

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire

De fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master
en Biologie
Option : Génie biologie

Thème

*Dépistage des hémoglobinopathies par formule
numéraire sanguine et HB glyquée et frottis sous
microscope chez une population adulte*

Présenté par :

M^{elle} Houhou Wafaa

Soutenu le : 08/10/2017.

Devant le jury compose de :

M ^{me} BENCHABANE A	MCB	USDB1	Présidente
M ^{me} AMOKRANE S	MAA	USDB1	Examinatrice
M ^{me} KEBBAS S	MCB	USDB1	Promotrice

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Je remercie d'abord « Dieu » le plus puissant qui m'a donné du courage et de la volonté afin d'accomplir et de parvenir à élaborer ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement notre promotrice M^{me} KEBBAS S maître de conférence B au Faculté des Science de la Nature et de Vie , pour avoir dirigé ce travail, et pour son aide très précieux, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses conseils qui ont fait progresser ce travail. Un agréable devoir de lui adresser un grand merci pour, la confiance et liberté d'action dont j'ai bénéficié tout au long de notre stage.

Je tiens à exprimer ma respectueuse reconnaissance à M^{me} BENCHABANE A de conférence B au Faculté des Science de la Nature et de Vie pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la présidence du jury.

Nos reconnaissances vont également à M^{me} AMOKRANE S maître assistant A au Faculté des Science de la Nature et de Vie qui m'a fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurés de tout notre respect et de notre profonde gratitude.

Je remercie tous les personnel de Plateau technique de BIOGROUPE et en particulier le personnel de l'unité Hématologie et son responsable Dr AZMADROUB qui m'a aidés à surmonter mon aléas au cours de mon pratique.

Un grand merci à tous les membres du l'équipe de Biochimie Younes, Zaki, Zola, Zahra, Chahra, Samia et Dr Medjadba pour son soutien et son encouragement.

Je veux témoigner mon gratitude et mon profond respect à tous les enseignants du département de biologie.

Enfin, je remercie tous ceux qui sont m'aidé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail

Dédicace

*Je remercie Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné
la santé, le courage pour réaliser ce travail.*

*Chaleureusement, je dédie ce modeste travail fruit de mon labeur à :
la lumière de ma vie et l'espoir de mon existence*

Ma mère

*La source de mon inspiration, celui qui m'a rendu telle que je suis et telle
qu'il a souhaité :*

Mon père

*Pour leur respect dans mon professionnel,
leur confiance, leur sacrifice et leur amour*

Mes sœurs et frères

Feriel et son mari Mhamed

Asmâa et son mari Mohamed

Ahmed

Mohamed et sa femme Karima

Moufid et sa femme Hanan

Mes chères Nièces et Neveux

A toute la famille : Houhou et Salma.

Mes Copines : Amel, Salma, Nawel, Souhila et Warda.

A toute la promotion de Genie biologique 2017

Waffâa

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I : Données bibliographiques	
I. Rappels sur l'hémoglobine.....	02
I.1. Définition de l'hémoglobine	02
I.2. Structure de la molécule d'Hb.....	03
I.2.1. L'hème.....	02
I.2.2. La globine	03
I.3. Fonction de l'hémoglobine.....	04
I.4. Les différents types de l'hémoglobine humaines.....	05
I.4.1. Hémoglobines embryonnaires.....	05
I.4.2. Hémoglobine fœtale.....	05
I.4.3. Hémoglobine Adulte	06
I.5. Les gènes de l'Hb.....	06
II. La physiopathologie de l'hémoglobine	08
II.1. Types d'hémoglobinopathies.....	08
II.2. Les variants.....	08
II.2.1. L'hémoglobine S ou la drépanocytose.....	09
II.2.2. L'hémoglobinose C	12
II.2.3. L'hémoglobinose D.....	12
II.2.4 . L'hémoglobinose E.....	13
II.3. Les thalassémies	13
II.3.1. Les β -thalassémies	14
II.3.2. Les α -thalassémies.....	14
II.4. Autres hémoglobinopathies.....	15
II.6. Diagnostique biologique d'une hémoglobinopathie.....	15
III. Les techniques d'étude biologique de l'hémoglobine	16
III.1 Les techniques d'étude séparatives.....	16
III.1.1.L'électrophorèse.....	16
III. 1.2. La chromatographie.....	17
III.1.3. La spectrophotométrie.....	18
III.2. Les techniques d'étude non séparatives.....	18

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	20
I.1. Matériel biologique.....	20
I.2. Matériel non biologique.....	20
II. Méthodologies de travail.....	20
II.1 L'hémogramme.....	20
II.1.1. Numération Formule Sanguine NFS.....	20
II.1.2. Frottis sanguin	22
II .2. Le test de falciformation.....	23
II.3. La Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	24
II.4. L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine.....	26
II.5.L'enquête génétique.....	29

Chapitre III : Résultat et discussion

I. Les résultats des tests Hématologique	30
I.1. Les résultats de NFS	30
I.1.1. Résultats des états hétérozygotes	30
I.1.2.Les résultats des états homozygotes et composites	31
I.2. Les résultats de frottis sanguin.....	32
I.3. Test Emmel ou falciformation	33
II. Les résultats des profils chromatographique et électrophorétique	34
II.1. Hémoglobine normale.....	34
II.2. Drépanocytose hétérozygote.....	35
II.3. Drépanocytose homozygote et la composite S/C.....	36
II.4. Autres hétérozygoties	49
III. Étude d'un exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte la drépanocytose	42
VI. L'étude statistique des anomalies	43
VI.1. La répartition des anomalies selon la population globale des patients	43
VI.2. La répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies.....	45
VI.3. La répartition des anomalies selon le sexe des patients	47
Conclusion	48
Références bibliographique	50

Listes des figures

Figure (01) : Schémas de la molécule complète d'hémoglobine	02
Figure (02) : L'hème dans l'oxyhémoglobine	03
Figure (03) : Structure de la globine.....	04
Figure (04) : Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines précédant et suivant la naissance.....	06
Figure (05) : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine	07
Figure (06) : Falciformation des globules rouges, perte d'élasticité et occlusion des vaisseaux de faible calibre.....	11
Figure (07) : Électrophorèse de l'hémoglobine montrant la drépanocytose homozygote	17
Figure (09) : Schémas comparatif des résultats positif et négatif de teste falciformation sur microscope optique	19
Figure (10) : Profil des différents fractions de l'hémoglobine par l'HPLC avec leurs rapports (pics) sur le chromatogramme.....	25
Figure (11) : Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis® , avec identification automatique des pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C et découpage en 15 zones de migration	28
Figure (12) : Aspect microscopique des hématies sur frottis sanguin d'un drépanocytaire (MG G x 100).....	32
Figure (13) : Aspect microscopique des hématies falciformes par test Emmel d'un sujet drépanocytaire hétérozygote (MG G x 100).....	33
Figure (14) : Exemples d'un profil normal par électrophorèse capillaire et HPLC	34
Figure (15) : Exemples d'un profil drépanocytaire hétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC.....	35
Figure (16) : Exemple d'un profil drépanocytaire homozygote par électrophorèse capillaire.....	36
Figure (17) : Profil de la double hétérozygotie (composite) S/C par électrophorèse capillaire.....	38
Figure (18) : Exemples d'un profil d'HbC hétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC.....	39
Figure (19) : Exemples d'un profil d'HbD hétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC	40

Figure (20) : Exemples d'un profil d'HbE hétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC.....	41
Figure (21): Exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte de la drépanocytose.....	42
Figure (22) : Pourcentage de la présence des hémoglobinopathies par rapport à la population globale.....	43
Figure (23) : la répartition des anomalies par rapport à la population	43
Figure (24) : Répartition des anomalies selon leurs différents types.....	46
Figure (25) : Répartition de la population selon le sexe.....	47

Liste des tableaux

Tableau I : Les différents types d'hémoglobine embryonnaire.....	05
Tableau II : Variation des paramètres hématologiques à l'état hétérozygote chez 3 porteurs différents ; un jeune à 27ans, un homme à 51ans et un vieux à 79 ans.....	30
Tableau III : Variation des paramètres hématologiques à l'état homozygote S/S et à l'hétérozygotie composite S/C.....	31

Liste des abréviations

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien

CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CVO : Crise vaso-occlusive

EDTA : acide éthylène-diamino-tétraacétique

EPH : Électrophorèse d'Hémoglobine

G/L : Giga par litre

G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GR : Globules Rouges

Hb : Hémoglobine

HbF : Hémoglobine fœtale

HbS : Hémoglobine S

IFCC : Fédération Internationale de la Chimie Clinique .

IgM : Immunoglobuline M

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

J : jour

Lys : Lysine

M/ μ l : million par microlitre

NFS : Numération Formule Sanguine

NGSP : Programme de Standardisation des Glycohémoglobine Nationale

PEC : Prise en charge

SDM : Syndromes Drépanocytaires Majeurs

TCMH : Teneur Moyenne en Hémoglobine

VGM : Volume globulaire moyen

Résumé

Les hémoglobinopathies constituent un véritable problème de santé publique. L'intérêt de l'étude de ces pathologies est le dépistage des porteurs pour la prévention des hémoglobinopathies avec la recherche des cas familiaux à terme de développer un conseil génétique.

L'objectif de notre étude est de déterminer le profil épidémiologique et biologique des anomalies de l'hémoglobine dans les régions de Alger et Blida . À travers la réalisation de quelques tests biologiques, tel que le test de falciformation et l'hémogramme complète, avec des techniques biochimiques comme l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide de haute performance. Il est s'ensuit d'une requête génétique visant à rechercher les hémoglobinopathies au sein d'une famille.

Parmi les 16900 dossiers traités on a révélé 400 cas d'hémoglobinopathies. Le syndrome drépanocytaire est l'anomalie la plus fréquente dans notre population avec 207 malades (51% des forme hétérozygote A/S et 0.5% des forme homozygote S/S), ensuite l'hémoglobinose C hétérozygote était présente chez 148 cas (37%), les hétérozygoties D (A/D) et E (A/E) occupent la troisième position dans notre série avec 22 cas (5.5%), suivies par la double hétérozygotie S/C rencontrée chez 05 patients (1.25%).

Les mots clés : chromatographie, drépanocytose, électrophorèse , falciformation, hémoglobinopathie, hémogramme, hétérozygote, homozygote.

الملخص

تعتبر امراض خضاب الدم مشكلة حقيقية للصحة العامة، والاهتمام بدراسة هذه الأمراض هو للكشف عن الناقلين للوقاية من اعتلال الهيموجلوبين، بحثا عن الحالات الأسرية وفي نهاية المطاف لتطوير المشورة الوراثية.

الهدف من دراستنا هو تحديد الوضع الوبائي والبيولوجي لتشوهات الهيموجلوبين في منطقة الجزائر العاصمة والبلدية. من خلال تحقيق بعض الاختبارات البيولوجية، مثل اختبار الشكل المنجلي والعد الكامل للدم، مع التقنيات البيوكيميائية مثل الهجرة الكهربائية والكروماتوجرافيا السائلة عالية . و يتبع ذلك بإجراء تحقيق وراثي للبحث عن اعتلال الهيموجلوبين داخل الأسرة.

من بين 16900 حالة تمت تشخيصها ، تم الكشف عن 400 حالة من امراض خضاب الدم. مرض فقر الدم المنجلي هي المتلازمة الأكثر شيوعا في عدد المرضى لدينا مع 207 مريض (51% من متخالف و 0.5% من متماثل الاليلات) ، وتغاير الزيغوت C موجودة في 148 حالة (37%) ، ثم الهيموجلوبينات المختلفة الاليلات D و E يحتلان المركز الثالث في سلسلتنا مع 22 حالة (5.5%) تتبع بالمتغايرة الاليلات المزوجة SC ب 05 مرضى (1.25%).

كلمات البحث : امراض خضاب الدم ، مرض الخلية المنجلية، متماثل، متخالف، الكهربائي، تمنجل، تعداد الدم.

Abstract

Hemoglobin diseases constitute a real public health problem. The interest of the study of these pathologies is the detection of the carriers for the prevention of hemoglobinopathies, in the search of the family cases to develop in the long term a genetic counseling.

The objective of our study is to determine the epidemiological and biological profile of hemoglobin abnormalities in the Algiers and Blida regions. Through the realization of some biological tests, such as sickling test and complete blood count, with biochemical techniques such as capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography.

Of the 16,900 cases treated, 400 cases of hemoglobin diseases were revealed. Sickle cell syndrome is the most frequent abnormality in our population with 207 patients (51% heterozygous A / S and 0.5% homozygous S / S), followed by heterozygous hemoglobin C in 148 cases (37%), the heterozygous D (A / D) and E (A / E) occupied the third position in our series with 22 cases (5.5%), followed by the double heterozygote S / C encountered in 05 patients (1.25%). It followed by a genetic investigation to search for hemoglobinopathies inside a family.

Keywords: chromatography, complete blood count, electrophoresis, hemoglobin diseases, homozygous, heterozygote, sickle cell anemia, sickling.

Introduction

Avec plus de 300 000 naissances d'individus affectés par an, les anomalies qualitatives et quantitatives de l'hémoglobine figurent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Historiquement limitées à certaines régions du globe (Afrique et Asie principalement), elles se sont rapidement étendues aux pays occidentaux. C'est en Afrique que le nombre des malades est le plus élevé. 200 000 nouveaux cas sont détectés chaque année. (**Aguilar et al., 2010**). Au Maghreb on compte 12 000 malades, et on recense environ 400 cas parmi les nourrissons chaque année (**OMS, 2011**).

Un diagnostic précoce de certaines de ces anomalies permet une prise en charge précoce et une amélioration considérable de la qualité de vie des patients. Différentes techniques d'étude de l'hémoglobine ont été développées dans le passé, telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin et l'électrophorèse en gel d'agarose à pH acide. Cependant, en raison du manque de sensibilité de ces dernières, d'autres techniques ont été mises au point pour le diagnostic des anomalies de l'hémoglobine. Ainsi, la chromatographie liquide de haute performance a contribué à l'identification plus rapide d'un grand nombre de variants de l'hémoglobine et à une quantification plus précise de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F. (**Keren et al., 2008**). Plus récemment, au début des années 2000, une méthode automatisée d'électrophorèse capillaire de zone a été développée pour le diagnostic des hémoglobinopathies. En effet, le système Capillarys, initialement conçu pour l'électrophorèse capillaire, permet désormais la recherche des anomalies de l'hémoglobine (**Guis et al. 2013**).

L'objectif de notre travail consiste à rechercher certaines anomalies de l'hémoglobine les plus fréquentes dans la population dans les régions de ALGER et BLIDA , à travers une petite recherche épidémiologique dans l'archive de dossiers de cette maladie au niveau du service d' Hématologie de Biogroupe , pendant la période du janvier 2017 jusqu'au mois de mai 2017, et la réalisation de certains tests biologiques sur des échantillons frais.

Dans la première partie de ce travail, nous présentons un bref rappel sur l'hémoglobine, les hémoglobinopathies, ainsi que la drépanocytose et son diagnostic. La seconde partie rapporte les techniques utilisées, et en fin les résultats obtenus avec son discussion.

Références Bibliographiques

HbVar: <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>

Vulgaris-medical : <https://www.vulgaris-medical.com>

ADAMS ® A1c HA-8180V (2006): Analyseur Automatique d'Hémoglobine glyquée. Manuelle d'utilisation. ARCKAY-EUROPE,B.V. 88p.

Capillarys 2 Flex Piercing (2014) : Capillarys hemoglobin(e) using the capillarys 2 flex-piercing instrument. SEBIA INSTRUCTIONS -American.429 p.

OMS (2000) : Comité régional de l'Afrique. Drépanocytose : une stratégie pour la région africaine de l'OMS. AFR/RC60/8 ; Juin 2000.

OMS, Comité régional pour l'Afrique (2011) : La drépanocytose dans la région africaine : situation actuelle et perspectives. AFR/RC56/17, 17 Juin 2011.

Aguilar-Martinez P., Badens C., Bonello-Palot N., Cadet E., Couque N., Ducrocq R, Elion J., Francina A., Joly P., Pissard S., Rochette J. (2010) : Réseau DHOS Pathologie héréditaire de l'érythrocyte. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. Ann Biol Clin (Paris). 464 p.

Baledent F (2000) : Physiologie de l'hémostase. Paris : Elsevier. 510 p.

Bardakdjian-Michau J., Dhondt JL., Ducrocq R., Galactéros F., Guyard A., Huchet FX., Lahary A., LenaRusso D., Maboudou P., North ML., Prehu C., Soummer AM., Verschelde M., Wajcman H. (2003) : Groupe de travail SFBC Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Ann Biol Clin (Paris). 400 pages.

Belhadi K (2010) : Étude des hémoglobinopathies dans la région de Batna. Thèse de Doctorat. Université Batna. 172 p.

Bernard J., Levy J.P., Varet B., Clairel J., Rain D., Sultant Y. (1998) : Abrégés d'hématologie, 9^e édition.- Paris : Manson. 405 p.

Bernini LF. (2001): « Geographic distribution of α thalassemia » : Steinberg MH, Forget B, Higgs DR, Nagel RL, éd. Disorders of hemoglobin. Genetics, pathophysiology, and clinical management, Cambridge : Cambridge University Press. 878 p.

Références Bibliographiques

Bourée P., Ensaf A. (2012) : La drépanocytose : une hémoglobinopathie tropicale qui devient cosmopolite. *Bio* 23. 320 p.

Carrell RW. (1972): A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol.* 615 p.

Credos. (2005) : Module de formation à la prise en charge de la drépanocytose. Paris : Elsevier. 700 p.

Cotton F., Malaviolle X., Vertongen F., Gulbis B. (2009): Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. *Clin Lab*; 55 . 217p.

Cotton F., Gulbis B., Hansen V., Vertongen F. (2003): Interference of hemoglobin D in hemoglobin A(2) measurement by cation-exchange HPLC. *Clin Chem* 45. 1318 p.

Couque N., Montalembert DE. (2003) : Diagnostique d'une hémoglobinopathie. *Hématologie* : 4. 289 p.

Diakite S. (2005) : Les mécanismes de protection de l'hémoglobine C contre les formes graves de al paludisme *A. P falciparum*. résultats d'études préliminaires in vitro. 100 p.

Djamâa I. (2012) : Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des béta-thalassémies et drépanocytose. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. 152 p.

Emmel V.E. (1977): Study of the erythrocytes in case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. *Arch. Inter Med.* 586 p.

Farce M-H.(2000) : Génétique moléculaire. Editions Quae. Paris. 262 p.

Frédéric B., Piel., Thomas N., Williams. ,(2013): Sickle Cell Anemia, Sickle Cell Anemia History and Epidemiology, London, Springer. 216 p.

Françoise R. (2004): Anémie à l'accouchement : Prévalence, facteurs de risques et répercussions chez le nouveau-né. Ed : *Rév Epidémiol*, 40 (4) .267 p.

Galacteros F. (2000) : Alpha thalassémie. *Br J Haematol.* 312 p.

Galanello R., Origa R. (2010): Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 470 p.

Références Bibliographiques

Giambona A., Passarello C., Renda D., Maggio A. (1997): The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. Clin Biochem 42. 880 p.

Girot L. (1999) : La drépanocytose. Rev Fr Lab. 540 p

Girot R., Bégué P., Galacteros F. (2003) : La drépanocytose. Ed : John Libbey Eurotext, Paris. 270 p.

Guis L., Chaumier A., Gall VL., Havrez S. (2013) : Intégration du Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée. Rev Francoph Lab. 140p.

Higgs DR. (2001): Molecular mechanisms of thalassemia.. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Ed: Steinberg MH, Cambridge : Cambridge University Press. 405 p.

ISO 22870 (2010) :Examens de biologie médicale délocalisée (EBMD). Exigences concernant la qualité et compétence.

Kafando E., Savadogo LGB., Ayéroué J. (2008): Les syndromes drépanocytaires majeurs : une enquête anonyme au près du corps médical au Burkina-Faso. Med. Trop. 246 p.

Keren DF., Hedstrom D., Gulbranson R., Ou CN., Bak R. (2008): Comparison of Sebia Capillarys capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Am J Clin Pathol. 824 p.

Khadjetou B. (2013): Étude épidémiologique des hémoglobinopathies chez les femmes enceintes et consultation prénatal. Thèse de Doctorat. Université de Nouakchott. 690 p.

Kohne A .(2011): Haemoglobinopathy Diagnosis. 2ème Edition. Blackwell Publishing Ed. Oxford. 328 p.

Kutlar A. (2007): Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder, Hemoglobin. 209 p.

Références Bibliographiques

Labie D., Elion J. (2005) : Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie. Paris : Elsevier. Pp : 20-31. 210 p.

Lodish., Balimore., Berk. et Darnell (2000): Biologie Moléculaire de la cellule. Boeck Université.

Lubin B., H H, Witkowska E., Kleman K. (1991): Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. Clin Biochem. 363p.

Mérault G., Diarra J.P., De Caunes F., Bibrac A., Loret H., Berchel C., Reinette P. (1996) : Dépistage néonatal et prise en charge coordonnée de la drépanocytose en Guadeloupe. In: "Drépanocytose et Santé publique", F. Ed : Galacteros, S. Dormont. 465 p.

Maniatis S., Conley CL., Waugh DF., Ugoretz RJ., Spurrell JR. (1980): Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease. J Clin Invest. 795 p.

Monplaisir N., Merault G., Poyart C., Rhoda MD., Craescu C., Vidaud M., Galacteros F., Blouquit Y., Rosa J. (1986) : Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. Proc Natl Acad Sci USA. 1450 p.

Neel H. (1979): Disorders of Hemoglobin : Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2ème Edition. Cambridge University Press Ed. 846 p.

Ngo DA, Aygun B., Akinsheye I., Hankins JS., Bhan I., Luo HY., Steinberg MH., Chui DH. (2012): Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. Br J Haematol. 259 p.

Redding-Lallinger R., Knoll C. (2006): Sickle cell disease-pathophysiology and treatment. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care; 36(10). 346 p.

Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. (2010) : Sickle-cell disease. Lancet. 318 p.

Références Bibliographiques

Richard J-L., Ducrocq R., Guyard A., Huchet F-X., Lahary A., Lena-Russo D., Maboudou P., North M-L, Prehu C., Soummer A-M., Vershelde M., Wajcman H. (1999) : Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Ann Biol Clin (Paris) .409 p.

Riou J., Godart C., Mathis M., Hurtrel D., Wajcman H., Préhu C., Bardakdjian J. (2005) : Evaluation of the Bio-Rad /HbA1C Dual Program for measurement of hemoglobin concentrations and detection of variants. Clin Chem Lab Med. 237 p.

Rivière I., Sadelain M. (1997): Method for construction of removal vectors and the generation of high titer producers. In . Totowa, NJ. Gene therapy protocols: Method in modular biology. Humana Press. 590 p.

Robert N., Dunda BO., SchaeferRego KE. (2003): Sickle cell hemoglobin and its interactions with other variants haemoglobins and with thalassaemias. In: "Hemoglobinopathy diagnosis", B.J. Bain, Ed., Blackwell Pub., London. 880p.

Roberts W.L., Hedstrom D., Gulbranson R. (2003): The effect of increased fetal hemoglobin on 7 common Hb A1c assay methods. Clin Chem 58, 945 p.

Santin A., Renaud B. (2013) : Drépanocytose et complications aiguës, Maladies rares en médecine d'urgence. Paris, Springer-Verlag. 301 p.

Serge P. (2004) : Interrelations métaboliques Physiopathologique Érythrocytaire et Métabolisme Énergétique. 520 p.

Steinberg MH. (2006): Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. Trends PharmacolSci. 27(4). 204 p.

SYSMEX XT (2010) : Manuel of Automated Hematology Analyzer; Fluorescent Flow Cytometry Yields Optimized Productivity. Sysmex.70 p.

Terkia CR. (2008) : End stage renal disease in sickle cell disease: future directions. Postgrad Med. 775p.

Vaubourdolle M. (2007) : Toxicologie , Sciences mathématiques, Physiques et Chimique. 392 p.

Références Bibliographiques

Vinatier H. (2006) : Diagnostic biologique des hémoglobinoses. *Annales de Pédiatrie*. 32 (9) 789 p.

Wainsten J-P. (1990) : Dictionnaire Nouveau Larousse Médical. Librairie Larousse.

Wajeman H., Lantz B., Girot R. (1994) : Les maladies du globule rouge. 2^{ème} édition ; Paris : INSERM. 570 p.

Wajcman H., Riou J., Tapo AP. (2002): Globin chain analysis by reversed phase high performance liquid chromatography: recent developments. *Hemoglobin*; 950 p.

Wajcman H., Riou J. (2009): Globin chain analysis: an important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. *Clin Biochem* . 1802 p.

Weatherall DJ. (1999): « The thalassaemias », *BMJ*, vol. 314. 1675 p.

Weatherall DJ., Clegg JB. (2009): Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem , *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 79 . 704 p.

Zanella-Cleon I., Préhu C., Joly P., Riou J., Becchi M., Wajcman H., Francina A. (2009): Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in Cis in the beta-globin chain. *Hemoglobin 2009* ; 33(3). 177 p .

I. Rappels sur l'hémoglobine

I.1. Définition de l'hémoglobine

Hoppe-Seyler en 1862 a introduit le terme, hémoglobine pour désigner le pigment respiratoire du globule rouge. Chaque globule rouge contient de nombreuses molécules d'hémoglobine qui caractérise l'aspect moléculaire du globule rouge et est responsable de la fonction principale des globules rouges de l'organisme. C'est un hétéro-tétramère chez tous les vertébrés du monde vivant. A chaque stade d'évolution de la vie, cette protéine voit son contenu modifié au niveau de la nature des différentes chaînes qu'elle porte (Najman et al., 1994 ; Bernard et al., 1998).

I.2. Structure de la molécule d'Hb

L'hémoglobine humaine avec un poids moléculaire de 64500 daltons, possède quatre protomère (sous -unités) identiques deux à deux, les sous unités sont constitué de l'association d'une chaîne polypeptidique, la globine, et d'un groupement prosthétique, l'hème (Figure 01). Chaque complexe hème + globine forme une sous unité: les quatre sous-unités s'adaptent les unes aux autres pour former un tétraèdre = la molécule d'hémoglobine. (Najman et al., 1994 ; Vander et al., 2001).

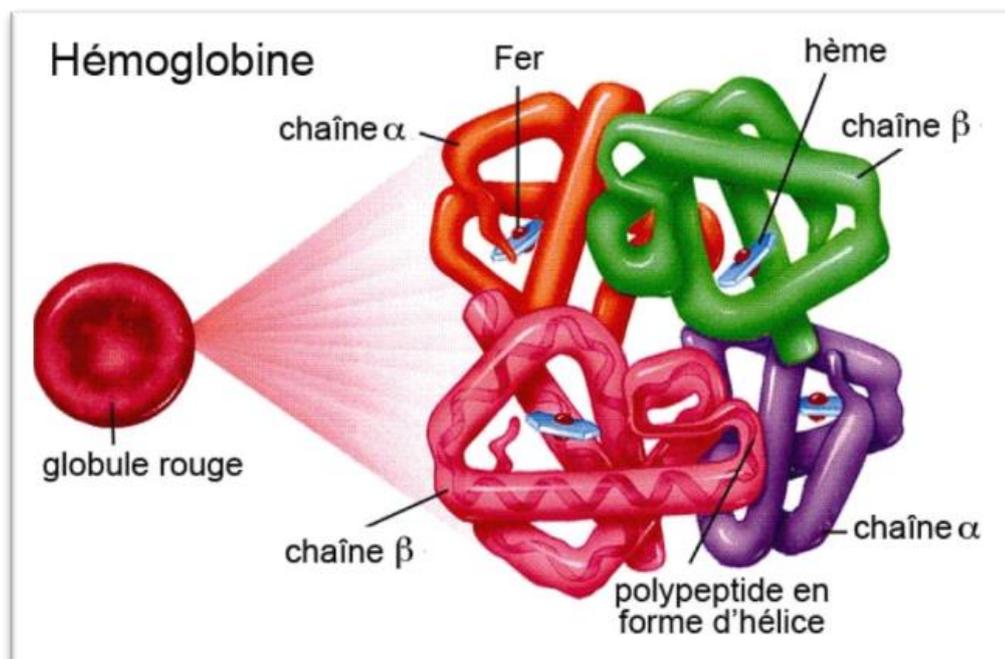


Figure (01) : Schémas de la molécule complète d'hémoglobine (Serge., 2004).

I.2.1. L'hème

L'hème est une protoporphyrine (quatre noyaux pyrroles unis par les ponts méthényles, à laquelle est lié un atome de fer à l'état ferreux en position centrale de l'hème (Figure02), qui se lie aux quatre atomes d'azote de la protoporphyrine, et de part et d'autre du plan de l'hème avec l'O₂ et avec l'un des acides aminés de la globine (Vaubourdolle., 2007).

