ; 490 : 25-33.

25. Sullivan JI, Rockey DC. Diagnosis and evaluation of hyperbilirubinemia. Current Opinion in Gastroenterology 2017; 33(3):164–170.

26. Van den Bergh AAH, Muller P. Uber eine direkte undeine indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin. Biochem Z 1916; 77:90–103.

27. Kramer, P. Present concepts of the nature of direct and indirect bilirubin. The American Journal of Digestive Diseases 1957; 2(6), 330–334.

28. Doumas BT, Yein F, Perry B, et al. Determination of the sum of bilirubin sugar conjugates in plasma by bilirubin oxidase. Clin Chem 1999; 45:1255–1260.

29. Zelenka J, Lenícek M, Muchová L, Jirsa M, Kudla M, Balaz P, Zadinová M, Ostrow JD, Wong RJ, Vítek L. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues. Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci 2008; 867(1):37-42. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.03.005

30. Blanckaert N, Kabra PM, Farina FA, et al. Measurement of bilirubin and its monoconjugates and diconjugates in human serum by alkaline methanolysis and high-performance liquid chromatography. J Lab Clin Med 1980; 96:198–212.

31. Lo SF, Doumas BT, Ashwood ER. Performance of bilirubin determinations in US laboratories—revisited. Clin Chem 2004; 50:190–4.

32. Rubaltelli F F, Gourley G R, Loskamp N, Modi N, Roth-Kleiner M, Sender A, & Vert P. Transcutaneous Bilirubin Measurement: A Multicenter Evaluation of a New Device. PEDIATRICS 2001; 107(6) :1264–1271.

33. Fevery J, Blanckaert N .What can we learn from analysis of serum bilirubin? J Hepatol 1986 ; 2 : 113-121.

34. Roderick P,Macdonaldrichard J, Henrys L, Jacobsfrank A, Ibbottalanmather. Bilirubin (Modified Malloy and Evelyn) .Standard Methods of Clinical Chemistry 1965; 5: 65-67.

35. Doumas BT, Poon PKC, Perry BW, et al. Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation. Clin Chem 1985; 31:1779–89.

36. Lauff JJ, Kasper ME, Wu TW, Ambrose RT. Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin in serum that is firmly bound to protein. Clin Chem 1982; 28:629-637.

37. Langbaum ME, Farber SJ, Rosenthal P. Automated total and neonatal bilirubin values in newborns: is a distinction clinically relevant? Clin Chem 1992; 38:1690-1693.

38. Muraca M, Blanckaert N. Liquid chromatographic assay and identification of mono- and dieter conjugates of bilirubin in normal serum. Clin Chem 1983 ; 29 :1767-1771.

39. Michaelsson M. Bilirubin determination in serum and urine. Scand J Clin Lab Invest 1961; 13(Suppl. 56):1–80.

40. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem 1937;119: 481–90.

41. Vert P. Physiopathologie de l'hyperbilirubinémie néonatale. Archives de Pédiatrie 1998; 5(9) :1028–1030.

42. Torres M et Bruguera M. Crigler-Najjar syndrome. Gastroenterol Hepatol 2005 ; 28 (10) : 637-640. doi: 10.1016/s0210-5705(05)71530-2.

43. Bhandari J, Thada PK, Yadav D. Crigler Najjar Syndrome. StatPearls, Treasure Island (FL) 2022.

44. Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited disorders of bilirubin transport and conjugation: new insights into molecular mechanisms and consequences. Gastroenterology 2014; 146 (7): 1625-1638. doi: 10.1053/j.gastro.2014.03.047.

45. Singh A, Koritala T, Jialal I. Unconjugated Hyperbilirubinemia. StatPearls 2021.

46. Valdiguié P: Biochimie clinique 2000 ; 2ème édition : 282-288.

47. Labrune P. Exploration d'un ictère néonatal. Médecine Thérapeutique Pédiatrie 2001 ; 4(2) : 127-132.

48. Cortey A. Ictère du nouveau-né : le retour de l'ictère nucléaire. Archives de Pédiatrie 2012; 19(9) : 897-899. doi: 10.1016/j.arcped.2012.06.018.

49. Odievre M. Classification des causes d'ictère néonatal. Hépato-Gastro Oncol Dig 1996; 3(2) : 113-120.

50. Cortey A, Bedu A, Casper C, Raignoux J, Renesme L, Truffert P, Tourneux P. Ictère néonatal à bilirubine libre : Aspects physiopathologiques et thérapeutiques. Bases Scientifiques En Néonatologie 2017; 391–408. doi:10.1016/b978-2-294-73742-8.00030-3

51. American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation. Pediatrics 2004; 114(1): 297-316. doi: 10.1542/peds.114.1.297.

52. Mutombo AK, Mukuku O, Kabulo BK, Mutombo AM, Ngeleka AM, Mutombo JD, Kabuya MS, Kayembe CM, Luboya ON. Ictères pathologiques du nouveau-né à l'hôpital Bonzola de Mbuji-Mayi, République Démocratique du Congo. Pan Afr Med J 2014; 19:302. doi: 10.11604/pamj.2014.19.302.5658.

53. Alexandre J, Balian A, Bensoussan L, Chaïb A, Gridel G, Kinugawa, K, … Soria A. Ictère néonatal. Le Tout En Un Révisions IFSI 2009, 1202–1203. doi:10.1016/b978-2-294-70633-2.50407-8

54. Doumas BT, Perry BW, Sasse EA, Straumfjord JV Jr. Standardization in bilirubin assays: evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions. Clin Chem 1973; 19(9):984-93.

55. Cortey A, Renesme L, Raignoux J, Bedu A, Casper C, Tourneux P, Truffert P. Ictère à bilirubine non conjuguée du nouveau-né de 35 semaines et plus : du dépistage au suivi après sortie de la maternité. Recommandations pour la pratique clinique. Archives de Pédiatrie 2017 ; 24(2) : 192–203.

56. Jendrassik L, Grof P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. Biochem Z 1938; 297:81–9.

57. Strassburg CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). Best Pract Res Clin Gastroenterol 2010;24 (5) :555-571. doi: 10.1016/j.bpg.2010.07.007.

58. Bhutani VK, Gourley GR, Adler S, Kreamer B, Dalin C, Johnson LH. Noninvasive measurement of total serum bilirubin in a multiracial predischarge newborn population to assess the risk of severe hyperbilirubinemia. Pediatrics 2000; 106 (2):E17. doi: 10.1542/peds.106.2.e17.

59. Tcaciuc E, Podurean M, Tcaciuc A. Management of Crigler-Najjar syndrome. Med Pharm Rep 2021; 94(1): S64-S67. doi: 10.15386/mpr-2234.

60. Arias IM, Gartner LM, Seifter S, Furman M. Prolonged neonatal unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast feeding and a steroid, pregnane-3 (alpha), 20(beta)-diol, in maternal milk that inhibits glucuronide formation in vitro. J Clin Invest 1964; 43: 2037-2047. doi: 10.1172/JCI105078.

61. Maisels MJ, Newman BT. Kernicterus in otherwise healthy, breast-fed term newborns. Pediatrics 1995; 96 (4): 730-733.

62. Preer GL, Philipp BL. Understanding and managing breast milk jaundice. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2011;96(6): F461-466.doi: 10.1136/adc.2010.184416.

63. Walter AW. Maladie hémolytique du nouveau-né. MSD Manuals 2022.

64. Lehlimi M, El Korchi Z, Chemsi M, Badre A, Habzi A, Benomar S. L'incompatibilité fœto-maternelle dans le système ABO. J Pédiatrie Puériculture 2020;33(3): 151-157. doi:10.1016/j.jpp.2019.11.002.

65. Cortey A, Elzaabi M, Waegemans T, Roch B, Aujard Y. Efficacité et tolérance des immunoglobulines polyvalentes dans l'hyperbilirubinémie néonatale par incompatibilité ABO. Méta-analyse. Archives de Pédiatrie 2014; 21 (9): 976-983. doi: 10.1016/j.arcped.2014.02.005.

66. Parnet-Mathieu F. Anémie par incompatibilité érythrocytaire fœtomaternelle. J Pédiatrie Puériculture 2004; 17(6): 338-341. doi: 10.1016/j.jpp.2004.07.006.

67. National Reference System for Total Bilirubin, NCCLS Code NRSCL7-CR. Report on Analyte Reference Summaries of the National Reference System for the Clinical Laboratory (Revised 3/29/89, pp 20-21),National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA 19085.

68. Kayemba-Kay's S, Christin P, Yahouanc-Lapalle H, Oriot D. Anémie néonatale par incompatibilité rhésus traitée par érythropoïétine. Archives de Pédiatrie 2004; 11(7): 868-869. doi: 10.1016/j.arcped.2004.03.033.

69. Chemsi M, Badre A, Aitouahmane S, Lehlimi M, Habzi A, Benomar S. Place des immunoglobulines polyvalents intraveineuses dans la prise en charge de l'ictère néonatal par incompatibilité fœto-maternelle rhésus 1. J Pédiatrie Puériculture 2021; 34(1): 36-343. doi:10.1016/j.jpp.2020.10.004.

70. Monpoux F, Dageville C, Maillotte AM, De Smet S, Casagrande F, Boutté P. Immunoglobulines polyvalentes intraveineuses et ictère néonatal par allo-immunisation érythrocytaire. Archives de Pédiatrie 2009; 16(9) :1289-1294. doi: 10.1016/j.arcped.2009.05.015.

71. Dépistage d'un déficit en G6PD et ictère néonatal .Revue Française des Laboratoires 2001; 332:18. doi:10.1016/S0338-9898(01)80119-0.

72. Saadi S, Chiche L, Brah S, Lanfranchi M A, Thomas G, Gouriou E, Durand J M. Anémie hémolytique par favisme se révélant seulement à l'âge adulte et chez la femme : à propos de deux cas. La Revue de Médecine Interne 2010 ; 31 : S480. doi:10.1016/j.revmed.2010.10.303.

73. Megarbane B. Déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase : quand y penser et quelles précautions prendre ? Réanimation 2008 ; 17(4) :399–406.

74. Girot R, Mandelbrot L. Le nouveau-né de mère atteinte d'une hémoglobinopathie majeure (thalassémie ou drépanocytose). Archives de Pédiatrie 2013; 20(5):H31-H32. doi: 10.1016/S0929693X(13)71306-X.

75. Sangaré A, Sanogo I, Meité M, Ambofo Y, SOPIE V, Segbena A. Contribution à l'étude du profil hématologique de l'alpha thalassémie chez le nouveau-né en Côte d'ivoire. Médecine d'Afrique Noire 1991; 38(8/9):551-557.

76. LOUFOUA-LEMAY AM, Makoumbou P, Babela JM, Nakahonda C, Mayanda F, Nzingoula S. Dépistage néonatal de la drépanocytose au Congo Brazzaville. Annales des Sciences de la Santé 2016; 11(5).

77. Bader-Meunier B, Cynober T, Tchernia G. Maladies de la membrane du globule rouge. Médecine thérapeutique/Pédiatrie2001; 4(3), 217-22.

78. Ayadi Dahmane I, Chaouachi S, Rabaii B, Hajji A, Bezzine A, Ben Hamida E, Marrakchi Z. Sphérocytose héréditaire néonatale sévère : à propos d'une observation. Journal de Pédiatrie et de Puériculture 2016; 29(3): 155–157.

79. Tatopoulos A, Hubert C, Vieux R, Hascoët JM. Quel bilan sanguin réaliser avant une sortie précoce de maternité pour prédire un ictère sévère ? Rev Sage-Femme 2010; 9(4):183-188. doi:10.1016/j.sagf.2010.07.001.

80. Anne Claire Nonnotte. Le nouveau-né de mère diabétique. Elsevier 2017.

81. Bach Knudsen K, Ebbesen F. Crigler-Najjar type 1 in children. Ugeskr Laeger 2013; 175(42):2489-2491.

82. Lauff JJ, Kasper ME, Ambrose RT. Separation of bilirubin species in serum and bile by high performance reverse-phase liquid chromatography. J Chromatogr 1981; 226:391–402.

83. Gorbunova O, Chernysheva E. A new look at gilbert syndrome (Literature review). Georgian Med News 2019; 296: 75-81.

84. Horsfall LJ, Nazareth I, Pereira SP, Petersen I. Gilbert's syndrome and the risk of death: a population-based cohort study. J Gastroenterol Hepatol 2013; 28(10):1643-1647. doi:10.1111/jgh.12279.

85. Roche SP, Kobos R. Jaundice in the Adult Patient. Am Fam Physician 2004; 69(2): 299-304.

86. Sprinz H, Nelson RS. Persistent non-hemolytic hyperbilirubinemia associated with lipochrome-like pigment in liver cells: report of four cases. Ann Intern Med 1954; 41(5): 952-962. doi:10.7326/0003-4819-41-5-952.

87. Dubin IN, Johnson FB. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. Medicine (Baltimore) 1954; 33(3):155-197. doi: 10.1097/00005792-195409000-00001.

88. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. Hepatology 1997 ; 25(6):1539-42. doi: 10.1002/hep.510250635.

89. Dubin IN. Chronic idiopathic jaundice; a review of fifty cases. Am J Med 1958; 24(2):268-292. doi: 10.1016/0002-9343(58)90315-2.

90. Shani M, Seligsohn U, Gilon E, Sheba C, Adam A. Dubin-Johnson syndrome in Israel. I. Clinical, laboratory, and genetic aspects of 101 cases. Q J Med 1970; 39(156): 549-567.

91. You SJ, Sun YX, Zhang J, He Q, Wu XM, Hu Y. Literature review and report of three cases of Dubin-Johnson syndrome related to ABCC2 gene mutations in children. Am J Transl Res 2021; 13(5):4477-4488.

92. Lee JH, Chen HL, Chen HL, Ni YH, Hsu HY, Chang MH. Neonatal Dubin-Johnson syndrome: long-term follow-up and MRP2 mutations study. Pediatr Res 2006; 59 (4 Pt 1): 584-9. doi: 10.1203/01.pdr.0000203093.10908.bb.

93. Van de Steeg E, Stránecký V, Hartmannová H, Nosková L, Hřebíček M, Wagenaar E, van Esch A, de Waart DR, Oude Elferink RP, Kenworthy KE, Sticová E, al-Edreesi M, Knisely AS, Kmoch S, Jirsa M, Schinkel AH. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver. J Clin Invest 2012; 122(2):519-28. doi: 10.1172/JCI59526.

94. Chen HL, Wu SH, Hsu SH, Liou BY, Chen HL, Chang MH. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. J Biomed 2018; 25(1):75. doi: 10.1186/s12929-018-0475-8.

95. Bronstein JA, Caumes JL, Richecoeur M, Lipovac AS. Conduite à tenir devant une cholestase. EMC-Hépatologie 2004;1(3):113-121.doi: 10.1016/j.emchep.2004.07.001.

96. Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, Boyer JL. Drug-induced cholestasis. Hepatology 2011; 53(4):1377-87.

97. Valla DC. Cholestase. Hepato Gastro 2013 ; 20 : 618-627.doi : 10.1684/ hpg.2013.0915.

98. Chazouillères O, Erlinger S. Cholangite sclérosante primitive. Hépato-gastro & oncologie digestive 2014; 21(6):449-459.

99. Lemoinne S, Camus M, Chambenois E, Wendum D. La cholangite sclérosante primitive. Hépato-Gastro & Oncologie Digestive 2018; 25(9), 912-921.

100. Watchko JF. Kernicterus and the molecular mechanisms of bilirubin-induced CNS injury in newborns. Neuromolecular Med 2006; 8(4): 513-529.doi: 10.1385/NMM:8:4:513.

101. Shapiro SM. Chronic bilirubin encephalopathy: diagnosis and outcome. Semin Fetal Neonatal Med 2010; 15(3): 157-163. doi: 10.1016/j.siny.2009.12.004.

102. Bhutani VK, Johnson L. A proposal to prevent severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus. J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc 2009; 29(1): S61-67. doi: 10.1038/jp.2008.213.

103. Johnson L, Bhutani VK, Karp K, Sivieri EM, Shapiro SM. Clinical report from the pilot USA Kernicterus Registry (1992 to 2004). J Perinatol Off J Calif Perinat Assoc 2009; 29 (1): S25-45. doi:10.1038/jp.2008.211.

104. Kaplan M, Bromiker R, Hammerman C. Severe neonatal hyperbilirubinemia and kernicterus: are these still problems in the third millennium? Neonatology 2011; 100(4):354-362. doi:10.1159/000330055.

105. Manning D, Todd P, Maxwell M, Platt MJ. Prospective surveillance study of severe hyperbilirubinaemia in the newborn in the UK and Ireland. Arch Dis Child Fetal Neonatal 2007; 92(5):F342-F346. doi: 10.1136/adc.2006.105361.

106. Karjoo M, Hassan HH, Chowdhury JR, Kadakol JA. Gilbert syndrome presenting as prolonged hyperbilirubinemia in an infant. Gastroenterology 2000; 118(4): A65. doi: 10.1016/S0016-5085(00)82334-3.

107. Bynum WT. Mavero-Hepatic Icterus. Gastroenterology 1957; 33(1): 97-103. doi: 10.1016/S0016-5085(19)35793-2.

108. Meulengracht E. A review of chronic intermittent juvenile jaundice. QJM 1947; 16: 83-98

109. Gilbert A, Lereboullet P. La cholémie simple familiale. Sem Med 1901;21:241-3.

110. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O et Karpathios T. Gilbert syndrome. European Journal of Pediatrics 2012; 171(1):11-15. doi: 10.1007/s00431-011-1641-0.

111. Watson KJR, Gollan JL. Gilbert's syndrome. Baillières Clin Gastroenterol 1989; 3(2): 337-355. doi: 10.1016/0950-3528(89)90004-3.

112. Wagner KH, Shiels RG, Lang CA, Seyed Khoei N et Bulmer AC. Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome. Crit Rev Clin Lab Sci 2018; 55(2): 129-139. doi: 10.1080/10408363.2018.1428526.

113. Hana CA, Tran LV, Mölzer C, Müllner E, Hörmann-Wallner M, Franzke B, Tosevska A, Zöhrer PA, Doberer D, Marculescu R, Bulmer AC, Freisling H, Moazzami AA, Wagner KH. Serum metabolomics analysis reveals increased lipid catabolism in mildly hyperbilirubinemic Gilbert's syndrome individuals. Metabolism 2021; 125:154913. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154913.

114. Le Bihan-Levaufre B, Francoual J, Chalas J, Trioche P, Capel L, Lindenbaum A, Labrune P. Prévalence génotypique de la maladie de Gilbert, en France [Genetic incidence of Gilbert's syndrome in France] Gastroenterol Clin Biol 2001; 25(5):557-8.

115. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GN, Jansen PL, Oude Elferink RP, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. N Engl J Med 1995; 333(18):1171-5. doi: 10.1056/NEJM199511023331802.