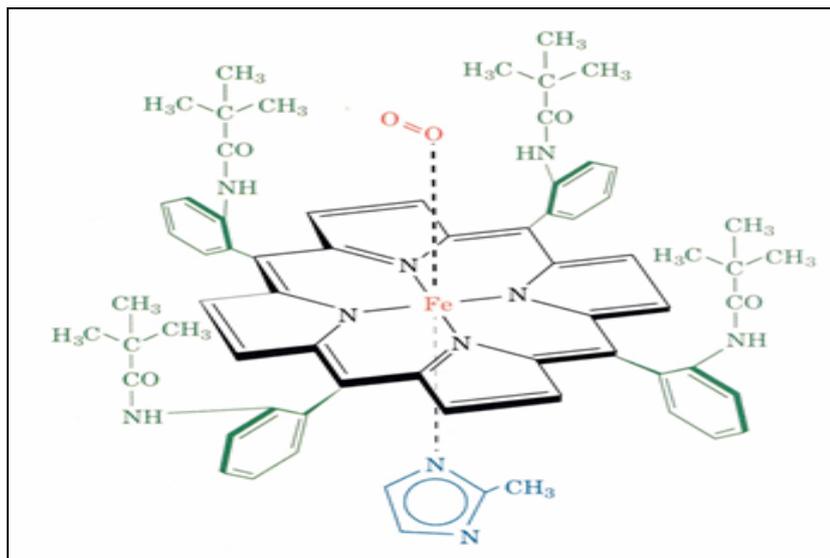


Figure (02) : L'hème dans l'oxyhémoglobine (Vaubourdolle., 2007).

I.2.2. La globine

C'est une protéine au sein de laquelle se positionne une molécule d'hème, dans une poche hydrophobe. Chaque globine est subdivisée en 8 zones (A à H), utiles pour positionner les anomalies moléculaires en pathologie (Rivière et Sadelain., 1997).

C'est un ensemble de quatre chaînes polypeptidiques, qui sont semblable deux à deux. Par exemple l'hémoglobine A est l'hémoglobine adulte, constituée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes bêta (Rivière et Sadelain., 1997).

Chaque chaîne c'est un polypeptide constituée d'acide aminé (144 AA pour la chaîne α et 146 AA pour la chaîne β) réunis par des liaisons peptidiques (Rivière et Sadelain., 1997).

Une chaîne ainsi formé s'enroule sur elle-même en spirale pour réaliser une structure secondaire en hélice. En fait l'hélice est discontinue, l'ensemble de la chaîne

formant 8 segments hélicoïdaux (A à H) et porte une crevasse entre hélice E et F où s'insère une molécule d'hème (**Rivière et Sadelain., 1997**).

Ces segments sont séparés par des courts segments non hélicoïdaux au niveau des quels se font des coupures pour donner à chaque chaîne sa forme définitive. Des liaisons de natures divers entre acides aminés mise en évidence en contact par des courbures de la molécule et la stabilisent (structures tertiaire) en fin la réunion de deux chaînes α et deux chaînes β forme une molécule symétrique globulaire (**Bernard et al., 1998**).

L'architecture de cette protéine globulaire compacte avec des dépressions, interface entre domaine et crevasses lui permet d'assurer ces fonctions dynamiques (Figure 03). La forme désoxygénée de l'hémoglobine présente une conformation T (tendue), la forme oxygénée avec une conformation R (relaxée) (**Rivière et Sadelain., 1997**)

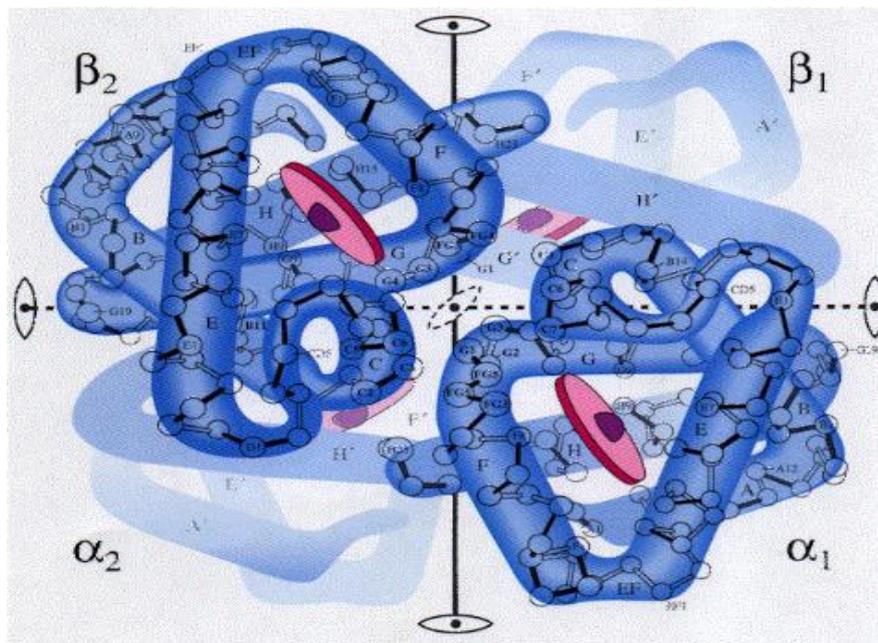


Figure (03) : Structure de la globine (**Vaubourdolle., 2007**).

I.3. Fonction de l'hémoglobine

Le rôle physiologique des globules rouges est en partie assuré par l'hémoglobine. L'hémoglobine fixe l'oxygène permettant ainsi son transport par le globule rouge au niveau des alvéoles pulmonaire vers les tissus de l'organisme. Mais elle facilite également l'élimination par le globule rouge du dioxyde de carbone des tissus aux poumons (**Labie et Elion., 2005**).

I.4. Les différents types de l'hémoglobine humaines

Il existe différentes variétés d'hémoglobines qui sont fonction des différents types de chaînes de globine synthétisées (Vinatier., 2006). Les monomères de globine sont deux types assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie : deux chaînes α (type ζ et α -globine) constituées chacune de 141 acides aminées et deux chaînes β (type ε , γ , δ et β -globine) composées de 146 acides aminées.

Selon Khadijetou (2013) , plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie , ces hémoglobines se distinguent par la nature de sous unités qui les constituent (figure 04)

I.4.1. Hémoglobines embryonnaires

On connaît quatre types d'hémoglobine embryonnaire chez l'homme dans le tableaux I.

Tableau I : Les différents types d'hémoglobine embryonnaire

Type d'Hb	Formule des chaînes de globine	Caractéristique
Hb Gower-1	$\zeta_2 \varepsilon_2$	Elle est relativement instable et se décompose facilement.
Hb Gower-2	$\alpha_2 \varepsilon_2$	Plus stable que la variante Gower-1, existe en petites quantités au cours de la vie embryonnaire et fœtale.
Hb Portland-1	$\zeta_2 \gamma_2$	est présente en faibles quantités au cours de la vie embryonnaire et fœtale.
Hb Portland-2	$\zeta_2 \beta_2$	Elle est encore plus instable que la variante Gower-1.

(Khadijetou., 2013)

I.4.2. Hémoglobine fœtale

L'hémoglobine fœtale **HbF**, de formule $\alpha_2\gamma_2$, remplace l'hémoglobine embryonnaire après 10 à 12 semaines de développement (figure 04). Elle constitue jusqu'à 95 % du sang du nouveau-né, et est progressivement remplacée par l'hémoglobine adulte HbA à partir du sixième mois suivant la naissance ; elle demeure cependant présente à l'état de traces chez l'adulte.

I.4.3. Hémoglobine Adulte

Chez l'adulte on retrouve :

- Hb A ($\alpha_2 \beta_2$) > 97 %
- Hb A2 ($\alpha_2 \delta_2$) 1 – 3 %
- Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) < 1 %

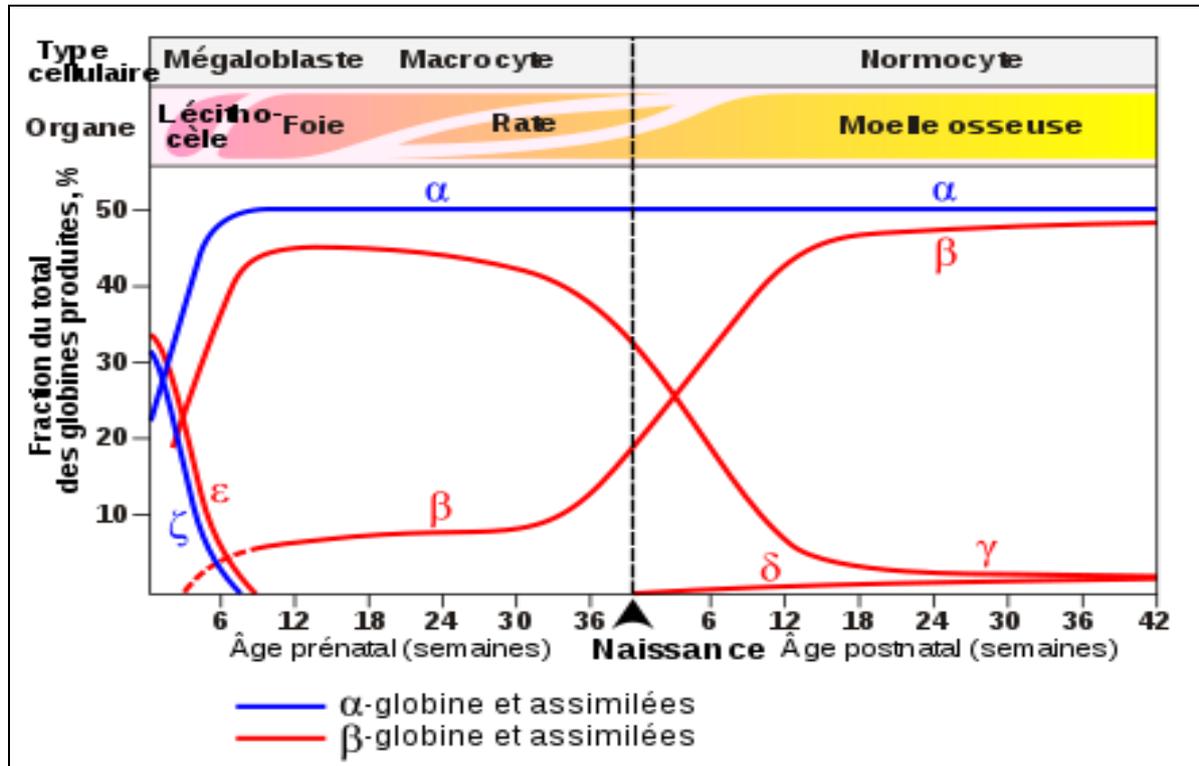


Figure (04) : Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines précédant et suivant la naissance (Rivière et Sadelain., 1997).

I.5. Les gènes de l'Hb

Les gènes de la globine dérivent tous d'un même gène ancestral qui codait pour une protéine de transport de l'oxygène. La duplication de gènes (800 millions d'années) a donné naissance à la myoglobine d'une part, protéine de stockage de l'O₂, et l'Hb d'autre part, protéine de transport de l'O₂ (Vinatier., 2006).

Les chaînes de type α correspondent à des chaînes polypeptidiques de 141 résidus dont la synthèse est sous le contrôle de gènes situés sur le chromosome 16. Les chaînes de type β

(auxquelles se rattachent les chaînes γ , δ et ε) comportent 146 résidus et dépendent de gènes situés sur le chromosome 11 (Vinatier., 2006).

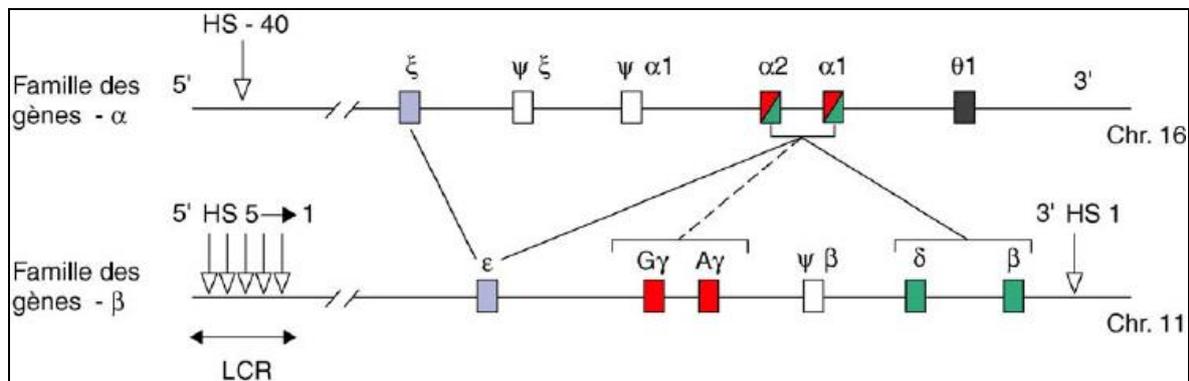


Figure (05) : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine (Rivière et Sadelain., 1997).

Les gènes sont organisés de 5`en 3` selon leurs ordre d`expression au cour du développement. Les gènes de globine comportent trois zones codantes (exon) séparés par deux zones non codantes (introns), ces introns débutent classiquement par une séquence GT et se terminent par une séquence AG (loi du Chambon) (Djamaa.,2012).

Les gènes α , β et ζ diffèrent considérablement par la taille des introns, un promoteur est situé en 5`de la région transcrite du gène, cette zone impliquée dans la fixation de l`ARN polymérase comporte la séquence ATA qui se situe à une trentaine de nucléotide du site codant pour la coiffe, localisée entre les nucléotides -70 à -80 et une séquence plus variable, située entre les nucléotides -80 et -100. Le gène γ possède entre les séquences -170 et -190 une région GATA fixant les facteurs de régulation érythroïde spécifique (khadijetou., 2013).

Il existent également des séquences activatrices (enhancers) et inhibitrices (silencers) régulant le niveau d`expression des gènes au cours de l`évolution. La séquence en 3`serait le signal de terminaison pour la polymérase ou un site de reconnaissance pour la polyadénylation (khadijetou., 2013).

II. La physiopathologie de l'hémoglobine

II.1. Types d'hémoglobinopathies

Selon **Diakite. (2005)** , les hémoglobinopathies sont de deux types :

✚ **Les anomalies qualitatives**, correspond à des anomalies de structure qui sont la conséquence d'une modification de la séquence de acides aminées de la globine. Elles conduisent à une hémoglobine anormale appelée «variant». les anomalies les plus fréquentes affectants les chaînes β , plus rarement les chaînes α , exceptionnellement les chaînes γ ou δ . La présence d'une Hb de structure anormale, entraînant ou non des signes fonctionnels.

✚ **Les anomalies quantitative**, correspond à un défaut de synthèse, partiel ou total des chaînes α et/ou β , qui s'exprime dans le groupe très hétérogène des thalassémies. Ce sont des pathologies différentes dans leur expression clinique et leur physiopathologie.

Néanmoins, il existe en réalité un certain chevauchement entre ces deux groupes puisque certaines Hb de structure anormale se comportent comme des variants thalassémiques. D'autre part, il n'est pas rare que les deux types d'anomalies soient présents chez un même individu (**Kutlar., 2007**).

Les hémoglobinopathies, qui étaient jusqu'à présent assez bien localisées dans certaines régions du monde, sont maintenant beaucoup plus dispersées du fait des migrations de populations (**Lubin et al., 1991**).

II.2. Les variants

Plus de 1000 variants sont aujourd'hui répertoriés dans la banque de données HbVar. Seuls 1/3 d'entre eux ont des répercussions cliniques, la mutation intervenant dans une zone critique pour le fonctionnement de la molécule. Quatre Hb anormales occupent une place prépondérante de par leur fréquence et leur caractère pathogène : HbS, HbE , HbD et HbC.

II.2.1. L'hémoglobine S ou la drépanocytose**II.2.1.1. Définition**

La drépanocytose est la plus fréquente des hémoglobinopathies, d'origine génétique, elle est due à une mutation sur le chromosome 11 du gène de la β -globine où l'acide glutamique en position 6 est substitué par une valine. Cette substitution, qui place un résidu d'acide aminé hydrophobe à la surface de la protéine, crée une zone d'adhérence qui favorise la précipitation de l'hémoglobine S en longs filaments qui allongent les érythrocytes en leur donnant une forme de faucille (*sicle* en anglais, d'où le « S » de cette variante), d'où le nom d'anémie falciforme également donnée à cette maladie, également appelée drépanocytose. Cette variation autosomique récessive rend l'Hb insoluble sous sa forme désoxygénée les chaînes insolubles cristallisent dans les érythrocytes en provoquant une déformation sous forme lame de faux (**Cotton., 2009**).

Selon **Cotton (2009)** on distingue cliniquement :

- La forme hétérozygote AS ou trait drépanocytaire qui est typiquement asymptomatique sur le plan clinique ;
- Les syndrome drépanocytaire majeurs (SDM) qui regroupent la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par l'association de l'Hb S à autre hémoglobinopathies (SC, S β thalassémie, ect....).

Cette pathologie hémolytique chronique est associée à un fond permanent de vaso-occlusion dont les poussées exposent les patients à des lésions ischémiques tissulaires 12 potentiellement graves avec parfois mise en jeu du pronostic vital. Si les sujets les plus gravement atteints sont les homozygotes S/S, l'expression de la maladie présente de grandes variations interindividuelles dans l'évolution de la pathologie (**Santin et Renaud., 2013**).

II.2.1.2. Épidémiologie

La drépanocytose est très répandue dans la race noire. Elle est considérée comme l'hémoglobinopathie la plus fréquente et concerne des millions de familles porteurs de traits drépanocytaires dans plusieurs dizaines de pays dans le monde. C'est un problème de santé publique (**Credos., 2005**).

Les principales régions à risque pour la drépanocytose sont certains départements d'outre-mer, tous les pays d'Afrique, l'Amérique du Sud (Bresil surtout), l'Amérique du Nord pour les sujets de race noire, l'océan indien et le pourtour Méditerranéen (**Santin et Renaud., 2013**).

II.2.1.3. Mode de transmission

Le drépanocytose est une affection génétique qui se transmet selon le mode autosomique récessif, car seuls les homozygotes sont considérés comme malades. Ainsi dans un couple de sujet hétérozygote AS, à chaque grossesse, la probabilité de naissance d'un enfant homozygote SS est de 25%, celle d'un homozygote AA de 25% et celle d'un hétérozygote AS de 50% (**Neel., 1979**).

II.2.1.4. Physiopathologie

L'anomalie initiale responsable de la drépanocytose est une transversion d'Adénine-thymine au niveau du 6ème codon du bêta-globine, traduite au niveau protéique par un ensemble d'interactions hydrophobes lors de la substitution Glu par Val en position 6 de cette chaîne. Le remplacement de l'acide glutamique neutre par un acide aminé apolaire hydrophobe la valine conduit à un changement de charge et de polarité induit à la surface de la molécule de l'hémoglobine S, modifie le rapport aussi bien entre les sous-unités de l'Hb qu'entre deux molécules d'Hb voisines. Cette substitution suffit donc pour rompre l'équilibre et amorcer une cristallisation en milieu désoxygéné. On observe alors une gélification du contenu cellulaire, des cristaux allongés en forme d'aiguille longue (figures 06) de 1 à 15 microns se forment, ce sont des tactoids (**Aguilar et al., 2010**).

Cette anomalie de structure est responsable de la polymérisation de l'hémoglobine S. Cette polymérisation aboutit à la formation de fibres protéiques plus ou moins organisées parallèlement au grand axe du globule rouge (**Aguilar et al., 2010**).

Cette phénomène ralenti par la présence d'hémoglobine fœtale (HbF) constitue la gélification de l'hémoglobine. Elle s'associe à une diminution de la solubilité sans altération de la déformabilité du globule rouge. La poursuite de ce processus jusque-là réversible conduit à la formation d'un réseau rigide dans le globule rouge ; qui se déforme perd sa

souplesse et se fragilise constituant ainsi les drépanocytes. Les facteurs qui déclenchent ce phénomène sont : l'hypoxie, la déshydratation, l'acidose, la fièvre, le froid (Françoise., 2004).

La polymérisation de l'Hb S dans sa forme désoxygénée est au centre de processus physiopathologique. Déformation, rigidification et fragilisation des globules rouges qui en résultent sont responsables de deux des grandes manifestations : crise vaso-occlusive douloureuse (Figure 06) et anémie hémolytique (Credos., 2005).

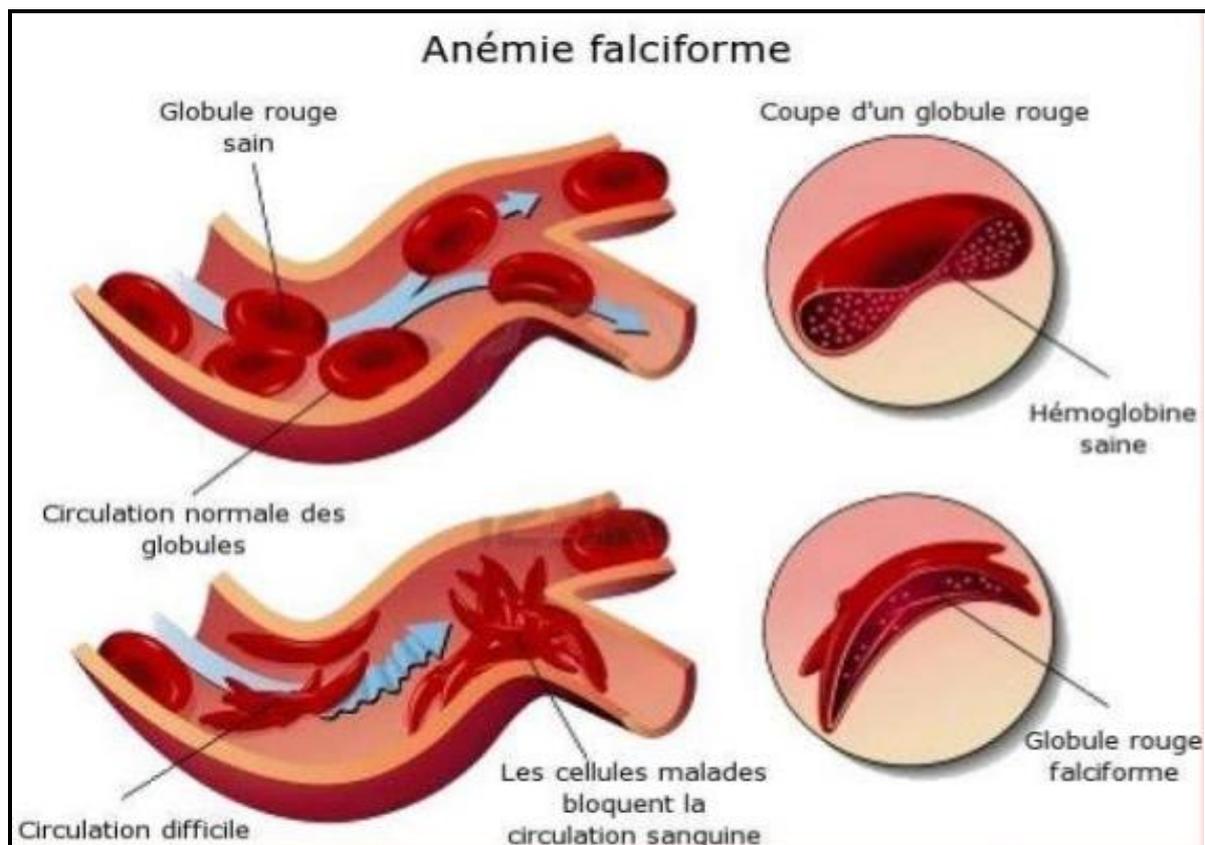


Figure (06) : Falciformation des globules rouges, perte d'élasticité et occlusion des vaisseaux de faible calibre (Lapie *et al.*, 2003).

II.2.1.5. Traitement de la drépanocytose

Les principaux traitements utilisés sont :

- A) La transfusion sanguine : elle permet de corriger le déficit quantitatif en transporteur d'oxygène que d'apporter des hématies déformable, et diminuer la proportion d'hémoglobine drépanocytaire afin d'éviter ou d'enrayer la falciformation (Françoise., 2004) ;

- B) La greffe de moelle osseuse (ou « greffe » de cellules souches hématopoïétiques) présente un pourcentage d'efficacité supérieur à 80% (**Redding et Knoll., 2006**) ;
- C) Les traitements pharmacologiques sont les plus fréquemment appliqués :
- Induction d'HbF: hémoglobine non polymérisant,
 - Modulation de la densité des érythrocytes et inhibition de la déshydratation ,
 - Inhibition du Co-transport K⁺- Cl⁻ (magnésium oral), et /ou du canal Gardos,
 - Inhibition de la perméabilité anionique; Inhibition des flux induits par la désoxygénation (**Redding et Knoll., 2006**).

II. 2.2. L'hémoglobine C

C'est le deuxième variant d'hémoglobine le plus fréquemment rencontré dans le monde, qui correspond à une substitution du résidu de glutamate en position 6 par un résidu de lysine de la chaîne β -globine . Le premier possède une chaîne latérale courte et chargée négativement, tandis que le second possède une chaîne latérale longue chargée positivement, ce qui affecte la plasticité générale des érythrocytes. Cette anomalie provoque la formation des cristaux intra-érythrocytaire qui sont responsables d'une augmentation de la densité du globule rouge et sa déshydratation (**Giro et al., 2003**).

Les hétérozygotes comptent de 28 % à 44 % d'hémoglobine C, ce qui demeure asymptomatique, tandis que les homozygotes comptent 100 % d'hémoglobine C, ce qui provoque une anémie hémolytique (**Steinberg., 2006**).

Le gène de l'hémoglobine C'est surtout présent en Afrique de l'Ouest, où il peut présenter un avantage préventif contre le paludisme à l'instar d'autres hémoglobinopathies, ainsi qu'en Europe du Sud, en Amérique latine et dans les Caraïbes (**OMS, 2011**).

II.2.3. L'hémoglobine D

L'hémoglobine D est due à une substitution de l'acide glutamique dans la position 121^{ème} de la chaîne β par une glutamine (glu→gln). Il s'agit d'une maladie génétique ubiquitaire, toute fois on le rencontre surtout dans le sous-continent indien (fréquence du gène 2-3 %). Sa transmission génétique est autosomique récessive (**Belhadi., 2010**).

À l'état hétérozygote AD , une absence d'anomalie clinique (mais nombreuses hématies en cible : 25 à 40% d'Hb D).

Chez l'homozygotie : parfois une anémie légèrement hémolytique , parfois discrète microcytose avec nombreuse hématies en cible (Hb D > 95%) (**Robert et al., 2003**).

Son importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite β^S/β^D -Punjab qui favorise les propriétés de polymérisation de l'Hb S, et la composite de le double hétérozygote D / β Thal: la microcytose est plus nette ; l'Hb A2 est augmentée et l'Hb F est > 10% (**Steinberg., 2006**).

II.2.4 . L'hémoglobine E

L'Hb E est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 26 est remplacé par une lysine. L'Hb E est considéré comme la seconde hémoglobinopathie dans le monde après l'Hb S. Cette hémoglobine est parfois classée parmi les hémoglobinopathies thalassémiques (**Couque et Demotalemenbrt., 2003**).

La localisation géographique : Asie du sud-est (Thaïlande, Cambodge, Laos ; jusqu'à 35% de la population est porteuse) : 30 à 50 millions d'individus porteurs (**OMS., 2011**).

La mutation ponctuelle à l'origine de ce variant présente une propriété : d'une part, elle est responsable d'une substitution faux sens créant un mutant de surface ; d'autre part, elle crée un site cryptique d'épissage partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARNm vers la maturation anormale au dépend de la production d'ARN m normale .La substitution n'affecte pas la fonction d'hémoglobine, mais la diminution d'ARNm normale conduit à un défaut où constitue un déficit de production de β -globine normale, ce qui conduit à une bêta thalassémie . De plus, les sous-unités β^E interagissent moins fortement avec les sous-unités α , ce qui rend les molécules d'hémoglobine E moins stables en présence d'oxydants donc un défaut thalassémique (**Couque et Demotalemenbrt., 2003**).

II.3. Les thalassémies

Les thalassémies sont un groupe hétérogène d'affections génétiques touchant la synthèse de l'hémoglobine et provoquant une diminution de la production de l'une ou plusieurs chaînes de globine (α , β , γ , δ), elles se distinguent en thalassémie α , β , $\delta\beta$ ou $\gamma\delta\beta$,

selon le type de chaîne produite en quantité insuffisante. Du point de vue de la santé publique, seulement les α et β thalassémies sont importantes (**Weatherall et Clegg., 2001**).

Lorsque la synthèse des chaînes de globine est nulle, les thalassémies seront appelées α^0 et β^0 , tandis que celle où persiste un certain degré de synthèse de globine sont appelées α^+ et β^+ (**Géorges.,1996**).

II.3.1. Les β -thalassémies

Les β -thalassémies sont très fréquentes dans une large région qui englobe le bassin méditerranéen, l'Afrique, le Moyen-Orient, le sous-continent indien, le sud-est asiatique. La fréquence de l'anomalie varie de 1 à 20 % dans ces régions. La présence d'un gène thalassémique assure un certain degré de protection contre le paludisme, ce qui explique cette large répartition (**OMS., 2011**).

Ils sont la conséquence d'un défaut congénitale de la synthèse des chaînes β sur le chromosome 11. Ce sont hritées selon le mode autosomique récessif, les parents d'enfant atteint sont obligatoirement hétérozygote et porteur d'une seule copie d'une mutation β -globine (**Djamâa., 2012**).