116. Claridge LC, Armstrong MJ, Booth C, Gill PS. Gilbert's syndrome .BMJ 2011; 342: 2293. doi: 10.1136/bmj.d2293.

117. Burchell B, Hume R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. J Gastroenterol Hepatol 1999; 14(10): 960-966. doi: 10.1046/j.1440-1746.1999.01984.x.

118. Maghat MA. MALADIE DE GILBERT CHEZ L'ENFANT. Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat - Thèse de médecine 2019.

119. Rossi F, Francese M, Iodice RM, Falcone E, Vetrella S, Punzo F, De Vita S, Perrotta S. Disordini ereditari del metabolismo della bilirubina [Inherited disorders of bilirubin metabolism]. Minerva Pediatr 2005; 57(2):53-63.

120. Monaghan G, McLellan A, McGeehan A, Li Volti S, Mollica F, Salemi I, Din Z, Cassidy A, Hume R, Burchell B. Gilbert's syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn. J Pediatr 1999; 134(4):441-6. doi: 10.1016/s0022-3476(99)70201-5.

121. Radlović N, Leković Z, Mladenović M, Ristić D, Radlović V, Lekić V, Vuletić B, Djurdjević J, Gajić M. Gilbert's syndrome in children--our experience. Srp Arh Celok Lek 2007; 135(5-6): 317-20. doi: 10.2298/sarh0706317r.

122. Cleary KJ, White PD. Gilbert's and chronic fatigue syndromes in men. Lancet Lond Engl 1993; 341: 842. doi: 10.1016/0140-6736(93)90629-u.

123. Bancroft JD, Kreamer B, Gourley GR. Gilbert syndrome accelerates development of neonatal jaundice. J Pediatr 1998; 132(4): 656-660.doi: 10.1016/S0022-3476(98)70356-7.

124. Schmid R. Gilbert's syndrome-a legitimate genetic anomaly? N Engl J Med 1995; 333(18):1217-1218. doi: 10.1056/NEJM199511023331812.

125. Arias IM. Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults. J Clin Invest 1962; 41: 2233±45.

126. Sleisenger MH, Kahn I, Barniville H, Rubin W, Ben-Ezzer J, Arias IM. Nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with hepatic glucuronyl transferase deficiency: a genetic study in four generations. Trans Assoc Am Phys 1967; 80: 259±66.

127. King D, Armstrong M. Overview of Gilbert's syndrome. Drug Ther Bull 2019; 57(2): 27–31. doi: 10.1136/dtb.2018.000028.

128. Ashraf W, van Someren N, Quigley EM, Saboor SA, Farrow LJ. Gilbert's syndrome and Ramadan: exacerbation of unconjugated hyperbilirubinemia by religious fasting. J Clin Gastroenterol 1994; 19(2):122-4.

129. Powell LW, Hemingway E, Billing BH, Sherlock S. Idiopathic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome). A study of 42 families. N Engl J Med 1967; 277(21): 1108-12. doi: 10.1056/NEJM196711232772102.

130. Bakhotmah MA, Gasem A, Barotee. Asymptomatic unconjugated hyperbilirubinemia (Gilbert syndrome) among Saudis in Jeddah. Ann Saudi Med 1995; 15:422-3.

131. Blanckaert N. Analysis of bilirubin and bilirubin mono- and di-conjugates: determination of their relative amounts in biological samples. Biochem J 1980; 185:115–28.

132. Hirschfield GM, Alexander GJ. Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. Ann Clin Biochem 2006; 43(5):340–343.doi: 10. 1258/00045630. 6778520034.

133. Valesini G, Conti F, Priori R, Balsano F. Gilbert's syndrome and chronic fatigue syndrome. Lancet 1993; 341:1162-1163.15

134. Levine RA, Klatskin G. Unconjugated hyperbilirubinemia in the absence of overt hemolysis: Importance of acquired disease as an etiologic factor in 366 adolescent and adult subjects. The American Journal of Medicine 1964; 36 (4)1964:541-52.doi: 10.1016/0002-9343(64)90102-0

135. Adachi Y, Inufusa H, Yamashita M, Kambe A, Yamazaki K, Sawada Y, Yamamoto T. Clinical application of serum bilirubin fractionation by simplified liquid chromatography. Clin Chem 1988; 34(2):385-8.

136. Wu N, Sweedler JV, Lin M. Enhanced separation and deletion of serum bilirubin species by capillary electrophoresis using a mixed anionic surfactant-protein buffer system with laser-induced fluorescence detection. J Chromatogr B Biomed Appl 1994; 654:185–91.

137. Bosma PJ, Chowdhury NR, Goldhoorn BG, Hofker MH, Oude Elferink RP, Jansen PL, Chowdhury JR. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin-UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I. Hepatology 1992; 15(5):941-7.doi: 10.1002/hep.1840150531.

138. Winger J, Michelfelder A. Diagnostic approach to the patient with jaundice. Prim Care 2011; 38(3): 469-82.

139. Barret PVD. Hyperbilirubinemia of fasting. J Am Med Assoc 1971; 217:1349-1353.

140. Owens D, Sherlock S. Diagnosis of Gilbert's syndrome: role of reduced caloric intake test. Br Med J 1973; 3: 559-563

141. Felsher BF, Carpio NM. Caloric intake and unconjugated hyperbilirubinemia. Gastroenterology 1975; 69: 42-47

142. Gollan JL, Hatt KJ, Billing BH. The influence of diet on unconjugated hyperbilirubinaemia in the Gunn rat. Clinical Science and Molecular Medicine 1975; 49(3):229-35. doi: 10.1042/cs0490229.

143. Barrett PVD. Effects of caloric and noncaloric materials in fasting hyperbilirubinaemia. Gastroenferology 1975; 68:361-369.

144. Gollan JL, Huang SN, Billing BH et Sherlock S. Prolonged survival in three brothers with severe type 2 Crigler-Najar syndrome. Ultrastructural and metabolic studies. Gastroenterology 1975; 68:1543-1555.

145. Gollan JL, Bateman C, Billing BH. Effect of dietary composition on the unconjugated hyperbilirubinaemia of Gilbert's syndrome. Gut 1976; 17:335-340.

146. Gollan JL, Hole DR, Billing BH. The role of dietary lipid in the regulation of unconjugated hyperbilirubinaemia in Gunn rats. Clin Sci 1979; 57(4):327-337.doi: 10.1042/cs0570327

147. Watson KJR, Gollan JL. Gilbert's syndrome. Baillières Clin Gastroenterol 1989; 3(2): 337-355. doi: 10.1016/0950-3528(89)90004-3.

148. Murthy GD, Byron D, Shoemaker D, Visweswaraiah H, Pasquale D. The utility of rifampin in diagnosing Gilbert's syndrome. Am J Gastroenterol 2001; 96(4):1150-4. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03693.x.

149. Thomsen HF, Hardt F, Juhl E. Diagnosis of Gilbert's syndrome. Reliability of the caloric restriction and phenobarbital stimulation tests. Scand. J Gastroenterol 1981; 16(5): 699-703. doi: 10.3109/00365528109182033.

150. Black M, Sherlock S. Treatment of Gilbert's syndrome with phenobarbitone. Lancet 1970; 1:1359-1361.

151. Davidson AR, Rojas-Bueno A, Thompson RP, Williams R. Reduced caloric intake and nicontinic acid provocation tests in the diagnosis of Gilbert's syndrome. Br Med J 1975; 2 (5969): 480.

152. Gentile S, Tiribelli C, Persico M, Bronzino P, Marmo R, Orzes N, Orlando C, Rubba P, Coltorti M. Dose dependence of nicotinic acid-induced hyperbilirubinemia and its dissociation from hemolysis in Gilbert's syndrome. J Lab Clin Med 1986 ; 107(2):166-71.

153. Rollinghoff W, Paumgartner G, Preisig R. Nicotinic acid test in the diagnosis of Gilbert's syndrome. Correlation with the bilirubin clearance. Gut 1981; 22: 663-668.

154. Gentile S, Rubba P, Persico M, Bronzino P, Marmo R, Faccenda F. Improvement of the nicotinic acid test in the diagnosis of Gilbert's syndrome by pretreatment with indomethacin. Hepatogastroenterology 1985; 32(6):267-9.

155. Fromke VL, Miller D. Constitutional hepatic dysfunction (CHD; Gilbert's snydrome): A review with special reference to a characteristic increase and prolongation of the hyperbilirubinemic response to nicotinic acid. Medicine 1972; 51:451-464.

156. Ohkubo H, Musha H, Okuda K. Studies on nicotinic acid interaction with bilirubin metabolism. Dig Dis Sci 1979; 24:700-704.

157. Dickey W, McAleer JJ, Callender ME. The nicotinic acid provocation test and unconjugated hyperbilirubinaemia. Ulster Med J 1991; 60:49-52.

158. Sieg A, Stiehl A, Raedsch R, Ullrich D, Messmer B, Kommerell B. Gilbert's syndrome: diagnosis by typical serum bilirubin pattern. Clin Chim Acta 1986; 154(1):41-7. doi: 10.1016/0009-8981(86)90086-0.

159. Sieg A, König R, Ullrich D, Fevery J. Subfractionation of serum bilirubins by alkaline methanolysis and thin-layer chromatography. An aid in the differential diagnosis of icteric diseases. J Hepatol 1990; 11(2):159-64. doi: 10.1016/0168-8278(90)90107-3.

160. Adachi Y, Katoh H, Fuchi I, Yamamoto T. Serum bilirubin fractions in healthy subjects and patients with unconjugated hyperbilirubinemia. Clin Biochem 1990; 23(3):247-51. doi: 10.1016/0009-9120(90)90705-y.

161. Gentile S, Persico M, Tiribelli C. Abnormal hepatic uptake of low doses of sulfobromophthalein in Gilbert's syndrome: the role of reduced affinity of the plasma membrane carrier of organic anions. Hepatology 1990; 12(2):213±17.

162. Berk PD, Blaschke TF, Waggoner JC. Defective BSP clearance in patients with constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's syndrome). Gastroenterology 1972; 63:472-481.

163. Fiorelli G, Portaleone D, Chiesa G, Bitto T, Del Ninno E. Hemolytic components in Gilbert's syndrome. Quad Sclavo Diagn 1973; 9(1):347±56.

164. Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. Hepatology 2000; 32 (4): 792–795. doi: 10.1053/jhep.2000.18193

165. Harraway JR, George PM. Use of fully denaturing HPLC for UGT1A1 genotyping in Gilbert syndrome. Clin Chem 2005; 51: 2183–5.

166. Ehmer U, Lankisch TO, Erichsen TJ, Kalthoff S, Freiberg N,Wehmeier M, Manns MP, Strassburg CP. Rapid Allelic Discrimination by TaqMan PCR for the Detection of the Gilbert's Syndrome Marker UGT1A1*28. Journal of Molecular Diagnostics 2008; 10(6): 549–552. doi:10.2353/jmoldx.2008.080036

167. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology 2002 ; 2(2) : 2-11.

168. Carceller AM, Delvin E, Gonthier M, Grégoire MC, Cousineau J, Alexandrov L. Évaluation de la mesure transcutanée de la bilirubine et concordance avec la mesure sur sang total et plasma. Annales de Biologie Clinique 2006; 64(6):575-579. doi:10.1684/abc.2006.0016

169. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(14):8170-4. doi: 10.1073/pnas.95.14.8170.

170. Sugatani J. Function, genetic polymorphism, and transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. Drug Metab Pharmacokinet 2013; 28:83–92.

171. Nilyanimit P, Krasaelap A, Foonoi M, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Role of a homozygous $A(TA)_7TAA$ promoter polymorphism and an exon 1 heterozygous frameshift mutation UGT1A1 in Crigler-Najjar syndrome type II in a Thai neonate. Genet Mol Res 2013; 12(3):3391-7. doi: 10.4238/2013.September.4.5.

172. Arias IM, Gartner LM, Cohen M, Ezzer JB, Levi A. Chronic nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia with glucuronyl transferase deficiency. American Journal of Medicine 1969; 47(3):395–409.

173. Kraemer D, Scheurlen M. Gilbert's disease and Crigler-Najjar syndrome type I and II are based on mutations in the same gene locus UGT1A1. Med Klin 2002; 97: 528-532.

174. Carey RG, Balisteri WF. Inherited deficient conjugation of bilirubin (familial nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia). Philadelphia: Elsevier; 2011:1389-91.

175. Sticova E, Jirsa M. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. World J Gastroenterol 2013; 19(38): 6398-407.

176. Murao S, Tanaka N. Isolation and identification of a microorganism producing bilirubin oxidase. Agric Biol Chem 1982; 46:2031–4.

177. Moghrabi N, Clarke DJ, Boxer M, Burchell B. Identification of an A-to-G missense mutation in exon 2 of the UGT1 gene complex that causes Crigler-Najjar syndrome type 2. Genomics 1993:18:171-3.

178. D'Angelo R, Rinaldi C, Donato L, Nicocia G, Sidoti A. The combination of new missense mutation with [A(TA) 7TAA] dinucleotide repeat in UGT1A1 gene promoter causes Gilbert's syndrome. Ann Clin Lab 2015; 45(2): 202-205.

179. Radoi VE, Ursu RI, Poenaru E, Arsene C, Bohiltea CL, Bohiltea R. Frequency of the UGT1A1*28 polymorphism in a Romanian Cohort of gilbert syndrome individuals. J Gastrointestin Liver Dis 2017; 26: 25-28.

180. Clarke DJ, Moghrabi N, Monaghan G, Cassidy A, Boxer M, Hume R, Burchell B. Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1) gene that cause familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. Clin Chim Acta 1997; 266:63-74.

181. King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR. UDP-glucuronosyltransferases. Curr Drug Metab 2000; 1(2): 143-161. doi: 10.2174/1389200003339171.

182. Senafi SB, Clarke DJ, Burchell B. Investigation of the substrate specificity of a cloned expressed human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase: UDP-sugar specificity and involvement in steroid and xenobiotic glucuronidation. Biochem J 1994; 303 (1): 233-40. doi: 10.1042/bj3030233.

183. Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. Pharmacogenomics J 2003; 3(3):136-158, 2003.doi: 10.1038/sj.tpj. 6500171.

184. Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. Mol Pharmacol 2011; 59(3): 405-414. doi: 10.1124/mol.59.3.405.

185. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, Nebert DW. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. Pharmacogenetics 1997; 7(4):255-69.doi: 10. 1097/00008571- 199708000-00001.

186. Girard H, Thibaudeau J, Court MH, Fortier LC, Villeneuve L, Caron P, Hao Q, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Guillemette C. UGT1A1 polymorphisms are important determinants of dietary carcinogen detoxification in the liver. Hepatology 2005; 42(2):448-57. doi: 10.1002/hep.20770.

187. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000; 40:581–616.

188. Jin CJ, Miners JO, Lillywhite KJ, Mackenzie PI. cDNA cloning and expression of two new members of the human liver UDP-glucuronosyltransferase 2B subfamily. Biochem Biophys Res Commun 1993; 194: 496–503.

189. Carrier JS, Turgeon D, Journault K, Hum DW, Bélanger A. Isolation and characterization of the human UGT2B7 gene. Biochem Biophys Res Commun 2000; 272(2):616-21. doi: 10.1006/bbrc.2000.2795. PMID: 10833461.

190. Kamal S, Abdelhakam S, Ghoraba D, Massoud Y, Aziz KA, Hassan H, Hafez T, Abdel Sallam A. The frequency, clinical course, and health related quality of life in adults with Gilbert's syndrome: a longitudinal study. BMC Gastroenterol. 2019; 19(1):22. doi: 10.1186/s12876-019-0931-2.

191. Gong QH, Cho JW, Huang T, Potter C, Gholami N, Basu NK, Kubota S, Carvalho S, Pennington MW, Owens IS, Popescu NC .Thirteen UDP glucuronosyltransferase genes are encoded at the human UGT1 gene complex locus. Pharmacogenetics 2001; 11:357-68.

192. Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. Toxicology 2002; 181–182:453–6.

193. Strassburg CP, Kalthoff S, Ehmer U. Variability and function of family 1 uridine-5′-diphosphate glucuronosyltransferases (UGT1A). Crit Rev Clin Lab 2008; 45: 485–530.

194. Ritter JK, Chen F, Sheen YY, Tran HM, Kimura S, Yeatman MT, Owens IS. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. J Biol Chem 1992; 267(5):3257-61. doi: 10.1016/S0021-9258(19)50724-4.

195. Mukherjee S. Gilbert's syndrome. EMedicine 2005 www.emedicine.com/med/topic870.htm

196. Strassburg CP. Pharmacogenetics of Gilbert's syndrome. Pharmacogenomics 2008; 9(6):703-715. doi:10.2217/14622416.9.6.703

197. Matsui K, Maruo Y, Sato H, Takeuchi Y. Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1 as a cause of Gilbert syndrome. BMC Gastroenterol 2010; 10:57. doi: 10.1186/1471-230X-10-57.

198. Bosma P, Goldhorn B, Bakker C, et al. Presence of an additional TA in the TATA box of B-UGT1 correlates with Gilbert syndrome. Hepatology 1994; 20:266A.

199. Hsieh TY, Shiu TY, Huang SM, Lin HH, Lee TC, Chen PJ, Chu HC, Chang WK, Jeng KS, Lai MM, Chao YC. Molecular pathogenesis of Gilbert's syndrome: decreased TATA-binding protein binding affinity of UGT1A1 gene promoter. Pharmacogenet Genomics 2007; 17(4):229-36.doi: 10.1097/FPC.0b013e328012d0da.

200. Monaghan G, Ryan M, Seddon R, Hume R, Burchell B. Genetic variation in bilirubin UPDglucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. Lancet 1996; 347:578–581.

201. Canu G, Minucci A, Zuppi C, Capoluongo E. Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. Blood Cells Mol Dis 2013; 50:273–80.

202. Ki CS, Lee KA, Lee SY, Kim HJ, Cho SS, Park JH, Cho S, Sohn KM, Kim JW. Haplotype structure of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene and its relationship to serum total bilirubin concentration in a male Korean population. Clin Chem 2003; 49(12):2078-81. doi: 10.1373/clinchem.2003.024174.

203. Ando Y, Chida M, Nakayama K, Saka H, Kamataki T. The UGT1A1*28 allele is relatively rare in a Japanese population. Pharmacogenetics 1998; 8(4):357-60. doi: 10.1097/00008571-199808000-00010.

204. Horsfall LJ, Zeitlyn D, Tarekegn A, Bekele E, Thomas MG, Bradman N, Swallow DM. Prevalence of clinically relevant UGT1A alleles and haplotypes in African populations. Ann Hum Genet 2011; 75(2):236-46. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00638.x.

205. Huang CS, Luo GA, Huang ML, Yu SC, Yang SS. Variations of the bilirubin uridine-diphosphoglucuronosyl transferase 1A1 gene in healthy Taiwanese. Pharmacogenetics 2000; 10(6):539-544. doi:10.1097/00008571-200008000-00007

206. Yamamoto K, Sato H, Fujiyama Y, Doida Y, Bamba T. Contribution of two missense mutations (G71R and Y486D) of the bilirubin UDP glycosyltransferase (UGT1A1) gene to phenotypes of Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. Biochim Biophys Acta 1998; 1406:267–73.

207. Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, Kolor K, Dotson WD. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. Genet Med 2009; 11(1):21-34. doi:10.1097/GIM.0b013e31818efd77

208. Gabilan JC. Pharmacologic treatment of neonatal jaundice. A new approach. Arch Pediatr 1998; 5(11):1274-8.

209. Ramakrishnan N, Bittar K, Jialal I. Impaired Bilirubin Conjugation. 2018.

210. Barrington KJ, Sankaran K, Société canadienne de pédiatrie, Comité d'étude du foetus et du nouveau-né. Lignes directrices pour la détection, la prise en charge et la prévention de l'hyperbilirubinémie chez les nouveau-nés à terme et peu prématurés (35 semaines d'âge gestationnel ou plus). Paediatr Child Health 2007; 12(5):13B-24B. doi.org/10.1093/pch/12.suppl_B.13B

211. Cremer RJ, Perryman PW, Richards DH. Influence of light on the hyperbilirubinaemia of infants. Lancet Lond Engl 1958; 1(7030):1094 7.

212. Maisels MJ, McDonagh AF. Phototherapy for neonatal jaundice. N Engl J Med 2008; 358(9):920-8.

213. Conte A, Veyrenche N, Chevallier M, Deray M, Simon N, Bardiaux L, Bouix O. Exsanguino-transfusion chez un nouveau-né suite à une incompatibilité foeto-maternelle ABO. Transfusion Clinique et Biologique 26 (2019) : S34–S90. doi:10.1016/j.tracli.2019.06.101

214. Terrence F. Blaschke, Paul D. Berk, F.Lee Rodkey, Bruce F. Scharschmidt, Harold A. Collison, Jeanne G. Waggoner. Drugs and the liver—I: Effects of glutethimide and phenobarbital on hepatic bilirubin clearance, plasma bilirubin turnover and carbon monoxide production in man. Biochemical Pharmacology 1974; 23(20): 2795-2806. doi: 10.1016/0006-2952(74)90053-7.

215. Costa E, Vieira E, dos Santos R. The polymorphism c.-3279T> G in the phenobarbital-responsive enhancer module of the bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene is associated with Gilbert syndrome. Clin Chem 2005; 51(11):2204–6.

216. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science 1987; 235:1043–1046. doi.org/10.1126/science.3029864

217. Wagner KH, Wallner M, Mölzer C, Gazzin S, Bulmer AC, Tiribelli C, Vitek L. Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases. Clin Sci (Lond) 2015; 129(1):1-25. doi: 10.1042/CS20140566.

218. Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. Proceedings of the National Academy of Sciences 2009; 106(13):5171–5176. doi:10.1073/pnas. 0813132106

219. E. Masson. Stress oxydant et pathologies humaines. EM-Consulte. https://www.em-consulte.com/article/87978/stress-oxydant-et-pathologies-humaines.

220. Li WC, Mo LJ, Shi X, Lin ZY, Li YY, Yang Z, Wu CL, Li XH, Luo YZ, Qin LQ, Mo WN. Antioxidant status of serum bilirubin, uric acid and albumin in pemphigus vulgaris. Clin Exp Dermatol 2018; 43(2):158-163. doi: 10.1111/ced.13289.

221. Gaté L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother 1999; 53(4): 169180. doi: 10.1016/S0753-3322(99)80086-9.

222. Walter MF, Jacob RF, Bjork RE, Jeffers B, Buch J, Mizuno Y, Mason RP; PREVENT Investigators. Circulating lipid hydroperoxides predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: the PREVENT study. J Am Coll Cardiol 2008; 51(12):1196-202. doi: 10.1016/j.jacc.2007.11.051.

223. Caputo F, Vegliante R, Ghibelli L. Redox modulation of the DNA damage response. Biochem Pharmacol 2012; 84(10):1292-1306. doi: 10. 1016/j.bcp. 2012.07.022.

224. Boyer JC, Etienne-Grimaldi MC, Thomas F, Quaranta S, Picard N, Loriot MA, Poncet D, Gagnieu MC, Ged C, Broly F, Le Morvan V, Bouquié R, Gaub MP, Philibert L, Ghiringhelli F, Le Guellec C. Intérêt du génotypage de l'UGT1A1 dans le cadre du traitement des cancers digestifs par irinotécan [Interest of UGT1A1 genotyping within digestive cancers treatment by irinotecan]. Bull Cancer 2014; 101(6):533-53. doi: 10.1684/bdc.2014.1933.

225. Strassburg CP. Gilbert-Meulengracht's syndrome and pharmacogenetics: is jaundice just the tip of the iceberg? Drug Metabolism Reviews 2009 ; 42(1) : 168–181. doi: 10.3109/03602530903209429

226. Pincemail J, Cillard J, Nève J, Defraigne JO. Determination of the plasma global antioxidant capacity: a critical review. Ann Biol Clin 2014; 72(4): 413-421. doi:10.1684/abc.2014.0971.

227. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol 2003; 53 (3): S26-36; discussion S36-38.doi: 10.1002/ana.10483.

228. Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh AM. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. European Journal of Pharmacology 2014; 735:150-168.

229. Poetsch AR. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. Comput Struct Biotechnol J 2020; 18:207-219.doi: 10.1016/j. csbj.2019.12.013.

230. Moussa Z, Judeh ZMA, Ahmed SA. Nonenzymatic Exogenous and Endogenous Antioxidants. IntechOpen 2019. doi: 10.5772/intechopen.87778.

231. Krishnamurthy P, Wadhwani A. Antioxidant Enzymes and Human Health. Intech Open 2012. doi: 10.5772/48109.

232. Kapitulnik J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. Mol Pharmacol 2004; 66(4):773-9. doi: 10.1124/mol.104.002832.

233. Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. Pediatrics 2004;113 (6):1776-1782.doi: 10.1542/peds. 113.6.1776.

234. McDonagh AF. The biliverdin-bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel? Free Radic Biol Med. 2010; 49(5):814-20. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.001.

235. Jansen T, Daiber A. Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? Frontiers in Pharmacology 2012; 3:30. doi: 10.3389/fphar.2012.00030.

236. Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. Antioxid Redox Signal 2004; 6:841- 849.

237. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. Transplantation 2002; 74: 905-912.

238. Maines MD and Panahian N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? Adv Exp Med Biol 2001; 502:249-272.

239. Dalmazi G Di, Hirshberg J, Lyle D, Freij JB, Caturegli P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. Autoimmunity Highlights 2016; 7(1):11. doi: 10.1007/s13317-016-0083-0.

240. Srivastava S, Singh D, Patel S, Singh MR. Role of enzymatic free radical scavengers in management of oxidative stress in autoimmune disorders. International Journal of Biological Macromolecules 2017; 101: 502-517. doi: 10.1016/j.ijbiomac. 2017.03.100.

241. Adin CA, VanGundy ZC, Papenfuss TL, Xu F, Ghanem M, Lakey J, Hadley GA. Physiologic Doses of Bilirubin Contribute to Tolerance of Islet Transplants by Suppressing the Innate Immune Response. Cell Transplant 2017; 26(1):11-21. doi: 10.3727/096368916X692096.

242. Zhu H, Wang J, Jiang H, Ma Y, Pan S, Reddy S, Sun X. Bilirubin protects grafts against nonspecific inflammation-induced injury in syngeneic intraportal islet transplantation. Exp Mol Med 2010 Nov 30;42(11):739-48. doi: 10.3858/emm.2010. 42.11.075.

243. Zhao X, Li L, Li X, Li J, Wang D, Zhang H. The Relationship between Serum Bilirubin and Inflammatory Bowel Disease. Mediators of Inflammation 2019; 1–7. doi:10.1155/2019/5256460

244. Catarzi S, Favilli F, Romagnoli C, Marcucci T, Picariello L, Tonelli F, Vincenzini MT, Iantomasi T. Oxidative state and IL-6 production in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients. Inflamm Bowel Dis 2011; 17(8):1674-84.doi: 10.1002/ibd.21552.

245. De Vries HS, Te Morsche RH, Jenniskens K, Peters WH, de Jong DJ. A functional polymorphism in UGT1A1 related to hyperbilirubinemia is associated with a decreased risk for Crohn's disease. 2012; Journal of Crohn's and Colitis; 6(5): 597-602. doi:10.1016/j.crohns.2011.11.010

246. Schieffer KM, Bruffy SM, Rauscher R, Koltun WA, Yochum GS, Gallagher CJ. Reduced total serum bilirubin levels are associated with ulcerative colitis. PloS One 2017; 12(6): e0179267. doi: 10.1371/journal.pone.0179267.

247. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature 2007; 448:427–34.

248. Meyer O. Lupus érythémateux systémique. EMC Rhumatol Orthopédie 2005;2(1):1-32. doi: 10.1016/j.emcrho.2004.08.005.

249. Fang X, Zaman MH, Guo X, Ding H, Xie C, Zhang X, Deng GM. Role of Hepatic Deposited Immunoglobulin G in the Pathogenesis of Liver Damage in Systemic Lupus Erythematosus. Front Immunol 2018; 9:1457. doi: 10.3389/fimmu.2018.01457.

250. Vítek L, Muchová L, Jančová E, Pešičková S, Tegzová D, Peterová V, Pavelka K, Tesař V, Schwertner H. Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels. Scand J Rheumatol 2010; 39(6):480-4. doi: 10.3109/03009741003742748.

251. Liu Y, Li P, Lu J, Xiong W, Oger J, Tetzlaff W, Cynader M. Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2008; 181(3):1887-97. doi: 10.4049/jimmunol.181. 3.1887.

252. Ye N, Zhou Z, Gong H, Teng J, Han Y, Yang C, Ye J. Gilbert syndrome with systemic lupus erythematosus presenting with persistent unconjugated hyperbilirubinemia: A case report. Exp Ther Med 2020; 20(5):91. doi: 10.3892/etm.2020.9219.

253. Rocuts F, Zhang X, Yan J, Yue Y, Thomas M, Bach FH, Czismadia E, Wang H. Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells. Cell Transplant 2010; 19(4):443-51. doi: 10.3727/096368909X484680.

254. Morel J, Miossec P, Combe B. Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. EMC Rhumatol Orthopédie 2004; 1(3): 218-230. doi: 10.1016/j.emcrho.2004.03.003.

255. Veselinovic M, Barudzic N, Vuletic M, Zivkovic V, Tomic-Lucic A, Djuric D, Jakovljevic V. Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. Mol Cell Biochem 2014; 391(1-2):225-32. doi: 10.1007/s11010-014-2006-6.

256. Jangi S, Otterbein L, Robson S. The molecular basis for the immunomodulatory activities of unconjugated bilirubin. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2013; 45(12): 2843–2851. doi: 10.1016/j.biocel.2013.09.014

257. Isogai H, Hirayama N. A possible molecular mechanism of immunomodulatory activity of bilirubin. Int J Med Chem. 2013; 2013:467383.

258. Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG, Kettle AJ. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2012; 51(10):1796-803. doi: 10.1093/rheumatology/kes193.

259. Khojah HM, Ahmed S, Abdel-Rahman MS, Hamza AB. Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. Free Radic Biol Med 2016;97:285–291.

260. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci 2008; 4:89–96.

261. Kundur AR, Singh I, Bulmer AC. Bilirubin, platelet activation and heart disease: a missing link to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome. Atherosclerosis 2015; 239(1): 73-84. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.042.

262. Fujii M, Inoguchi T, Sasaki S, Maeda Y, Zheng J, Kobayashi K, Takayanagi R. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. Kidney Int 2010; 78(9):905-19. doi: 10.1038/ki.2010.265.

263. Bulmer AC, Blanchfield JT, Toth I, Fassett RG, Coombes JS. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: a mechanism for cardiovascular protection. Atherosclerosis 2008; 199(2):390-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.11.022.

264. Djousse L, Levy D, Cupples LA, Evans JC, D'Agostino RB, Ellison RC. Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. Am J Cardiol 2001; 87: 1196 – 1200.

265. Novotny L, Vitek, L. Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies. Exp Biol Med 2003; 228:568-71.

266. Madhavan M, Wattigney WA, Srinivasan SR, Berenson GS. Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults. Atherosclerosis 1997; 131(1): 107 – 113. doi: 10.1016/s0021-9150(97)06088-7.

267. Schwertner HA. Association of smoking and low serum bilirubin antioxidant concentrations. Atherosclerosis 1998; 136: 383 – 387.

268. Kunutsor SK, Bakker SJL, Gansevoort RT, Chowdhury R, Dullaart RPF. Circulating total bilirubin and risk of incident cardiovascular disease in the general population. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2015; 35(3):716-724.doi: 10. 1161/ATVBAHA.114.304929.

269. Hunt SC, Kronenberg F, Eckfeldt JH, Hopkins PN, Myers RH, Heiss G. Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: the NHLBI family heart study. Atherosclerosis 2001; 154(3): 747-754. doi: 10.1016/s0021-9150(00)00420-2.

270. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vase Biol 1996; 16:250-255.

271. Breimer LH, Wannamethee G, Ebrahim S, Shaper AG. Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men. Clin Chem 1995; 41:1504.

272. Hinds TD Jr, Adeosun SO, Alamodi AA, Stec DE. Does bilirubin prevent hepatic steatosis through activation of the PPARα nuclear receptor? Med Hypotheses 2016; 95:54-57. doi: 10.1016/j.mehy.2016.08.013.

273. Perry B, Doumas BT, Buffone G, Glick M, Ou CN, Ryder K. Measurement of total bilirubin by use of bilirubin oxidase. Clin Chem 1986; 32(2):329-32.

274. Wallner M, Marculescu R, Doberer D, Wolzt M, Wagner O, Vitek L, Bulmer AC, Wagner KH. Protection from age-related increase in lipid biomarkers and inflammation contributes to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome. Clin Sci 2013; 125(5):257-64. doi: 10.1042/CS20120661.

275. Cüre E, Ciçek Y, Cumhur Cüre M, Yüce S, Kırbaş A, Yılmaz A. The evaluation of relationship between adiponectin levels and epicardial adipose tissue thickness with low cardiac risk in Gilbert`s syndrome: an observational study. Anadolu Kardiyol 2013; 13(8):791-6. doi: 10.5152/akd.2013.266.

276. Vogel ME, Idelman G, Konaniah ES, Zucker SD. Bilirubin Prevents Atherosclerotic Lesion Formation in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice by Inhibiting Endothelial VCAM-1 and ICAM-1 Signaling. J Am Heart Assoc 2017; 6(4) e004820. doi: 10.1161/JAHA.116.004820.

277. Keshavan P, Deem TL, Schwemberger SJ, Babcock GF, Cook-Mills JM, Zucker SD. Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. J Immunol Baltim 2005 Md 1950; 174(6):3709-3718. doi: 10. 4049/jimmunol.174.6.3709.

278. Choi SH, Yun KE, Choi HJ. Relationships between serum total bilirubin levels and metabolic syndrome in Korean adults. Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD 2013; 23(1):31-37. doi: 10.1016/j.numecd.2011.03.001.

279. Vítek L. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. Front Pharmacol 2012; 3:55. doi: 10.3389/fphar.2012.00055.

280. Andersson C, Weeke P, Fosbol EL, Brendorp B, Kober L, Coutinho W, Sharma AM, Van Gaal L, Finer N, James WP, Caterson ID, Rode RA, Torp-Pedersen C; SCOUT Executive Steering Committee; SCOUT investigators. Acute effect of weight loss on levels of total bilirubin in obese, cardiovascular high-risk patients: an analysis from the lead-in period of the Sibutramine Cardiovascular Outcome trial. Metabolism 2009; 58(8):1109-15. doi: 10.1016/j.metabol.2009.04.003.

281. Jenko-Pražnikar Z, Petelin A, Jurdana M, Žiberna L. Serum bilirubin levels are lower in overweight asymptomatic middle-aged adults: an early indicator of metabolic syndrome? Metabolism 2013; 62(7):976-985. doi: 10.1016/j.metabol.2013.01.011.

282. Mayer M. Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease. Clin Chem 2000; 46:1723-1727.

283. Zucker SD, Horn PS, Sherman KE. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. Hepatol Baltim Md 2004; 40(4):827-835. doi: 10.1002/hep.20407.

284. Wen CP, Zhang F, Liang D, Wen C, Gu J, Skinner H, Chow WH, Ye Y, Pu X, Hildebrandt MA, Huang M, Chen CH, Hsiung CA, Tsai MK, Tsao CK, Lippman SM, Wu X. The ability of bilirubin in identifying smokers with higher risk of lung cancer: a large cohort study in conjunction with global metabolomic profiling. Clin Cancer Res 2015; 21(1):193-200. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0748.

285. Van Hoydonck PG, Temme EH, Schouten EG. Serum bilirubin concentration in a Belgian population: the association with smoking status and type of cigarettes. Int. J. Epidemiol 2001; 30(6):1465-1472. doi: 10.1093/ije/30.6.1465.

286. O'Malley SS, Wu R, Mayne ST, Jatlow PI. Smoking cessation is followed by increases in serum bilirubin, an endogenous antioxidant associated with lower risk of lung cancer and cardiovascular disease. Nicotine Tob 2014; 16(8):1145-1149. doi:10.1093/ntr/ntu067.

287. Adin CA. Bilirubin as a Therapeutic Molecule: Challenges and Opportunities. Antioxid Basel Switz 2021; 10(10):1536. doi: 10.3390/antiox10101536.

288. Keshavan P, Schwemberger SJ, Smith DLH, Babcock GF, Zucker SD. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. Int. J. Cancer 2004; 112(3): 433-445. doi: 10.1002/ijc.20418.

289. Yang L, Ge LY, Yu T, Liang Y, Yin Y, Chen H. The prognostic impact of serum bilirubin in stage IV colorectal cancer patients. J Clin Lab Anal 2018 ; 32(2):e22272. doi: 10.1002/jcla.22272.

290. Jirásková A, Novotný J, Novotný L, Vodicka P, Pardini B, Naccarati A, Schwertner HA, Hubácek JA, Puncochárová L, Šmerhovský Z, Vítek L. Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. Int J Cancer 2012; 131(7): 1549-55. doi: 10.1002/ijc.27412.

291. Seyed Khoei N, Anton G, Peters A, Freisling H, Wagner KH. The Association between Serum Bilirubin Levels and Colorectal Cancer Risk : Results from the Prospective Cooperative Health Research in the Region of Augsburg (KORA) Study in Germany.Antioxidants.2020; 9(10):908. doi: 10.3390/antiox9100908..