Dans les β -thalassémies, le défaut de chaînes β est responsable d'un excès de chaînes α , incapables de s'associer entre elles et extrêmement instables. Elles sont responsables d'une érythropoïèse inefficace. C'est le déséquilibre de synthèse entre chaînes qui augmente de façon croissante la sévérité du phénotype. Les modificateurs secondaires du phénotype sont les autres gènes de globine dont l'expression interagit avec celle du gène β anormal (**Djamâa., 2012**).

II.3.2. Les α -thalassémies

Les alpha-thalassémies se caractérisent par une insuffisance de la synthèse ou la délétion d'un ou de plusieurs des quatre gènes α -globines. Elles affectent donc la synthèse des trois sortes d'hémoglobine : HbA, HbA2 et HbF, puisque toutes contiennent la chaîne alpha ; dans ces cas la vie n'est possible que grâce à la formation de quantités importantes d'hémoglobines anormales. Ce sont hritées selon le mode autosomique récessif (**Weatherall., 1999**).

Les alpha-thalassémies sont particulièrement fréquentes en Asie du Sud Est et en Chine. Leur prévalence peut atteindre 30 à 40 % en Thaïlande et au Laos. Elles sont fréquentes en Afrique équatoriale (OMS., 2011).

Le sujet normal a deux gènes alpha sur chaque chromosome 16, donc quatre gènes alpha fonctionnels. La plupart des alpha-thalassémies sont expliquées par des délétions d'un ou de deux gènes alpha. L'inactivation d'un, deux, trois ou quatre gènes alpha va se traduire par des tableaux cliniques différents (Bernini., 2001).

En l'absence de quelque production d' α -globine que ce soit, ces fœtus sont entièrement incapables de produire de l'hémoglobine fœtale (HbF) ou adulte (HbA); ils ne peuvent produire que des hémoglobines embryonnaires, lesquelles ne peuvent généralement pas soutenir la vie au-delà du troisième trimestre (Galacteros., 2000).

II.4. Autres hémoglobinopathies

Il existe des hémoglobinopathies hétérozygotes dites composites, où le sujet atteint est aussi hétérozygote pour une autre maladie de l'hémoglobine. Ces formes hétérozygotes composites sont considérées comme des formes majeures mais se manifestant plus tardivement (vers l'âge adulte) que les formes homozygotes (Monplaisir et al., 1986).

On peut citer des exemples comme la composite des hétérozygotes S/C qui est l'hémoglobinopathie la plus répandue après la drépanocytose SS, les thalasso-drépanocytaire (S/ β ou α - thal), les composites thalassémiques, l'hétérozygotie D/ β ou α - thalassémie...ect (Monplaisir et al., 1986).

II.6. Diagnostic biologique d'une hémoglobinopathie

Une anomalie de l'hémoglobine peut être recherchée selon les signes clinico-biologiques, le plus souvent une anémie (par extension devant une pâleur, un ictère, une hépato-splénomégalie, une asthénie, un essoufflement, des acouphènes, des vertiges). Elles peuvent aussi être recherchées en raison de la constatation d'éléments purement biologiques come une hémolyse ou une microcytose. Elle peut enfin être demandée lors une enquête familiale ou du dépistage systématique chez une personne appartenant à une ethnie dite « à risque »(Afrique sub-Saharienne, Afrique du nord , Bassin méditerranéen, Antilles, Asie, Moyen-Orient et Proche Orient), ou encore dans le contexte anesthésique, anténatal, pré-

greffe... Enfin, il peut s'agir d'un test de confirmation d'un dépistage néonatale (Couque et Demaontalembert ., 2013).

Selon la NABM (Nomenclature des Actes de Biologie Médicale), « un bilan standard pour la recherche d'une hémoglobine anormale » doit inclure 3 tests phénotypiques distincts, dont au moins une technique électrophorétique avec interprétation . Les techniques utilisées sont, soit séparatives permettant de différencier les hémoglobines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (électrophorèse et chromatographie), soit non séparatives, mais mettant en évidence des propriétés spécifiques : test Itano, recherche de corps de Heinz, test de précipitation à l'isopropanol, spectrophotométrie pour la méthémoglobine, courbe de dissociation de l'oxygène,...(Wajcman *et al.*, 2002).

III. Les techniques d'étude biologique de l'hémoglobine

III.1 Les techniques d'étude séparatives

III.1.1. L'électrophorèse

L'électrophorèse sépare les hémoglobines en fonction de leur différence de charge dans un champ électrique.

◆ L'électrophorèse capillaire (EC)

C'est une technique d'électrophorèse liquide plus récemment développée pour l'étude de l'hémoglobine. Contrairement aux techniques citées ci-dessus, la migration se fait dans un capillaire de silice avec un tampon alcalin soumis à un haut voltage. Suite à l'injection de l'hémolysat dans le système et à l'application du courant électrique, les différentes fractions d'hémoglobines se séparent en fonction de leur mobilité électrophorétique (donc de leur charge) mais aussi en fonction du courant d'électro-endosmose (donc de leur rapport charge/masse). Les hauts voltages appliqués permettent une séparation rapide et sensible des différentes fractions. L'ordre de séparation est équivalent à celui observé pour l'électrophorèse sur gel à pH alcalin. La détection s'effectue par spectrophotométrie à 415 nm (maximum d'absorption de l'oxyhémoglobine). Un électrophorégramme (Figure 07) est alors généré avec les différents fractions d'hémoglobines « normales » (HbA, HbF, HbA2) et les fractions « anormales » de mutants caractérisés de façon présomptive en fonction de leur

position relative dans des zones spécifiques : HbS, HbC, HbE, HbO-Arab, HbD-Punjab... . Une quantification relative des différentes fractions est réalisée (Cotton *et al.*, 2009).

Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, reproductible et quantitative, avec des tracés simples à interpréter (Cotton *et al.*, 2009).

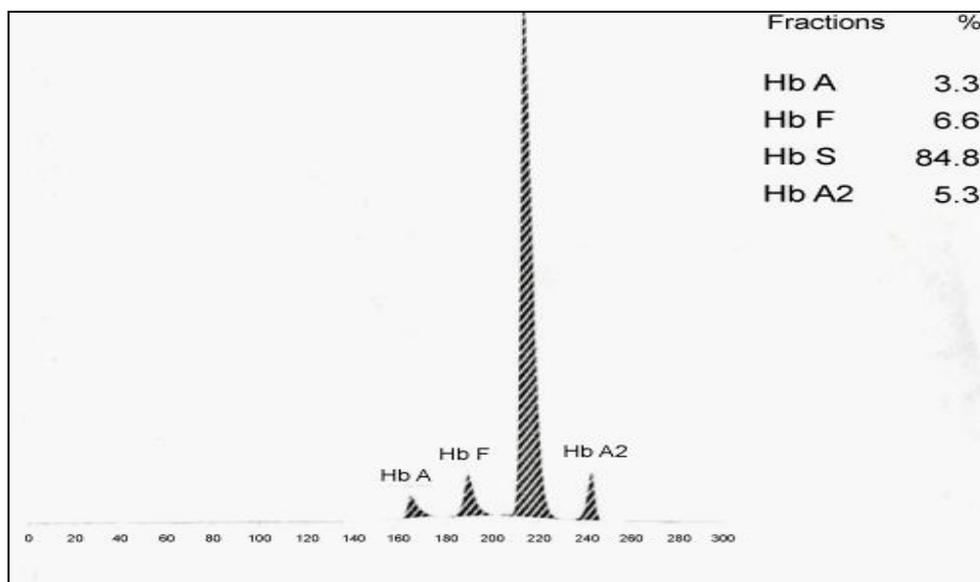


Figure (07) : Électrophorèse de l'hémoglobine (zone capillaire) montrant la drépanocytose homozygote (Cotton *et al.*, 2009).

III. 1.2. La chromatographie

◆ La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La méthode reposant sur la charge électrique les plus courantes permettant de mesurer l'HbA1c. Par conséquent, la séparation est uniquement possible si la molécule cible a une charge électrique différente par rapport aux autres composants de l'échantillon (Sang totale).

Elle sépare les différentes fractions d'hémoglobines en fonction de la force de leurs interactions ioniques sur une colonne échangeuse de cations. Les molécules d'hémoglobine chargées positivement dans le tampon utilisé interagissent avec la colonne chargée négativement (résidu carboxyl greffé sur une résine). Suite à l'injection d'un gradient de tampon de haute force ionique, les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées au fur et à mesure que la force ionique du tampon devient supérieure à leur interaction avec la colonne.

Les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées à un temps donné qui est caractéristique: c'est le temps de rétention. La détection est spectrophotométrie et s'effectue à 415 nm.

Les différents pics obtenus sont donc reconnus en fonction du temps de rétention : les hémoglobines normalement présentes (HbA, HbA2, HbF), ainsi que les variants d'hémoglobine les plus fréquents, sont reconnus de façon pré-somptive, avec séparation des HbS, HbC, HbE et HbD-Punjab; les variants dont le temps de rétention n'est pas répertorié par le fournisseur sont dits « unknown » (Riou *et al.*, 2005).

Cette technique est automatisée, rapide, reproductible et quantitative. La validation des profils obtenus par CLPH repose sur un certain nombre de critères : ligne de base droite, aire totale dans les limites préconisées, temps de rétention attendus respectés (par rapport aux données fournisseur), pics bien symétriques, absence de contamination (présence d'extra-pics) (Wajcman *et al.*, 2009).

III.1.3. La spectrophotométrie

La spectrophotométrie de masse ; technique permet la séparation de différents fragments protéiques de masses différentes. La révélation d'une chaîne de globine avec une masse « anormale » et le calcul de la différence de masse permet d'en déduire l'acide aminé impliqué. Cette technique peut être couplée à des digestions enzymatiques préalables, qui permettent une précision plus importante de masse .

Cette technique permet la séparation de différents fragments protéiques de masses différentes. La révélation d'une chaîne de globine avec une masse « anormale » et le calcul de la différence de masse permet d'en déduire l'acide aminé impliqué. Cette technique peut être couplée à des digestions enzymatiques préalables, qui permettent une précision plus importante (Zanella *et al.*, 2009).

III.2. Les techniques d'étude non séparatives

En condition de désoxygénation, l'hémoglobine S polymérise en longues fibres entraînant une rigidification et une déformation de l'hématie en forme de faucille (Figure 08).

◆ **Le test Itano** est essentiel pour confirmer la présence d'HbS entrepose sur le principe que seule l'HbS désoxygénée précipite en milieu réduit . C'est une technique manuelle facile

à mettre en œuvre et rapide (< 10 minutes) mais qui utilise des réactifs « maison » (Bardakdjian *et al.*, 2003).

◆ **Le test de falciformation** de Emmel est une alternative au test Itano. C'est également une technique manuelle qui met en évidence les drépanocytes sur une lame lorsque le frottis est mis en condition hypoxique. Elle nécessite plus de temps (45 minutes) et présente les mêmes risques de faux négatifs que le test Itano quand le taux d'HbS est trop faible (Bardakdjian *et al.*, 2003).

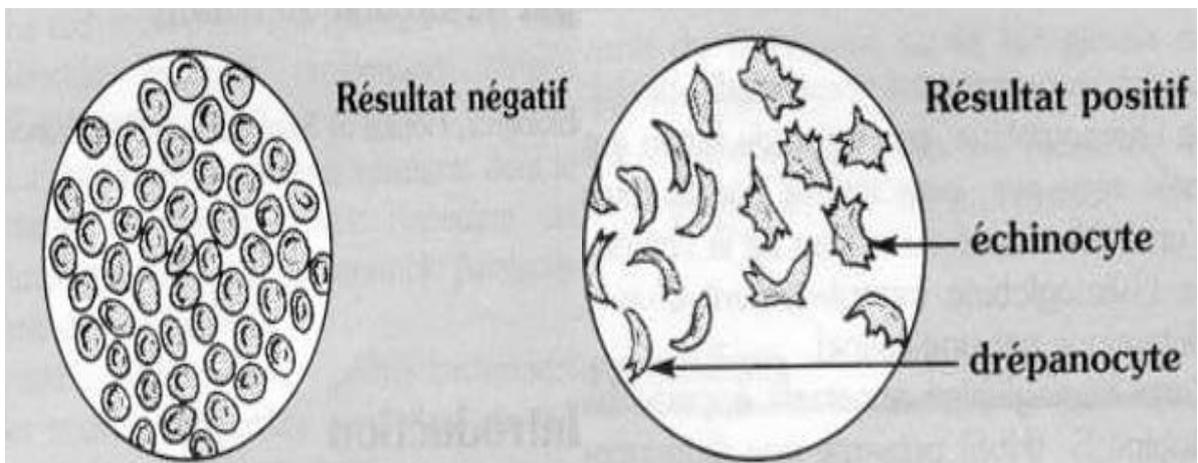


Figure (09) : Schémas comparatif des résultats positif (à droite) et négatif (à gauche) de teste falciformation sur microscope optique (Baledent., 2000).

INTRODUCTION

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIEL ET METHODES

RESULTATS ET DISCUSSION¹

CONCLUSION¹

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

L'étude s'est déroulée au niveau du service de laboratoire d'Analyse Médicale BIO-GROUPE de Ouled Slama ce laboratoire comporte plusieurs unités à savoir : la biochimie où nous avons effectué l'électrophorèse de l'hémoglobine, et l'hématologie où le test de falciformation et l'hémogramme ont été réalisés.

Cette étude a été complétée par une enquête rétrospective et perspective, de la période début Janvier 2017 jusqu'à la fin Avril 2017, Sur une population des adultes (+ de 15 ans) de 17000 sujets , nous avons trouvé 400 sujets atteintes des hémoglobinopathies.

L'objectif de cette étude est d'une part : la détection et la caractérisation des anomalies de l'hémoglobine, et d'autre part : la réalisation d'une enquête génétique, à la recherche de cas familiaux.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons utilisé des échantillons sanguin. Le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction veineuse et le sang a été recueilli dans des tubes EDTA et dans des tubes secs, le test de falciformation et l'hémogramme ont été réalisés dans les meilleurs délais avec le sang recueilli sur EDTA.

I.2. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel composé de appareillages, les milieux de cultures, réactifs et solutions sont énumérés au niveau d'annexe I .

II. Méthodologies de travail

II.1. L'hémogramme

II.1.1. Numération Formule Sanguine NFS

L'hémogramme est l'examen biologique le plus prescrit dans toutes pathologies confondues. Il apporte des informations sur les cellules du sang contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme: oxygénation des tissus, défense de l'organisme contre les agents

pathogènes, prévention de risque hémorragique. Le sang est recueilli dans des tubes EDTA et la lecture effectuée au multi paramètres (18 paramètres) le jour même de prélèvement sur un compteur automatique de type SYSMEX XT 4000 (Annexe I) selon l'ISO 22870. C'est un appareil qui permet la numération des éléments figurés du sang par impédance, la mesure du taux d'hémoglobine par **spectrophotométrie**, le calcul des constantes érythrocytaires avec des alarmes pour tous les paramètres (globules rouges, globules blancs et de plaquettes), afin de rechercher une anémie, une microcytose ou une pseudo-polyglobulie.

II.1.1.1. Principe selon SYSMEX XT (2010)

L'appareil aspire 30 µl de sang total bien homogénéisé à partir d'un tube de prélèvement ouvert et maintenu au contact de la sonde d'aspiration. Un volume de 7,5 ml de diluant est ajouté dans la cuve de pré mixage pour atteindre un rapport de dilution 1/251

L'échantillon dilué est alors divisé en deux parties distinctes :

- 100 µl de l'échantillon dilué sont mélangés avec 5 ml de diluant pour l'analyse des paramètres érythrocytaires et plaquettaires.
- Le reste est mélangé avec 1 ml de réactif de lyse dans la chambre de mélange pour les globules blancs. Ce réactif altère les membranes des globules rouges et permet la libération de l'hémoglobine. Cette dilution est utilisée pour mesurer les globules blancs ainsi que le taux d'hémoglobine.

L'impédance électrique est utilisée pour effectuer le comptage des globules. Dès qu'une cellule se présente devant l'ouverture, une modification de la résistance électrique se produit, ce qui a pour effet de générer un pic de tension équivalent. Le nombre de pics correspond au nombre de cellules. L'amplitude de chaque pic, est directement proportionnelle au volume de la cellule qui lui a donné naissance.

Le XT 4000 mesure l'hémoglobine par spectrophotométrie. La longueur d'onde de la source lumineuse est de 540 nm.

L'hématocrite, la CCMH et la TCMH sont calculés dès que les paramètres concernés sont mesurés :

- Hématocrite = Volume Globulaire Moyen \times nombre de globules rouges.
- CCMH = hémoglobine / hématocrite.
- TCMH = hémoglobine / nombre de globules rouges.

II.1.2. Frottis sanguin

II.1.2.1.Principe

Une goutte de sang totale est utilisée pour réaliser un frottis coloré par une technique de coloration rapide (variante de la coloration de May-Grünwald et Giemsa) de façon à observer au microscope pour simplifier la lecture des éléments figurés du sang, afin de déterminer s'il y a présence d'anomalies, l'aspect ou le nombre de cellules (**Carrell, 1972**).

II.1.2.2. Protocole selon Carrell (1972) (Annex II)

Nous avons déposé la plus petite goutte de sang possible à l'extrémité d'une lame en verre avec une pipette et nous avons fait glisser la lamelle maintenue à 45° sur tout le long de la lame pour étaler uniformément la goutte de façon à ce que le sang s'étale sous la lamelle par capillarité, puis nous avons fait séché la lame en l'agitant dans l'air avec la fixation de la goutte étalée par le trempage 5 fois de suite pendant une seconde dans le fixateur avec l'égouttage de ce dernier sur papier filtre.

Ensuite nous sommes passé à la fixation et la coloration rapide de cette lame (appelée KIT RAL 555) qui a été réalisée en 2 étapes : la première par le trempage de la lame 5 fois de suite pendant une seconde dans le fixateur et le colorant de May-Grünwald ; puis 5 fois de suite pendant une seconde dans le deuxième colorant (Giemsa).

En fin nous avons bien égoutté la lamelle colorée sur un papier filtre et la rincer à l'eau distillée en commençant par enlever l'excès de colorant sur le dos de la lame puis en laissant couler doucement l'eau distillée sur le frottis.

La lecture de cet frottis est réalisée sous microscope optique à l'objectif 100 sous huile à immersion ou bien une visionneuse automatique appelé CELLAVISION (voir Annexe D).

II .2. Le test de falciformation**II.2.1. Principe du test**

En l'absence d'oxygène, les hématies ayant l'HbS prennent la forme de faucille ainsi ce test consiste à créer un milieu pauvre en oxygène qui consiste à provoquer entre la lame et la lamelle de microscope une désoxygénation (réduction de l'oxygène) totale de l'échantillon de sang à examiner : l'HbS se polymérise alors sous la forme de cristaux insolubles allongés qui déforment les hématies. Cette déformation est facilement observable au microscope, à grossissement x40 ou x100.

II.2.2. Techniques

Selon **Merault et al. (1996)**, deux (02) méthodes sont possibles, avec ou sans réactif du métabisulfite (Annexe II).

Dans tous les cas il faut manipuler rapidement pour éviter l'oxygénation du sang.

A) Avec réactif , la métabisulfite (substance réductrice)

C'est une technique plus rapide et plus fiable mais nécessitant ce réactif, la solution du métabisulfite de sodium ($S_2O_5Na_2$) à 2 % (2 grammes pour 100 ml) dans l'eau : dissoudre 40 mg de métabisulfite de Na dans 2 ml d'eau ou 100 mg dans 5 ml d'eau.

À l'aide d'une pipette, nous avons mis une goutte de sang (environ 5 μ l) sur une lame et nous avons mélangé cette goutte sanguine avec une autre goutte d'une solution réductrice (20 μ l métabisulfite de sodium) qui consomme l'oxygène du milieu. Ceci entraîne la cristallisation de l'Hb et la falciformation. En suite la moitié du mélange est aspirés puis la lame est couvrirs rapidement par une lamelle sans faire de bulles d'air.

Une fois que la lame est prête, elle est incubée dans une petite chambre humide pendant 30 mn avant la lecture au microscope optique.

Si le résultat est négatif, il faut examiner de nouveau 2 h plus tard.

S'il est encore négatif, de préférence luter la lamelle avec du vernis à ongle, puis examiner 24 h plus tard.

B) Sans réactif, avec paraffine

Cette technique est plus lente, moins fiable (faux négatifs) mais moins cher.

Nous avons mis une petite goutte de sang (5 µl) sur une lame avec une goutte environ 4 fois plus grosse (environ 20 µl) de sérum physiologique juste à côté ou dessus (eau avec 9g/l de sel), et nous avons mélangé rapidement mais soigneusement puis nous avons aspiré environ la moitié du liquide.

Ensuite nous avons couvré rapidement cette lame à l'aide d'une lamelle sans faire aucune bulle d'air et nous avons mis de la paraffine aux bordure de la lamelle pour que l'oxygène ne puisse absolument pas pénétrer.

La lecture de cette lame est effectuée sur un microscope optique après 1 heure puis à 2, 6 et 24 heures si on n'a pas vu d'hématies falciformes.

II.2.3. Interprétation des résultats

Le test est négatif si les hématies gardent leur forme ronde. Si le test est positif, les hématies prennent progressivement une forme de faucille ou de banane, souvent aussi en forme de feuille de houx. Il est recommandé d'examiner plusieurs zones de préparation car la falciformation ne s'effectue pas de façon homogène (**Baledent., 2000**).

II.3. La Chromatographie liquide haute performance (HPLC)**II.3.1. Principe**

Cette technique est effectuée selon la directive européenne **98/79/EC**, sur l'automate Arckray Adams HA 8180 (Annexe I), qui a du principe de pousser l'échantillon sanguin par un liquide sur une colonne échangeuse de cations, et permettre à les molécules d'être séparées en fonction de leurs charges électriques.

Cet automate est relié à un système d'intégration et de calcul et la séparation des fraction d'hémoglobine a optimisée pour éliminer des interférences des variants (HbS, HbC, HbD, HbE), d'HbA1c, HbF, via un détecteur avec les rayons UV à 415 nm (**ADAMS® A1c HA-8180V, 2006**).

Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La

combinaison de ces attributs de rapidité et résolution élevées qui conduit à l'appellation « haute performance » (Farce., 2000).

II.3.2. Interprétation des résultats

L'instrument imprime automatiquement une liste des résultats de mesure à la fine d'un lot de mesure sur un papier thermique (figure 10) qui contient tout le informations nécessaire pour identifier le profil de chaque patient (position de tube dans le portoir, date et heure de la mesure, ID de patient, etc....) (Annexe II) (ADAMS ® A1c HA-8180V, 2006).

Les résultats de la mesure sont exprimé par les 2 unités de valeur international : NGSP (%) et IFCC (mmol/mol) pour chaque fraction d'hémoglobine (les variants, HbA1c HbF ...)(ADAMS ® A1c HA-8180V).

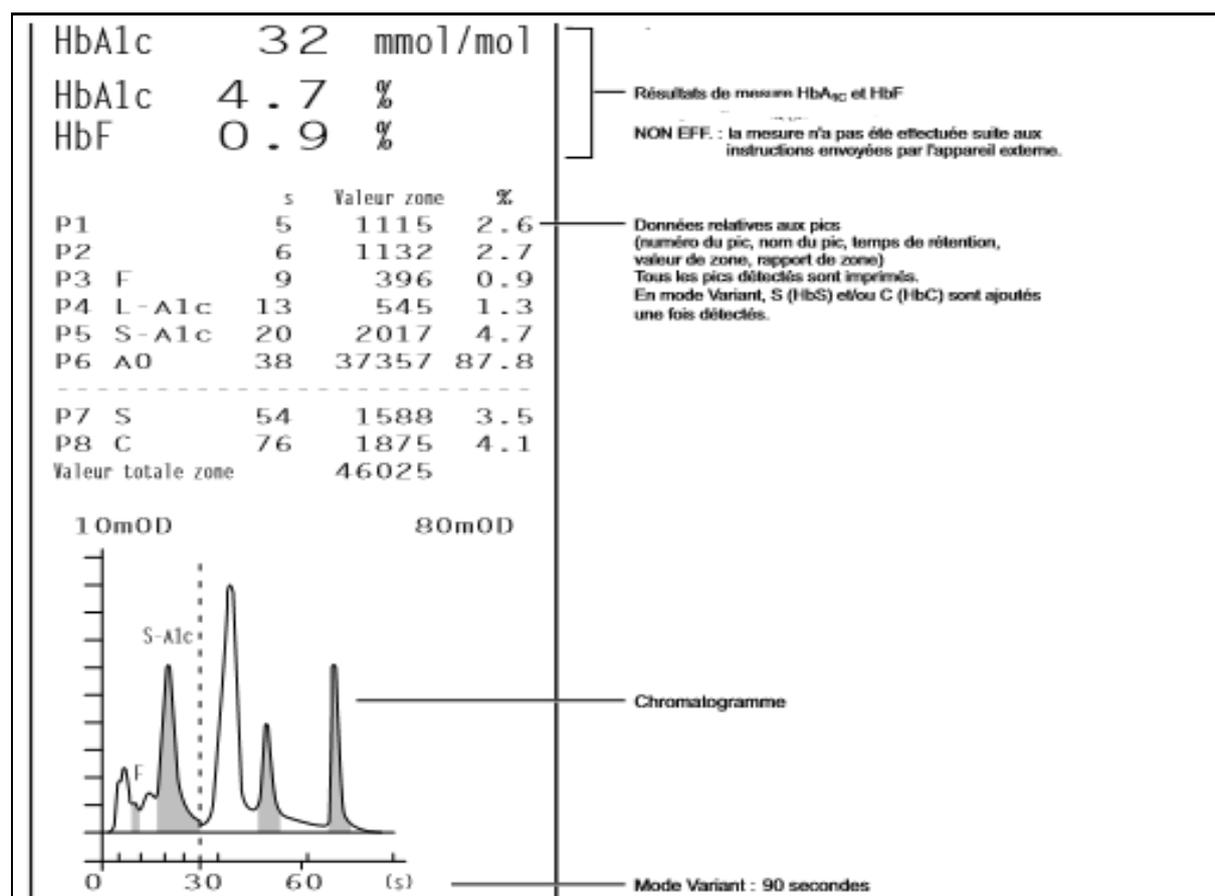


Figure (10) : Profil des différents fractions de l'hémoglobine par l'HPLC avec leurs rapports (pics) sur le chromatogramme (Originale).

Les données sont relatives aux pics (numéro de pic, nom du pic, temps de rétention, valeur de zone). Les principaux variants (HbS, HbC, HbD et HbE) sont présentés sous forme des pics qui sont relatif a les données précédentes dans le chromatogramme(ADAMS ® A1c HA-8180V, 2006).

II.4. L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine

II.4.1. Principe

Cet examen de laboratoire biologique permet d'isoler les différentes formes d'hémoglobines, qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et, partant, de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre , et des voltages élevés (15 à 30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption U.V, fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible. Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée (**Guis et al ., 2013**).

L'automate CAPILARYS 2 Flex Piercing- SEBIA (Annexe I) sépare toutes les fractions de l'Hb par électrophorèse capillaire et quantification par spectrophotométrie à 415nm.

II.4.2. Échantillons analysés

L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine par « Capillarys 2 Flex Piercing » se fait sur culot globulaire obtenu à partir de sang frais prélevé sur anticoagulant EDTA. La préparation du culot globulaire est réalisée par centrifugation du tube de sang total pendant 5 minutes à 5000 tr/min, élimination du maximum de plasma, lavage des globules rouges par de l'eau physiologique à deux reprises et élimination de l'excès d'eau physiologique à la surface du culot globulaire lavé. Il existe un système de « cap piercing » permettant l'analyse en sang total,. Les échantillons de sang total peuvent être conservés au maximum 7 jours entre 2 et 8°C, puisqu'au-delà de ce délai, la dégradation des hémoglobines dans l'échantillon risque d'être trop importante. Dans un échantillon conservé plus de 7 jours à 4°C, certaines fractions liées à une dégradation de l'échantillon apparaissent., d'où l'importance du respect de la procédure pré-analytique (**Guis et al ., 2013**).

II.4.3. Technique analytique

La méthode d'électrophorèse capillaire Sebia fait intervenir plusieurs étapes. Tout d'abord, les tubes primaires contenant les culots globulaires préparés précédemment sont placés sur les racks en positions 1 à 10. Les tubes doivent être débouchés et les codes-barres placés face à la fenêtre de lecture, l'automate procède à la lecture des codes-barres des tubes primaires échantillons et du racks . Les échantillons sont ensuite hémolysés et dilués par la solution hémolysante dans les cupules réactif, avec rinçage de l'aiguille de prélèvement entre chaque dilution. Un lavage des capillaires a lieu avant injection des échantillons hémolysés dans ces capillaires, l'injection s'effectuant à l'anode par aspiration. Les différentes fractions d'hémoglobine migrent alors dans les capillaires en milieu basique (pH 9,4), permettant leur séparation et leur détection directe à la cathode. La migration, qui dure environ 8 minutes, se fait à voltage constant élevé (plusieurs milliers de volts) et à température régulée par effet Peltier. La lecture des différents pics d'hémoglobine est réalisée à 415 nm, correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'hémoglobine. Toutes ces étapes aboutissent à l'obtention de tracés ou profils électrophorétiques qui seront ensuite interprétés par le biologiste (**Guis et al ., 2013**).

II.4.4. Interprétation des profils électrophorétiques

À la fin de l'analyse, les profils électrophorétiques s'affichent sur le logiciel Phoresis® fourni par la société Sebia, où ils font l'objet d'une interprétation visuelle à la recherche d'éventuelles anomalies. Une quantification relative des différentes fractions de l'hémoglobine est automatiquement réalisée. Afin de faciliter l'interprétation des profils électrophorétiques, le pic d'hémoglobine A est positionné au centre de la fenêtre de reprise. Les pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C sont identifiés de façon automatique. Les positions des autres variants de l'hémoglobine sont repérées à l'écran au sein de zones allant de Z1 à Z15 (Figure 11) . Une liste des variants connus potentiellement présents dans chaque zone apparaît lorsque l'on place le curseur sur cette zone en haut de l'écran (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

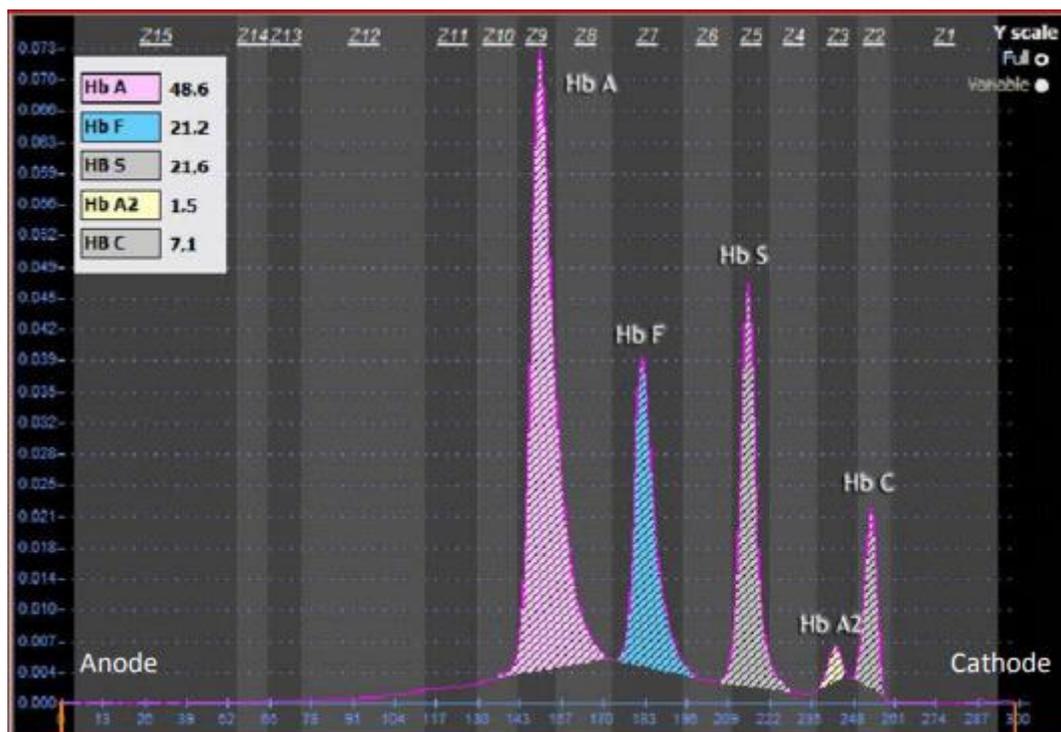


Figure (11) : Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis® , avec identification automatique des pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C et découpage en 15 zones de migration (**Originale**).

Les profils électrophorétiques de sangs normaux, à l'âge adulte (Annexe III), montrent la présence d'une majorité d'Hb A et d'une faible proportion d'Hb A2, de l'ordre de 2,2 à 3,2%. Une faible fraction d'Hb F est parfois retrouvée, dans ce cas en pourcentage inférieur à 1% (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

Les principaux variants de l'hémoglobine d'intérêt médical ou anthropologique présentent une charge électrique globale modifiée suite au remplacement d'un acide aminé par un autre, résultant lui-même d'une mutation, délétion ou insertion de nucléotides. Leur séparation des autres fractions de l'hémoglobine et leur identification sont rendues possibles par électrophorèse du fait de cette modification de charge (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

Ainsi, l'Hb S, résultant d'une mutation $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$, présente un point isoélectrique plus élevé que celui de l'Hb A et, par conséquent, une charge négative globale plus faible au pH de l'analyse. Elle migre donc en position cathodique par rapport à l'Hb A. Par la

technique d'électrophorèse capillaire, en tampon alcalin, elle migre entre les fractions d'Hb A et d'Hb A₂, à environ un tiers de la distance A₂ - A, dans la zone Z5 (Annexe III).

Concernant l'Hb C, due à la mutation $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$, son point isoélectrique est encore plus augmenté que celui de l'Hb S. L'Hb C migre alors plus rapidement que l'Hb A et que l'Hb A₂, dont elle est parfois partiellement séparée (notamment dans les hémoglobinoses C homozygotes) (Annexe III).

L'Hb E, dans laquelle un acide glutamique en position 26 de la chaîne β est remplacé par une lysine, migre quant à elle juste après l'Hb A₂, dont elle est totalement séparée.

L'Hb D (appelée D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ou encore D-Portugal) est la conséquence du remplacement d'un acide glutamique en position 121 de la chaîne β -globine par une glutamine. En raison de la modification de charge électrique globale qui en résulte, elle migre au niveau de la zone Z6 (Annexe III), en position anodique par rapport à l'Hb S (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

II.5. L'Enquête génétique

La transmission héréditaires des hémoglobinopathies augmente le risque de développer ces maladies génétiques. Le dépistage génétique consiste alors à identifier ces mutations génétiques chez une personne qui présente des antécédents familiaux.

Dans le but de la réalisation d'une enquête génétique d'une famille atteinte une hémoglobinopathies, nous avons établi un questionnaire familiale comportant les informations suivantes :

- Nombre des antécédents familiaux ;
- Nombre d'enfants pour chaque petite famille ;
- Nombre des génération dans la grande famille ;
- La présence de la consanguinité avec son degré dans la famille.

Ce questionnaire est s'ensuit par l'établissement d'une arabe généalogique de cette famille avec une étude du mode de transmission de la maladie.

I. Les résultats des tests Hématologique

I.1. Les résultats de l'hémogramme sanguin

Dans notre étude, nous avons recherché une anomalie de l'hémoglobine devant des signes clinico-biologiques, le plus souvent une anémie, plus rarement une cyanose ou une polyglobulie et/ou en raison de la constatation d'éléments purement biologiques comme une hémolyse ou une microcytose.

I.1.1. Résultats des états hétérozygotes

Les résultats de la numération de la formule sanguine montrent qu'il existe rarement une carence en hémoglobine (anémie hémolytique) à l'état hétérozygote. Chez un nombre très faible de patients nous avons constatés une microcytose hypochrome ou parfois normochrome, la majorité de ces patients sont des personnes âgées (tableaux II).

Tableau II : Variation des paramètres hématologiques à l'état hétérozygote chez 3 porteurs différents ; un jeune à 27ans, un homme à 51ans et un vieux à 79ans.

Test Biologique	27ans	51ans	79ans	Témoins sains (homme)
Nombres de globules rouges($10^6/\text{mm}^3$)	$5.5 \cdot 10^6$	$5.3 \cdot 10^6$	$3.3 \cdot 10^6$	$5,939 \cdot 10^6 \pm 0,759$
Taux de l'hémoglobine (g/dl)	13.96	12.51	11.12	$14,168 \pm 0,53$
TCMH (pg)	32.57	30.34	27.46	$33,981 \pm 1,102$
VGM (fl)	92.10	90.40	82.30	$88,183 \pm 3,098$

D'après **Richard et al. (1999)**, le dépistage d'hémoglobinopathies est généralement envisagé chez deux populations cibles : les nouveau-nés et les adultes en âge de reproduire. En effet, à l'état hétérozygote l'hémoglobinopathie est asymptomatique. D'après **Bernard et al (1998)**, les sujets hétérozygotes (HbS, HbC, HbD, HbE....) ne présentent pas des complications dues à la maladie et ont une espérance de vie qui ne diffère pas de celle des sujets sains.

I.1.2. Les résultats des états homozygotes et composites

Tableau III : Variation des paramètres hématologiques à l'état homozygote S/S et à l'hétérozygotie composite S/C

Test Biologique	Homme malades	Témoins sains (homme)
Nombres de globules rouges($10^6/mm^3$)	4,815 x106 ± 2,95	5,939x106 ± 0,759
Taux de l'hémoglobine (g/dl)	7,815 ± 2,95	14,168 ± 0,53
TCMH (pg)	26,5 ± 1,591	33,981 ± 1,102
VGM (fl)	59,892 ± 3,935	88,183 ± 3,098

Les résultats de hémogrammes (Tableaux II) montrent qu'il existe une diminution significative par rapport aux témoins, ce qui traduit par la présence d'une anémie microcytose et hypochrome grave.

Les résultats obtenus dans le tableau (II) montrent qu'il existe une diminution de nombre de globule rouges chez les sujets malades ($4,815 \times 10^6 \pm 2,95$) par rapport aux sujets témoins ($5,939 \times 10^6 \pm 0,759$), la solubilité de la forme désoxygénée de l'hémoglobine S est moins soluble que l'hémoglobine A. elle peut alors se polymériser selon un processus coopératif et permettre la rigidification, l'agglutination et la falciformation des hématies. De ce fait une hémolyse exagérée entraînant une anémie.

Concernant le taux de l'hémoglobine nos résultats montrent qu'il existe une diminution significatif de taux de l'hémoglobine chez les malades ($7,815 \pm 2,95$) par rapport les témoins ($14,168 \pm 0,53$). Selon **Kafando et al.(2008)** ; le mécanisme de substitution moléculaire de la chaîne de la globine entraînant la production anormale de l'hémoglobine qui cause à la déshydratation des globules rouges et d'un défaut de leur déformabilité liées à la polymérisation des molécules d'Hb en milieu pauvre en O₂.

Nos résultats montrent une diminution significative du volume globulaire moyen chez les drépanocytaires SS et les composites SC ($59,892 \pm 3,935$) par rapport les témoins ($88,183 \pm 3,098$), selon **Frédéric et al. (2013)**; l'hémoglobine polymérisée modifie l'interaction du cytosquelette et de la membrane en altérant ce réseau, par la diminution de la solubilité et de

la déformabilité du globule rouge. La poursuite de ce processus jusque à la formation d'un réseau rigide dans le globule rouge ; qui se déforme, perd sa souplesse, se fragilise et conduit à la falciformation, en constituant ainsi les drépanocytes.

I.2. Les résultats de frottis sanguin

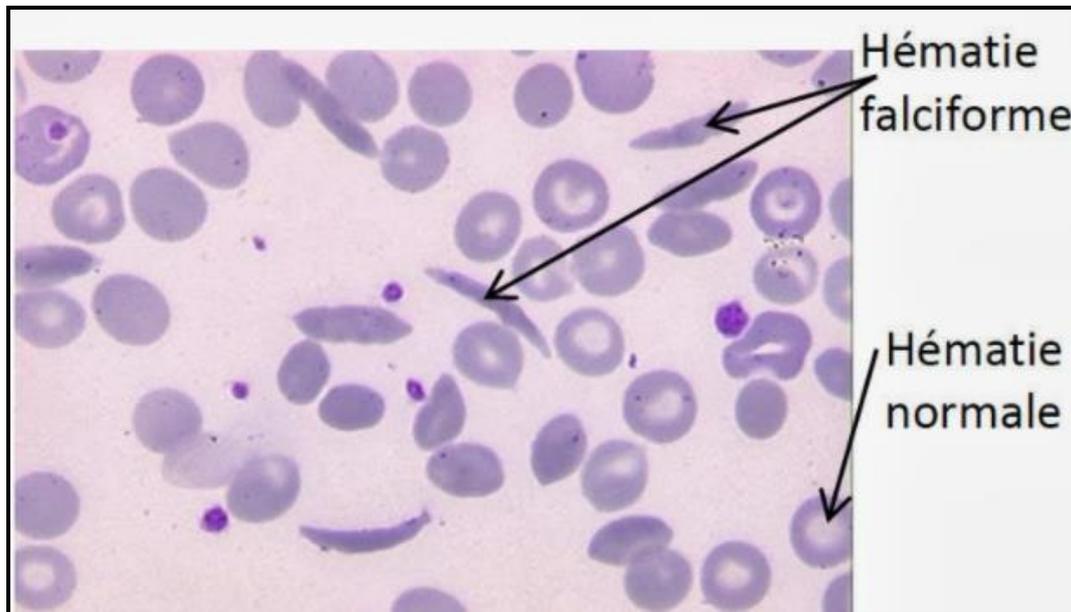


Figure (12): Aspect microscopique des hématies sur frottis sanguin d'un patient drépanocytaire (MG G x 100).

Les résultats des frottis sanguins montrent la présence des hématies en forme faucille chez les patients drépanocytaires (figure 12) dans les deux états (homo et hétérozygote), cependant pour les autres hémoglobinopathies nous n'avons pas observé un changement de la forme des hématies, donc nous n'avons pas pu les dépister à partir de cette technique.

I.3. Test Emmel ou falciformation

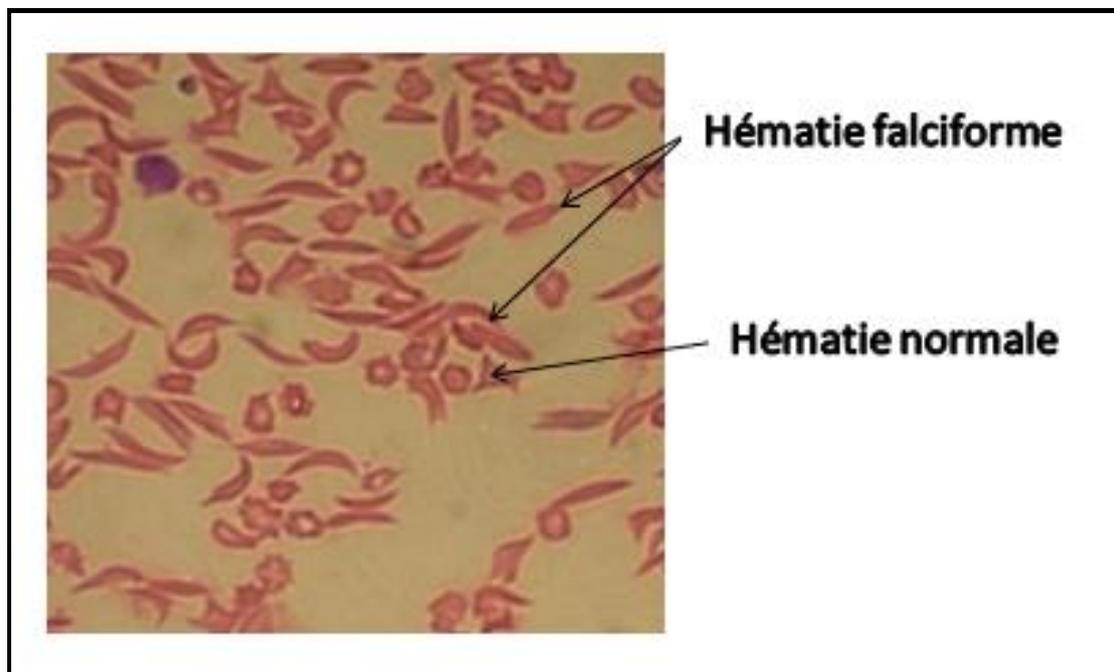


Figure (13): Aspect microscopique des hématies falciformes par test Emmel d'un sujet drépanocytaire hétérozygote (MG G x 100).

Notre figure (13) montre des hématies falciformes ou drépanocytaires bien allongés sous forme des cristaux et bien séparés en absence d'oxygène. En effet l'intérêt capital du test de falciformation dans notre étude est le dépistage en masse du trait drépanocytaire (absence de drépanocytes spontanés visibles sur les frottis).

D'après **Emmel (1977)**, le test de falciformation est négatif si les globules rouges gardent leur forme ronde. Il est positif en cas de présence des cellules en forme de faucille et pointues. Ce test ne permet pas de distinguer un porteur de l'HbS d'un patient homozygote ou hétérozygote composite .

II. Les résultats des profils chromatographiques et électrophorétiques

II.1. Hémoglobine normale

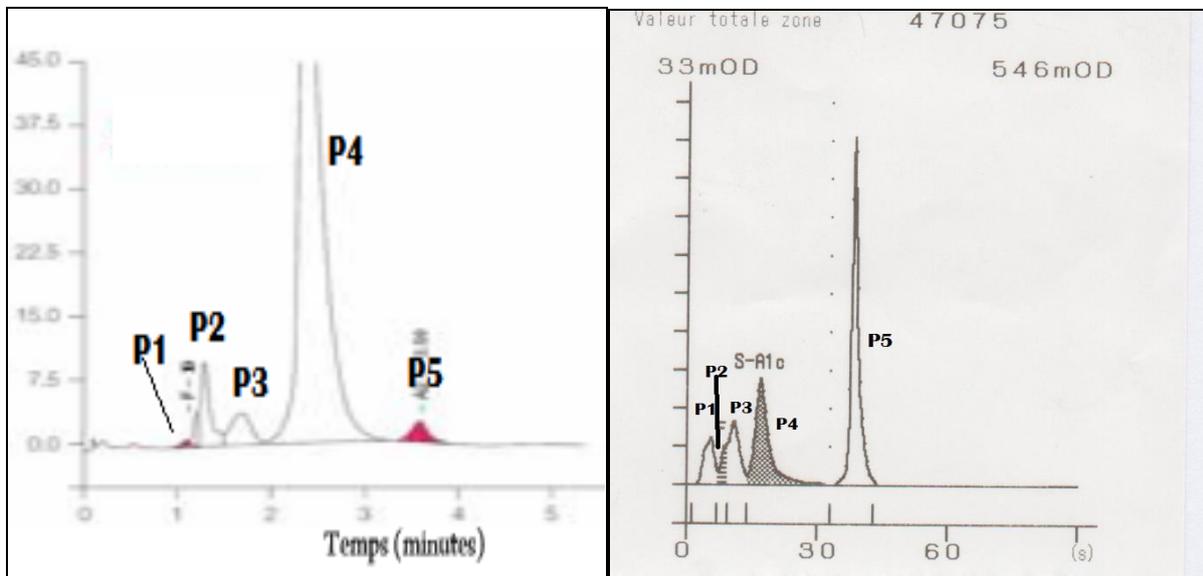


Figure (14) : Exemples d'un profil normal par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

Les profils chromatographiques et électrophorétique sont deux profils similaires.

❖ Le chromatogramme se présente sous forme de cinq (05) pics représentant les 5 fractions d'hémoglobine principales :

P1 : Hémoglobine fœtal (HbF), son pourcentage normale est de 0.1 à 10% de l'Hb totale ;

P2 : HbA1a : l'hémoglobine qui fixe le fructose-6-phosphate (de 1 à 2.5% de l'Hb totale),

P3 : HbA1b : l'hémoglobine qui fixe le pyruvate (de 1 à 2.5% de l'HB totale) ;

P4 : HbA1c : l'hémoglobine glyquée (fixe le glucose) ,leur pourcentage normale est de 2 à 6% de l'Hb totale ;

P5 : HbA0, est le cas normal d'hémoglobine AA dont les deux gènes sont normaux, leur pourcentage normale est de 80 à 90 % de l'Hb totale ;

❖ Le profil d'électrophorèse est constitué de 5 pics représentant :

P1 : Hemoglobine foetal (HbF) ;

P2 : HbA1c : l'hémoglobine glyquée qui fixe le glucose ;

P3 : Autres HbA (HbA1a qui fixe le fructose-6-phosphate et HbA1b qui fixe le pyruvate) ;

P4 : HbA0 : l'hémoglobine AA dont les deux gènes sont normaux ;

P5 : HbA2 : Elle représente entre 1,5 et 3,1 % de l'hémoglobine totale d'un homme adulte en bonne santé, seulement l'électrophorèse qui permet de différencier l'HbA2 de l'HbA0.

Le temps en minute représente le temps de rétention pour chaque fraction à éluer, le temps de rétention pour chaque fraction est représenté par un pic.

Ces techniques sont considérées par de nombreux laboratoires comme les méthodes de choix pour dépister et quantifier les différentes fractions d'Hb normales et anormales (programmes de contrôle de qualité internationaux).

II.2. Drépanocytose hétérozygote

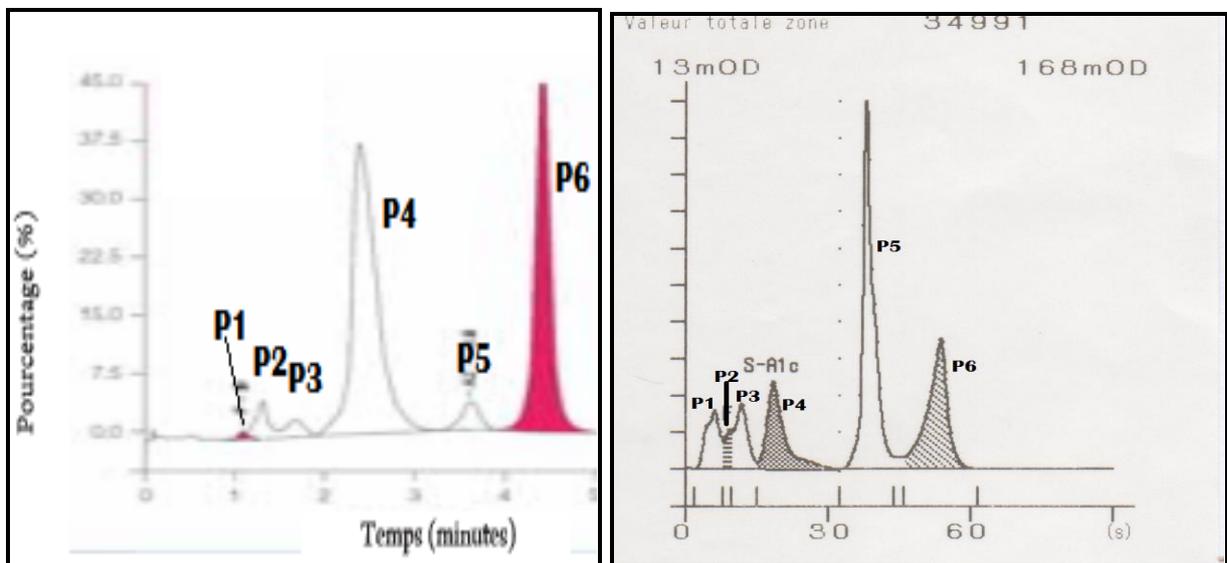


Figure (15) : Exemples d'un profil drépanocytaire hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

La figure (15) représente un profil caractéristique d'un sujet drépanocytaire hétérozygote A/S, qui est constitué de six (06) pics , avec la présence des cinq (05) fractions habituels plus

une fraction supplémentaire représentant la HbS A/S (pic n°6) avec un pourcentage de 38% par rapport à l'hémoglobine totale .

Selon **Rees et al. (2010)** , les sujets hétérozygotes pour ce mutant (A/S) sont des porteurs du trait drépanocytaire et sont asymptomatiques (anémie hémolytique régénérative en général compensée, ictère,...), ce qui nécessite dans ce contexte le recours aux techniques de biologie moléculaire afin de caractériser ces mutants).

Selon **Bardakdjian et al. (2003)** et **Aguilar et al. (2010)** : le diagnostic de l'HbS est donc important. La présence en électrophorèse d'une bande dans la « S-Window » ou S-like, et en chromatographie d'un pic d'élution compatible avec l'HbS, sont deux éléments présomptifs de la présence d'HbS. Compte tenu de l'existence de mutants présentant des propriétés équivalentes, une confirmation par un troisième test, classiquement le test de falciformation.

L'association de ces 3 tests permet de distinguer facilement l'HbS des principaux mutants dits « S-like » en électrophorèse à pH alcalin . Une fois la présence d'HbS certaine, c'est le taux d'expression de l'HbS et les données clinico-biologiques qui vont permettre de conclure .

II.3. Drépanocytose homozygote et la composite S/C

❖ Cas d'homozygote SS

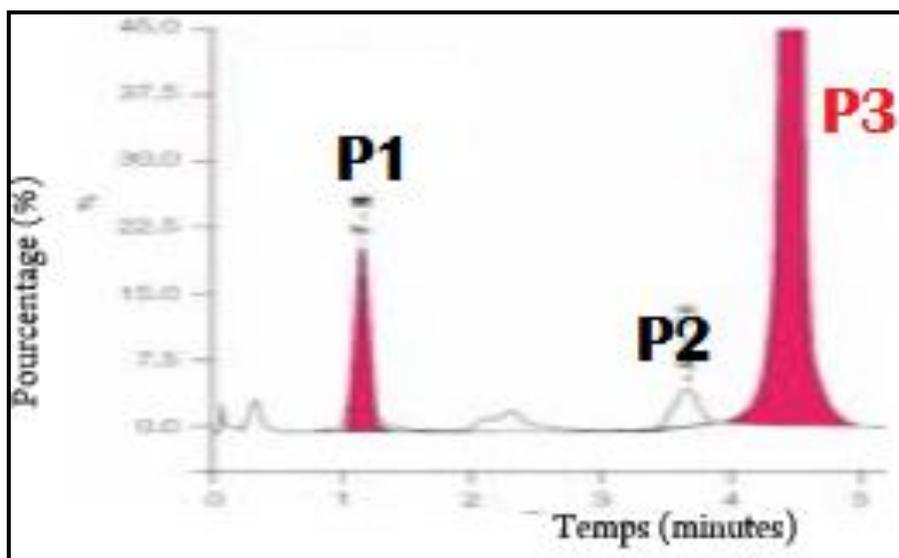


Figure (16) : Exemple d'un profil drépanocytaire homozygote par électrophorèse capillaire.

La figure (16) présente uniquement le profil électrophorétique puisque il y a une impossibilité à détecter et à quantifier les fractions d'Hb par HPLC pour les cas de drépanocytose homozygotes ou composites S/C.

Ce profil représente un sujet homozygote S/S, qui montre 3 pics caractéristiques des 3 fractions d'Hb principales :

- ✓ P1 : l'HbF (fœtale) avec un pourcentage de 1.5% ;
- ✓ P2 : Hb A2 avec un pourcentage de 2.4% ;
- ✓ P3 : L'Hb SS avec un pourcentage de **83%**.

Plusieurs éléments diagnostiques sont observés avec la présence d'HbS, l'absence d'HbA et la présence d'HbF et HbA2 à un taux variable.

D'après **Ngo et al. (2012)**, Les taux d'HbA2 et D'HbF, sont classiquement augmentés de façon artéfactuelle en présence d'HbS en électrophorèse avec les tests hématologiques.

Ce type de profil est pathologique et s'accompagne d'éléments cliniques tel que une anémie hémolytique grave, crises douloureuses vaso-occlusives, ictère... . Il s'agit d'un patient atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur (**SDM**): homozygote S/S.

Selon **Labie et al. (2005)**, la physiopathologie des SDM résulte de la propriété de polymérisation de l'HbS désoxygénée, jusqu'à former des réseaux de fibres au sein du globule rouge. Cette polymérisation de l'HbS désoxygénée est responsable de déformations cellulaires typiques : les drépanocytes, ou hématies en « faucilles ». Ce phénomène de base entraîne les deux manifestations majeures de la maladie : l'anémie hémolytique par fragilisation des globules rouges, et la crise vaso-occlusive par obstruction des micro-capillaires. Même si la globule rouge est l'acteur principal mais l'environnement cellulaire, aussi bien endothélial que circulant, sont également des éléments clés dans la physiopathologie de la maladie .

Le diagnostic différentiel peut se faire facilement par l'analyse de l'étude de l'hémoglobine des parents ou par biologie moléculaire en cas d'impossibilité d'étude familiale complète.

❖ La composite S/C

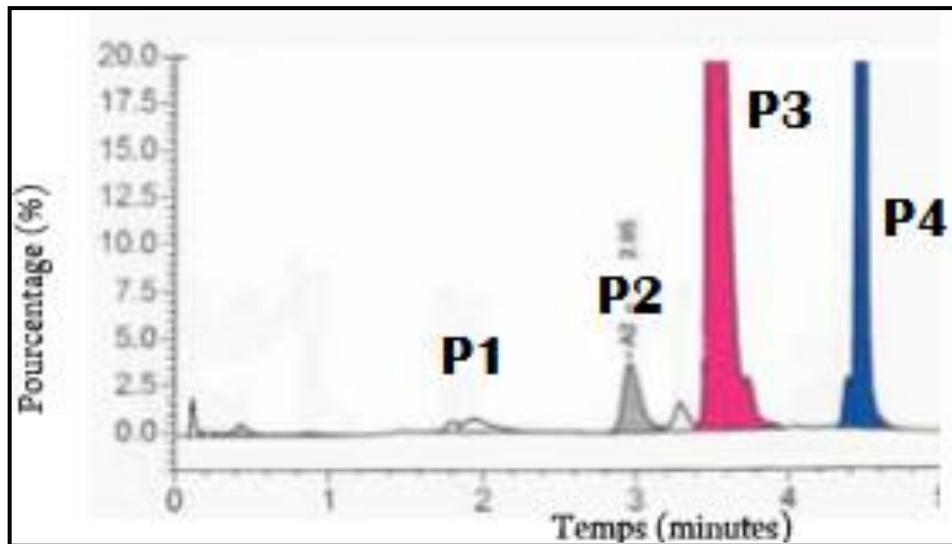


Figure (17) : Profil de la double hétérozygotie (composite) S/C par électrophorèse capillaire.