292. Lundin E, Wirgin I, Lukanova A, Afanasyeva Y, Krogh V, Axelsson T, Hemminki K, Clendenen TV, Arslan AA, Ohlson N, Sieri S, Roy N, Koenig KL, Idahl A, Berrino F, Toniolo P, Hallmans G, Försti A, Muti P, Lenner P, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A. Selected polymorphisms in sex hormone-related genes, circulating sex hormones and risk of endometrial cancer. Cancer Epidemiol 2012; 36(5):445-52.doi: 10.1016/j.canep.2012.04.006.

293. Duguay Y, McGrath M, Lépine J, Gagné JF, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, Plante M, Têtu B, Bélanger A, Guillemette C, De Vivo I. The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk. Cancer Res 2004 ; 64(3): 1202-7. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-3295.

294. Ribrag V, Koscielny S, Casasnovas O, Cazeneuve C, Brice P, Morschhauser F, Gabarre J, Stamatoullas A, Lenoir G, Salles G; Groupe d'Etude des Lymphomes agressifs group, Laboratoire de Génétique et de recherche translationnelle, and Institut Gustave Roussy. Pharmacogenetic study in Hodgkin lymphomas reveals the impact of UGT1A1 polymorphisms on patient prognosis. Blood 2009; 113(14):3307-13. doi: 10.1182/blood-2008-03-148874.

295. Tang W, Fu YP, Figueroa JD, et al. Mapping of the UGT1A locus identifies an uncommon coding variant that affects mRNA expression and protects from bladder cancer. Hum Mol Genet 2012; 21(8):1918-1930. doi:10.1093/hmg/ddr619

296. Yao JJ, Kou J, Peng QH, Dong J, Zhang WJ, Lawrence WR, Zhang F, Zhou GQ, Wang SY, Sun Y. Prognostic value of serum bilirubin in southern Chinese patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. Clin Chim Acta. 2018; 484:314-319. doi: 10.1016/j.cca.2018.05.058.

297. He M, Nitti M, Piras S, Furfaro AL, Traverso N, Pronzato MA, Mann GE. Heme oxygenase-1-derived bilirubin protects endothelial cells against high glucose-induced damage. Free Radic Biol Med 2015; 89:91-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 2015.07.151.

298. Inoguchi T, Sasaki S, Kobayashi K, Takayanagi R, Yamada T. Relationship between Gilbert syndrome and prevalence of vascular complications in patients with diabetes. JAMA 2007; 298(12): 1398-1400. doi: 10.1001/jama.298.12.1398-b.

299. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 1991; 40(4): 405-412. doi: 10.2337/diab.40.4.405.

300. Chen YH, Chau LY, Chen JW, Lin SJ. Serum bilirubin and ferritin levels link heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and susceptibility to coronary artery disease in diabetic patients. Diabetes Care 2008; 31(8):1615-20. doi: 10.2337/dc07-2126.

301. Ndisang JF, Lane N, Jadhav A. The heme oxygenase system abates hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats by potentiating insulin-sensitizing pathways. Endocrinology 2009; 150(5): 2098-2108. doi: 10.1210/en.2008-0239.

302. Liu J, Dong H, Zhang Y, Cao M, Song L, Pan Q, Bulmer A, Adams DB, Dong X, Wang H. Bilirubin Increases Insulin Sensitivity by Regulating Cholesterol Metabolism, Adipokines and PPARγ Levels. Sci Rep 2015; 5:9886. doi: 10.1038/srep09886.

303. Dong H, Huang H, Yun X, Kim DS, Yue Y, Wu H, Sutter A, Chavin KD, Otterbein LE, Adams DB, Kim YB, Wang H. Bilirubin increases insulin sensitivity in leptin-receptor deficient and diet-induced obese mice through suppression of ER stress and chronic inflammation. Endocrinology 2014; 155(3):818-28. doi: 10.1210/en.2013-1667.

304. Li M, Peterson S, Husney D, Inaba M, Guo K, Terada E, Morita T, Patil K, Kappas A, Ikehara S, Abraham NG. Interdiction of the diabetic state in NOD mice by sustained induction of heme oxygenase: possible role of carbon monoxide and bilirubin. Antioxid Redox Signal 2007; 9(7):855-63. doi: 10.1089/ars.2007.1568.

305. Fu YY, Kang KJ, Ahn JM, Kim HR, Na KY, Chae DW, Kim S, Chin HJ. Hyperbilirubinemia reduces the streptozotocin-induced pancreatic damage through attenuating the oxidative stress in the Gunn rat. Tohoku J Exp Med 2010; 222(4):265-73. doi: 10.1620/tjem.222.265.

306. Cheriyath P, Gorrepati VS, Peters I, Nookala V, Murphy ME, Srouji N, Fischman D. High Total Bilirubin as a Protective Factor for Diabetes Mellitus: An Analysis of NHANES Data From 1999 - 2006. J Clin Med Res 2010; 2(5):201-6. doi: 10.4021/jocmr425w.

307. Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, Kawate H, Takayanagi R. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Japanese men and women. Diabetes Res Clin Pract 2010; 88(1):103-10. doi: 10.1016/j.diabres.2009.12.022.

308. Wu Y, Li M, Xu M, Bi Y, Li X, Chen Y, Ning G, Wang W. Low serum total bilirubin concentrations are associated with increased prevalence of metabolic syndrome in Chinese. J Diabetes 2011; 3(3):217-24. doi: 10.1111/j.1753-0407.2011.00138.x.

309. Kwon KM, Kam JH, Kim MY, Kim MY, Chung CH, Kim JK, Linton JA, Eom A, Koh SB, Kang HT. Inverse association between total bilirubin and metabolic syndrome in rural korean women. J Womens Health (Larchmt) 2011; 20(6):963-9. doi: 10.1089/jwh.2010.2453.

310. Lin LY, Kuo HK, Hwang JJ, Lai LP, Chiang FT, Tseng CD, Lin JL. Serum bilirubin is inversely associated with insulin resistance and metabolic syndrome among children and adolescents. Atherosclerosis. 2009;203(2):563-8.doi: 10.1016/j. atherosclerosis. 2008.07.021.

311. Bondia-Pons I, Ryan L, Martinez JA. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. Journal of Physiology and Biochemistry 2012; 68(4), 701–711. doi:10.1007/s13105-012-0154-2

312. D'Archivio M, Annuzzi G, Varì R, Filesi C, Giacco R, Scazzocchio B, Santangelo C, Giovannini C, Rivellese AA, Masella R. Predominant role of obesity/insulin resistance in oxidative stress development. Eur J Clin Invest 2012; 42(1):70-8. doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02558.x.

313. Dennery PA. Evaluating the beneficial and detrimental effects of bile pigments in early and later life. Frontiers in Pharmacology 2012; 3: 115. doi.org/10.3389/fphar.2012.00115.

314. Doré S, Goto S, Sampei K, Blackshaw S, Hester LD, Ingi T, et al. L'hème oxygénase-2 agit pour prévenir la mort neuronale dans les cultures cérébrales et à la suite d'une ischémie cérébrale transitoire. Neuroscience 2000; 99: 587-592.

315. Chang EF, Claus CP, Vreman HJ, Wong RJ, Noble-Haeusslein LJ. Régulation de l'hème dans les lésions cérébrales traumatiques: pertinence pour le cerveau adulte et en développement. J Cereb Blood Flow Metab 2005; 25: 1401–1417.

316. Doré S. Diminution de l'activité de l'enzyme antioxydante de l'hème oxygénase: implications dans l'ischémie et dans la maladie d'Alzheimer. Radic Biol Med 2002; 32:1276-1282.

317. Robards C, Brull SJ. Les implications anesthésiques du syndrome de Crigler-Najjar. Anesth Analg 2007; 104 : 435-436.

318. Echauvet. AVC: aspects cellulaires et moléculaires 2019. https://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/neurosciences/actualisation-des-connaissances/maladies-et-traitements/accidents-vasculaires-cerebraux-et-tumeurs/avc-ischemiques-et-canaux-potassiques

319. Caroline Lepage. Futura : enfin un espoir de prévenir la rechute de l'accident vasculaire cérébral. 2020

320. Wang X, Wu D, Zhong P. Serum bilirubin and ischaemic stroke: a review of literature. Stroke Vasc Neurol. 2020; 5(2):198-204. doi: 10.1136/svn-2019-000289.

321. Kim SY, Kang HT, Choi HR, Park SC. Biliverdin reductase A in the prevention of cellular senescence against oxidative stress. Exp Mol Med 2011; 43(1):15-23.doi: 10.3858/emm.2011.43.1.002.

322. Perlstein TS, Pande RL, Creager MA, Weuve J, Beckman JA. Serum total bilirubin level, prevalent stroke, and stroke outcomes: NHANES 1999-2004. Am J Med 2008; 121(9):781-788.e1. doi: 10.1016/j.amjmed.2008.03.045.

323. Schwertner HA, Vítek L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. Atherosclerosis 2008; 198(1): 1-11.doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.01.001.

324. Luo Y, Li J, Zhang J, Xu Y. Elevated bilirubin after acute ischemic stroke linked to the stroke severity. Int J Dev Neurosci 2013; 31(7):634-8.doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.08.002.

325. Pineda S, Bang OY, Saver JL, Starkman S, Yun SW, Liebeskind DS, Kim D, Ali LK, Shah SH, Ovbiagele B. Association of serum bilirubin with ischemic stroke outcomes. J Stroke Cerebrovasc Dis 2008; 17(3):147-52. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2008.01.009.

326. Kimm H, Yun JE, Jo J, Jee SH. Low serum bilirubin level as an independent predictor of stroke incidence: a prospective study in Korean men and women. Stroke 2009 ; 40(11):3422-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.560649.

327. Oda E, Kawai R. A possible cross-sectional association of serum total bilirubin with coronary heart disease and stroke in a Japanese health screening population. Heart Vessels 2012; 27:29-36. doi: 10.1007/s00380-011-0123-7

328. Lin SP, Lin PY, Jiang HL, Long YM, Chen XH. Is serum total bilirubin useful to differentiate cardioembolic stroke from other stroke subtypes? Neurol Res 2015; 37(8): 727-731. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000038.

329. Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Abdullah SM, Cruz-Martins N, Batiha GE. Case Report: Hyperbilirubinemia in Gilbert Syndrome Attenuates Covid-19-Induced Metabolic Disturbances. Frontiers in Cardiovascular Medicine 2021; 8:642181. doi: 10.3389/fcvm.2021.642181.

330. Luckring EJ, Parker PD, Hani H, Grace MH, Lila MA, Pierce JG, Adin CA. In Vitro Evaluation of a Novel Synthetic Bilirubin Analog as an Antioxidant and Cytoprotective Agent for Pancreatic Islet Transplantation. Cell Transplant 2020 ; 29:963689720906417. doi: 10.1177/0963689720906417.

331. Bakrania B, Du Toit EF, Ashton KJ, Wagner KH, Headrick JP, Bulmer AC. Chronically elevated bilirubin protects from cardiac reperfusion injury in the male Gunn rat. Acta Physiol 2017; 220:461–70. doi: 10.1111/apha.12858.

332. Long B, Brady WJ, Koyfman A, Gottlieb M. Cardiovascular complications in COVID-19. Am J Emerg Med 2020; 38:1504– 7. doi: 10.1016/j.ajem.2020.04.048

333. Karmouty-Quintana H, Thandavarayan RA, Keller SP, Sahay S, Pandit LM, Akkanti B. Emerging Mechanisms of Pulmonary Vasoconstriction in SARS-CoV-2-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) and Potential Therapeutic Targets. International Journal of Molecular Sciences 2020; 21(21), 8081.doi: 10.3390/ijms21218081

334. Novák P, Jackson AO, Zhao GJ, Yin K. Bilirubin in metabolic syndrome and associated inflammatory diseases: New perspectives. Life Sci 2020; 257: 118032. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118032.

335. Tran DT, Jeong YY, Kim JM, Bae HB, Son SK, Kwak SH. The Anti-Inflammatory Role of Bilirubin on “Two-Hit” Sepsis Animal Model. Int.J. Mol. Sci 2020; 21(22): E8650. doi: 10.3390/ijms21228650.

336. Taneera J, El-Huneidi W, Hamad M, Mohammed AK, Elaraby E, Hachim MY. Expression profile of SARS-CoV-2 host receptors in human pancreatic islets revealed upregulation of ACE2 in diabetic donors. Biology 2020; 9:215.doi: 10.3390/biology9080215

337. Hinds TD Jr, Stec DE. Bilirubin, a cardiometabolic signaling molecule. Hypertension 2018; 72:788– 95. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11130

338. Peng YF, Xie LQ, Xiang Y, Xu GD. Serum Bilirubin and Their Association with C-Reactive Protein in Patients with Migraine. J. Clin. Lab. Anal 2016; 30(6): 982-985. doi: 10.1002/jcla.21967.

339. Estrada V, Monge S, Gómez-Garre MD, Sobrino P, Masiá M, Berenguer J, Portilla J, Viladés C, Martínez E, Blanco JR; CoRIS and the HIV Biobank integrated in the Spanish AIDS Research Network. Relationship between plasma bilirubin level and oxidative stress markers in HIV-infected patients on atazanavir- vs. efavirenz-based antiretroviral therapy. HIV Med 2016; 17(9):653-61. doi: 10.1111/hiv.12368.

340. Domej W, Oetll, K, Renner W. Oxidative stress and free radicals in COPD – implications and relevance for treatment. International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2014; 1207. doi:10.2147/copd.s51226

341. Brown KE, Sin DD, Voelker H, Connett JE, Niewoehner DE, Kunisaki KM; COPD Clinical Research Network. Serum bilirubin and the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. Respir Res 2017; 18(1):179. doi: 10.1186/s12931-017-0664-0.

342. Curjuric I, Imboden M, Adam M, Bettschart RW, Gerbase MW, Künzli N, Rochat T, Rohrer L, Rothe TB, Schwartz J, Stolz D, Tschopp JM, von Eckardstein A, Kronenberg F, Probst-Hensch NM. Serum bilirubin is associated with lung function in a Swiss general population sample. Eur Respir J 2014; 43(5):1278-88. doi: 10.1183/09031936.00055813.

343. Peng YF, Xiang Y, Wei YS. The significance of routine biochemical markers in patients with major depressive disorder. Scientific Reports 2016; 6(1):34402. doi: 10.1038/srep34402.

344. Stingl JC, Bartels H, Viviani R, Lehmann ML, Brockmöller J. Relevance of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms for drug dosing: A quantitative systematic review. Pharmacol Ther 2014; 141(1):92-116.doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.002.

345. Carulli N, Ponz de Leon M, Mauro E, Manenti F, Ferrari A. Alteration of drug metabolism in Gilbert's syndrome. Gut 1976; 17(8):581-7. doi: 10.1136/gut.17.8.581.

346. Radu P, Atsmon J. Gilbert's syndrome--clinical and pharmacological implications. Isr Med Assoc J. 2001; 3(8):593-8.

347. Perucca E, Bialer M. The clinical pharmacokinetics of the newer antiepileptic drugs. Focus on topiramate, zonisamide and tiagabine. Clin Pharmacokinet 1996; 31:29-46.

348. Ebner T, Remmel RP, Burchell B. Human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase catalyzes the glucuronidation of ethinylestradiol. Mol Pharmacol 1993; 43(4):649- 654.

349. Kuehl GE, Lampe JW, Potter JD, Bigler J. Glucuronidation of nonsteroidal antiinflammatory drugs: identifying the enzymes responsible in human liver microsomes. Drug Metab. Dispos 2005; 33(7):1027-1035.

350. Le Guellec C, Lacarelle B, Villard PH, Point H, Catalin J, Durand A. Glucuronidation of propofol in microsomal fractions from various tissues and species including humans: effect of different drugs. Anesth Analg 1995; 81(4):855-861. doi: 10.1097/00000539-199510000-00034.

351. Prueksaritanont T, Subramanian R, Fang X, Ma B, Qiu Y, Lin JH, Pearson PG, Baillie TA. Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization. Drug Metab Dispos 2002; 30(5):505-12. doi: 10.1124/dmd.30.5.505.

352. Esteban A, Perez-Mateo M. Heterogeneity of paracetamol metabolism in Gilbert’s syndrome. Eur J Drug Metab Pharmacokinet1999; 24:9-13doi: 10.1007/BF03190005.

353. Doumas BT, Perry B, Jendrzejczak, Davis L. Measurement of direct bilirubin by use of bilirubin oxidase. Clin Chem 1987; 33(8):1349-53.

354. Nakagawa T, Mure T, Yusoff S, Ono E, Harahap IS, Morikawa S, Morioka I, Takeshima Y, Nishio H, Matsuo M. Acetaminophen administration in a patient with Gilbert's syndrome. Pediatr Int 2012; 54(6):934-6. doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03602.x.

355. De Morais SM, Uetrecht JP, Wells PG. Decreased glucuronidation and increased bioactivation of acetaminophen in Gilbert's syndrome. Gastroenterology 1992; 102(2):577-586. doi: 10.1016/0016-5085(92)90106-9.

356. Rauchschwalbe SK, Zühlsdorf MT, Wensing G, Kuhlmann J. Glucuronidation of acetaminophen is independent of UGT1A1 promotor genotype. J Clin Pharmacol Ther 2004; 42(2): 73-77. doi: 10.5414/cpp42073.

357. Saylam Kurtipek G, Sarı N, Tuncez Akyurek F. Significant reduction in bilirubin levels in a patient with Gilbert's Syndrome under isotretinoin treatment for acne vulgaris: A new area of use for isotretinoin? Dermatol Ther 2019; 32(3):e12884.doi: 10.1111/dth.12884.

358. Douglas AP, Savage RL, Rawlins MD. Paracetamol (acetaminophen) kinetics in patients with Gilber's syndrome. Eur J Clin Pharmacol 1978; 13(3):209-212. doi: 10.1007/BF00609984.

359. Macklon AF, Savage RL, Rawlins GD. Gilbert's syndrome and drug metabolism. Clin Pharmacokinet 1979; 4(3): 223-232, juin 197.doi: 10.2165/00003088-197904030-00004.

360. Schmid R, Hammaker L. Glucuronide formation in patients with constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease). N Engl J Med 1959; 260(26):1310-1314. doi: 10.1056/NEJM195906252602603.

361. Court MH, Duan SX, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Patten CJ, Miners JO, Mackenzie PI. Interindividual variability in acetaminophen glucuronidation by human liver microsomes: identification of relevant acetaminophen UDP-glucuronosyltransferase isoforms. J Pharmacol Exp Ther 2001; 299(3):998-1006.

362. Mutlib AE, Goosen TC, Bauman JN, Williams JA, Kulkarni S, Kostrubsky S. Kinetics of acetaminophen glucuronidation by UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential implications in acetaminophen-induced hepatotoxicity. Chem Res Toxicol 2006; 19(5):701-709. doi: 10.1021/tx050317i.