La figure (19) montre un profil qui représente un sujet d'hétérozygotie composite S/C (HbS A/S + HbC A/C) à 4 pics séparatif qui sont caractéristiques à 4 fractions d'Hb principales :

P1 : l'HbF (fœtale) avec un pourcentage de 0.5% par rapport à L'Hb totale ;

P2 : Hb A2 avec un pourcentage de 3.7 % par rapport à L'Hb totale ;

P3 : HbS avec un pourcentage de **48,4 %** par rapport à L'Hb totale ;

P4 : HbC avec un pourcentage de **44,2 %** par rapport à L'Hb totale .

Cette pathologie présente des éléments cliniques quasi-identiques à ceux de la forme SS. Selon **Kohne (2011)** , les porteurs des formes hétérozygotes de ces variants ne présentent pas habituellement de symptômes alors que ceux qui portent les formes homozygotes ou les formes hétérozygotes composées sont symptomatique à la gravité.

Selon **Galanello et Origa. (2010)**, Dans le contexte d'une hétérozygotie composite S/X, il faut rechercher en priorité l'association C/S, qui constitue un SDM. Classiquement décrit comme moins sévère que les SDM de type homozygote S/S, ce SDM expose cependant à des complications qui peuvent être certes plus tardives, mais tout aussi sévères voire plus sévères : ostéonécrose de hanche, rétinopathie, atteinte auditive, syndrome thoracique aigu...

II.4. Autres hétérozygoties

❖ Hémoglobine C hétérozygote

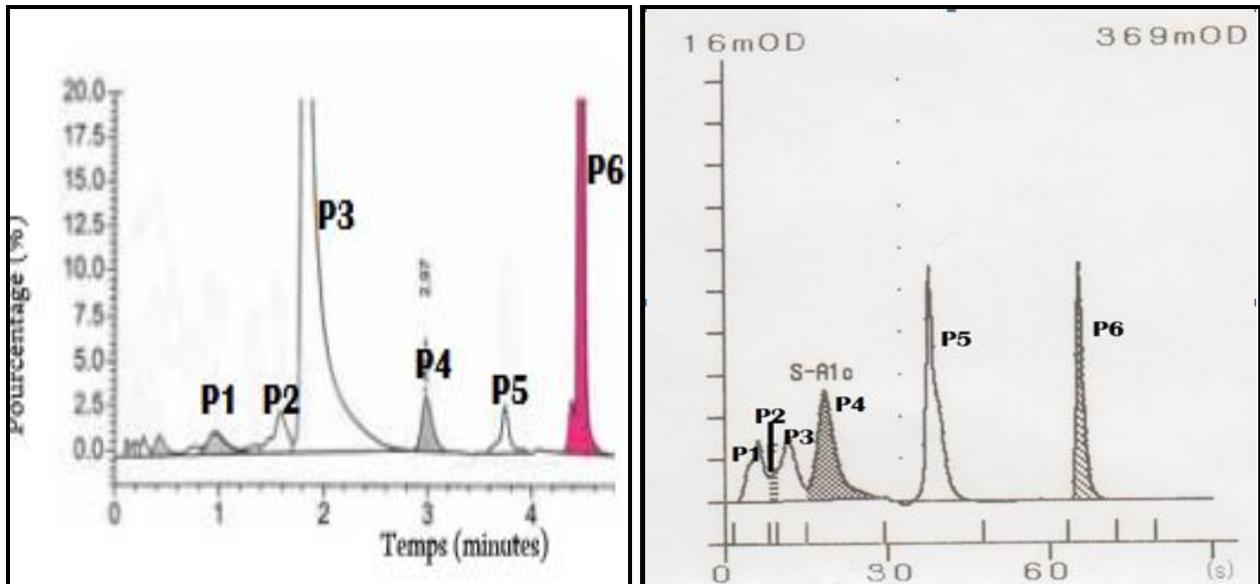


Figure (18) : Exemples d'un profil d'HbC hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

En figure (18), nous observons la présence de 6 pics qui caractérisent les 5 fractions habituelles plus une fraction de HbC A/C (pic n°6) avec un pourcentage de 34 % par rapport à l'hémoglobine totale.

D'après **Bardakdjian et al. (2003)**, C'est le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquemment rencontré dans le monde. La mutation affecte le sixième acide aminé de la chaîne bêta-globine, cette anomalie provoque la formation de cristaux intra-érythrocytaires qui sont responsables d'une augmentation de la densité du globule rouge et de sa déshydratation ce qui provoque largement une microcytose hypochrome. En effet la présence en électrophorèse d'une bande dans la « C-Window » ou C-like, et en chromatographie d'un pic d'éluion compatible avec l'HbC, sont deux éléments présomptifs de la présence d'HbC. Ces associations sont nécessaires afin de distinguer facilement l'HbC des principaux mutants dit C-like en électrophorèse à pH alcalin.

❖ Hb D-Los Angeles (D Punjab)

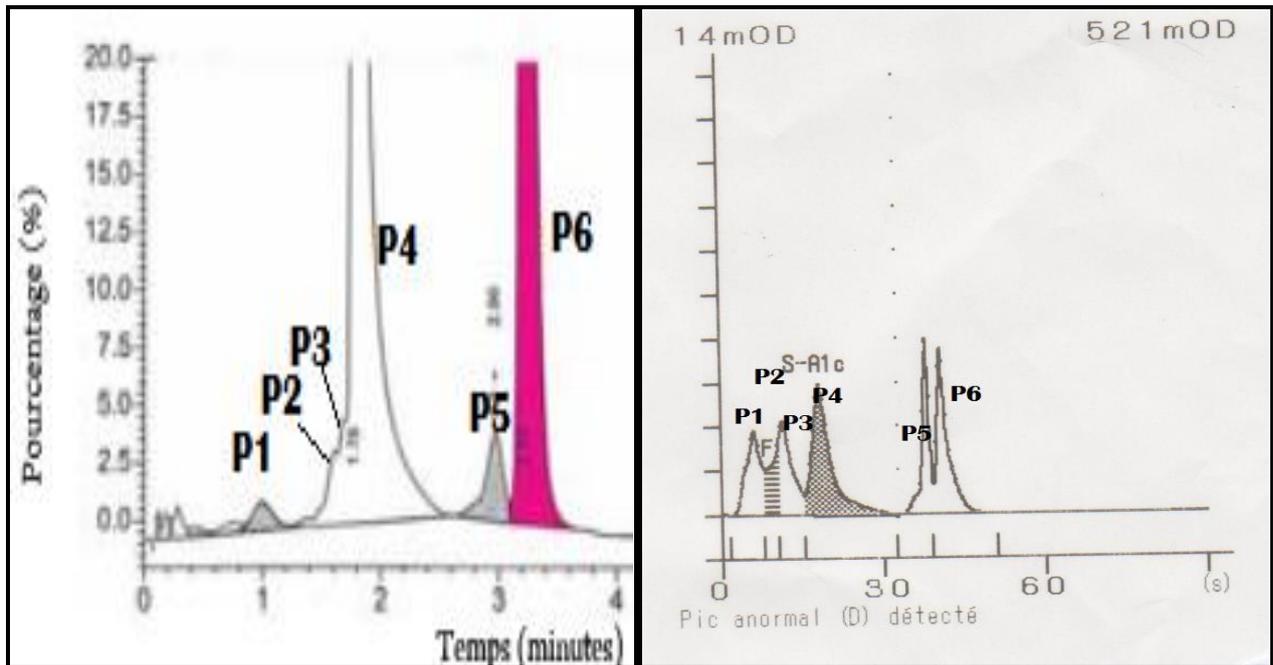


Figure (19): Exemples d'un profil d'HbD hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

Dans ce cas nous avons six (06) pics qui caractérisent les cinq (05) fractions habituelles plus une fraction supplémentaire représentant la HbD A/D (pic n°6) avec un pourcentage de 40% par rapport à l'hémoglobine totale .

Ce variant est « S-like » en électrophorèse à pH alcalin, mais distinct de l'HbS en CLHP. Le diagnostic différentiel entre HbD et HbS est donc simple.

Selon **Aguilar et al. (2010)**, cette hémoglobinopathie est asymptomatique à l'état hétérozygote ou homozygote. Son importance clinique tient du fait que l'hétérozygotie composite S/D-Punjab qui constitue un SDM sévère. En effet d'après **Bardakdjian et al.(2003)**, L'HbD Punjab favorise les propriétés de polymérisation de l'HbS qui constitue en association avec l'HbS une entité pathologique. Il est donc nécessaire chez les hétérozygotes composites, ou dans le contexte d'un conseil génétique, d'avoir recours à un laboratoire de référence pour le diagnostic de certitude.

❖ Hémoglobinoses E hétérozygote

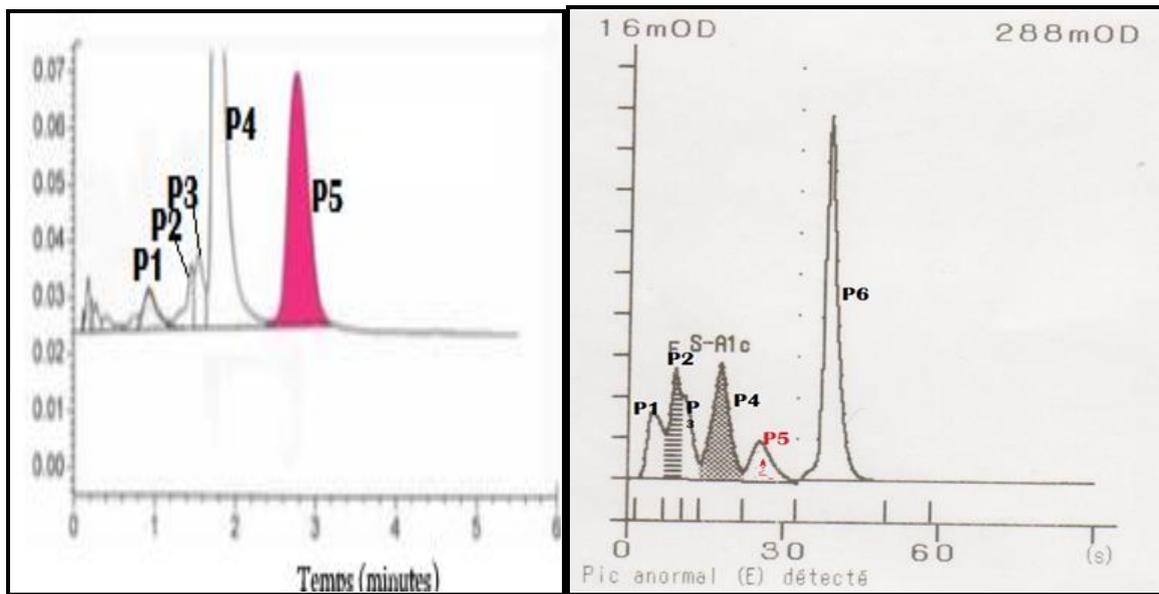


Figure (20) : Exemples d'un profil d'HbE hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

Ce profil est caractéristique du sujet hétérozygote A/E, et présente les mêmes pics que les autres hétérozygoties, excepté la présence de l'HbE A/E (pic n°5 en profil électrophorétique et pic n°6 en chromatogramme) à 21 % par rapport à l'Hb totale. En effet l'absence de l'HbA2 dans le profil électrophorétique est expliquée par la présence de l'HbE, puisque ces deux fractions d'Hb ont la même zone de migration.

Selon **Bardakdjian et al. (2003)**, la présence de ce variant en électrophorèse dans la zone « C-Window » ou C-like, en CE d'un pic dans la zone d'identification de l'HbE, et en chromatographie d'un pic d'élution compatible avec l'HbE (co-migration ou pic très proche de celui de l'HbA2), sont des éléments présomptifs de la présence d'HbE.

III. Étude d'un exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte la drépanocytose

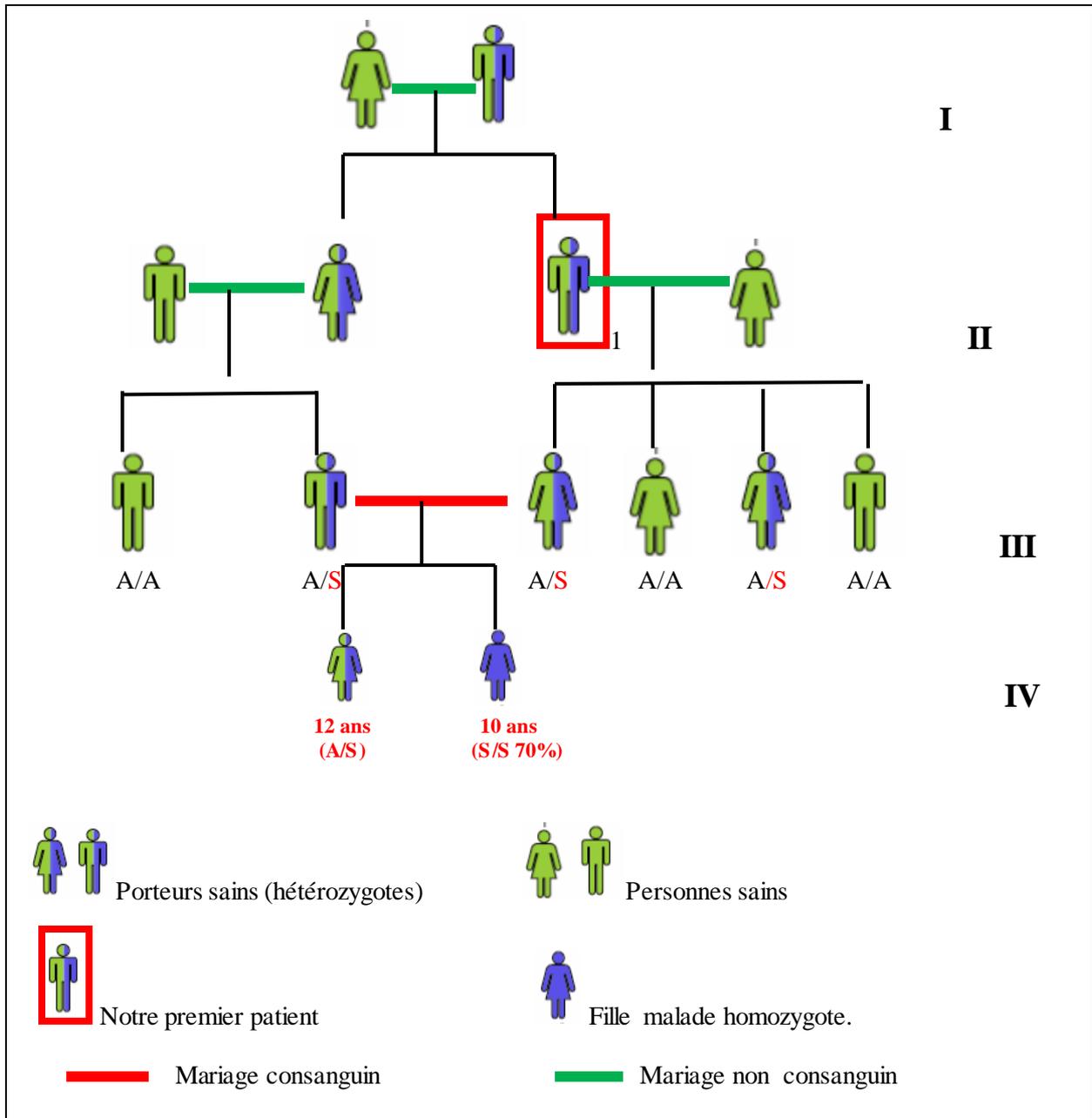


Figure (21): Exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte de la drépanocytose.

Comme indiqué sur l'arbre généalogique familiale (figure 21) sept (07) personnes souffrent de la drépanocytose dont six (06) sont des porteurs hétérozygotes et une (01) jeune fille est malade homozygote. la plus jeune membre de la famille est âgée de 10 ans et le plus âgé est de 63 ans.

Il n'y a aucune consanguinité entre les parents de la première (I) et de la deuxième (II) génération, ces derniers ne présentent aucun membre malade Homozygote au sein de leurs antécédents.

La présence de la consanguinité entre les parents dans la troisième (III) génération donne malheureusement une fille malade (Homozygote S/S) et une fille porteuse de la drépanocytose (Hétérozygote A/S).

Mode de transmission

Étant donné que les hétérozygotes sont asymptomatiques (non malades), et sachant que le gène de l'hémoglobine est situé sur le chromosome 11 (autosome), on en déduit que le mode de transmission des hémoglobinopathies est transmis héréditairement selon un mode autosomique récessif.

Selon **Neel. (1979)**, la transmission du gène βS muté, obéit aux lois de Mendel et se transmet sous le mode récessif et autosomique. La transmission du gène βS par les deux géniteurs détermine le génotype SS chez l'enfant. En effet d'après **Maniatis et al. (1980)**, Les transmetteurs possèdent deux gènes β globine codominants, le normal βA , l'autre muté βS . Chacun des gènes codera pour la synthèse d'hémoglobine en quantité équivalente, une normale, une mutée. Dès lors, les hétérozygotes pour une hémoglobine anormale ont deux hémoglobines différentes

VI. L'étude statistique des anomalies

VI.1. La répartition des anomalies selon la population globale des patients

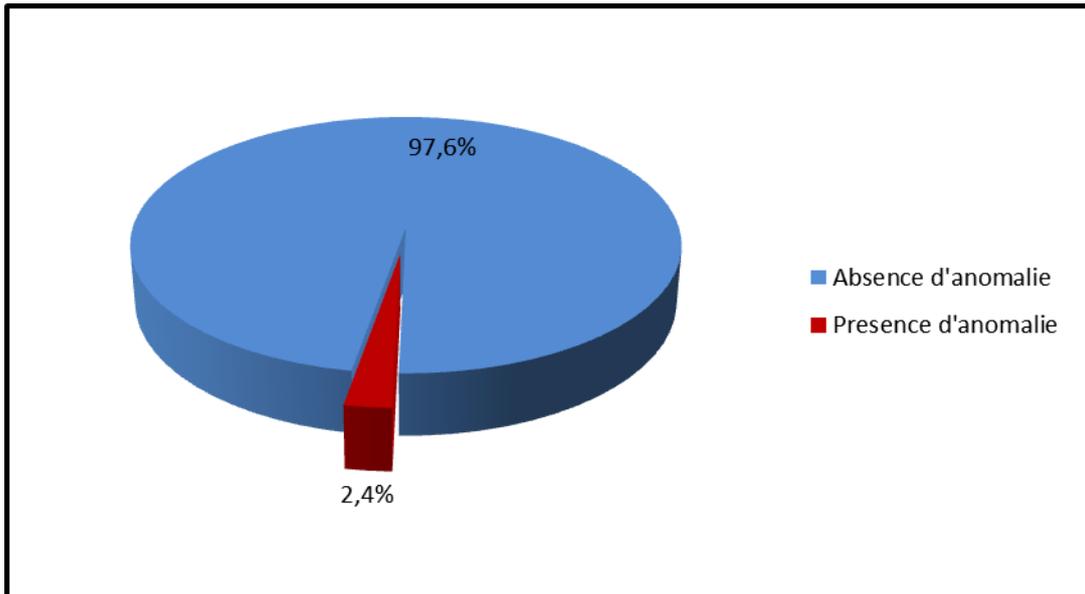


Figure (22) : Pourcentage de la présence des hémoglobinopathies par rapport à la population globale.

Les résultats de l'HPLC et l'EPH confirment l'existence de différents types d'hémoglobinopathies dans la population des patients de la région Blida-Alger, 400 malades ont été dépistés parmi 16900 sujets. Ce qui représente un pourcentage de 2.4% de la présence de l'Hb pathologique par rapport à notre population globale.

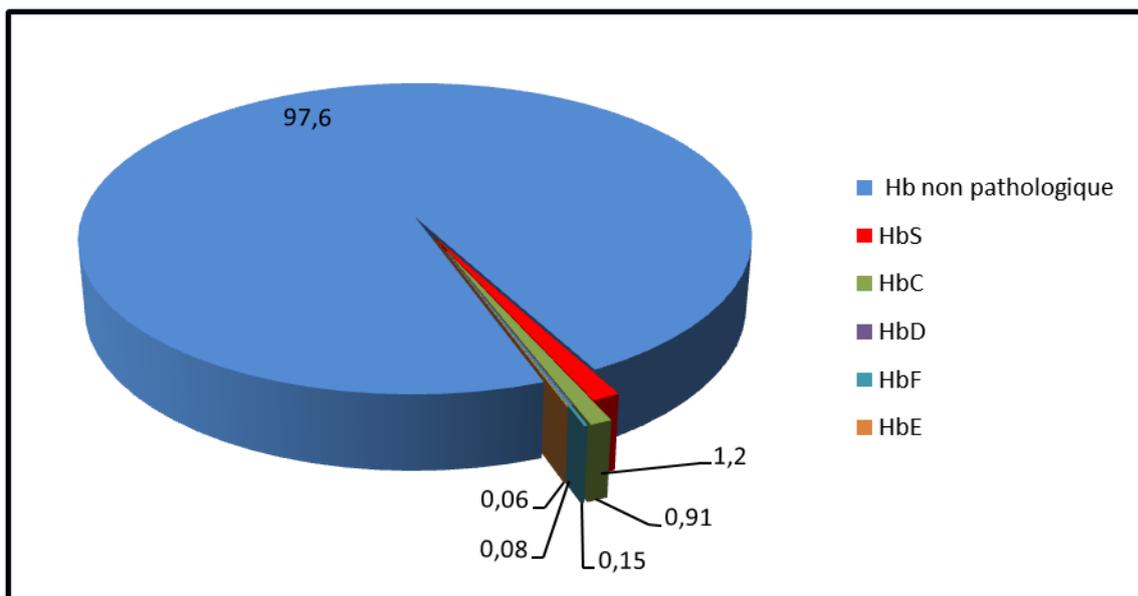


Figure (23) : la répartition des anomalies par rapport à la population

La figure (23) illustre les pourcentages des différents types d'hémoglobines anormales par rapport à l'ensemble de la population étudiée :

- HbS à 1.2% ;
- HbC à 0.91% ;
- HbD à 0.08% ;
- HbE à 0.06% ;HbF à 0.15%.

Selon **OMS (2000)**, le rapport statistique de la répartition des hémoglobinopathies est de 5 à 11% dans les régions de l'Afrique du Nord.

Nos résultats sont proches de ceux présentés en 2015 la journée mondiale de la drépanocytose. « Ces pathologies touchent 2 à 3% de la population algérienne. Très répandue, notamment au nord-est du pays, et dans plusieurs autres wilayas, la drépanocytose pose un réel problème de santé publique, qui n'est, cependant, pas reconnu en tant que tel en Algérie. l'OMS a décrété le 19 juin Journée mondiale de la drépanocytose.

VI.2. La répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies

Sur l'ensemble des 400 patients dépistés et selon la figure 26, nous avons obtenu :

- 205 sujets de drépanocytose Hétérozygote AS avec un pourcentage de 51.25% par rapport à la population dépistée ;
- 148 sujets de la hétérozygotie AC avec un pourcentage de 37% par rapport à la population dépistée ;
- 13 sujet de l'hémoglobinoase AD avec un pourcentage de 3.25% par rapport à la population dépistée ;
- 09 sujets de la hétérozygotie AE avec un pourcentage de 2.25% par rapport à la population dépistée ;
- 15 sujets à hémoglobine fœtale élevée HbF avec un pourcentage de 3.75 % par rapport à la population dépistée ;
- 05 sujets de la composite S/C avec un pourcentage de 1.25% par rapport à la population dépistée ;
- 02 sujets de drépanocytose homozygote avec un pourcentage de 0.5% par rapport à la population dépistée ;

➤ 03 sujets d'autres hémoglobinopathies avec un pourcentage de 0.75% par rapport à la population dépistée;

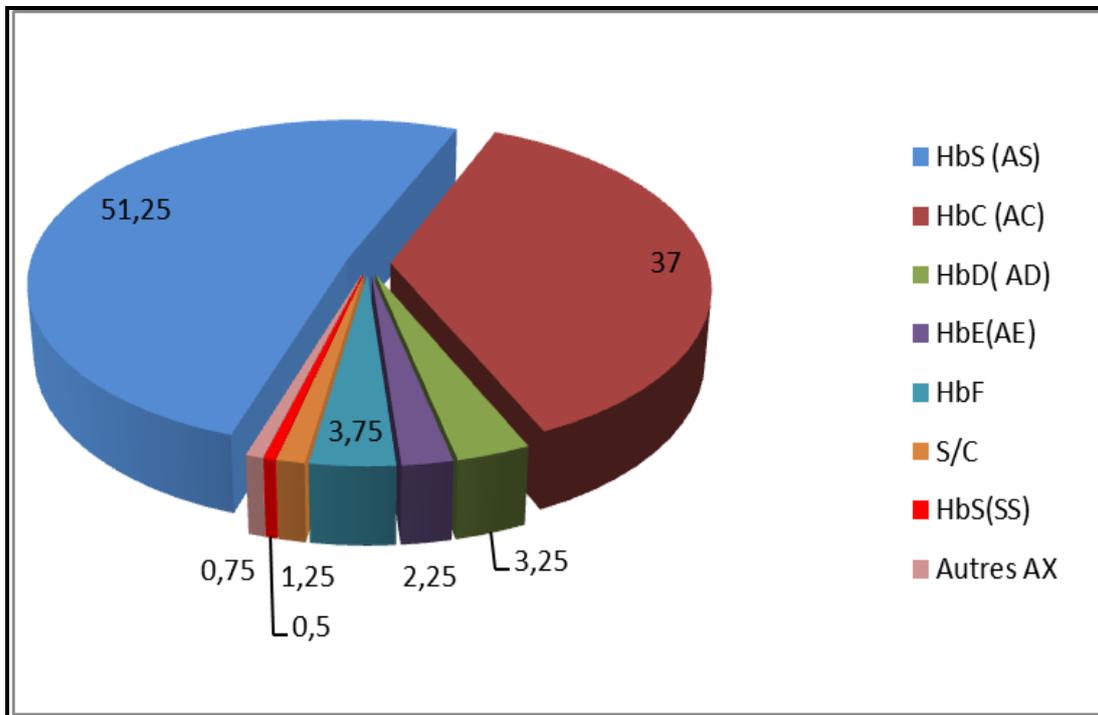


Figure (24) : Répartition des anomalies selon leurs différents types.

D'après nos résultats le pourcentage de la drépanocytose hétérozygote est le plus fréquent, par rapport aux autres hémoglobinopathies.

D'après **Giroit. (1999)**, la drépanocytose caractérise l'anomalie de l'hémoglobine la plus fréquente observée en Afrique, dans toutes les régions où les natifs d'Afrique sont retrouvés, et sur l'ensemble du pourtour méditerranéen. Selon **l'OMS (2000)**, la drépanocytose est la maladie génétique la plus répandue dans le monde par 1 pour 3000 naissances.

D'après **Giabmonaa et al. (1997)**, La drépanocytose est suivie des hémoglobinoses C, D et E. L'hémolobinose C, est représentée chez la population africaine, Maghrébine aussi que chez les noirs américains.

Enfin la drépanocytose homozygote avec la composite SC sont les hémoglobinopathies les plus rares.

Selon **Baradai. (2014)**, La diminution des formes homozygotes est justifiée par l'efficacité du conseil génétique qui conduit à la diminution du mariage consanguin, et par l'information sur la drépanocytose dans le système scolaire.

VI.3. La répartition des anomalies selon le sexe des patients

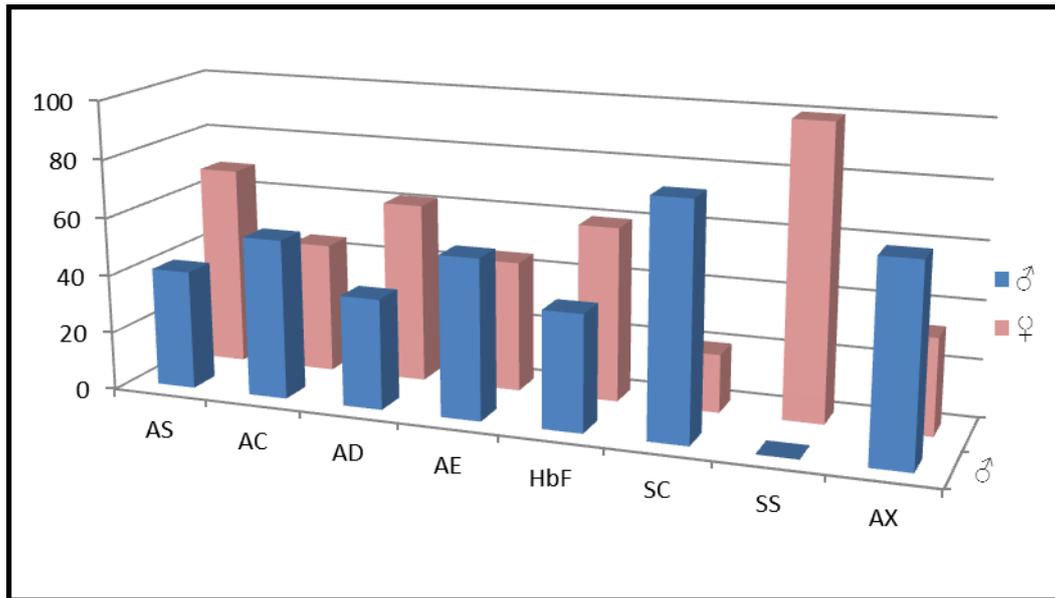


Figure (25) : Répartition de la population selon le sexe.