363. Bock KW, Forster A, Gschaidmeier H, Brück M, Münzel P, Schareck W, Fournel-Gigleux S, Burchell B. Paracetamol glucuronidation by recombinant rat and human phenol UDP-glucuronosyltransferases. Biochem Pharmacol 1993; 45(9):1809-14. doi: 10.1016/0006-2952(93)90437-2.

364. McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. Pharm Res 2013; 30(9):2174-2187. doi: 10.1007/s11095-013-1007-6.

365. Ofoegbu A, Ettienne EB. Pharmacogenomics and Morphine. J Clin Pharmacol 2021; 61(9):1149-1155, 2021. doi: 10.1002/jcph.1873.

366. Nishimura TG, Jackson SH, Cpohen SN. Prolongation of morphine anaesthesia in a patient with Gilbert's disease: report of a case. Can Anaesth Soc J 1973; 20(5):709-712. doi: 10.1007/BF03026269.

367. Rasool A, Sabir S, Ashlaq M, Farooq U, Khan MZ, Khan FY. GILBERT'S SYNDROME - A CONCEALED ADVERSITY FOR PHYSICIANS AND SURGEONS. J Ayub Med Coll Abbottabad JAMC 2015; 27(3):707-710.

368. Jena BR, Khandelwal A, Pandia MP, Singh GP. Anesthetic Management of a Patient with Gilbert's Syndrome for Spine Surgery: A Case Report. Journal of Neuroanaesthesiology and Critical Care 2020; 07(2):107-109.doi: 10.1055/s-0039-1679134.

369. Hiremath, Vishwanath. ANAESTHETIC MANAGEMENT OF PATIENT WITH GILBERT'S SYNDROME. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences 2015; 4:9685-9688. doi: 10.14260/jemds/2015/1399.

370. Runciman WB, Mather LE, Ilsley AH, Carapetis RJ, Upton RN. A sheep preparation for studying interactions between blood flow and drug disposition. III: Effects of general and spinal anaesthesia on regional blood flow and oxygen tensions. Br J Anaesth 1984; 56(11): 1247-1258. doi: 10.1093/bja/56.11.1247.

371. Sanjay Deb, Sinha Niraj, Samaddar Devi, Mahanty Pratap. General anesthesia in a patient with Gilbert's syndrome. Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology 2011; 27: 253-5. doi: 10.4103/0970-9185.81836.

372. Dundee JW. Thiopentone as a factor in the production of liver dysfunction. Br J Anaesth 1955; 27: 14-23.

373. Dundee JW, Fee JP, Moore J. Macllory PD, Wilson DB. Changes in serum enzyme levels following ketamine infusions. Anaesthesia 1980; 35: 12-6.

374. Cook DR, Stiller R, Ingram M. In vitro degradation of atracurium. Anesth Analg 1986; 65(5):543. doi: 10.1213/00000539-198605000-00033.

375. De Wolf AM, Freeman JA, Scott VL, Tullock W, Smith DA, Kisor DF, Kerls S, Cook DR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in patients with end-stage liver disease undergoing liver transplantation. Br J Anaesth 1996; 76(5):624-8. doi: 10.1093/bja/76.5.624.

376. Goldfarb G, Debaene B, Ang ET, Roulot D, Jolis P, Lebrec D. Hepatic blood flow in humans during isoflurane-N2O and halothane-N2O anesthesia. Anesth Analg 1990; 71(4): 349-353. doi: 10.1213/00000539-199010000-00005.

377. Rotger M, Taffe P, Bleiber G, Gunthard HF, Furrer H, Vernazza P, Drechsler H, Bernasconi E, Rickenbach M, Telenti A; Swiss HIV Cohort Study. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. J Infect Dis 2005; 192(8):1381-6. doi: 10.1086/466531.

378. Zucker SD, Qin X, Rouster SD, Yu F, Green RM, Keshavan P, Feinberg J, Sherman KE. Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(22):12671-6. doi: 10.1073/pnas.231140698.

379. Zhang D, Chando TJ, Everett DW, Patten CJ, Dehal SS, Humphreys WG. In vitro inhibition of UDP glucuronosyltransferases by atazanavir and other HIV protease inhibitors and the relationship of this property to in vivo bilirubin glucuronidation. Drug Metab Dispos Biol Fate Chem 2005; 33(11): 1729-1739.doi: 10.1124/dmd.105.005447.

380. Lankisch TO, Moebius U, Wehmeier M, Behrens G, Manns MP, Schmidt RE, Strassburg CP. Gilbert's disease and atazanavir: from phenotype to UDP-glucuronosyltransferase haplotype. Hepatology 2006; 44(5):1324-32. doi: 10.1002/hep.21361.

381. Balani SK, Woolf EJ, Hoagland VL, Sturgill MG, Deutsch PJ, Yeh KC, Lin JH. Disposition of indinavir, a potent HIV-1 protease inhibitor, after an oral dose in humans. Drug Metab Dispos 1996; 24(12):1389-94.

382. Kosaka A, Yamamoto C, Morishita Y, Nakane K. Enzymatic determination of bilirubin fractions in serum. Clin Biochem 1987; 20(6):451-8. doi: 10.1016/0009-9120(87)90014-2.

383. Ha VH, Jupp J, Tsang RY. Oncology Drug Dosing in Gilbert Syndrome Associated with UGT1A1: A Summary of the Literature. Pharmacotherapy 2017; 37(8):956-972. doi: 10.1002/phar.1946.

384. Burchell B, Soars M, Monaghan G, Cassidy A , Smith D et Ethell B. Drug-mediated toxicity caused by genetic deficiency of UDP-glucuronosyltransferases. Toxicol Lett 2000; 112-113: 333-340. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00209-x.

385. Chen YJ, Hu F, Li CY, Fang JM, Chu L, Zhang X, Xu Q. The association of UGT1A1*6 and UGT1A1*28 with irinotecan-induced neutropenia in Asians: a meta-analysis. Biomarkers 2014; 19(1):56-62. doi: 10.3109/1354750X.2013.867534.

386. Premawardhena A, Fisher CA, Liu YT, Verma IC, de Silva S, Arambepola M, Clegg JB, Weatherall DJ. The global distribution of length polymorphisms of the promoters of the glucuronosyltransferase 1 gene (UGT1A1): hematologic and evolutionary implications. Blood Cells Mol Dis 2003; 31(1):98-101. doi: 10.1016/s1079-9796(03)00071-8.

387. Kishi S, Cheng C, French D, Pei D, Das S, Cook EH, Hijiya N, Rizzari C, Rosner GL, Frudakis T, Pui CH, Evans WE, Relling MV. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity. Blood 2007; 109(10):4151-7. doi: 10.1182/blood-2006-10-054528.

388. Lee JS, Wang J, Martin M, Germer S, Kenwright A, Benayed R, Spleiss O, Platt A, Pilson R, Hemmings A, Weinblatt ME, Kaplowitz N, Krasnow J. Genetic variation in UGT1A1 typical of Gilbert syndrome is associated with unconjugated hyperbilirubinemia in patients receiving tocilizumab. Pharmacogenet Genomics 2011; 21(7):365-74. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834592fe.

389. Mori S, Terada K, Ueki Y. Tocilizumab-induced hyperbilirubinemia in Japanese patients with rheumatoid arthritis: its association with UDP glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms. Mod Rheumatol 2012; 22(4):515-523. doi:10.1007/s10165-011-0537-1

390. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res 2001; 7(8):2182-94.

391. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Boiocchi M. Pharmacogenetics of irinotecan. Curr Med Chem Anticancer Agents 2003; 3:225–237.

392. Kunimoto T, Nitta K, Tanaka T, Uehara N, Baba H, Takeuchi M, Yokokura T, Sawada S, Miyasaka T, Mutai M. Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothec in a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. Cancer Res 1987; 47(22):5944-7.

393. Houghton PJ, Cheshire PJ, Hallman JC, Houghton JA. Therapeutic Efficacy of the Topoisomerase I Inhibitor 7-Ethyl-10-(4-[1-piperidino]-1-piperidino)-carbonyloxy-camptothecin against Human Tumor Xenografts: Lack of Cross-Resistance in Vivo in Tumors with Acquired Resistance to the Topoisomerase I Inhibitor 9-Dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin. Cancer Research 1993; 53(12): 2823-2829.

394. Vassal G, Terrier-Lacombe MJ, Bissery MC, Vénuat AM, Gyergyay F, Bénard J, Morizet J, Boland I, Ardouin P, Bressac-de-Paillerets B, Gouyette A. Therapeutic activity of CPT-11, a DNA-topoisomerase I inhibitor, against peripheral primitive neuroectodermal tumour and neuroblastoma xenografts. Br J Cancer 1996; 74:537–545.

395. Stintzing S, Modest DP, Rossius L, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. Lancet Oncol 2016; 17(10):1426–1434.

396. Sugiyama T, Okamoto A, Enomoto T, et al. Randomized phase III trial of irinotecan plus cisplatin compared with paclitaxel plus carboplatin as first-line chemotherapy for ovarian clear cell carcinoma: JGOG3017/ GCIG trial. J Clin Oncol 2016; 34(24):2881–2887.

397. Rothenberg ML, Eckardt JR, Kuhn JG, Burris III HA, Nelson J, Hilsenbeck SG, Rodriguez GI, Thurman AM, Smith LS, Eckardt SG et al. 1996. Phase II trial of irinotecan in patients with progressive or rapidly recurrent colorectal cancer. J Clin Oncol 1996; 14:1128–1135.

398. Folprecht G, Kohne CH. The role of new agents in the treatment of colorectal cancer. Oncology 2004; 66:1–17.

399. Chen S, Hua L, Feng C, Mo Q, Wei M, Shen Y, Lin Z, Li G, Xu J, Guo C, Huang H. Correlation between UGT1A1 gene polymorphism and irinotecan chemotherapy in metastatic colorectal cancer: a study from Guangxi Zhuang. BMC Gastroenterol 2020; 20(1):96. doi: 10.1186/s12876-020-01227-w.

400. Innocenti F, Ratain MJ. Irinotecan treatment in cancer patients with UGT1A1 polymorphisms. Oncol Williston Park N 2003; 17(5): 52-55.

401. Takasuna K, Kasai Y, Kitano Y, Mori K, Kakihata K, Hirohashi M, et al. Study on the mechanisms of diarrhea induced by a new anticancer camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. Folia Pharmacol Jpn 1995; 105: 447–60.

402. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11 in the antitumor effect of CPT-11. Cancer Res 1991; 51:4187–4191.

403. Ando Y, Saka H, Asai G, Sugiura S, Shimokata K, Kamataki T. UGT1A1 genotypes and glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan. Ann Oncol 1998; 9(8):845-7. doi: 10.1023/a:1008438109725.

404. Tukey RH, Strassburg CP, Mackenzie PI. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferases and irinotecan toxicity. Mol Pharmacol 2002; 62:446–450.

405. Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M, Corona G, De Mattia E, Biason P, Buonadonna A, Toffoli G. Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. J Clin Oncol 2009; 27(15): 2457-65. doi: 10.1200/JCO.2008.19.0314.

406. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramírez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. J Clin Oncol 2004; 22(8):1382-8.doi: 10.1200/JCO.2004.07.173.

407. Fujita K, Kubota Y, Ishida H, Sasaki Y. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol 2015; 21(43):12234-12248. doi: 10.3748/wjg.v21.i43.12234.

408. Yan W, Wang YW, Yang FF, Wang M, Zhang XQ, Dong J, Chen E, Yang J. Differences in frequencies of UGT1A9, 1A7, and 1A1 genetic polymorphisms in Chinese Tibetan versus Han Chinese populations. Genet Mol Res 2013; 12(4):6454-61. doi: 10.4238/2013.December.10.6.

409. Fukui T, Mitsufuji H, Kubota M, Inaoka H, Hirose M, Iwabuchi K, Masuda N, Kobayashi H. Prevalence of topoisomerase I genetic mutations and UGT1A1 polymorphisms associated with irinotecan in individuals of Asian descent. Oncol Lett 2011; 2(5):923-928. doi: 10.3892/ol.2011.346.

410. Marques SC, Ikediobi ON. The clinical application of UGT1A1 pharmacogenetic testing: gene-environment interactions. Hum Genomics 2010; 4(4):238-249. doi: 10.1186/1479-7364-4-4-238.

411. Chen Z, Su D, Ai L, Jiang X, Wu C, Xu Q, Wang X, Fan Z. UGT1A1 sequence variants associated with risk of adult hyperbilirubinemia: a quantitative analysis. Gene 2014; 552(1):32-8. doi: 10.1016/j.gene.2014.09.009.

412. Liu X, Cheng D, Kuang Q, Liu G, Xu W. Association of UGT1A1*28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians. Pharmacogenomics J 2014; 14(2):120-129. doi: 10.1038/tpj.2013.10.

413. Fernández-Crehuet P, Fernández-Crehuet JL, Allam MF, Fernández-Crehuet Navajas R. Hepatotoxicity of isotretinoin in patients with acne and Gilbert's syndrome: a comparative study. BMJ Open 2014; 4(3):e004441.doi: 10.1136/bmjopen-2013-004441.

414. Marcuello E, Altés A, Menoyo A, Del Rio E, Gómez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer 2004; 91(4): 678-682. doi: 10.1038/sj.bjc.6602042.

415. Rouits E, Boisdron-Celle M, Dumont A, Guérin O, Morel A, Gamelin E. Relevance of different UGT1A1 polymorphisms in irinotecan-induced toxicity: a molecular and clinical study of 75 patients. J Am Assoc Cancer Res 2004; 10(15):5151-5159. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0548.

416. Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P, Rogatko A, Wang H, Blanchard RL. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. Clin Cancer Res 2005; 11(3):1226-36.

417. Inoue K, Sonobe M, Kawamura Y, Etoh T, Takagi M, Matsumura T, Kikuyama M, Kimura M, Minami S, Utsuki H, Yamazaki T, Suzuki T, Tsuji D, Hayashi H, Itoh K. Polymorphisms of the UDP-glucuronosyl transferase 1A genes are associated with adverse events in cancer patients receiving irinotecan-based chemotherapy. Tohoku J Exp Med 2013; 229(2):107-14. doi: 10.1620/tjem.229.107.

418. Tsunedomi R, Hazama S, Fujita Y, Okayama N, Kanekiyo S, Inoue Y, Yoshino S, Yamasaki T, Suehiro Y, Oba K, Mishima H, Sakamoto J, Hamamoto Y, Oka M. A novel system for predicting the toxicity of irinotecan based on statistical pattern recognition with UGT1A genotypes. Int J Oncol 2014; 45(4):1381-90.doi: 10.3892/ijo.2014.2556.

419. Fujita K, Ando Y, Nagashima F, Yamamoto W, Eodo H, Araki K, Kodama K, Miya T, Narabayashi M, Sasaki Y. Genetic linkage of UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms to UGT1A1*6 is associated with reduced activity for SN-38 in Japanese patients with cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2007; 60(4):515-22.doi: 10.1007/s00280-006-0396-1.

420. Matsuoka A, Ando Y. UGT1A1 Genotyping for Proper Use of Irinotecan. Rinsho Byori 2015; 63(7):876-882.

421. Onoue M, Terada T, Kobayashi M, Katsura T, Matsumoto S, Yanagihara K, Nishimura T, Kanai M, Teramukai S, Shimizu A, Fukushima M, Inui K. UGT1A1*6 polymorphism is most predictive of severe neutropenia induced by irinotecan in Japanese cancer patients. Int J Clin Oncol 2009; 14(2):136-42.doi: 10.1007/s10147-008-0821-z.

422. Lankisch TO, Vogel A, Eilermann S, Fiebeler A, Krone B, Barut A, Manns MP, Strassburg CP. Identification and characterization of a functional TATA box polymorphism of the UDP glucuronosyltransferase 1A7 gene. Mol Pharmacol 2005; 67(5):1732-9. doi: 10.1124/mol.104.007146.

423. Lankisch TO, Schulz C, Zwingers T, Erichsen TJ, Manns MP, Heinemann V, Strassburg CP. Gilbert's Syndrome and irinotecan toxicity: combination with UDP-glucuronosyltransferase 1A7 variants increases risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17(3):695-701. doi: 10.1158/1055-9965.

424. Tallman MN, Miles KK, Kessler FK, Nielsen JN, Tian X, Ritter JK, Smith PC. The contribution of intestinal UDP-glucuronosyltransferases in modulating 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38)-induced gastrointestinal toxicity in rats. J Pharmacol Exp Ther 2007; 320(1):29-37. doi: 10.1124/jpet.106.110924.

425. Ciotti M, Basu N, Brangi M, Owens IS. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the UGT1 locus. Biochem Biophys Res Commun 1999; 260(1):199-202. doi: 10.1006/bbrc.1999.0453.

426. Strassburg CP, Vogel A, Kneip S, Tukey RH, Manns MP. Polymorphisms of the human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A7 gene in colorectal cancer. Gut 2002; 50(6):851-6. doi: 10.1136/gut.50.6.851.

427. Guillemette C, Ritter JK, Auyeung DJ, Kessler FK, Housman DE. Structural heterogeneity at the UDP-glucuronosyltransferase 1 locus: functional consequences of three novel missense mutations in the human UGT1A7 gene. Pharmacogenetics 2000; 10(7):629-644. doi: 10.1097/00008571-200010000-00006.

428. ADAM DE BEAUMAIS T, JACQZ AIGRAIN E. Syndrome de Gilbert : aspects génétiques et pharmacogénétiques. Correspondances en Onco-Hématologie 2014 ; 6.

429. Penhaker M, Kasik V, Hrvolova B. Advanced bilirubin measurement by a photometric method. Elektronika Ir elektrotechnika 2013; 19(3):47–50.

430. Kundur AR, Santhakumar AB, Bulmer AC, Indu Singh. Mildly elevated unconjugated bilirubin is associated with reduced platelet activation-related thrombogenesis and inflammation in Gilbert’s syndrome. Platelets 2017 ; 28(8), 779–785. doi:10.1080/09537104.2017.1280146

431. Boon AC, Hawkins CL, Bisht K, Coombes JS, Bakrania B, Wagner KH, Bulmer AC. Reduced circulating oxidized LDL is associated with hypocholesterolemia and enhanced thiol status in Gilbert syndrome. Free Radical Biology and Medicine 2012 ; 52(10) : 2120–2127. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.002

432. Gitlin N. The clinical presentation of Gilbert's disease in 26 patients. S Afr Med J 1977; 52(1):19-20. PMID: 888039.

433. Wu TW, Dappen GM, Powers DM, Lo DH, Rand RN, Spayd RW. The Kodak Ektachem clinical chemistry slide for measurement of bilirubin in newborns: principles and performance. Clin Chem. 1982; 28(12):2366-72.