D'après ce diagramme en figure (25) nous remarquons que les anomalies de l'hémoglobine touchent le sexe masculin que le féminin.

Nos résultats confirment que le sexe ne modifie rien la répartition des hémoglobinopathies car ces anomalies sont liées à une transmission récessive et sont par conséquent indépendantes du sexe.

Selon **Neel. (1979)**, les gènes qui codent pour la synthèse des chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine (α , β , γ et λ) sont autosomiques et la transmission de l'anomalie est indépendante du sexe.

Conclusion

Ce travail a porté sur l'étude de 400 cas d'hémoglobinopathies qui ont été détectées parmi une population de 16900 sujets de les régions de Blida et Alger. Il nous a permis de démontrer que : la prévalence des hémoglobinopathies dans ces régions est de 2.4% par rapport à la population étudiée. On a détecté l'existence de différents types d'anomalies d'hémoglobine. Nous avons révélé que la drépanocyte hétérozygote est l'anomalie la plus fréquente (HbS AS à 51%), puis l'hétérozygote HbC (37%) et les hétérozygotes HbE et HbD (5.5%), et enfin la double hétérozygotie SC (1.25%) et la drépanocytose homozygote SS (0.5%).

Les sujets présentant des formes hétérozygotes (HbS, HbC, HbE et HbD) sont porteurs de la maladie et sont cliniquement asymptomatiques, mais l'association d'une double hétérozygotie SC et le cas de drépanocytose homozygote présentent un syndrome drépanocytaire majeur (SDM).

Les résultats de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC sur Arckray) et l'électrophorèse capillaire (sur Capilarys II) permettent d'une part d'évaluer la prévalence des hémoglobinopathies dans notre étude, et de préciser et quantifier l'anomalie d'hémoglobine.

Le diagnostic précoce des hémoglobinopathies est très important dans le but d'optimiser la prise en charge de personnes atteintes de formes majeures et la prévention de la survenue de la forme homozygote grave, mais malheureusement pas encore leurs traitement.

Les stratégies de prévention les plus efficaces pour réduire la fréquence des hémoglobinopathies consiste à :

- ✓ Des tests sanguins fiable permettant de déterminer si un couple a risque de donner naissance à des enfants malades.
- ✓ Les services de conseil informent les porteurs du trait génétique à des risques pour leurs futures enfants, du traitement dont ceux-ci auront besoin s'ils sont atteint d'une hémoglobinopathie et des solutions qui s'offrent au couple.
- ✓ Le dépistage prénatale des maladies génétiques pose des problèmes éthiques, juridiques et sociaux qui doivent durement pris en considération.

Conclusion

Cette étude a été réalisée sur une population limitée, il serait donc souhaitable de réaliser un dépistage des hémoglobinopathies étendue à la population générale, à la recherche des cas familiaux pour pouvoir instaurer un conseil génétique afin d'éviter au maximum les formes homozygotes.

Matériel non biologique

❖ Appareillage

Automate SYSMEX XT 4000 ;
Automate Arckray Adams HA 8180;
CAPILARYS 2 Flex Piercing- SEBIA;
Centrifugeuse;
Microscope optique ;
Automate Cellavision.

❖ Consommables

Tubes à essais de 5 ml;
Les gants stériles ;
Lames et lamelles ;
Embouts jaunes et bleus ;
Bacs de coloration ;
Portoir en plastique ;
Porte plaque ;
Papier absorbant ;
Micropipettes fixes et réglable ;
Eau distillée ;
Paraffine ;
Papier thermique.

❖ Réactifs

Solution de la coloration de May-Grünwald ;
Solution de la coloration Giemsa ;
Réactif de métabisulfite de sodium ($S_2O_5Na_2$) à 2 % (2 grammes pour 100 ml d'eau distillée);
Huile d'émersion ;
Les solutions échangeuse d'anions, cations et neutres ;
Solutions Wash

Le matériel utilisé :



Microscope optique



lames de lectures des frottis



Pack de coloration des frottis



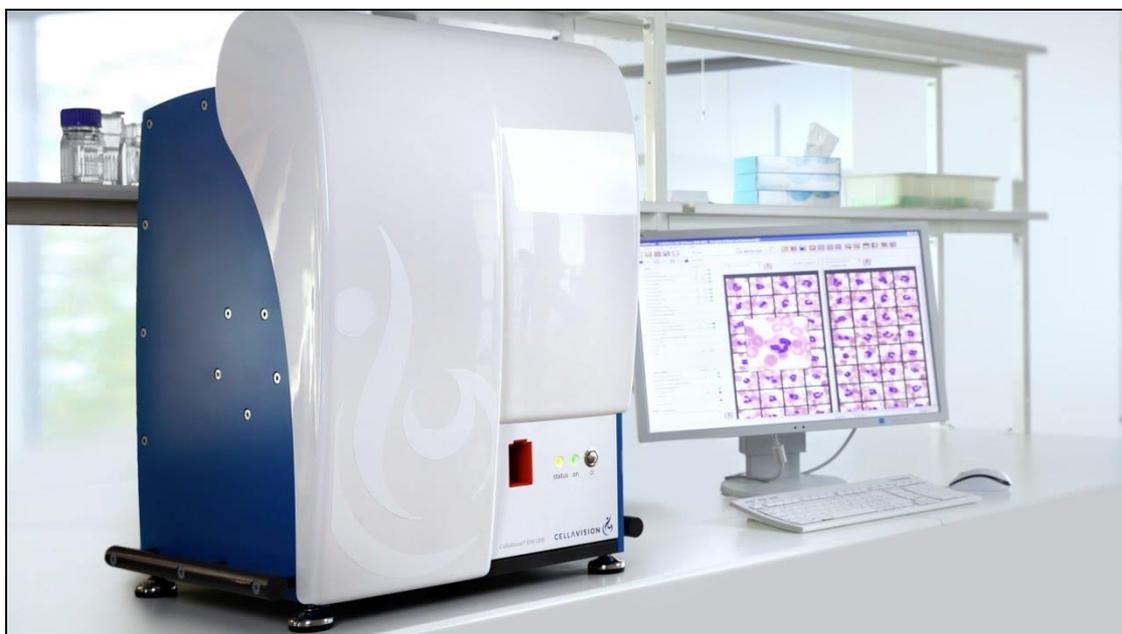
Tubes vacutainer EDTA



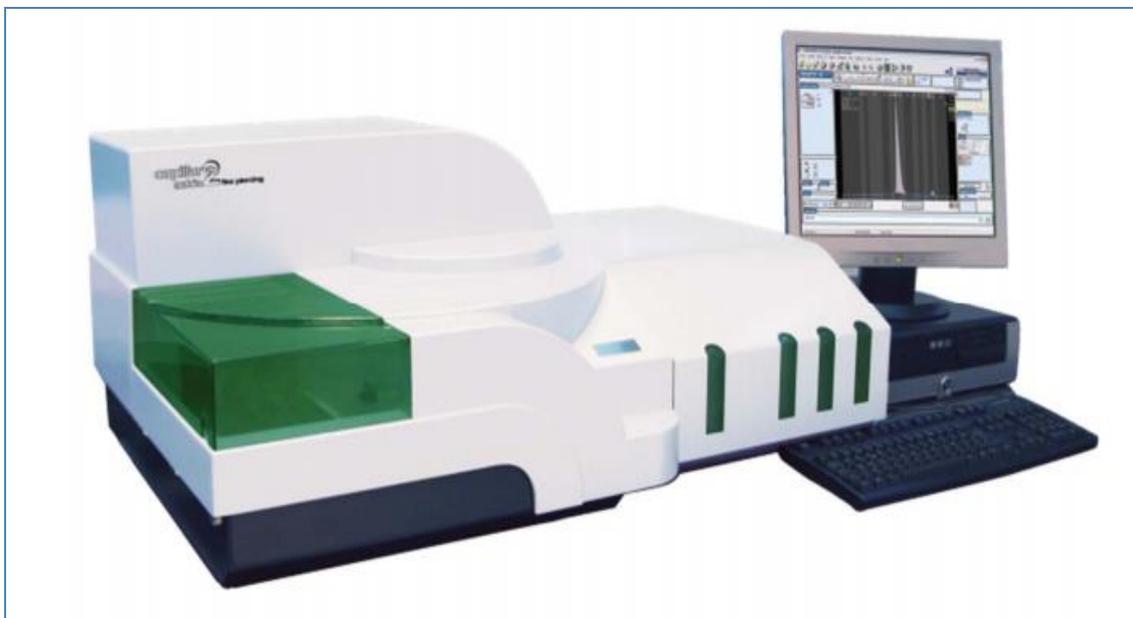
L'automate SYSMEX XT 4000.



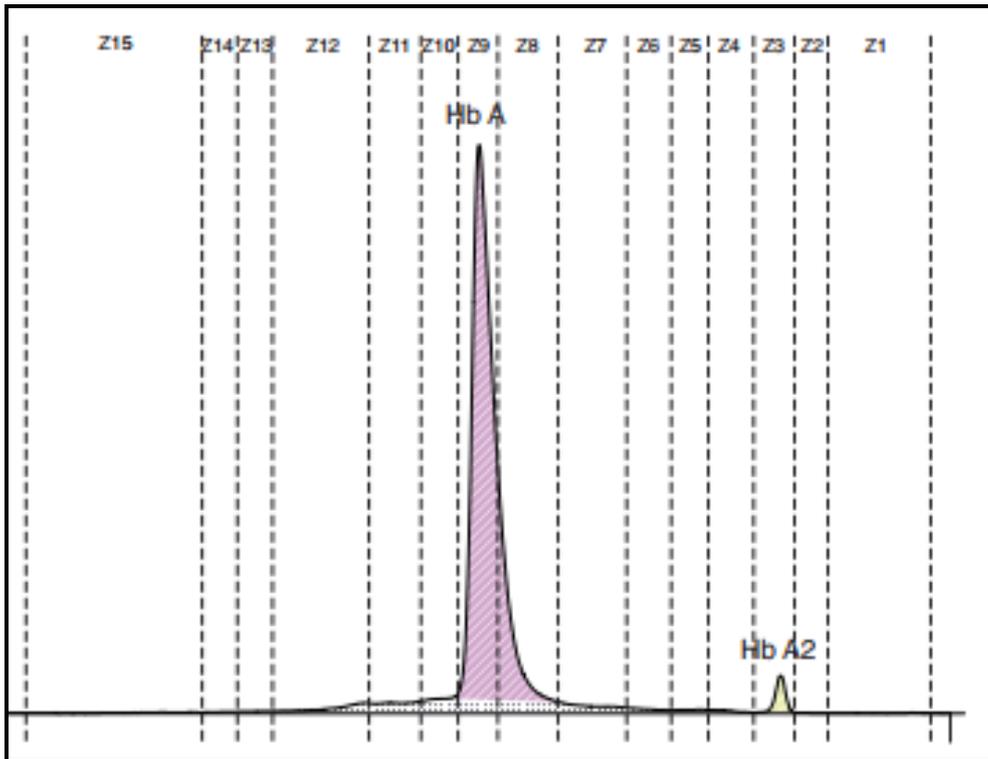
L'automate Arckray Adams HA 8180



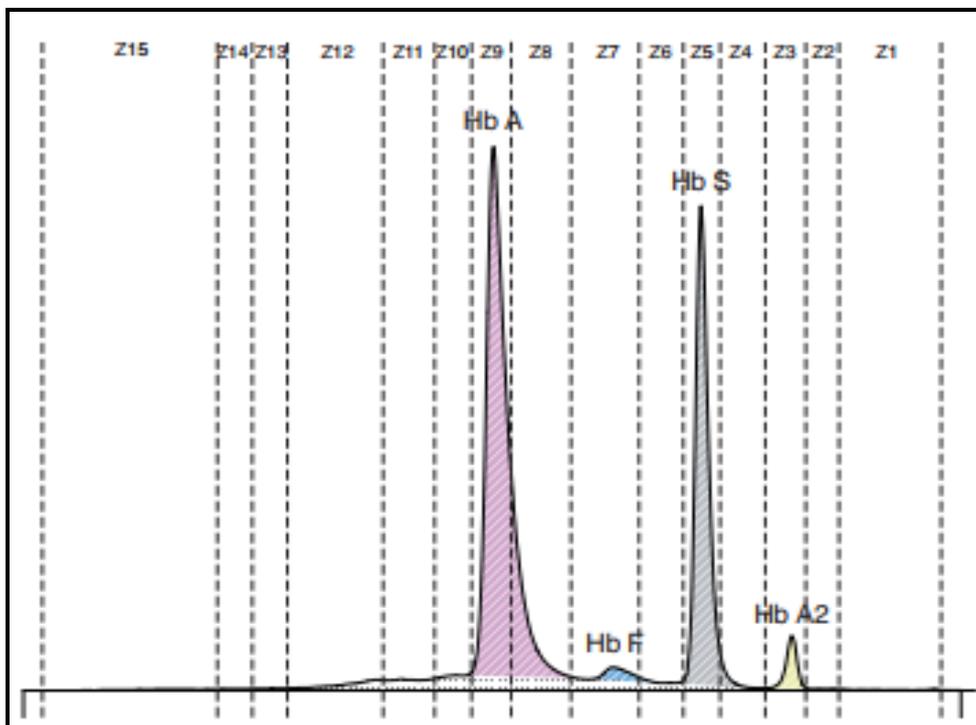
Cellavision : la visionneuse des frottis



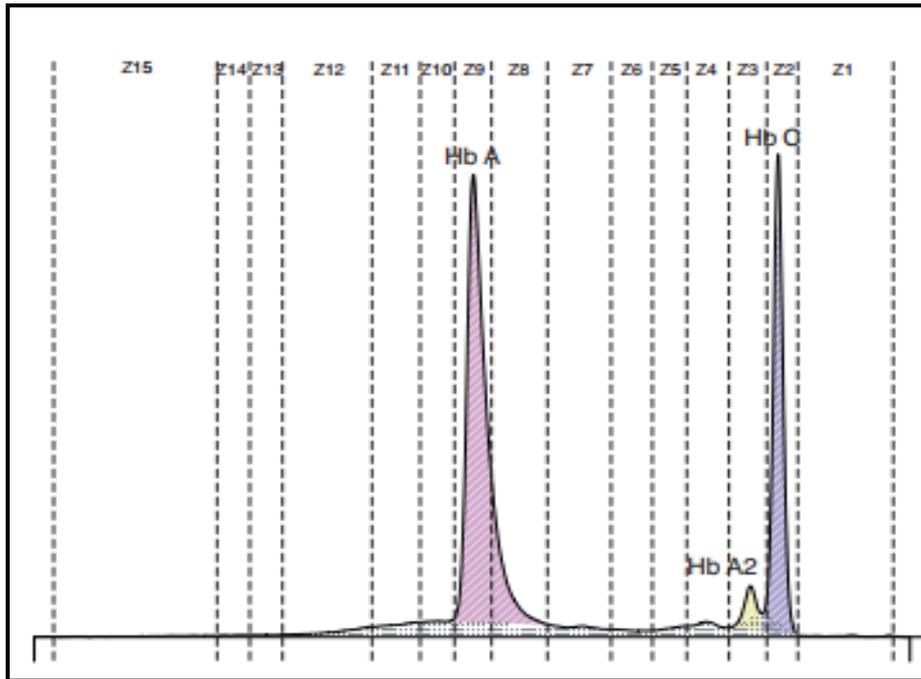
CAPILARYS 2 Flex Piercing- SEBIA.



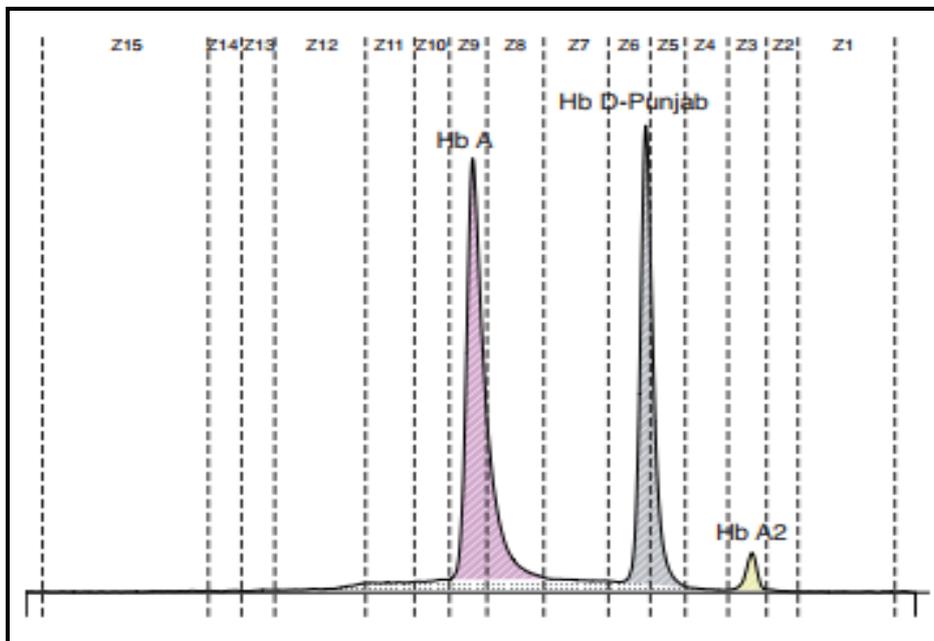
1. Profil électrophorétique normal de l'adulte.



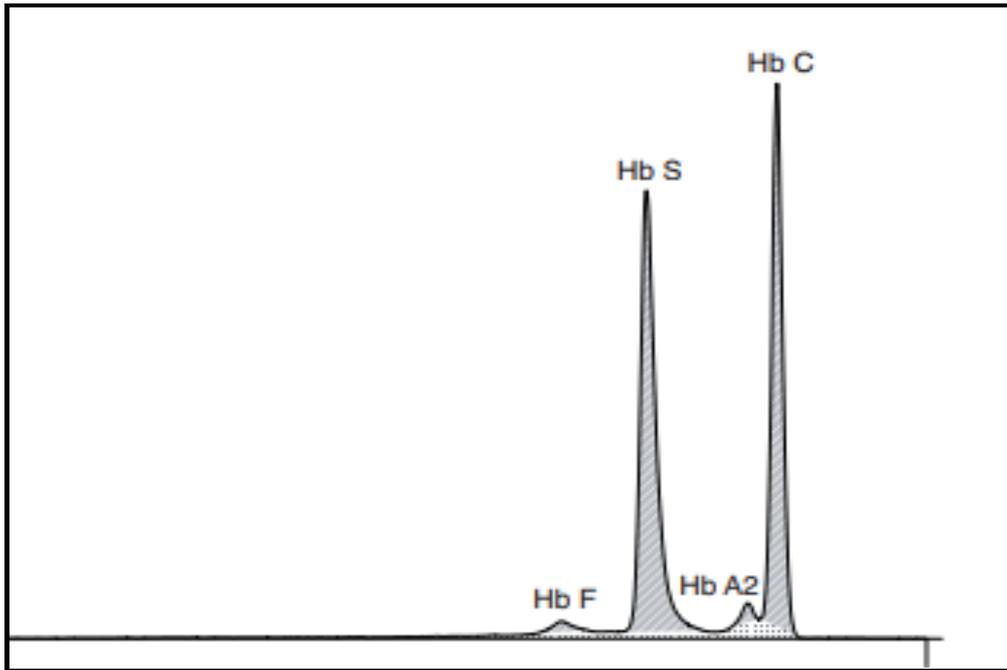
2. Profil électrophorétique anormal avec Hb S hétérozygote.



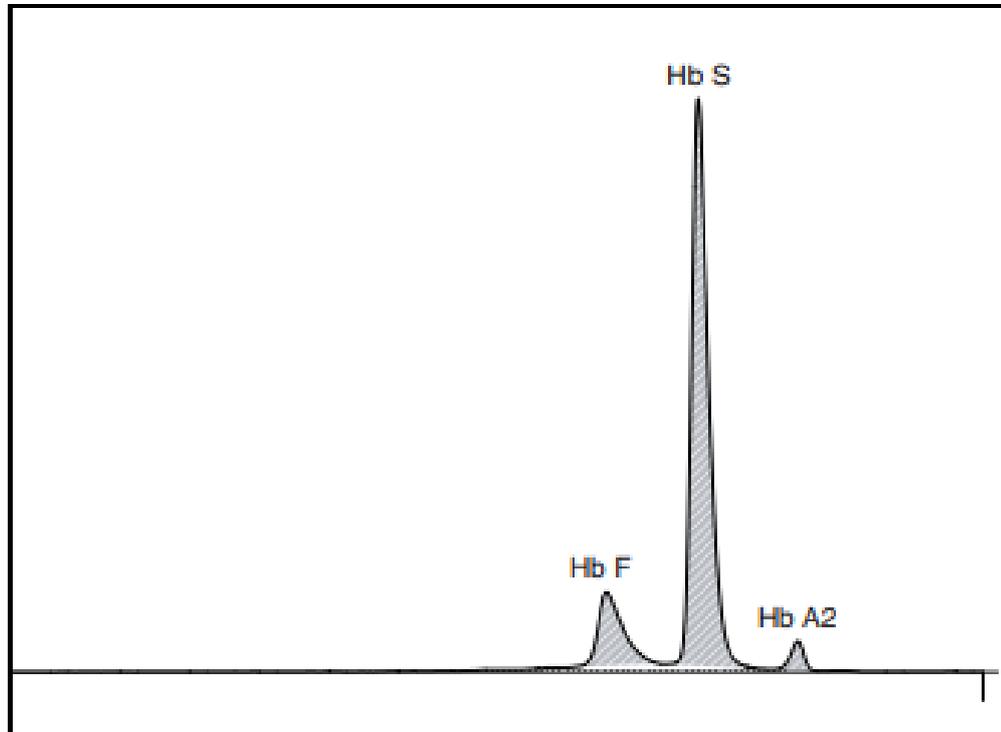
3. Profil électrophorétique anormal avec Hb C



4. Profil électrophorétique anormal avec Hb C.

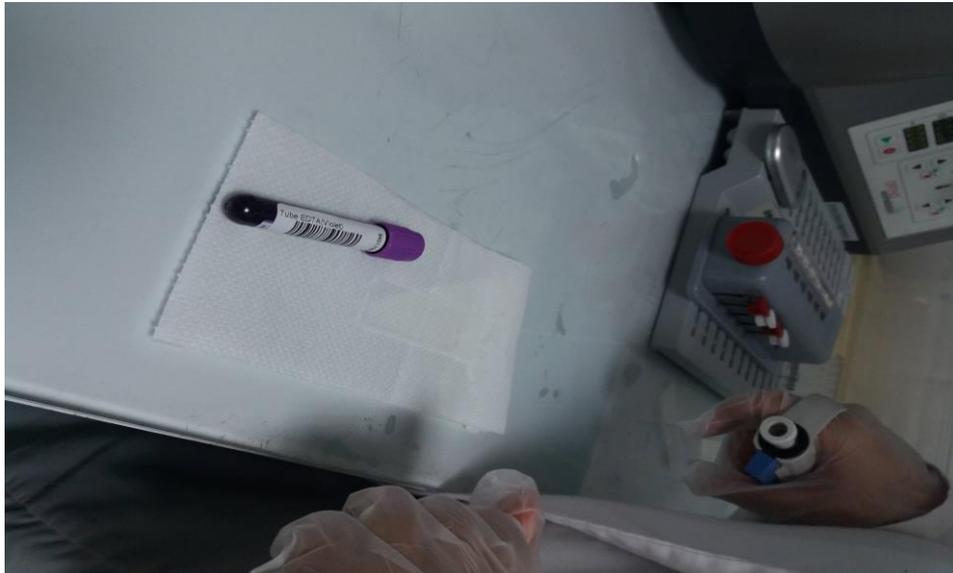


5. Profil électrophorétique anormal avec la composite d'h hétérozygoties SC

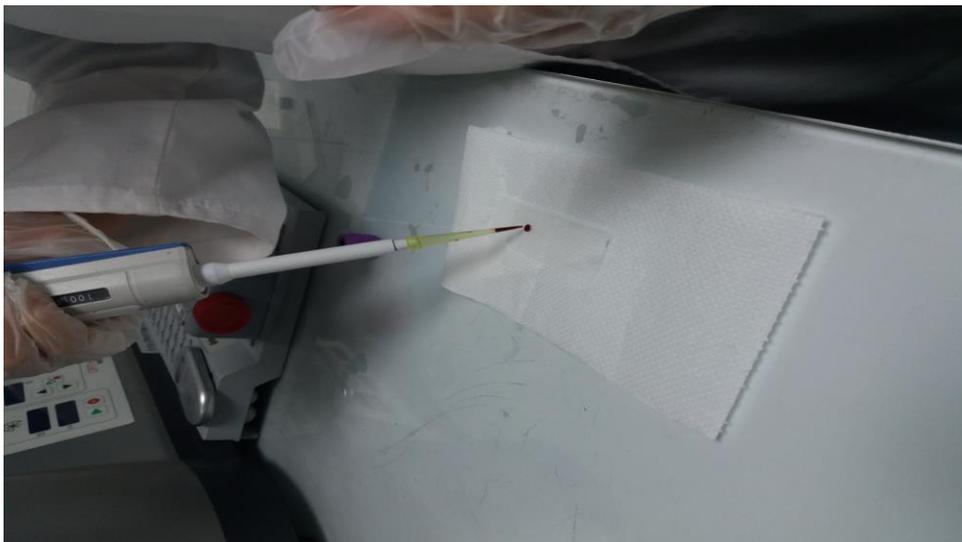


6. Profil électrophorétique anormal avec HbS homozygote .

I. Les étapes de réalisation de frottis sanguin



1. La préparation de l'échantillon sanguin et matériel de travail



2. Mètre une petite goutte de sang sur la lame



3. L'étalement de la goutte du sang



4. Coloration de frottis sanguin par la 1^{ère} coloration de May-Grunwald (à gauche) puis la 2^{ème} coloration de Giemsa.

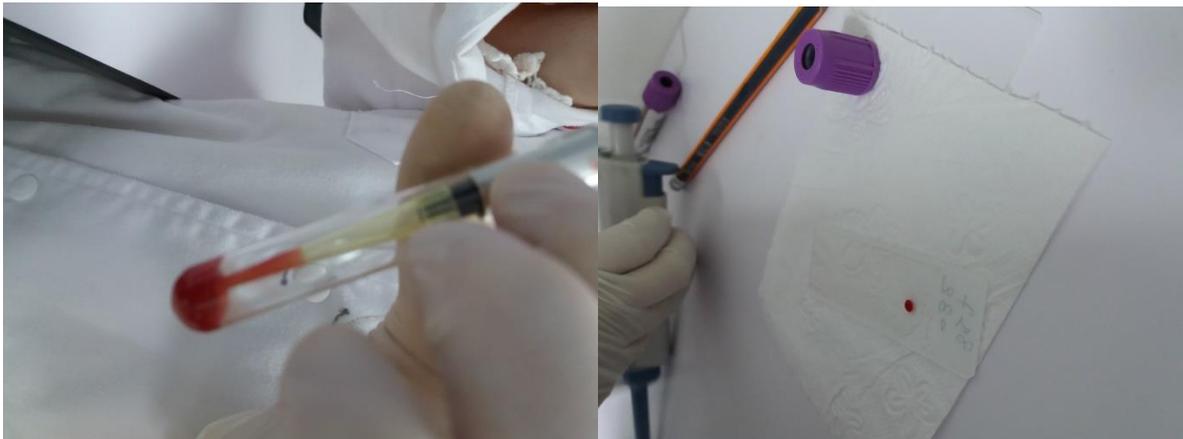


5. La mise de l'huile d'émersion avant la lecture

II. Les étapes de test falciformation



1. Préparation de la lame et les échantillons de travail.



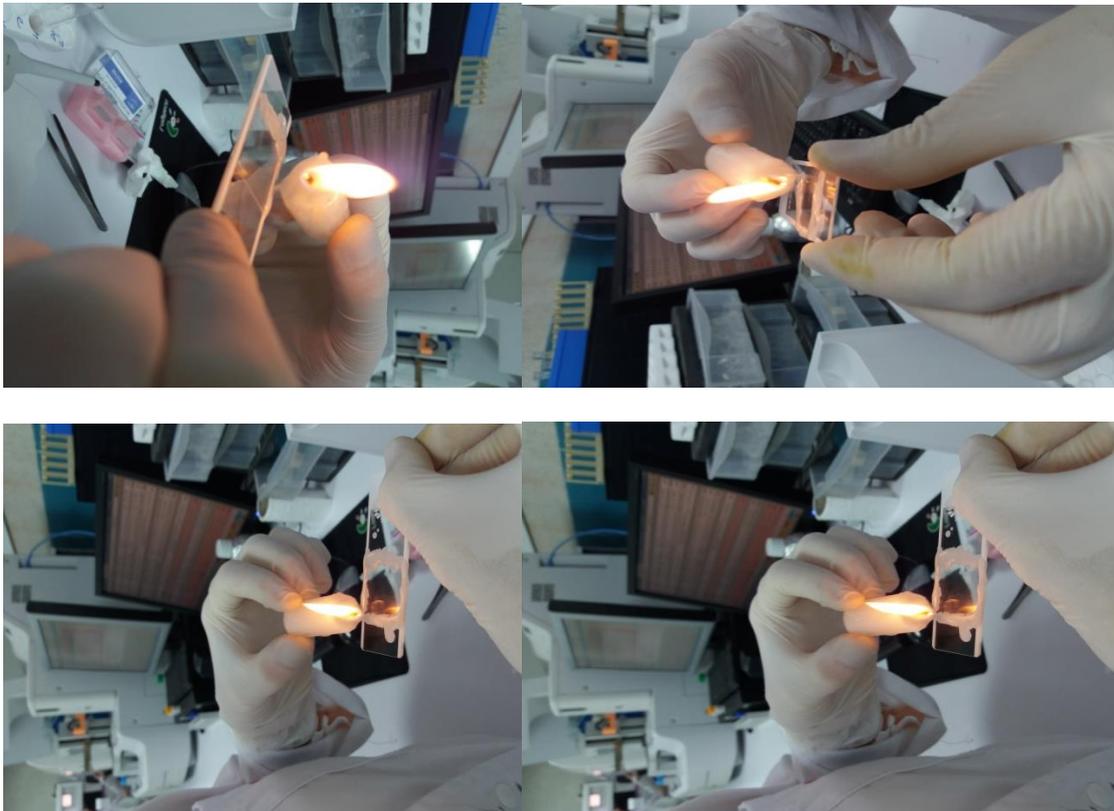
2. La mise d'une goutte de sang sur la lame



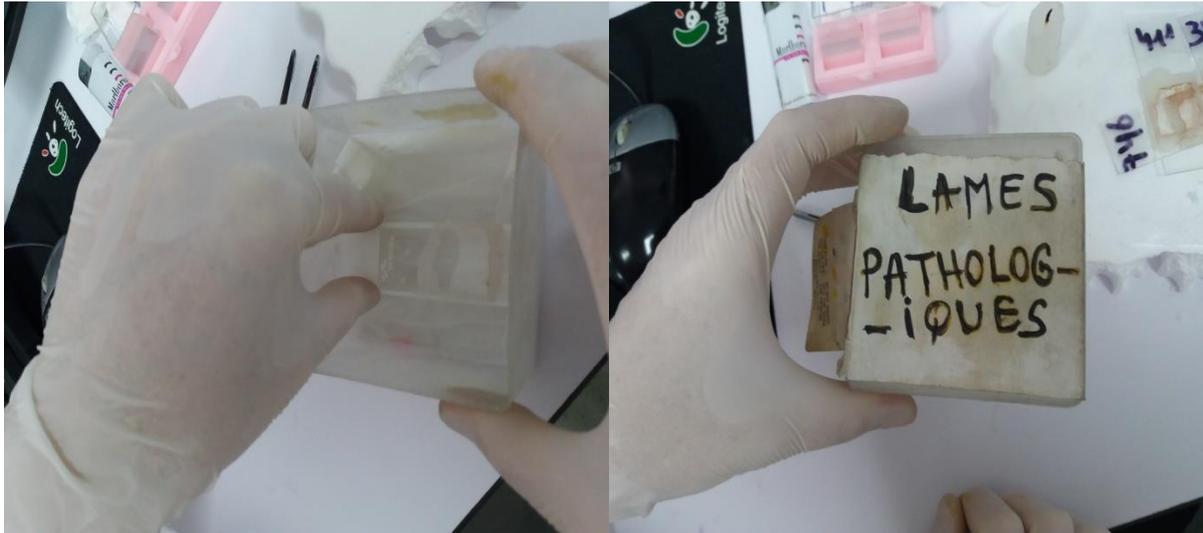
3. L'étalonnage de la goutte du sang sur la lame



4. Le couvrage de la lame étalé par une lamelle



5. Recouvrement des 4 bords de la lamelle par la paraffine .



6. L'incubation de la lame avant la lecture sous microscope .

Glossaire

Anémie : L'anémie (du privatif «*an*»- et du grec ancien «*haimos*», « sang ») est une anomalie de l'hémogramme caractérisée par une diminution de la concentration en hémoglobine intra-érythrocytaire (et quelques fois par le manque d'érythrocytes ou globules rouges). Ce manque entraîne un mauvais transport du dioxygène par le sang. Elle est diagnostiquée par la numération formule sanguine, un examen effectué sur une prise de sang. L'anémie serait donc la diminution pathologique du nombre de globules rouges ou du taux d'hémoglobine dans le sang (**Wainsten., 1990**).

Anémie hémolytique : Une anémie hémolytique est due à la destruction excessive des hématies (globules rouges) (**vulgaris-medical**).

Corps de Hienz : Le corps de Heinz est une anomalie des globules rouges, ou hématies. L'hémoglobine, en cas de corps de Heinz, change de structure et perd sa forme circulaire pour subir des déformations. Le corps de Heinz est caractéristique d'une anémie hémolytique, qui se distingue par une destruction massive des globules rouges (**Wainsten., 1990**).

Crises drépanocytaires : Ce sont les accidents aigus douloureux qui émaillent la vie du drépanocytaire. Elles sont souvent révélatrices de la maladie. Leurs fréquences et leur importance varient d'un malade à l'autre. Ces crises sont dues à des phénomènes vaso-occlusifs. Les douleurs peuvent siéger à plusieurs endroits mais ce sont les douleurs ostéoarticulaires et abdominales qui sont plus fréquentes. Les facteurs déclenchants sont : infection, paludisme, humidité, froid, surmenage, situation d'hypoxie, déshydratation, acidose, effort physique intense, etcn(**Cotton., 2009**).

Hypochromie : Diminution de la coloration des hématies de la concentration moyenne en hémoglobine qui est inférieure à 32 g/dL (**Lodish et al., 2000**).

Microcytose : Anomalie de morphologie érythrocytaire correspondant à un diamètre des hématies inférieur à l'habituel (TGM < 6 µm) et volume globulaire moyen(VGM) inférieur à 80 fL chez l'adulte (**Lodish et al., 2000**).

Polyglobulie : Augmentation anormale du volume qu'occupent les hématies dans le sang. Ce volume est apprécié par la mesure de l'espace de dilution d'hématies. Il est normalement proche de 28 à 35 ml/kg (**Wainsten., 1990**).

Réticulocyte : Les réticulocytes sont des globules rouges jeunes qui possèdent encore des ribosomes et des mitochondries, mais dépourvues de peroxydase. Ils sont dès lors capables d'un métabolisme assez intense et ils synthétisent encore activement de l'hémoglobine. Le taux des réticulocytes est exprimé en pourcentage du nombre de G.R. par millimètre cube. Le taux normal est de 0,2 à 2 % chez l'adulte (**vulgaris-medical**).

Dédicace

*Je remercie Dieu tout puissant et miséricordieux de m'avoir donné
la santé, le courage pour réaliser ce travail.*

*Chaleureusement, je dédie ce modeste travail fruit de mon labeur à :
la lumière de ma vie et l'espoir de mon existence*

Ma mère

*La source de mon inspiration, celui qui m'a rendu telle que je suis et telle
qu'il a souhaité :*

Mon père

*Pour leur respect dans mon professionnel,
leur confiance, leur sacrifice et leur amour*

Mes sœurs et frères

Feriel et son mari Mhamed

Asmâa et son mari Mohamed

Ahmed

Mohamed et sa femme Karima

Moufid et sa femme Hanan

Mes chères Nièces et Neveux

A toute la famille : Houhou et Salma.

Mes Copines : Amel, Salma, Nawel, Souhila et Warda.

A toute la promotion de Genie biologique 2017

Waffâa

Remerciements

Je remercie d'abord « Dieu » le plus puissant qui m'a donné du courage et de la volonté afin d'accomplir et de parvenir à élaborer ce travail.

Je tiens à remercier particulièrement notre promotrice M^{me} KEBBAS S maître de conférence B au Faculté des Science de la Nature et de Vie , pour avoir dirigé ce travail, et pour son aide très précieux, sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses conseils qui ont fait progresser ce travail. Un agréable devoir de lui adresser un grand merci pour, la confiance et liberté d'action dont j'ai bénéficié tout au long de notre stage.

Je tiens à exprimer ma respectueuse reconnaissance à M^{me} BENCHABANE A de conférence B au Faculté des Science de la Nature et de Vie pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la présidence du jury.

Nos reconnaissances vont également à M^{me} AMOKRANE S maître assistant A au Faculté des Science de la Nature et de Vie qui m'a fait l'honneur de bien vouloir examiner ce travail. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assurés de tout notre respect et de notre profonde gratitude.

Je remercie tous les personnel de Plateau technique de BIOGROUPE et en particulier le personnel de l'unité Hématologie et son responsable Dr AZMADROUB qui m'a aidés à surmonter mon aléas au cours de mon pratique.

Un grand merci à tous les membres du l'équipe de Biochimie Younes, Zaki, Zola, Zahra, Chahra, Samia et Dr Medjadba pour son soutien et son encouragement.

Je veux témoigner mon gratitude et mon profond respect à tous les enseignants du département de biologie.

Enfin, je remercie tous ceux qui sont m'aidé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I : Données bibliographiques	
I. Rappels sur l'hémoglobine.....	02
I.1. Définition de l'hémoglobine	02
I.2. Structure de la molécule d'Hb.....	03
I.2.1. L'hème.....	02
I.2.2. La globine	03
I.3. Fonction de l'hémoglobine.....	04
I.4. Les différents types de l'hémoglobine humaines.....	05
I.4.1. Hémoglobines embryonnaires.....	05
I.4.2. Hémoglobine fœtale.....	05
I.4.3. Hémoglobine Adulte	06
I.5. Les gènes de l'Hb.....	06
II. La physiopathologie de l'hémoglobine	08
II.1. Types d'hémoglobinopathies.....	08
II.2. Les variants.....	08
II.2.1. l'hémoglobine S ou la drépanocytose.....	09
II.2.2. L'hémoglobinose C	12
II.2.3. L'hémoglobinose D.....	12
II.2.4 . L'hémoglobinose E.....	13
II.3. Les thalassémies	13
II.3.1. Les β -thalassémies	14
II.3.2. Les α -thalassémies.....	14
II.4. Autres hémoglobinopathies.....	15
II.6. Diagnostique biologique d'une hémoglobinopathie.....	15
III. Les techniques d'étude biologique de l'hémoglobine	16
III.1 Les techniques d'étude séparatives.....	16
III.1.1.L'électrophorèse.....	16
III. 1.2. La chromatographie.....	17
III.1.3. La spectrophotométrie.....	18
III.2. Les techniques d'étude non séparatives.....	18

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	20
I.1. Matériel biologique.....	20
I.2. Matériel non biologique.....	20
II. Méthodologies de travail.....	20
II.1 L'hémogramme.....	20
II.1.1. Numération Formule Sanguine NFS.....	20
II.1.2. Frottis sanguin	22
II.2. Le test de falciformation.....	23
II.3. La Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	24
II.4. L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine.....	26
II.5.L'enquête génétique.....	29

Chapitre III : Résultat et discussion

I. Les résultats des tests Hématologique	30
I.1. Les résultats de NFS	30
I.1.1. Résultats des états hétérozygotes	30
I.1.2.Les résultats des états homozygotes et composites	31
I.2. Les résultats de frottis sanguin.....	32
I.3. Test Emmel ou falciformation	33
II. Les résultats des profils chromatographique et électrophorétique	34
II.1. Hémoglobine normale.....	34
II.2. Drépanocytose hétérozygote.....	35
II.3. Drépanocytose homozygote et la composite S/C.....	36
II.4. Autres hétérozygoties	49
III. Étude d'un exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte la drépanocytose	42
VI. L'étude statistique des anomalies	43
VI.1. La répartition des anomalies selon la population globale des patients	43
VI.2. La répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies.....	45
VI.3. La répartition des anomalies selon le sexe des patients	47
Conclusion	48
Références bibliographique	50

Résumé

Les hémoglobinopathies constituent un véritable problème de santé publique. L'intérêt de l'étude de ces pathologies est le dépistage des porteurs pour la prévention des hémoglobinopathies avec la recherche des cas familiaux à terme de développer un conseil génétique.

L'objectif de notre étude est de déterminer le profil épidémiologique et biologique des anomalies de l'hémoglobine dans les régions de Alger et Blida . À travers la réalisation de quelques tests biologiques, tel que le test de falciformation et l'hémogramme complète, avec des techniques biochimiques comme l'électrophorèse capillaire et la chromatographie liquide de haute performance. Il est s'ensuit d'une requête génétique visant à rechercher les hémoglobinopathies au sein d'une famille.

Parmi les 16900 dossiers traités on a révélé 400 cas d'hémoglobinopathies. Le syndrome drépanocytaire est l'anomalie la plus fréquente dans notre population avec 207 malades (51% des forme hétérozygote A/S et 0.5% des forme homozygote S/S), ensuite l'hémoglobinosé C hétérozygote était présente chez 148 cas (37%), les hétérozygoties D (A/D) et E (A/E) occupent la troisième position dans notre série avec 22 cas (5.5%), suivies par la double hétérozygotie S/C rencontrée chez 05 patients (1.25%).

Les mots clés : chromatographie, drépanocytose, électrophorèse , falciformation, hémoglobinopathie, hémogramme, hétérozygote, homozygote.

Liste des tableaux

Tableau I : Les différentstypes d'hémoglobine embryonnaire.....	05
Tableau II : Variation des paramètres hématologiques à l'état hétérozygote chez 3 porteurs différents ; un jeune à 27ans, un homme à 51ans et un vieux à 79ans.....	30
Tableau III : Variation des paramètres hématologiques à l'état homozygote S/S et à l'hétérozygotie composite S/C.....	31

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire

De fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master
en Biologie

Option : Génie biologie

Thème

*Dépistage des hémoglobinopathies par formule
numéraire sanguine et HB glyquée et frottis sous
microscope chez une population adulte*

Présenté par :

M^{elle} Houhou Wafaa

Soutenu le : 08/10/2017.

Devant le jury compose de :

M ^{me} BENCHABANE A	MCB	USDB1	Présidente
M ^{me} AMOKRANE S	MAA	USDB1	Examinatrice
M ^{me} KEBBAS S	MCB	USDB1	Promotrice

Année universitaire 2016-2017

الملخص

تعتبر امراض خضاب الدم مشكلة حقيقية للصحة العامة، والاهتمام بدراسة هذه الأمراض هو للكشف عن الناقلين للوقاية من اعتلال الهيموجلوبين، بحثا عن الحالات الأسرية وفي نهاية المطاف لتطوير المشورة الوراثية.

الهدف من دراستنا هو تحديد الوضع الوبائي والبيولوجي لتشوهات الهيموجلوبين في منطقة الجزائر العاصمة والبلدية. من خلال تحقيق بعض الاختبارات البيولوجية، مثل اختبار الشكل المنجلي والعد الكامل للدم، مع التقنيات البيوكيميائية مثل الهجرة الكهربائية والكروماتوجرافيا السائلة عالية . و يتبع ذلك بإجراء تحقيق وراثي للبحث عن اعتلال الهيموجلوبين داخل الأسرة.

من بين 16900 حالة تمت تشخيصها ، تم الكشف عن 400 حالة من امراض خضاب الدم. مرض فقر الدم المنجلي هي المتلازمة الأكثر شيوعا في عدد المرضى لدينا مع 207 مريض (51% من متخالف و 0.5% من متماثل الاليلات) ، وتغاير الزيغوت C موجودة في 148 حالة (37%) ، ثم الهيموجلوبينات المختلفة الاليلات D و E يحتلان المركز الثالث في سلسلتنا مع 22 حالة (5.5%) تتبع بالمتغايرة الاليلات المزدوجة SC ب 05 مرضى (1.25%).

كلمات البحث : امراض خضاب الدم ، مرض الخلية المنجلية، متماثل، متخالف، الكهربائي، تمنجل، تعداد الدم.

Abstract

Hemoglobin diseases constitute a real public health problem. The interest of the study of these pathologies is the detection of the carriers for the prevention of hemoglobinopathies, in the search of the family cases to develop in the long term a genetic counseling.

The objective of our study is to determine the epidemiological and biological profile of hemoglobin abnormalities in the Algiers and Blida regions. Through the realization of some biological tests, such as sickling test and complete blood count, with biochemical techniques such as capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography.

Of the 16,900 cases treated, 400 cases of hemoglobin diseases were revealed. Sickle cell syndrome is the most frequent abnormality in our population with 207 patients (51% heterozygous A / S and 0.5% homozygous S / S), followed by heterozygous hemoglobin C in 148 cases (37%), the heterozygous D (A / D) and E (A / E) occupied the third position in our series with 22 cases (5.5%), followed by the double heterozygote S / C encountered in 05 patients (1.25%). It followed by a genetic investigation to search for hemoglobinopathies inside a family.

Keywords: chromatography, complete blood count, electrophoresis, hemoglobin diseases, homozygous, heterozygote, sickle cell anemia, sickling.

Glossaire

Anémie : L'anémie (du privatif «an»- et du grec ancien «*haimos*», « sang ») est une anomalie de l'hémogramme caractérisée par une diminution de la concentration en hémoglobine intra-érythrocytaire (et quelques fois par le manque d'érythrocytes ou globules rouges). Ce manque entraîne un mauvais transport du dioxygène par le sang. Elle est diagnostiquée par la numération formule sanguine, un examen effectué sur une prise de sang. L'anémie serait donc la diminution pathologique du nombre de globules rouges ou du taux d'hémoglobine dans le sang (**Wainsten., 1990**).

Anémie hémolytique : Une anémie hémolytique est due à la destruction excessive des hématies (globules rouges) (**vulgaris-medical**).

Corps de Hienz : Le corps de Heinz est une anomalie des globules rouges, ou hématies. L'hémoglobine, en cas de corps de Heinz, change de structure et perd sa forme circulaire pour subir des déformations. Le corps de Heinz est caractéristique d'une anémie hémolytique, qui se distingue par une destruction massive des globules rouges (**Wainsten., 1990**).

Crises drépanocytaires : Ce sont les accidents aigus douloureux qui émaillent la vie du drépanocytaire. Elles sont souvent révélatrices de la maladie. Leurs fréquences et leur importance varient d'un malade à l'autre. Ces crises sont dues à des phénomènes vaso-occlusifs. Les douleurs peuvent siéger à plusieurs endroits mais ce sont les douleurs ostéoarticulaires et abdominales qui sont plus fréquentes. Les facteurs déclenchants sont : infection, paludisme, humidité, froid, surmenage, situation d'hypoxie, déshydratation, acidose, effort physique intense, etcn(**Cotton., 2009**).

Hypochromie : Diminution de la coloration des hématies de la concentration moyenne en hémoglobine qui est inférieure à 32 g/dL (**Lodish et al., 2000**).

Microcytose : Anomalie de morphologie érythrocytaire correspondant à un diamètre des hématies inférieur à l'habituel ($TGM < 6 \mu m$) et volume globulaire moyen(VGM) inférieur à 80 fL chez l'adulte (**Lodish et al., 2000**).

Polyglobulie : Augmentation anormale du volume qu'occupent les hématies dans le sang. Ce volume est apprécié par la mesure de l'espace de dilution d'hématies. Il est normalement proche de 28 à 35 ml/kg (**Wainsten., 1990**).

Réticulocyte : Les réticulocytes sont des globules rouges jeunes qui possèdent encore des ribosomes et des mitochondries, mais dépourvues de péroxysome. Ils sont dès lors capables d'un métabolisme assez intense et ils synthétisent encore activement de l'hémoglobine. Le taux des réticulocytes est exprimé en pourcentage du nombre de G.R. par millimètre cube. Le taux normal est de 0,2 à 2 % chez l'adulte (**vulgaris-medical**).

Listes des figures

Figure (01) : Schémas de la molécule complète d'hémoglobine	02
Figure (02) : L'hème dans l'oxyhémoglobine	03
Figure (03) : Structure de la globine.....	04
Figure (04) : Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines précédant et suivant la naissance.....	06
Figure (05) : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine	07
Figure (06) : Falciformation des globules rouges, perte d'élasticité et occlusion des vaisseaux de faible calibre.....	11
Figure (07) : Électrophorèse de l'hémoglobine montrant la drépanocytose homozygote	17
Figure (09) : Schémas comparatif des résultats positif et négatif de teste falciformation sur microscope optique	19
Figure (10) : Profil des différents fractions de l'hémoglobine par l'HPLC avec leurs rapports (pics) sur le chromatogramme.....	25
Figure (11) : Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis® , avec identification automatique des pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C et découpage en 15 zones de migration	28
Figure (12) : Aspect microscopique des hématies sur frottis sanguin d'un drépanocytaire (MG G x 100).....	32
Figure (13) : Aspect microscopique des hématies falciformes par test Emmel d'un sujet drépanocytaire hétérozygote (MG G x 100).....	33
Figure (14) : Exemples d'un profil normal par électrophorèse capillaire et HPLC	34
Figure (15) : Exemples d'un profil drépanocytaire hétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC.....	35
Figure (16) : Exemple d'un profil drépanocytaire homozygote par électrophorèse capillaire.....	36
Figure (17) : Profil de la double hétérozygotie (composite) S/C par électrophorèse capillaire.....	38
Figure (18) : Exemples d'un profil d'HbC hétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC.....	39
Figure (19) : Exemples d'un profil d'HbDhétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC	40

Figure (20) : Exemples d'un profil d'HbEhétérozygote par électrophorèse capillaire et HPLC.....	41
Figure (21): Exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte de la drépanocytose.....	42
Figure (22) : Pourcentage de la présence des hémoglobinopathies par rapport à la population globale.....	43
Figure (23) : la répartition des anomalies par rapport à la population	43
Figure (24) : Répartition des anomalies selon leurs différents types.....	46
Figure (25) : Répartition de la population selon le sexe.....	47

L'étude s'est déroulée au niveau du service de laboratoire d'Analyse Médicale BIO-GROUPE de Ouled Slama ce laboratoire comporte plusieurs unités à savoir : la biochimie où nous avons effectué l'électrophorèse de l'hémoglobine, et l'hématologie où le test de falciformation et l'hémogramme ont été réalisés.

Cette étude a été complétée par une enquête rétrospective et perspective, de la période début Janvier 2017 jusqu'à la fin Avril 2017, Sur une population des adultes (+ de 15 ans) de 17000 sujets , nous avons trouvé 400 sujets atteintes des hémoglobinopathies.

L'objectif de cette étude est d'une part : la détection et la caractérisation des anomalies de l'hémoglobine, et d'autre part : la réalisation d'une enquête génétique, à la recherche de cas familiaux.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons utilisé des échantillons sanguin. Le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction veineuse et le sang a été recueilli dans des tubes EDTA et dans des tubes secs, le test de falciformation et l'hémogramme ont été réalisés dans les meilleurs délais avec le sang recueilli sur EDTA.

I.2. Matériel non biologique

L'ensemble du matériel composé de appareillages, les milieux de cultures, réactifs et solutions sont énumérés au niveau d'annexe I .

II. Méthodologies de travail

II.1. L'hémogramme

II.1.1. Numération Formule Sanguine NFS

L'hémogramme est l'examen biologique le plus prescrit dans toutes pathologies confondues. Il apporte des informations sur les cellules du sang contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme: oxygénation des tissus, défense de l'organisme contre les agents

pathogènes, prévention de risque hémorragique. Le sang est recueilli dans des tubes EDTA et la lecture effectuée au multi paramètres (18 paramètres) le jour même de prélèvement sur un compteur automatique de type SYSMEX XT 4000 (Annexe I) selon l'ISO 22870. C'est un appareil qui permet la numération des éléments figurés du sang par impédance, la mesure du taux d'hémoglobine par **spectrophotométrie**, le calcul des constantes érythrocytaires avec des alarmes pour tous les paramètres (globules rouges, globules blancs et de plaquettes), afin de rechercher une anémie, une microcytose ou une pseudo-polyglobulie.

II.1.1.1. Principe selon SYSMEX XT (2010)

L'appareil aspire 30 µl de sang total bien homogénéisé à partir d'un tube de prélèvement ouvert et maintenu au contact de la sonde d'aspiration. Un volume de 7,5 ml de diluant est ajouté dans la cuve de pré mixage pour atteindre un rapport de dilution 1/251

L'échantillon dilué est alors divisé en deux parties distinctes :

- 100 µl de l'échantillon dilué sont mélangés avec 5 ml de diluant pour l'analyse des paramètres érythrocytaires et plaquettaires.
- Le reste est mélangé avec 1 ml de réactif de lyse dans la chambre de mélange pour les globules blancs. Ce réactif altère les membranes des globules rouges et permet la libération de l'hémoglobine. Cette dilution est utilisée pour mesurer les globules blancs ainsi que le taux d'hémoglobine.

L'impédance électrique est utilisée pour effectuer le comptage des globules. Dès qu'une cellule se présente devant l'ouverture, une modification de la résistance électrique se produit, ce qui a pour effet de générer un pic de tension équivalent. Le nombre de pics correspond au nombre de cellules. L'amplitude de chaque pic, est directement proportionnelle au volume de la cellule qui lui a donné naissance.

Le XT 4000 mesure l'hémoglobine par spectrophotométrie. La longueur d'onde de la source lumineuse est de 540 nm.

L'hématocrite, la CCMH et la TCMH sont calculés dès que les paramètres concernés sont mesurés :

- Hématocrite = Volume Globulaire Moyen \times nombre de globules rouges.
- CCMH = hémoglobine / hématocrite.
- TCMH = hémoglobine / nombre de globules rouges.

II.1.2. Frottis sanguin

II.1.2.1.Principe

Une goutte de sang totale est utilisée pour réaliser un frottis coloré par une technique de coloration rapide (variante de la coloration de May-Grünwald et Giemsa) de façon à observer au microscope pour simplifier la lecture des éléments figurés du sang, afin de déterminer s'il y a présence d'anomalies, l'aspect ou le nombre de cellules (**Carrell., 1972**).

II.1.2.2. Protocole selon Carrell (1972) (Annex II)

Nous avons déposé la plus petite goutte de sang possible à l'extrémité d'une lame en verre avec une pipette et nous avons fait glisser la lamelle maintenue à 45° sur tout le long de la lame pour étaler uniformément la goutte de façon à ce que le sang s'étale sous la lamelle par capillarité, puis nous avons fait séché la lame en l'agitant dans l'air avec la fixation de la goutte étalée par le trempage 5 fois de suite pendant une seconde dans le fixateur avec l'égouttage de ce dernier sur papier filtre.

Ensuite nous sommes passé à la fixation et la coloration rapide de cette lame (appelée KIT RAL 555) qui a été réalisée en 2 étapes : la première par le trempage de la lame 5 fois de suite pendant une seconde dans le fixateur et le colorant de May-Grünwald ; puis 5 fois de suite pendant une seconde dans le deuxième colorants colorant (Giemsa).

En fin nous avons bien égoutté la lamelle colorée sur un papier filtre et la rincer à l'eau distillée en commençant par enlever l'excès de colorant sur le dos de la lame puis en laissant couler doucement l'eau distillée sur le frottis.

La lecture de cet frottis est réalisée sous microscope optique à l'objectif 100 sous huile à immersion ou bien une visionneuse automatique appelé CELLAVISION (voir Annexe I).

II .2. Le test de falciformation**II.2.1. Principe du test**

En l'absence d'oxygène, les hématies ayant l'HbS prennent la forme de faucille ainsi ce test consiste à créer un milieu pauvre en oxygène qui consiste à provoquer entre la lame et la lamelle de microscope une désoxygénation (réduction de l'oxygène) totale de l'échantillon de sang à examiner : l'HbS se polymérise alors sous la forme de cristaux insolubles allongés qui déforment les hématies. Cette déformation est facilement observable au microscope, à grossissement x40 ou x100.

II.2.2. Techniques

Selon **Merault et al. (1996)**, deux (02) méthodes sont possibles, avec ou sans réactif du métabisulfite (Annexe II).

Dans tous les cas il faut manipuler rapidement pour éviter l'oxygénation du sang.

A) Avec réactif , la métabisulfite (substance réductrice)

C'est une technique plus rapide et plus fiable mais nécessitant ce réactif, la solution du métabisulfite de sodium ($S_2O_5Na_2$) à 2 % (2 grammes pour 100 ml) dans l'eau : dissoudre 40 mg de métabisulfite de Na dans 2 ml d'eau ou 100 mg dans 5 ml d'eau.

À l'aide d'une pipette, nous avons mis une goutte de sang (environ 5 μ l) sur une lame et nous avons mélangé cette goutte sanguine avec une autre goutte d'une solution réductrice (20 μ l métabisulfite de sodium) qui consomme l'oxygène du milieu. Ceci entraîne la cristallisation de l'Hb et la falciformation. En suite la moitié du mélange est aspirés puis la lame est couvrirs rapidement par une lamelle sans faire de bulles d'air.