434. Yamanouchi I, Yamauchi Y, Igarashi I. Transcutaneous bilirubinometry: preliminary studies of noninvasive transcutaneous bilirubin meter in the Okayama National Hospital. Pediatrics 1980; 65:195–202.

435. I Mercantia, F Michela, L Thomachota, D-A Loundoub, C Nicaisea, R Vialeta, J-N Di Marcoa, P Lagiera, C Martina. Estimation de la bilirubinémie par méthode transcutanée chez le nouveau-né prématuré. Archives de pédiatrie 2007; 14 : 875–880. doi:10.1016/j.arcped.2007.02.091

436. Foulk WT, Butt HR, Owen CA, Whitoomb FF, Mason HL. Constitutional hepatic dysfunction (Gilbert's disease) : its natural history and related symptoms. Medicine

1959; 38: 25-46.

437. Aliarab A, Yaghmaei B, Ghaderian SMH, Khoshnia M, Roshandel G, Babaei G, Joshaghani HR. Effect of gilbert's syndrome associated polymorphic alleles (rs8175347 and rs4148323) of UDP-glucuronyl transferase on serum bilirubin level. Meta Gene 2020; 26 : 100788. doi:10.1016/j.mgene.2020.100788

438. Robert J. Polymorphismes génétiques. Bull Cancer 2010 ; 97(11) :1253-64.

439. Sukasem C, Atasilp C, Chansriwong P, Chamnanphon M, Puangpetch A, Sirachainan E. Development of Pyrosequencing Method for Detection of UGT1A1 Polymorphisms in Thai Colorectal Cancers. J Clin Lab Anal 2016; 30(1):84-9. doi: 10.1002/jcla.21820.

440. Marsh, S. Pyrosequencing® applications. Methods in Molecular Biology : Pyrosequencing® protocols 2007 ; 373 :15-23.

441. Pirulli D, Giordano M, Puzzer D, Crovella S, Rigato I, Tiribelli C, Momigliano-Richiardi P, Amoroso A. Rapid method for detection of extra (TA) in the promoter of the bilirubin-UDP-glucuronosyl transferase 1 gene associated with Gilbert syndrome. Clin Chem 2000; 46(1):129-31.

442. Organisation Mondiale de la Santé - International Classification of adult underweight, overweight and obesity according to BMI - Dernière visite le 5 Mai 2014 maladies cardiovasculaires en pratique clinique (version 2012) pour le site de la cardiologie francophone par Francois Boustani.

443. Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (Constituted by representatives of nine societies and by invited experts). European Heart Journal 2007; 28(19):2375-2414. doi: 10. 1093/eurheartj/ehm316.

444. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Circulation 2002 ;17 :106(25):3143-421.

445. Žaja O, Tiljak MK, Štefanović M, Tumbri J, Jurčić Z. Correlation of UGT1A1 TATA-box polymorphism and jaundice in breastfed newborns-early presentation of Gilbert's syndrome. J Matern Fetal Neonatal Med 2014; 27(8):844-50. doi: 10.3109/14767058. 2013.837879.

446. Manuel du kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Version 2. Juin 2012. file:///C:/Users/pclenovo/Downloads/FR-QIAamp-DSP-DNA-Blood-Mini-Kit. Handbook-2.pdf

447. Raoudha A, Amel S, Hassen G, Azeiz, OB (2012). Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (Polymorphism Chain Reaction) pour l'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez Stipa lagascae. Acta Botanica Gallica 2012 ; 159(1) : 73–78. https://doi.org/10.1080/12538078. 2012. 671646

448. García-Alegría AM, Anduro-Corona I, Pérez-Martínez CJ, Guadalupe Corella-Madueño MA, Rascón-Durán ML, Astiazaran-Garcia H. Quantification of DNA through the NanoDrop Spectrophotometer: Methodological Validation Using Standard Reference Material and Sprague Dawley Rat and Human DNA. Int J Anal Chem 2020, 29; 2020:8896738. doi: 10.1155/2020/8896738.

449. He HJ, Stein EV, DeRose P, Cole KD. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. Biotechniques 2018; 64(2):59-68. doi: 10.2144/btn-2017-0102.

450. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. Methods Mol Biol. 2003; 226:3-6. doi: 10.1385/1-59259-384-4:3.

451. McDonald C, Taylor D, Linacre A. PCR in Forensic Science: A Critical Review. Genes 2024; 15(4):438. https://doi.org/10.3390/genes15040438.

452. Shimizu T, Fujita T, Fujii H. Oligoribonucleotide interference-PCR: principles and applications, Biology Methods and Protocols 2022 ;7(1). https://doi.org/10.1093/biomethods/bpac010

453. Tarach P. Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) in the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Acta Universitatis Lodziensis. Folia Biologica et Oecologica 2021; 17:48–53. doi: 10.18778/1730-2366.16.14

454. Green MR, Sambrook J. Restriction Enzymes. Cold Spring Harb Protoc 2021; 2021(4). doi: 10.1101/pdb.top101360.

455. Tsuchida S, Hirayama T, Nunose H, Suzuki H, Hakota R, Shindo T, Nakagawa K. UGT1A1*28 detection using high-resolution agarose gel electrophoresis. Heliyon 2024; 10(9):e30465. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e30465.

456. Olsson R, Bliding A, Jagenburg R, Lapidus L, Larsson B, Svärdsudd K, Wittboldt S. Gilbert's syndrome--does it exist? A study of the prevalence of symptoms in Gilbert's syndrome. Acta Med Scand. 1988; 224(5):485-90.

457. GERMANAUD J, CAUSSE X. Présence de symptômes lors des phases ictériques d'une maladie de Gilbert. Ann Gastro entérol Heptane 1995 ;31(3): 165-166.

458. BOUGOUMA A, et al. LA MALADIE DE GILBERT CHEZ LE NOIR AFRICAIN- A propos de 4 observations au Centre Hospitalier National de Ouagadougou. Médecine d'Afrique Noire 1998; 45 (11) : 614-617.

459. Méndez-Sánchez N, González V, Flores A, Martínez M, Graef A, Uribe M. Delayed gastric emptying in subjects with Gilbert's syndrome. Hepatogastroenterology 2001; 48(40):1183-5.

460. Okolicsanyi L, Orlando R, Venuti M, Dal Brun G, Cobelli C, Ruggeri A, Salvan A. A modeling study of the effect of fasting on bilirubin kinetics in Gilbert's syndrome. Am J Physiol 1981; 240(5): R266-71. doi: 10.1152/ajpregu.1981.240.5.R266.

461. Tapan S, Karadurmus N, Dogru T, Ercin CN, Tasci I, Bilgi C, Kurt I, Erbil MK. Decreased small dense LDL levels in Gilbert's syndrome. Clinical Biochemistry 2011; 44(4):300-3. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.12.003.

462. Tapan S, Dogru T, Tasci I, Ercin CN, Ozgurtas T, Erbil MK. Soluble CD40 ligand and soluble P-selectin levels in Gilbert's syndrome: a link to protection against atherosclerosis? Clin Biochem 2009; 42(9):791-5. doi:10.1016/j. clinbiochem. 2009.02.005.

463. Hwang HJ, Lee SW, Kim SH. Relationship between bilirubin and C-reactive protein. Clin Chem Lab Med 2011; 49(11):1823-8. doi: 10.1515/CCLM.2011.662.

464. Horsfall LJ, Rait G, Walters K, Swallow DM, Pereira SP, Nazareth I, Petersen I. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death. JAMA 2011; 305(7):691-7. doi: 10.1001/jama.2011.124.

465. Tanaka M, Budhathoki S, Hirata A, Morita M, Kono S, Adachi M, Kawate H, Ohnaka K, Takayanagi R. Behavioral and clinical correlates of serum bilirubin concentrations in Japanese men and women. BMC Endocr Disord 2013; 13:39. doi: 10.1186/1472-6823-13-39.

466. O'Malley SS, Gueorguieva R, Wu R, Jatlow PI. Acute alcohol consumption elevates serum bilirubin: an endogenous antioxidant. Drug Alcohol Depend 2015;149:87-92. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.01.023.

467. Chan-Yeung M, Ferreira P, Frohlich J, Schulzer M, Tan F. The effects of age, smoking, and alcohol on routine laboratory tests. Am J Clin Pathol 1981; 75(3):320-6. doi: 10.1093/ajcp/75.3.320.

468. van der Bol JM, Mathijssen RH, Loos WJ, Friberg LE, van Schaik RH, de Jonge MJ, Planting AS, Verweij J, Sparreboom A, de Jong FA. Cigarette smoking and irinotecan treatment: pharmacokinetic interaction and effects on neutropenia. J Clin Oncol 2007; 25(19):2719-26. doi: 10.1200/JCO.2006.09.6115.

469. Cure MC, Cure E, Kirbas A, Cicek AC, Yuce S. The effects of Gilbert's syndrome on the mean platelet volume and other hematological parameters. Blood Coagul Fibrinolysis 2013; 24(5):484-8. doi: 10.1097/MBC.0b013e32835e4230.

470. Sun L, Li M, Zhang L, Teng X, Chen X, Zhou X, Ma Z, Qi L, Wang P. Differences in UGT1A1 gene mutations and pathological liver changes between Chinese patients with Gilbert syndrome and Crigler-Najjar syndrome type II. Medicine (Baltimore) 2017; 96(45):e8620. doi: 10.1097/MD.0000000000008620.

471. Schwertner HA, Jackson WG, Tolan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. Clin Chem 1994; 40:18–23.

472. Očadlík I, Hlinštáková S, Oravec S. Relationship between unconjugated hyperbilirubinemia and lipoprotein spectrum. Neuro Endocrinol Lett 2011; 32(3):360-4.

473. Vítek L, Kráslová I, Muchová L, Novotný L, Yamaguchi T. Urinary excretion of oxidative metabolites of bilirubin in subjects with Gilbert syndrome. J Gastroenterol Hepatol 2007; 22(6):841-5. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04564.x.

474. Zelenka J, Muchova L, Zelenkova M, Vanova K, Vreman HJ, Wong RJ, Vitek L. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. Biochimie 2012; 94(8):1821-7. doi: 10.1016/j.biochi.2012.04.026.

475. Vítek L, Jirsa M, Brodanová M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, Novotný L, Kotal P. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. Atherosclerosis 2002; 160(2):449-56. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00601-3.

476. Hwang HJ, Lee SW, Kim SH. Relationship between bilirubin and C-reactive protein. Clin Chem Lab Med 2011; 49(11):1823-8. doi: 10.1515/CCLM.2011.662.

477. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. Nature 2006; 444(7121):875-80. doi: 10.1038/nature05487.

478. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. JAMA 2001; 286(3):327-34. doi: 10.1001/jama.286.3.327.

479. Wallner M, Bulmer AC, Mölzer C, Müllner E, Marculescu R, Doberer D, Wolzt M, Wagner OF, Wagner KH. Haem catabolism: a novel modulator of inflammation in Gilbert's syndrome. Eur J Clin Invest 2013; 43(9):912-9. doi: 10.1111/eci.12120.

480. Preisig D, Bircher J, Preisig R. Positive diagnosis of Gilbert syndrome. Retrospective analysis of 59 cases with special reference to the nicotinic acid test. Schweiz Med Wochenschr 1982; 112(33):1122-9.

481. Owens D, Evans J. Population studies on Gilbert's syndrome. J Med Genet 1975; 12(2):152-6. doi: 10.1136/jmg.12.2.152.

482. Vítek L, Jirsa M, Brodanová M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, Novotný L, Kotal P (2002) Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. Atherosclerosis 160:449–456

483. Yoo TW, Sung KC, Shin HS, Kim BJ, Kim BS, Kang JH, Lee MH, Park JR, Kim H, Rhee EJ, Lee WY, Kim SW, Ryu SH, Keum DG. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. Circ J 2005; 69(8):928-33. doi: 10.1253/circj.69.928.

484. Strazzullo P, Puig JG. Uric acid and oxidative stress: relative impact on cardiovascular risk? Nutr Metab Cardiovasc Dis 2007; 17(6):409-14.doi: 10.1016/j.numecd.2007.02.011.

485. Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. Clin Chim Acta 2008; 392(1-2):1-7. doi: 10.1016/j.cca.2008.02.024.

486. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, Lear SA, Ndumele CE, Neeland IJ, Sanders P, et al. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation 2021 ;143 (21) : e984–e1010. doi: 10.1161/CIR.0000000000000973.

487. Narayan KM, Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Williamson DF. Effect of BMI on lifetime risk for diabetes in the U.S. Diabetes Care 2007; 30(6):1562-6.doi: 10.2337/dc06-2544.

488. Alley DE, Ferrucci L, Barbagallo M, Studenski SA, Harris TB. A research agenda: the changing relationship between body weight and health in aging. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2008; 63(11):1257-9. doi: 10.1093/gerona/63.11.1257.

489. Colpani V, Baena CP, Jaspers L, van Dijk GM, Farajzadegan Z, Dhana K, Tielemans MJ, Voortman T, Freak-Poli R, Veloso GGV, Chowdhury R, Kavousi M, Muka T, Franco OH. Lifestyle factors, cardiovascular disease and all-cause mortality in middle-aged and elderly women: a systematic review and meta-analysis. Eur J Epidemiol 2018 ; 33(9) :831-845. doi: 10.1007/s10654-018-0374-z.

490. Mazzone GL, Rigato I, Ostrow JD, Bossi F, Bortoluzzi A, Sukowati CH, Tedesco F, Tiribelli C. Bilirubin inhibits the TNFalpha-related induction of three endothelial adhesion molecules. Biochem Biophys Res Commun 2009 ; 386(2):338-44.doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.029.

491. Öllinger R, Yamashita K, Bilban M, Erat A, Kogler P, Thomas M, … Bach FH. Bilirubin and Biliverdin Treatment of Atherosclerotic Diseases. Cell Cycle 2007 ; 6(1) : 39-43. https://doi.org/10.4161/cc.6.1.3700

492. Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, Csizmadia E, Graça-Souza AV, Liloia A, Soares MP, Otterbein LE, Usheva A, Yamashita K, Bach FH. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. Circulation 2005 ; 112(7):1030-9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.528802.

493. Ko GT, Chan JC, Woo J, Lau E, Yeung VT, Chow CC, Li JK, So WY, Cockram CS. Serum bilirubin and cardiovascular risk factors in a Chinese population. J Cardiovasc Risk. 1996; 3(5):459-63. doi: 10.1177/174182679600300508.

494. Kalousová M, Novotny L, Zima T, Braun M, Vítek L. Decreased levels of advanced glycation end-products in patients with Gilbert syndrome. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2005; 51(4):387-92.

495. Lerner-Marmarosh N, Shen J, Torno MD, Kravets A, Hu Z, Maines MD. Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 ; 102(20):7109-14. doi: 10.1073/pnas.0502173102.

496. Fevery J. Pathogenesis of Gilbert's syndrome. Eur J Clin Invest 1981; 11(6):417-8. doi: 10.1111/j.1365-2362.1981.tb02006.x.

497. Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO. Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme : importance en matière de prévention. Medi Sphere 1999 ; 95.

498. Copur B, Yilmaz N, Topcuoglu C, Kiziltunc E, Cetin M, Turhan T, Demir BF, Altiparmak E, Ates I. Relationship between elevated bilirubin level and subclinical atherosclerosis as well as oxidative stress in Gilbert syndrome. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2020; 13(2):133-140.

499. Kalotychou V, Karakosta M, Tzanetea R, Stamoulakatou A, Konstantopoulos K, Rombos Y. Contribution of G71R mutation to Gilbert's syndrome phenotype in a Greek patient: A case report. World J Gastrointest Pharmacol Ther 2011; 2(5):42-5. doi: 10.4292/wjgpt.v2.i5.42.

500. Muraca M, Fevery J. Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. Gastroenterology 1984; 87(2):308-13.

501. Tioseco JA, Aly H, Milner J, Patel K, El-Mohandes AA. Does gender affect neonatal hyperbilirubinemia in low-birth-weight infants? Pediatr Crit Care Med 2005; 6(2):171-4. doi: 10.1097/01.PCC.0000154961.37833.79.

502. Heydari MR, Fardaei M, Kadivar MR, et al. Prevalence of 2 UGT1A1 Gene Variations Related to Gilbert's Syndrome in South of Iran: An Epidemiological, Clinical, and Genetic Study. Iran Red Crescent Med J 2017; 19(4):e44363.doi: 10.5812/ircmj.44363.

503. Agrawal SK, Kumar P, Rathi R, Sharma N, DAS R, Prasad R, Narang A. UGT1A1 gene polymorphisms in North Indian neonates presenting with unconjugated hyperbilirubinemia. Pediatr Res 2009; 65(6):675-80.doi: 10.1203/PDR. 0b013e31819. ed5de.

504. Laforgia N, Faienza MF, Rinaldi A, D'Amato G, Rinaldi G, Iolascon A. Neonatal hyperbilirubinemia and Gilbert's syndrome. J Perinat Med 2002; 30(2):166-9.doi: 10.1515/JPM.2002.021.

505. Babaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2006; 98(4):377-80. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_341.x.

506. Babaoglu MO, Yigit S, Aynacioglu AS, Kerb R, Yurdakok M, Bozkurt A. Neonatal jaundice and bilirubin UDP-glucuronosyl transferase 1A1 gene polymorphism in Turkish patients. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2006; 98(4):377-80. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_341.x.

ANNEXE I

Consentement Groupe 1

Consentement de prélèvement dans un but d'étude génétique et / ou de conservation dans une banque d'ADN chez une personne MAJEURE

Titre de l'étude

Hyperbilirubinémie libre non hémolytique : étude biochimique et moléculaire et implication clinique

Je, soussigné(e), (Nom et prénom)……

né(e)le……demeurant à……....

consens par la présente à participer à une étude scientifique concernant la recherche des polymorphismes et des mutations génétiques en cause dans le syndrome de Gilbert.

Le but, la nature ainsi que les bénéfices de cette étude m'ont été expliqués et je permets à cet effet le prélèvement sanguin sur moi-même. Ma participation est totalement volontaire. Je peux refuser de participer ou me retirer de l'étude à tout moment.

Les données médicales me concernant resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation, y compris la consultation de mon dossier médical, que par les personnes habilitées dans le cadre de cette recherche.

Fait à …….Le……...

Signature de l'intéressé(e)

ANNEXE II

Consentement Groupe 2

Consentement de prélèvement dans un but d'étude génétique et / ou de conservation dans une banque d'ADN chez une personne MINEURE

Titre de l'étude

Hyperbilirubinémie libre non hémolytique : étude biochimique et moléculaire et implication clinique

Je, soussigné(e), (Nom et prénom du tuteur légal de l'enfant) :……
né(e)le……demeurant à…….....
consens par la présente à participer à une étude scientifique concernant la recherche des polymorphismes génétiques et des mutations en cause dans le syndrome de Gilbert.

Le but, la nature ainsi que les bénéfices de cette étude m'ont été expliqués et je permets à cet effet le prélèvement sanguin sur mon enfant. Ma participation est totalement volontaire. Je peux refuser de participer ou me retirer de l'étude à tout moment.

Les données médicales me concernant resteront strictement confidentielles. Je n'autorise leur consultation, y compris la consultation de mon dossier médical, que par les personnes habilitées dans le cadre de cette recherche.

Fait à ……Le……...

Signature de l'intéressé(e)

ANNEXE III

Fiche de renseignements Groupe 1

- Nom et Prénom : .....
- Age : ……..……
- Sexe : Masculin Féminin :
- Origine géographique : …….....
-Poids : …… -Taille : ……. -IMC :…….
- N° Tel :……
- Centre de recrutement :……. -Service :……..

-Motif de la demande d'analyse :……

-Symptomatologie clinique :……

-Exploration radiologique : Oui Non
Résultat :……

-Antécédents médicaux : Oui Non

-Maladie(s) associée(s) : Diabète : Oui Non Type :
HTA : Oui Non
Syndrome métabolique : Oui Non
Maladie hématologique :
Maladie auto immune :
Autre :

-Traitement éventuel ou durant le mois précédant le prélèvement :

Oui Non Type de traitement :……

-Consommation de tabac : Oui Non

-Consommation d'alcool : Oui Non

-Antécédents familiaux d'hyperbilirubinémie : Oui Non

Grand-père Grand-mère Père Mère Fraterie (frère, sœur)
Autre :

-Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie ou d'ictère : Oui Non

-Age d'apparition / de découverte :.....

-Facteur déclenchant l'hyperbilirubinémie ou l'ictère :

Jeune Déshydratation
Surmenage Effort intense/ Travail forcé
Stress Choc
Menstruation Autre :……

ANNEXE IV

Fiche de renseignements Groupe 2

- Nom et Prénom : .....
- Age : ……..……
- Sexe : Masculin Féminin :
- Origine géographique : …….....
- Poids : …… -Taille : …….
- Groupe sanguin :……
- N° Tel parents :……
- Centre de recrutement :……. -Service :……..

-Motif de la demande d'analyse :……

-Symptomatologie clinique :……

- **Parents :**
  - Groupe sanguin père :
  - Groupe sanguin mère :
  - Consanguinité : Oui Non
  - Antécédents d'hyperbilirubinémie :

Père	Oui	Non
Mère	Oui	Non

-Antécédents d'hyperbilirubinémie / ictère néonatal dans la fraterie : Oui Non

- **Type d'allaitement reçu chez les nouveau-nés :**

Maternel exclusif Artificiel Mixte

-Antécédents personnels d'hyperbilirubinémie ou d'ictère : Oui Non

-Age d'apparition / de découverte :.....

ANNEXE V

Liste des consommables utilisés

1. Tubes Corning 20 ml ;
2. Tubes eppendorfs de 1,5 ml ;
3. Micropipettes réglables et fixes à différents volumes (10, 20, 50, 100, 200, 500,1000, 5000 µL) et leurs portoirs ;
4. Embouts pour pipettes de 1 ml et pour micropipettes ;
5. Portoirs de différentes tailles pour les différents tubes ;
6. Pipettes pasteur ;
7. Gants ;
8. Parafilm.

ANNEXE VI

Liste des réactifs

H_2O distillée ;

NaCl 5 M ;

EDTA 0,5 M, pH 8 ;

NaOH 10 N

SDS 10% ;

Tris-EDTA (TE) 10/10 (tampon de lyse) ;

Tris-EDTA (TE) 10/1 (tampon de dissolution) ;

Tris-HCl 1 M, pH 8 ;

Protéinase K 20 mg/ml ;

Ethanol absolu à 95% ;

Ethanol à 70% ;

Amorces ;

dNTp ;

Taq polymérase ;

Tampon pour la Taq polymérase 5x;

Chlorure de Magnésium 25 mM ;

H_2O distillée désionisée Nucléase free Water ;

Agarose Ultra pure qualité BioMol ;

Tampon TBE 10X ;

Tampon TBE 1X ;

Tampon TAE 1X ;

Tris ;

Acide borique ;

Bromure d'éthidium ;

Marqueur de taille 50pb ;

Tampon de charge Loading Dye 6X ;

Enzymes de restriction AVAII ;

Tampon pour enzyme de restriction Buffer G 10X.

ANNEXE VII

Préparation des réactifs

EDTA à 0,5 M- pH 8

EDTA 96,06 g

Faire dissoudre dans 400 ml d'H_2O

Ajuster le pH à 8 avec du NaOH 10N

H_2O qsp 500 ml

NaCl à 5 M

PM= 58.44 g/mol

NaCl 146.125 g

H_2O qsp 500 ml

Tampon TRIS-HCl 1M à pH 8

TRIS 60,57 g

Faire dissoudre dans 400 ml d'H_2O

Ajuster le pH à 8 avec Acide Chlorhydrique Pur

H_2O qsp 500 ml

Tampon de lyse TE 10/10

Tris-HCl 1 M pH 8 10 ml

EDTA 0,5 M pH 8 20 ml

H_2O qsp 1000 ml

Tampon de dissolution TE 10/1

Tris-HCl 1 M pH 8 10 ml

EDTA 0,5 M pH 8 2 ml

H_2O qsp 1000 ml

Réactif SLB (Solution de lyse des globules blancs)

Tris-HCl 1 M pH 8 2 ml

EDTA 0,5 M pH 8 40 ml

SDS 10% 10 ml

H_2O qsp 200 ml

- Mettre la solution sous agitation magnétique
- Transférer dans un flacon étiqueter, dater
- Conserver à température ambiante

Ethanol 70 %

Ethanol absolu	700 ml
H_2O qsp	1000 ml

Tampon TBE 10X

Tris	100 g
Acide borique	55 g
EDTA	9,3 g
Faire dissoudre dans	800 ml d'H2O
H_2O qsp	1000 ml

Tampon TBE 1X

Tampon TBE 10X	100 ml
H_2O qsp	1000 ml

Tampon TAE 1X

Tampon TAE 10X	100 ml
H_2O qsp	1000 ml

ANNEXE VIII

Préparation du gel d'agarose à 8%

Les quantités et volumes des produits nécessaires à la préparation du gel :

- 8g d'agarose;

- 100 ml de tampon TBE 1x;

- 8 µL de BET.

Le protocole est comme suit :

1- Peser de 8g d'agarose ;

2- Mélanger le tampon TBE et l'agarose dans un erlenmeyer ;

3- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections.

4- Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange ;

5- Laisser la préparation revenir à 60 °C environ ;

6- Déposer 8 µL de BET dans le flacon et mélanger ;

7- Placer les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support.

8- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne. Eviter les bulles d'air sinon les chasser à l'aide d'un embout après avoir coulé le gel.

8- Laisser reposer le gel 15 à 20 minutes pour qu'il se solidifie

9- Retirer délicatement le peigne et les joints. Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie préalablement de tampon TBE 1 x.

ANNEXE IX

Substrats et enzymes

a.- Principe du dosage du glucose :

Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'action de l'ATP et de l'hexokinase (HK). Ensuite, une seconde enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) catalyse l'oxydation du glucose-6-phosphate par le NADP+ pour former du NADPH.

D-glucose + ATP $\xrightarrow{HK}$ D-glucose-6-phosphate + ADP

D-glucose-6-phosphate + NADP+ $\xrightarrow{G6PDH}$ D-6-phosphogluconate + NADPH + H+

La concentration de NADPH formé est directement proportionnelle à la concentration de glucose.
Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

b.- Principe du dosage de l'acide urique :

L'acide urique est catalysé par l'uricase pour former de l'allantoïne et de l'eau oxygénée. En présence de peroxydase (POD), l'eau oxygénée formée réagit avec l'amino-4 phénazone et le TOOS[a] pour former un complexe quinonéimine.

Acide urique + 2 H_2O + O_2 $\xrightarrow{Uricase}$ allantoïne + CO_2 + H_2O_2

2 H_2O_2 + H^+ + TOOS[a]+ amino-4 phénazone $\xrightarrow{POD}$ colorant quinone-imine +

4 H_2O

L'intensité de la couleur de la quinonéimine formée est directement proportionnelle à la concentration en acide urique qui est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 552 nm.

a :[N-éthyl-(3-méthylanilino)]-2-hydroxypropyl-3-sulfonate de sodium

c.- Principe du dosage des triglycérides :

Les triglycérides sont hydrolysés en glycérol par une lipoprotéine-lipase (LPL) d'origine microbienne. Le glycérol formé est oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation d'eau oxygénée.

En présence de peroxydase (POD), l'eau oxygénée formée réagit avec l'amino-4 phénazone et le chloro-4 phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge (méthode en point final selon Trinder).

L'intensité de la coloration rouge développée est directement proportionnelle à la concentration en triglycérides et est mesurée à 512 nm.

triglycérides + 3 H_2O $\xrightarrow{LPL}$ glycérol + 3 RCOOH

glycérol + ATP $\xrightarrow[MG^{++}]{GK}$ glycérol-3-phosphate + ADP

glycérol-3-phosphate + O_2 $\xrightarrow{GPO}$ dihydroxyacétone-phosphate + H_2O_2

H_2O_2 + amino-4 phénazone + chloro-4 phénol $\xrightarrow{POD}$ (mono-imino-p-benzoquinone)-4 phénazone + 2 H_2O + HCl

d.- Principe de dosage du cholestérol :

Sous l'action de la cholestérol-estérase (CHER), les esters du cholestérol sont clivés en cholestérol libre et en acides gras. La cholestérol-oxydase (CHOD) catalyse ensuite l'oxydation du cholestérol en cholest-4-èn-3-one et en peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène formé provoque le couplage oxydatif du phénol et de la 4-aminoantipyrine (4-AAP) pour former un dérivé (quinone-imine) coloré rouge.

Esters du cholestérol + H_2O $\xrightarrow{CHER}$ cholestérol + RCOOH

Cholestérol + O_2 $\xrightarrow{CHOD}$ cholest-4-èn-3-one + H_2O_2

2 H_2O_2 + 4-AAP + phénol $\xrightarrow{POD}$ dérivé coloré quinone-imine + 4 H_2O

L'intensité du dérivé coloré formé est directement proportionnelle au taux de cholestérol. Elle est déterminée en mesurant l'absorbance à 512nm.

e.- Principe de dosage du HDLc :

Les lipoprotéines non-HDL (LDL, VLDL et chylomicrons) sont mises en présence de polyanions et un détergent pour former un complexe hydrosoluble. Dans ce complexe, la réaction enzymatique de CHER et CHOD envers les lipoprotéines non-HDL est bloquée. Seules les particules de HDL peuvent réagir avec CHER et CHOD. La concentration de cholestérol HDL est déterminée par voie enzymatique à l'aide de CHER et CHOD.

Esters du cholestérol HDL + H_2O $\xrightarrow{\text{CHER}}$ Cholestérol HDL + RCOOH

Cholestérol HDL + O_2 $\xrightarrow{\text{CHOD}}$ Δ4-cholesténone + H_2O_2

En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec la 4-amino-antipyrine et l'EMSE[a]) pour former un dérivé coloré.

2 H_2O_2 + 4-amino-antipyrine + EMSE + H^++ H_2O $\xrightarrow{\text{POD}}$ pigment coloré + 5 H_2O

L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en HDLc et est mesurée à 583 nm.

(a) : N-éthyl-N-(3-méthylphényl)-N'-succinyléthylènediamine

f.- Principe de dosage du fer :

À un pH acide, le fer est détaché de la transferrine. L'ascorbate réduit les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} qui forment ensuite un complexe coloré avec la FerroZine.

Complexe transferrine-fer $\xrightarrow{\text{pH < 2.0}}$ apotransferrine + Fe^{3+}

Fe^{3+} $\xrightarrow{\text{ascorbate}}$ Fe^{2+}

FerroZine + Fe^{2+} $\longrightarrow$ complexe coloré

L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en fer. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 552 nm.

g.- Principe de dosage de l'UIBC :

Détermination directe avec la FerroZine

$$Fe(II) + \text{transferrine} \xrightarrow{\text{Tampon alcalin}} \text{transferrine-}Fe(III) + Fe(II)\ (\text{excès})$$

$$Fe(II)\ (\text{excès}) + 3\ \text{FerroZine} \longrightarrow Fe(II)\text{-}(\text{FerroZine})_3$$

L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration d'excès de fer non lié et indirectement proportionnelle à la capacité latente de fixation du fer. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 552 nm.

h.- Principe de dosage de l'albumine :

À un pH de 4.1, l'albumine présente un caractère suffisamment cationique pour se combiner avec le vert de bromocrésol (BCG = Bromocresol Green) sous forme d'anion pour former un complexe bleu-vert.

$$\text{Albumine} + \text{BCG} \xrightarrow{\text{pH 4.1}} \text{complexe albumine-BCG}$$

L'intensité de la coloration bleu-vert développée est directement proportionnelle à la concentration en albumine. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 583 nm.

i.- Principe de dosage des protéines totales :

Les ions cuivriques réagissent en solution alcaline avec les liaisons peptidiques des protéines avec formation d'un complexe pourpre caractéristique. Le tartrate de sodium et de potassium empêche la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium empêche l'autoréduction du cuivre.

$$\text{Protéines} + Cu^{2+} \xrightarrow{\text{pH alcalin}} \text{complexe Cu-protéines}$$

L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration en protéines totales. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 552 nm.

j.- Principe de dosage de la bilirubine totale :

Test colorimétrique, méthode par diazoréaction.

En présence d'un agent solubilisant adapté, la bilirubine totale est couplée au 3,5-dichlorophényldiazonium (DPD) dans un milieu fortement acide.

Bilirubine + 3,5-DPD $\xrightarrow{\text{acide}}$ azobilirubine

L'intensité de la coloration rouge du dérivé azoïque formé est directement proportionnelle à la concentration en bilirubine totale et peut être mesurée à 552 nm.

k.- Principe de dosage de la bilirubine directe :

Méthode diazo

La bilirubine conjuguée et la δ-bilirubine (bilirubine directe) réagissent directement avec le sel de dichloro-3,5 phényldiazonium dans un tampon acide pour former l'azobilirubine de couleur rouge.

bilirubine + 3,5-DPD $\longrightarrow$ azobilirubine

L'intensité de la coloration rouge développée est directement proportionnelle à la concentration en bilirubine directe (conjuguée) et est mesurée à 552 nm.

l.- Principe de dosage de l'ASAT :

Méthode selon les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) avec pyridoxal-5'-phosphate.

L'ASAT de l'échantillon catalyse le transfert du groupement amine entre le L-aspartate et le 2-oxoglutarate pour former de l'oxaloacétate et du L-glutamate. L'oxaloacétate réagit ensuite avec le NADH, en présence de malate-déshydrogénase (MDH), pour former du NAD^+.

Le pyridoxal phosphate agit comme une coenzyme dans la transamination. Il garantit une activation enzymatique complète.

L-Aspartate + 2-oxoglutarate $\xrightarrow{\text{ASAT}}$ oxaloacétate + L-glutamate

Oxaloacétate + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L-malate + NAD^+

La vitesse d'oxydation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ASAT. Elle est déterminée par la diminution de l'absorbance à 340 nm.

m.- Principe de dosage de l'ALAT :

Méthode selon les recommandations de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC) avec pyridoxal-5'-phosphate.

L'ALAT catalyse la réaction entre la L-alanine et le 2-oxoglutarate. Le pyruvate formé est réduit par le NADH, dans une réaction catalysée par la lactate-déshydrogénase (LDH), pour former du L-lactate et du NAD^+.

Le pyridoxal phosphate agit comme une coenzyme dans la transamination. Il garantit une activation enzymatique complète.

L-alanine + 2-oxoglutarate $\xrightarrow{ALAT}$ pyruvate + L-glutamate

pyruvate + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ L-lactate + NAD^+

La vitesse d'oxydation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de l'ALAT. Elle est déterminée par la diminution de l'absorbance à 340 nm.

n.- Principe de dosage de PAL :

En présence d'ions magnésium et zinc, le p-nitrophénylphosphate est scindé par les phosphatases alcalines en phosphate et p-nitrophénol.

p-nitrophénylphosphate + H2O $\xrightarrow{ALP}$ phosphate + p-nitrophénol

La quantité de p-nitrophénol libéré est directement proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 409 nm.

o.- Principe de dosage de GGT :

La gamma-glutamyl transférase transfère le groupement γ-glutamyl du L-γ-glutamyl carboxy-3 nitro-4 anilide sur la glycylglycine.

L-γ-glutamyl carboxy-3 nitro-4 anilide + glycylglycine $\xrightarrow{GGT}$ L-γ-glutamyl-glycylglycine + amino-5 nitro-2 benzoate

La quantité d'amino-5 nitro-2 benzoate formée est proportionnelle à l'activité de la GGT dans l'échantillon. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 409 nm.

p.- Principe de dosage de LDH :

La lactate déshydrogénase catalyse la transformation du L-lactate en pyruvate. Le NAD^+ est réduit en NADH.

$$\text{L-Lactate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvate} + NADH + H^+$$

La vitesse de formation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340 nm.

ANNEXE X

Protéines spécifiques

a.- CRP :

Méthode immunoturbidimétrique sur particules de latex.

La CRP humaine s'agglutine sur les particules de latex recouvertes d'anticorps anti-CRP monoclonaux. Les amas de particules sont déterminés par turbidimétrie à 552 nm.

b.- Transferrine :

Méthode immunoturbidimétrique.

En présence d'un antisérum spécifique, la transferrine humaine forme un précipité qui est mesuré par turbidimétrie à 340 nm.

c.- Céruléoplasmine :

Méthode immunoturbidimétrique.

La céruléoplasmine humaine forme un précipité en présence d'un antisérum spécifique ; ce précipité est mesuré par turbidimétrie à 340 nm.

d.- Haptoglobine :

Méthode immunoturbidimétrique.

L'haptoglobine humaine forme un précipité en présence d'un antisérum spécifique ; ce précipité est mesuré par turbidimétrie à 340 nm.

ANNEXE XI

Les étapes de préparation de l'ADN par la technique salting-out

Une préparation préalable des réactifs nécessaires à l'extraction est indispensable (Annexe VII).

- Décongeler les tubes de sang total (prélevé sur EDTA) à température ambiante

- Transvaser le sang total de chaque tube dans un tube flacon de 20 ml, compléter avec du tampon TE10/10 jusqu'à un volume final de 20 ml, agiter doucement et placer les tubes dans la glace pendant 30 minutes.

- Centrifuger pendant 15 min à 2500 tours/min à +4˚C.

- Eliminer le surnageant, ajouter 10ml de TE10/10, un retournement du tube suffit pour resuspendre le culot, puis compléter le tube à 20 ml de TE10/10.

- Mettre le tube dans la glace pendant 10min et centrifuger à 2500 tours/min pendant 15min.

- Reprendre cette étape jusqu'à obtention d'un culot blanchâtre (culot de globules blancs).

- Au culot de lymphocytes, ajouter 5 ml de réactif SLB et 20µl de protéinase K à 20mg/ml et homogénéiser le culot par un vortex.

- Incuber au bain marie à 37°C pendant une nuit.

- Ajouter 2 ml de NaCl 5M, agiter vigoureusement et centrifuger à 4000 tours/min pendant 10 min.

- Récupérer le surnageant dans un tube conique de 20 ml, ajouter au volume V du surnageant obtenu, 2V d'éthanol absolu froid,

- Agiter doucement par retournement, jusqu'à apparition de la méduse d'ADN

- Retirer la méduse avec la pointe d'une pipette pasteur

- Laver la méduse dans 500 µl d'éthanol à 70% quelques secondes

- Placer la méduse dans un tube eppendorf et la laisser sécher à l'air libre

- Selon la taille de la méduse, la dissoudre dans 200-500µl de tampon TE10/1. Pour une totale dissolution, laisser les tubes sur agitation lente à température ambiante pendant au moins 24 heures.

ANNEXE XII

Les étapes de préparation de l'ADN par le kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN)

Une préparation préalable des réactifs nécessaires à l'extraction est indispensable.

a.- Préparation des réactifs et tampons :

- **Préparation de la Protéase QIAGEN :**

  Ajouter 1,2 ml de solvant de protéase (PS) dans le flacon de protéase QIAGEN (QP) lyophilisée et mélanger avec précaution. Pour éviter que le mélange ne mousse, mélanger en retournant plusieurs fois le flacon.

  Vérifier que la Protéase QIAGEN (QP) est entièrement dissoute.

- **Préparation du tampon de lavage 1 :**

  À l'aide d'une éprouvette, ajouter 25 ml d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 19 ml de tampon de lavage 1 (AW1) concentré.

  Conserver le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué à température ambiante (15 à 25°C).

  Avant de commencer la procédure, toujours mélanger le tampon de lavage 1 (AW1) reconstitué en retournant plusieurs fois le flacon.

- **Préparation du tampon de lavage 2 :**

  À l'aide d'une éprouvette, ajouter 30 ml d'éthanol (96 à 100 %) dans le flacon contenant 13 ml de tampon de lavage 2 (AW2) concentré.

  Conserver le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué à température ambiante (15 à 25 °C).

  Avant de commencer la procédure, toujours mélanger le tampon de lavage 2 (AW2) reconstitué en retournant plusieurs fois le flacon.

- **Préparation du tampon d'élution :**

  Le kit comprend un flacon de tampon d'élution (AE). Afin d'éviter toute contamination du tampon d'élution (AE), il est fortement recommandé non seulement d'utiliser des cônes à filtre de protection contre les aérosols pour le pipetage du tampon d'élution (AE), mais également de refermer immédiatement le flacon.

b.- Les étapes de préparation de l'ADN :

1-Transférer à la pipette 20 µl de Protéase QIAGEN (QP) dans un tube de lyse (LT).

2- Ajouter 200 µl d'échantillon de sang dans le tube de lyse (LT).

3- Ajouter 200 µl de tampon de lyse (AL) dans le tube de lyse (LT), fermer le capuchon et mélanger au moyen d'impulsions au vortex pendant 15 secondes.

4- Incuber pendant 10 minutes à 56 °C (± 1 °C).

5- Centrifuger pendant 5 secondes ou plus le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon.

6- Ajouter 200 µl d'éthanol (96 à 100 %) dans le tube de lyse (LT), fermer le capuchon et bien mélanger pendant 15 secondes ou plus au moyen d'impulsions au vortex.

7- Centrifuger pendant 5 secondes ou plus le tube de lyse (LT) à vitesse maximale pour éliminer les gouttelettes accumulées à l'intérieur du capuchon.

8- Déposer avec précaution la totalité du lysat de l'étape 7 dans la colonne de centrifugation QIAamp Mini sans en mouiller le bord. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

9- Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à environ 8000 tr/min pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

10- Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter 500 µl de tampon de lavage 1 (AW1) sans mouiller le bord de la colonne. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

11- Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à environ 8000 tr/min pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

12- Ouvrir la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et ajouter 500 µl de tampon de lavage 2 (AW2) sans mouiller le bord de la colonne. Éviter de toucher la membrane de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec le cône de la pipette.

13- Fermer le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini et centrifuger à vitesse maximale (14 000 tr/min) pendant 1 minute. Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube de lavage (WT) et mettre le tube contenant le filtrat au rebut.

14- Centrifuger pendant 3 minutes à vitesse maximale (14 000 tr/min) pour sécher la membrane complètement.

15- Placer la colonne de centrifugation QIAamp Mini dans un nouveau tube d'élution (ET) et mettre le tube de lavage (WT) contenant le filtrat au rebut. Ouvrir le capuchon de la colonne de centrifugation QIAamp Mini avec précaution et déposer au centre de la membrane 50 à 200 µl de tampon d'élution (AE). Fermer le capuchon et incuber à température ambiante (15 à 25 °C) pendant 1 minute. Centrifuger pendant 1 minute à environ 8 000 tr/min afin d'éluer l'ADN.

ANNEXE XIII

Les étapes de la PCR

- **Première étape :** la dénaturation thermique

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les liaisons hydrogènes du double brin d'ADN à une température de 95°C, qui est supérieure à la température de fusion (Tm). L'ADN se retrouve sous forme simple brin. Ces brins serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.

- **Deuxième étape :** l'hybridation des amorces

Le milieu réactionnel est refroidi jusqu'à une température qui permet la fixation des amorces à l'ADN simple brins sans permettre la reformation d'une double hélice entre les brins matrice. La température utilisée est variable (45 à 65°C) et elle est déterminée par la séquence et le nombre de bases dans les amorces.

- **Troisième étape :** l'élongation (ou extension) des amorces

L'élongation des fragments d'ADN par l'ADN polymérase dans le sens 5'-3' à partir des amorces hybridées. Cette étape se déroule à une température qui assure une activité optimale de l'ADN polymérase. Pour *Taq* c'est 72°C.

A la fin du cycle deux copies de la séquence d'ADN cible sont obtenues.
Un nouveau cycle recommence en suivant les trois étapes successives.
Pour une PCR classique, 25 à 40 cycles sont effectués, la durée de la PCR est de 1h 30 mn à 4 h, selon le protocole choisi.

RESUME

Introduction : L'effet protecteur d'une augmentation des taux de bilirubine indirecte sur certaines maladies liées au stress oxydatif (diabète sucré, maladies cardiovasculaires) chez les patients atteints du syndrome de Gilbert (GS) est bien connu. L'hyperbilirubinémie néonatale peut être sévère ou prolongée et nécessite une exploration de l'étiologie sous-jacente, pouvant inclure le diagnostic génétique du GS. Les polymorphismes du gène UGT1A1 associés au GS n'ont pas été caractérisés au sein de notre population.

L'objectif de notre étude est d'examiner les effets d'une augmentation des taux de bilirubine sur les paramètres biochimiques et de déterminer l'étiologie génétique de cette hyperbilirubinémie dans la population algérienne.

Patients et méthodes : Il s'agit d'une étude descriptive et transversale, appariée sur l'âge et le sexe, réalisée au niveau de l'Hôpital Militaire Régional Universitaire d'Oran (HMRUO) et de l'Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran (EHUO).

L'étude comporte des patients adultes (Groupe 1 :151 cas) et des patients appartenant aux trois tranches d'âge pédiatriques (Groupe 2 : 48 cas). Les paramètres étudiés chez les adultes sont : l'IMC, le bilan lipidique (triglycérides, cholestérol total, HDL-c, LDL-c, Ratio HDL:LDL), la CRP, le bilan ferrique et les protéines antioxydantes (fer, CS, transferrine, céruloplasmine), l'acide urique et le glucose.

Les deux groupes de patients ont bénéficié d'une étude moléculaire à la recherche des polymorphismes (TA)n(rs8175347) et G211A (rs4148323) du gène UGT1A1.

Résultats : **Groupe 1** : L'âge moyen des patients est de 37,1 ± 15,4 ans avec un *sex* ratio de 2,7. Le pic de fréquence de l'âge se situe entre 21 et 30 ans avec 34,1% des cas. L'asthénie, l'ictère et les douleurs abdominales sont les signes évocateurs les plus fréquents du GS. L'IMC moyen est de 24,2 ± 3,9 kg/m^2, il est plus élevé chez les sujets GS plus âgés. L'hypertension artérielle et le diabète sont retrouvés chez 9,2% et 6,7% des cas respectivement. Le génotype GS TA7/TA7 du (TA)n(rs8175347) est retrouvé chez 84,1% des cas et le génotype GG du G211A (rs4148323) est retrouvé chez 92,7% des cas. Les triglycérides, le cholestérol total, le LDL-c et le glucose sont significativement plus élevés chez les sujets GS plus âgés. La bilirubine non conjuguée (UCB) a montré des corrélations négatives et significatives avec l'IMC chez les hommes, le LDL-c chez les femmes, la CRP et la céruloplasmine. Des corrélations positives et significatives de l'UCB sont retrouvées avec le fer et le CS. Aucune corrélation de l'UCB n'est retrouvée avec l'acide urique.

Groupe 2 : Le pic de fréquence de l'âge se situe chez les nouveaux-nés (≤ 28 jours) avec 70,8% des cas. Le *sex* ratio est de 1,8. L'âge médian d'apparition de l'hyperbilirubinémie est de 4 ans et demi chez les enfants et de 3 jours chez les nouveau-nés. La bilirubine totale sérique est significativement plus élevée chez les nouveau-nés. La fréquence des génotypes du polymorphisme (TA)n(rs8175347) est de : 45,8% (TA7/TA7), 20,8% (TA6/TA7), 33,3%(TA6/TA6).La bilirubine totale est significativement plus élevée dans le génotype TA6/TA6. Le génotype GG du polymorphisme G211A (rs4148323) est retrouvé chez 89,6% des cas.

Le taux d'incidence brut (TIB) du GS est estimé à 5,49 pour 100 000 et le taux standardisé (TIS) est de 3,0 pour 100 000 dans la Wilaya d'Oran.

Conclusion : Le génotype TA7/TA7 du polymorphisme génétique (TA)n(rs8175347) est associé au GS dans notre population. Notre étude confirme l'effet bénéfique apporté par l'hyperbilirubinémie du GS impliquant ainsi un retentissement sur les différents profils biologiques.

Mots clés : hyperbilirubinémie, GS, UGT1A1, paramètres biochimiques, bénéfique.

ABSTRACT

Introduction : The protective effect of increased indirect bilirubin levels on certain oxidative stress-related diseases (diabetes mellitus, cardiovascular disease) in patients with Gilbert's syndrome (GS) is well known. Neonatal hyperbilirubinemia may be severe or prolonged and requires exploration of the underlying etiology, which may include genetic diagnosis of GS. Polymorphisms of the UGT1A1 gene associated with GS have not been characterized in our population.

The aim of our study was to examine the effects of increased bilirubin levels on biochemical parameters and to determine the genetic etiology of this hyperbilirubinemia in the Algerian population.

Patients and methods : This was a descriptive, cross-sectional study, matched for age and sex, carried out at the Regional University Military Hospital of Oran (HMRUO) and the University Hospital Establishment of Oran (EHUO).

The study included adult patients (Group 1: 151 cases) and patients in the three pediatric age groups (Group 2: 48 cases). The parameters studied in adults were: BMI, lipid profile (triglycerides, total cholesterol, HDL-c, LDL-c, HDL:LDL ratio), CRP, iron profile and antioxidant proteins (iron, CS, transferrin, ceruloplasmin), uric acid and glucose.

Both groups of patients underwent molecular testing for UGT1A1 polymorphisms (TA)n(rs8175347) and G211A (rs4148323).

Results : Group 1: The mean age of patients was 37.1 ± 15.4 years, with a *sex* ratio of 2.7. Peak age was between 21 and 30 years, with 34.1% of cases. Asthenia, jaundice and abdominal pain are the most frequent signs suggestive of GS. The mean BMI is 24.2 ± 3.9 kg/m2, higher in older GS subjects. Hypertension and diabetes were found in 9.2% and 6.7% of cases respectively. The GS TA7/TA7 genotype of (TA)n(rs8175347) was found in 84.1% of cases, and the GG genotype of G211A (rs4148323) in 92.7%. Triglycerides, total cholesterol, LDL-c and glucose were significantly higher in older GS subjects. Unconjugated bilirubin (UCB) showed negative and significant correlations with BMI in men, LDL-c in women, CRP and ceruloplasmin. Positive and significant UCB correlations were found with iron and CS. No UCB correlation was found with uric acid.

Group 2: The peak age frequency is in newborns (≤ 28 days) with 70.8% of cases. The *sex* ratio is 1.8. The median age of onset of hyperbilirubinemia is 4.5 years in children and 3 days in newborns. Total serum bilirubin was significantly higher in newborns. The frequency of genotypes of the (TA)n(rs8175347) polymorphism is : 45.8% (TA7/TA7), 20.8% (TA6/TA7), 33.3%(TA6/TA6).Total bilirubin is significantly higher in the TA6/TA6 genotype. The GG genotype of the G211A polymorphism (rs4148323) was found in 89.6% of cases.

The crude incidence rate (GIR) of GS is estimated at 5.49 per 100,000 and the standardized rate (SIR) is 3.0 per 1,000,000 in the Wilaya of Oran.

Conclusion : The TA7/TA7 genotype of the (TA)n(rs8175347) genetic polymorphism is associated with GS in our population. Our study confirms the beneficial effect of GS hyperbilirubinemia on the various biological profiles.

Key words : hyperbilirubinemia, GS, UGT1A1, biochemical parameters, benefical.

ملخص

المقدمة: إن التأثير الوقائي لزيادة مستويات البيليروبين غير المباشرة على بعض الأمراض المرتبطة بالإجهاد التأكسدي (داء السكري، أمراض القلب والأوعية الدموية) لدى المرضى الذين يعانون من متلازمة جيلبرت(GS) معروف جيداً. قد يكون فرط بيليروبين الدم عند حديثي الولادة شديدًا أو طويل الأمد ويتطلب التحقيق في المسببات الكامنة، والتي قد تشمل التشخيص الوراثي لمتلازمة جيلبرت. لم يتم تحديد الأشكال المتعددة لجين UGT1A1 المرتبط بـ(GS) في سكّاننا.

الهدف من دراستنا هو فحص آثار زيادة مستويات البيليروبين على المعايير الكيميائية الحيوية وتحديد المسببات الوراثية لهذه البيليروبين المتزايدة في الدّم لدى السكان الجزائريين.

المرضى والطريقة: هذه دراسة وصفية ومقطعية، تتناسب مع العمر والجنس، أجريت في المستشفى العسكري الجهوي الجامعي في وهران (HMRUO) والمؤسسة الاستشفائية الجامعية في وهران (EHUO).

شملت الدراسة مرضى بالغين (المجموعة الأولى: 151 حالة) ومرضى ينتمون إلى الفئات العمرية الثلاث للأطفال (المجموعة الثانية: 48 حالة). المعايير التي تمت دراستها عند البالغين هي: مؤشر كتلة الجسم، وملف الدهون (الدهون الثلاثية، والكوليسترول الكلي، HDL-c، LDL-c، نسبة HDL:LDL)، والبروتين-C المتفاعل(CRP)، ملف الحديد والبروتينات المضادة للأكسدة (الحديد، CS، الترانسفيرين، السيرولوبلازمين)، حمض اليوريك والجلوكوز.

خضعت كلتا المجموعتين من المرضى لدراسة جزيئية بحثًا عن تعدد الأشكال (TA)n(rs8175347) و G211A (rs4148323) لجين UGT1A1.

النتائج: المجموعة الأولى: كان متوسط عمر المرضى 37.1 ± 15.4 سنة مع نسبة جنس 2.7. وتوجد ذروة الإصابة في الفئة العمرية ما بين 21 و30 عاماً بنسبة 34.1% من الحالات. الوهن، اليرقان وألم البطن هي العلامات الأكثر شيوعا التي تشير إلى الإصابة بـ (GS). متوسط مؤشر كتلة الجسم هو 24.2 ± 3.9 كغ/م^2، وهو أعلى في الأشخاص الأكبر سناً.

وجد ارتفاع ضغط الدم والسكري في 9.2% و6.7% من الحالات على التوالي. تم العثور على النمط الجيني GS TA7/TA7 لـ (TA)n(rs8175347) في 84.1% من الحالات وتم العثور على النمط الجيني GG لـ G211A (rs4148323) في 92.7% من الحالات. تعتبر الدهون الثلاثية، الكوليسترول الكلي، LDL-c، والجلوكوز أعلى بشكل ملحوظ في كبار السن المصابين بمتلازمة جيلبرت(GS) أظهر البيليروبين غير المقترن (UCB) ارتباطات سلبية وهامة مع مؤشر كتلة الجسم لدى الرجال، وLDL-c لدى النساء، وCRP والسيرولوبلازمين. تم العثور على ارتباطات إيجابية ومهمة بين UCB والحديد و CS. لم يتم العثور على أي ارتباط بين UCB وحمض اليوريك.

المجموعة الثانية: الذروة العمرية تكون عند الأطفال حديثي الولادة (≥ 28 يومًا) بنسبة 70.8% من الحالات. نسبة الجنس هي 1.8. متوسط عمر ظهور ارتفاع بيليروبين الدم هو 4.5 سنوات عند الأطفال و 3 أيام عند الأطفال حديثي الولادة. يعتبر البيليروبين الكلي في المصل أعلى بشكل ملحوظ عند الأطفال حديثي الولادة. معدل تكرار النمط الجيني للتعدد الشكلي (TA)n(rs8175347) هو: 45.8% (TA7/TA7)، 20.8% (TA6/TA7)، 33.3% (TA6/TA6). يعتبر البيليروبين الكلي أعلى بشكل ملحوظ في النمط الجيني (TA6/TA6). تم العثور على النمط الجيني GG من تعدد أشكال G211A (rs4148323) في 89.6% من الحالات.

يقدر معدل الإصابة الخام (TIB) لمرض GS بنحو 5.49 لكل 100000 والمعدل المعياري (TIS) بنحو 3.0 لكل 1000000 في ولاية وهران.

الخلاصة: يرتبط النمط الجيني TA7/TA7 للتعدد الأشكال الجيني (TA)n(rs8175347) بمتلازمة GS في مجتمعنا. تؤكد دراستنا التأثير المفيد الذي يحدثه ارتفاع بيليروبين الدم لـ GS في مجتمعنا، والذي له تأثير على الملامح البيولوجية المختلفة.

الكلمات المفتاحية: فرط بيليروبين الدم،GS ، UGT1A1، المعايير الكيميائية الحيوية، مفيدة.