Une fois que la lame est prête, elle est incubée dans une petite chambre humide pendant 30 mn avant la lecture au microscope optique.

Si le résultat est négatif, il faut examiner de nouveau 2 h plus tard.

S'il est encore négatif, de préférence luter la lamelle avec du vernis à ongle, puis examiner 24 h plus tard.

B) Sans réactif, avec paraffine

Cette technique est plus lente, moins fiable (faux négatifs) mais moins cher.

Nous avons mis une petite goutte de sang (5 μ l) sur une lame avec une goutte environ 4 fois plus grosse (environ 20 μ l) de sérum physiologique juste à côté ou dessus (eau avec 9g/l de sel), et nous avons mélangé rapidement mais soigneusement puis nous avons aspiré environ la moitié du liquide.

Ensuite nous avons couvré rapidement cette lame à l'aide d'une lamelle sans faire aucune bulle d'air et nous avons mis de la paraffine aux bordure de la lamelle pour que l'oxygène ne puisse absolument pas pénétrer.

La lecture de cette lame est effectuée sur un microscope optique après 1 heure puis à 2, 6 et 24 heures si on n'a pas vu d'hématies falciformes.

II.2.3. Interprétation des résultats

Le test est négatif si les hématies gardent leur forme ronde. Si le test est positif, les hématies prennent progressivement une forme de faucille ou de banane, souvent aussi en forme de feuille de houx. Il est recommandé d'examiner plusieurs zones de préparation car la falciformation ne s'effectue pas de façon homogène (**Baledent., 2000**).

II.3. La Chromatographie liquide haute performance (HPLC)**II.3.1. Principe**

Cette technique est effectuée selon la directive européenne **98/79/EC**, sur l'automate Arckray Adams HA 8180 (Annexe I), qui a du principe de pousser l'échantillon sanguin par un liquide sur une colonne échangeuse de cations, et permettre à les molécules d'être séparées en fonction de leurs charges électriques.

Cet automate est relié à un système d'intégration et de calcul et la séparation des fraction d'hémoglobine a optimisée pour éliminer des interférences des variants (HbS, HbC, HbD, HbE), d'HbA1c, HbF, via un détecteur avec les rayons UV à 415 nm (**ADAMS® A1c HA-8180V, 2006**).

Les pics obtenus sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas (des pics étroits et hauts sont plus faciles à isoler du bruit de fond que des pics larges et bas). La

combinaison de ces attributs de rapidité et résolution élevées qui conduit à l'appellation « haute performance » (Farce., 2000).

II.3.2. Interprétation des résultats

L'instrument imprime automatiquement une liste des résultats de mesure à la fin d'un lot de mesure sur un papier thermique (figure 10) qui contient toutes les informations nécessaires pour identifier le profil de chaque patient (position de tube dans le portoir, date et heure de la mesure, ID de patient, etc....) (Annexe II) (ADAMS ® A1c HA-8180V, 2006).

Les résultats de la mesure sont exprimés par les 2 unités de valeur internationale : NGSP (%) et IFCC (mmol/mol) pour chaque fraction d'hémoglobine (les variants, HbA1c HbF ...)(ADAMS ® A1c HA-8180V).

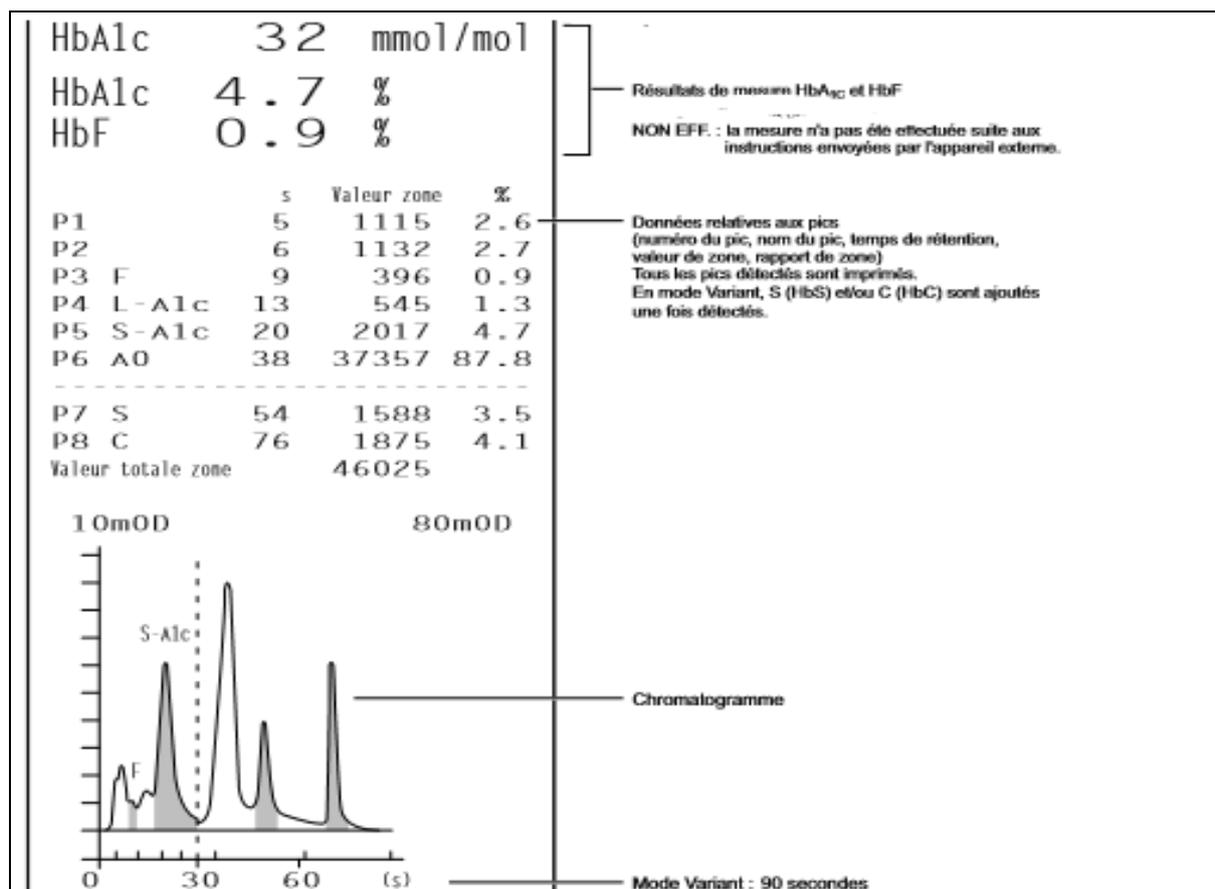


Figure (10) : Profile des différents fractions de l'hémoglobine par l'HPLC avec leurs rapports (pics) sur le chromatogramme (Originale).

Les données sont relatives aux pics (numéro de pic, nom du pic, temps de rétention, valeur de zone). Les principaux variants (HbS, HbC, HbD et HbE) sont présentés sous forme des pics qui sont relatif a les données précédentes dans le chromatogramme(ADAMS ® A1c HA-8180V, 2006).

II.4. L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine

II.4.1. Principe

Cet examen de laboratoire biologique permet d'isoler les différentes formes d'hémoglobines, qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et, partant, de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre , et des voltages élevés (15 à 30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption U.V, fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible. Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée (**Guis et al ., 2013**).

L'automate CAPILARYS 2 Flex Piercing- SEBIA (Annexe I) sépare toutes les fractions de l'Hb par électrophorèse capillaire et quantification par spectrophotométrie à 415nm.

II.4.2. Échantillons analysés

L'électrophorèse capillaire de l'hémoglobine par « Capillarys 2 Flex Piercing » se fait sur culot globulaire obtenu à partir de sang frais prélevé sur anticoagulant EDTA. La préparation du culot globulaire est réalisée par centrifugation du tube de sang total pendant 5 minutes à 5000 tr/min, élimination du maximum de plasma, lavage des globules rouges par de l'eau physiologique à deux reprises et élimination de l'excès d'eau physiologique à la surface du culot globulaire lavé. Il existe un système de « cap piercing » permettant l'analyse en sang total,. Les échantillons de sang total peuvent être conservés au maximum 7 jours entre 2 et 8°C, puisqu'au-delà de ce délai, la dégradation des hémoglobines dans l'échantillon risque d'être trop importante. Dans un échantillon conservé plus de 7 jours à 4°C, certaines fractions liées à une dégradation de l'échantillon apparaissent., d'où l'importance du respect de la procédure pré-analytique (**Guis et al ., 2013**).

II.4.3. Technique analytique

La méthode d'électrophorèse capillaire Sebia fait intervenir plusieurs étapes. Tout d'abord, les tubes primaires contenant les culots globulaires préparés précédemment sont placés sur les racks en positions 1 à 10. Les tubes doivent être débouchés et les codes-barres placés face à la fenêtre de lecture, l'automate procède à la lecture des codes-barres des tubes primaires échantillons et du racks. Les échantillons sont ensuite hémolysés et dilués par la solution hémolysante dans les cupules réactif, avec rinçage de l'aiguille de prélèvement entre chaque dilution. Un lavage des capillaires a lieu avant injection des échantillons hémolysés dans ces capillaires, l'injection s'effectuant à l'anode par aspiration. Les différentes fractions d'hémoglobine migrent alors dans les capillaires en milieu basique (pH 9,4), permettant leur séparation et leur détection directe à la cathode. La migration, qui dure environ 8 minutes, se fait à voltage constant élevé (plusieurs milliers de volts) et à température régulée par effet Peltier. La lecture des différents pics d'hémoglobine est réalisée à 415 nm, correspondant à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'hémoglobine. Toutes ces étapes aboutissent à l'obtention de tracés ou profils électrophorétiques qui seront ensuite interprétés par le biologiste (**Guis et al., 2013**).

II.4.4. Interprétation des profils électrophorétiques

À la fin de l'analyse, les profils électrophorétiques s'affichent sur le logiciel Phoresis® fourni par la société Sebia, où ils font l'objet d'une interprétation visuelle à la recherche d'éventuelles anomalies. Une quantification relative des différentes fractions de l'hémoglobine est automatiquement réalisée. Afin de faciliter l'interprétation des profils électrophorétiques, le pic d'hémoglobine A est positionné au centre de la fenêtre de reprise. Les pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C sont identifiés de façon automatique. Les positions des autres variants de l'hémoglobine sont repérées à l'écran au sein de zones allant de Z1 à Z15 (Figure 11). Une liste des variants connus potentiellement présents dans chaque zone apparaît lorsque l'on place le curseur sur cette zone en haut de l'écran (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

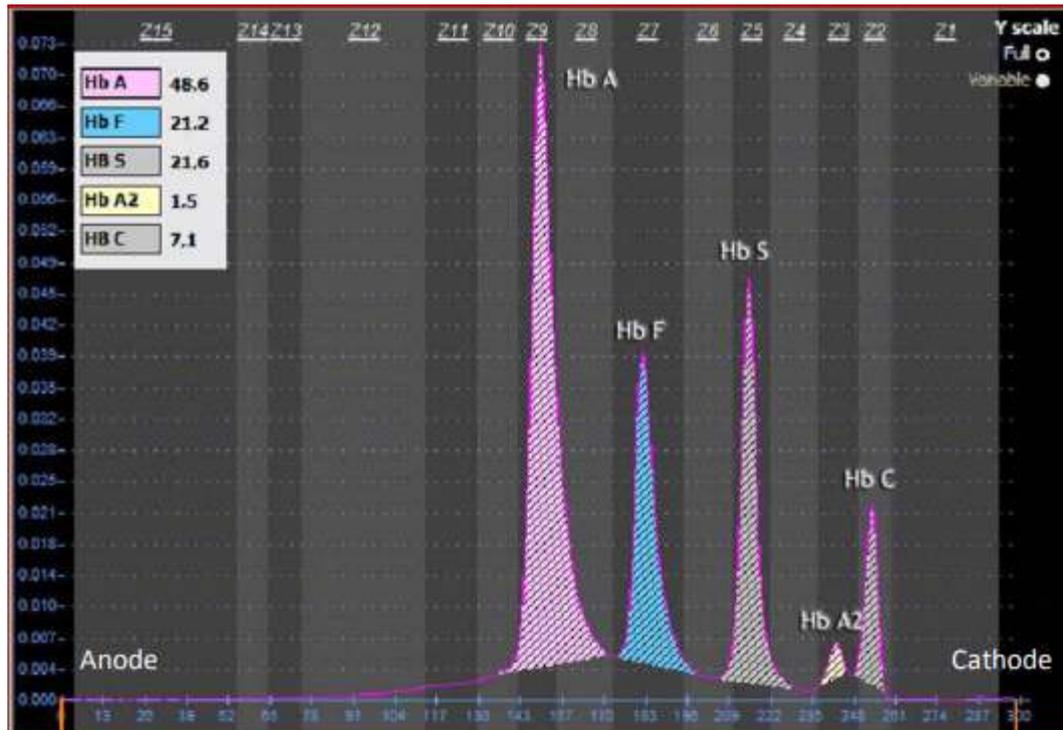


Figure (11) : Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis® , avec identification automatique des pics d'Hb A, Hb A2, Hb F, Hb S et Hb C et découpage en 15 zones de migration (**Originale**).

Les profils électrophorétiques de sangs normaux, à l'âge adulte (Annexe III), montrent la présence d'une majorité d'Hb A et d'une faible proportion d'Hb A2, de l'ordre de 2,2 à 3,2%. Une faible fraction d'Hb F est parfois retrouvée, dans ce cas en pourcentage inférieur à 1% (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

Les principaux variants de l'hémoglobine d'intérêt médical ou anthropologique présentent une charge électrique globale modifiée suite au remplacement d'un acide aminé par un autre, résultant lui-même d'une mutation, délétion ou insertion de nucléotides. Leur séparation des autres fractions de l'hémoglobine et leur identification sont rendues possibles par électrophorèse du fait de cette modification de charge (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

Ainsi, l'Hb S, résultant d'une mutation $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$, présente un point isoélectrique plus élevé que celui de l'Hb A et, par conséquent, une charge négative globale plus faible au pH de l'analyse. Elle migre donc en position cathodique par rapport à l'Hb A. Par la

technique d'électrophorèse capillaire, en tampon alcalin, elle migre entre les fractions d'Hb A et d'Hb A₂, à environ un tiers de la distance A₂ - A, dans la zone Z5 (Annexe III).

Concernant l'Hb C, due à la mutation $\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$, son point isoélectrique est encore plus augmenté que celui de l'Hb S. L'Hb C migre alors plus rapidement que l'Hb A et que l'Hb A₂, dont elle est parfois partiellement séparée (notamment dans les hémoglobinoses C homozygotes) (Annexe III).

L'Hb E, dans laquelle un acide glutamique en position 26 de la chaîne β est remplacé par une lysine, migre quant à elle juste après l'Hb A₂, dont elle est totalement séparée.

L'Hb D (appelée D-Punjab, D-Los Angeles, D-Chicago ou encore D-Portugal) est la conséquence du remplacement d'un acide glutamique en position 121 de la chaîne β -globine par une glutamine. En raison de la modification de charge électrique globale qui en résulte, elle migre au niveau de la zone Z6 (Annexe III), en position anodique par rapport à l'Hb S (**Capillarys 2 Flex Piercing, 2014**).

II.5. L'Enquête génétique

La transmission héréditaires des hémoglobinopathies augmente le risque de développer ces maladies génétiques. Le dépistage génétique consiste alors à identifier ces mutations génétiques chez une personne qui présente des antécédents familiaux.

Dans le but de la réalisation d'une enquête génétique d'une famille atteinte une hémoglobinopathies, nous avons établi un questionnaire familiale comportant les informations suivantes :

- Nombre des antécédents familiaux ;
- Nombre d'enfants pour chaque petite famille ;
- Nombre des génération dans la grande famille ;
- La présence de la consanguinité avec son degré dans la famille.

Ce questionnaire est s'ensuit par l'établissement d'une arabe généalogique de cette famille avec une étude du mode de transmission de la maladie.

I. Les résultats des tests Hématologique

I.1. Les résultats de l'hémogramme sanguin

Dans notre étude, nous avons recherché une anomalie de l'hémoglobine devant des signes clinico-biologiques, le plus souvent une anémie, plus rarement une cyanose ou une polyglobulie et/ou en raison de la constatation d'éléments purement biologiques comme une hémolyse ou une microcytose.

I.1.1. Résultats des états hétérozygotes

Les résultats de la numération de la formule sanguine montrent qu'il existe rarement une carence en hémoglobine (anémie hémolytique) à l'état hétérozygote. Chez un nombre très faible de patients nous avons constatés une microcytose hypochrome ou parfois normochrome , la majorité de ces patients sont des personnes âgés (tableaux II).

Tableau II : Variation des paramètres hématologiques à l'état hétérozygote chez 3 porteurs différents ; un jeune à 27ans, un homme à 51ans et un vieux à 79ans.

Test Biologique	27ans	51ans	79ans	Témoins sains (homme)
Nombres de globules rouges($10^6/mm^3$)	$5.5*10^6$	$5.3*10^6$	$3.3*10^6$	$5,939*10^6 \pm 0,759$
Taux de l'hémoglobine (g/dl)	13.96	12.51	11.12	$14,168 \pm 0,53$
TCMH (pg)	32.57	30.34	27.46	$33,981 \pm 1,102$
VGM (fl)	92.10	90.40	82.30	$88,183 \pm 3,098$

D'après **Richard et al. (1999)**, le dépistage d'hémoglobinopathies est généralement envisagé chez deux populations cibles : les nouveau-nées et les adultes en âge de reproduire. En effet , à l'état hétérozygote l'hémoglobinopathie est asymptomatique. D'après **Bernard et al (1998)**, les sujets hétérozygotes (HbS, HbC, HbD, HbE....) ne présentent pas des complications dues à la maladie et ont une espérance de vie qui ne diffère pas de celle des sujets sains.

I.1.2. Les résultats des états homozygotes et composites

Tableau III : Variation des paramètres hématologiques à l'état homozygote S/S et à l'hétérozygotie composite S/C

Test Biologique	Homme malades	Témoins sains (homme)
Nombres de globules rouges($10^6/mm^3$)	4,815 x106 ± 2,95	5,939x106 ± 0,759
Taux de l'hémoglobine (g/dl)	7,815 ± 2,95	14,168 ± 0,53
TCMH (pg)	26,5 ± 1,591	33,981 ± 1,102
VGM (fl)	59,892 ± 3,935	88,183 ± 3,098

Les résultats de hémogrammes (Tableaux II) montrent qu'il existe une diminution significative par rapport aux témoins, ce qui traduit par la présence d'une anémie microcytose et hypochrome grave.

Les résultats obtenus dans le tableau (II) montrent qu'il existe une diminution de nombre de globule rouges chez les sujets malades ($4,815 \times 10^6 \pm 2,95$) par rapport aux sujets témoins ($5,939 \times 10^6 \pm 0,759$), la solubilité de la forme désoxygénée de l'hémoglobine S est moins soluble que l'hémoglobine A. elle peut alors se polymériser selon un processus coopératif et permettre la rigidification, l'agglutination et la falciformation des hématies. De ce fait une hémolyse exagérée entraînant une anémie.

Concernant le taux de l'hémoglobine nos résultats montrent qu'il existe une diminution significatif de taux de l'hémoglobine chez les malades ($7,815 \pm 2,95$) par rapport les témoins ($14,168 \pm 0,53$). Selon **Kafando et al.(2008)** ; le mécanisme de substitution moléculaire de la chaîne de la globine entraînant la production anormale de l'hémoglobine qui cause à la déshydratation des globules rouges et d'un défaut de leur déformabilité liées à la polymérisation des molécules d'Hb en milieu pauvre en O₂.

Nos résultats montrent une diminution significative du volume globulaire moyen chez les drépanocytaires SS et les composites SC ($59,892 \pm 3,935$) par rapport les témoins ($88,183 \pm 3,098$), selon **Frédéric et al. (2013)**; l'hémoglobine polymérisée modifie l'interaction du cytosquelette et de la membrane en altérant ce réseau, par la diminution de la solubilité et de

la déformabilité du globule rouge. La poursuite de ce processus jusque à la formation d'un réseau rigide dans le globule rouge ; qui se déforme, perd sa souplesse, se fragilise et conduit à la falciformation, en constituant ainsi les drépanocytes.

I.2. Les résultats de frottis sanguin

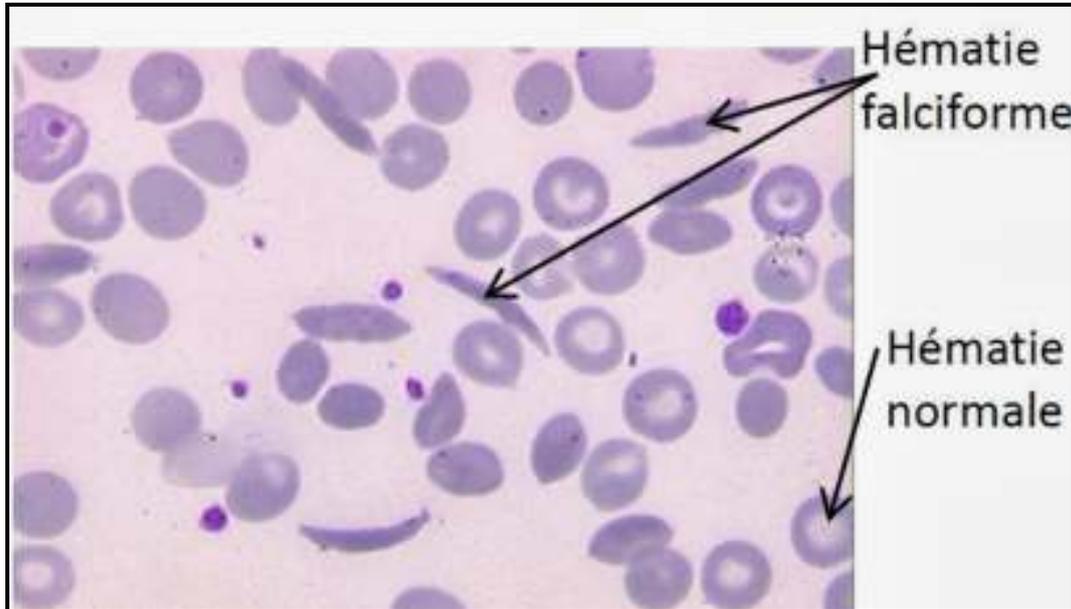


Figure (12): Aspect microscopique des hématies sur frottis sanguin d'un patient drépanocytaire (MG G x 100).

Les résultats des frottis sanguins montrent la présence des hématies en forme faucille chez les patients drépanocytaires (figure 12) dans les deux états (homo et hétérozygote), cependant pour les autres hémoglobinopathies nous n'avons pas observé un changement de la forme des hématies, donc nous n'avons pas pu les dépister à partir de cette technique.

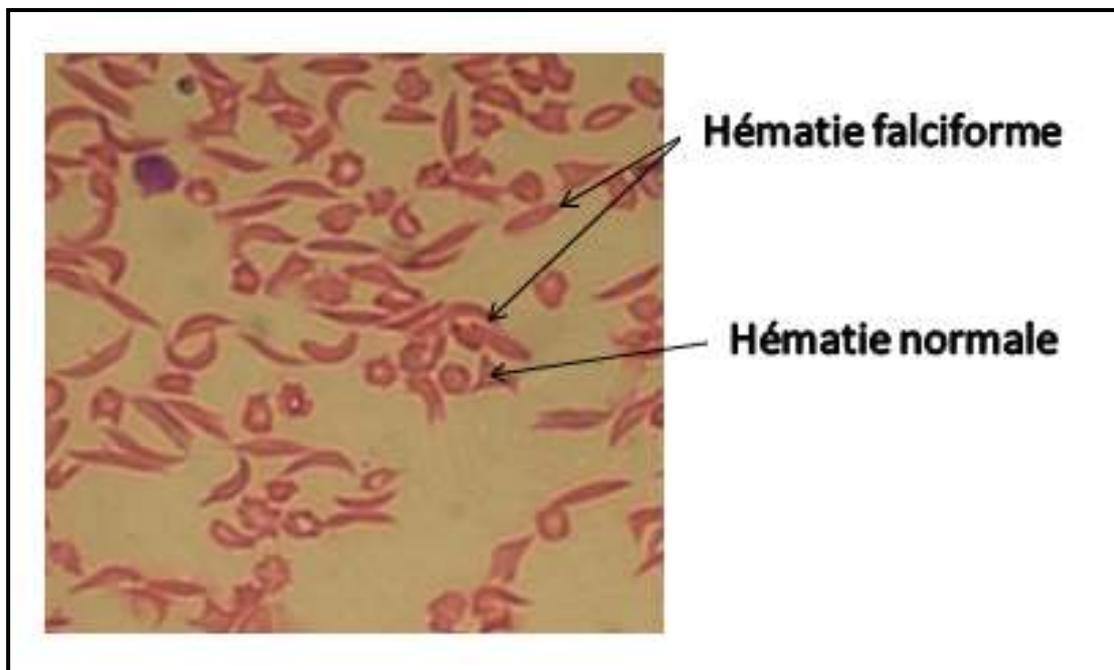
I.3. Test Emmel ou falciformation

Figure (13): Aspect microscopique des hématies falciformes par test Emmel d'un sujet drépanocytaire hétérozygote (MG G x 100).

Notre figure (13) montre des hématies falciformes ou drépanocytaires bien allongés sous forme des cristaux et bien séparés en absence d'oxygène. En effet l'intérêt capital du test de falciformation dans notre étude est le dépistage en masse du trait drépanocytaire (absence de drépanocytes spontanés visibles sur les frottis).

D'après **Emmel (1977)**, le test de falciformation est négatif si les globules rouges gardent leur forme ronde. Il est positif en cas de présence des cellules en forme de faucille et pointues. Ce test ne permet pas de distinguer un porteur de l'HbS d'un patient homozygote ou hétérozygote composite .

II. Les résultats des profils chromatographiques et électrophorétiques

II.1. Hémoglobine normale

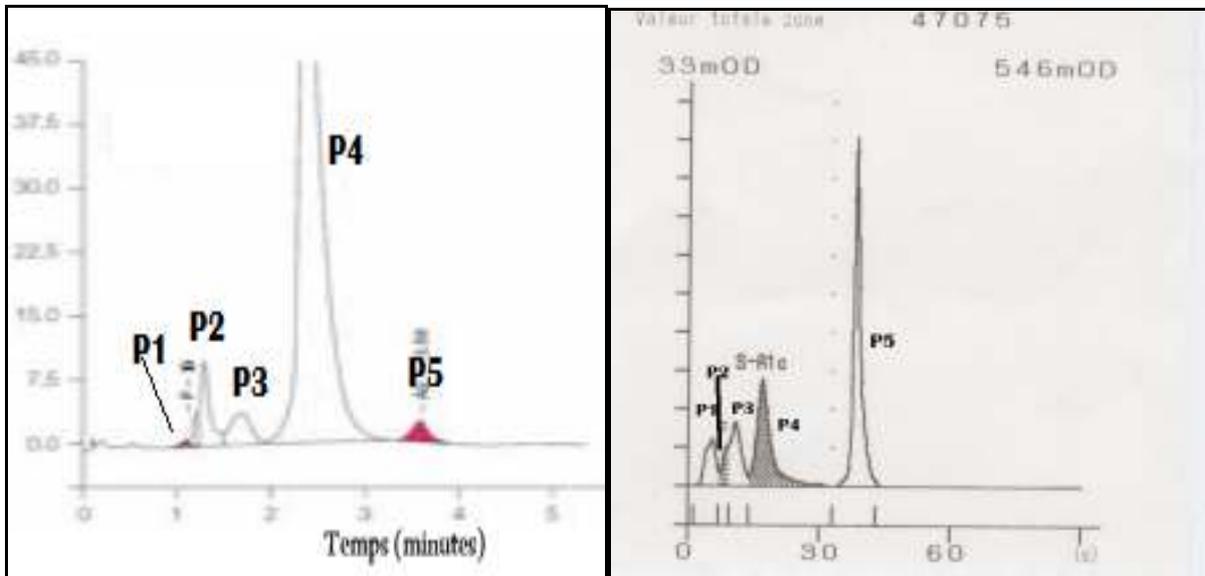


Figure (14) : Exemples d'un profil normal par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

Les profils chromatographiques et électrophorétique sont deux profils similaires.

❖ Le chromatogramme se présente sous forme de cinq (05) pics représentant les 5 fractions d'hémoglobine principales :

P1 : Hémoglobine fœtal (HbF), son pourcentage normale est de 0.1 à 10% de l'Hb totale ;

P2 : HbA1a : l'hémoglobine qui fixe le fructose-6-phosphate (de 1 à 2.5% de l'Hb totale),

P3 : HbA1b : l'hémoglobine qui fixe le pyruvate (de 1 à 2.5% de l'HB totale) ;

P4 : HbA1c : l'hémoglobine glyquée (fixe le glucose), leur pourcentage normale est de 2 à 6% de l'Hb totale ;

P5 : HbA0, est le cas normal d'hémoglobine AA dont les deux gènes sont normaux, leur pourcentage normale est de 80 à 90 % de l'Hb totale ;

❖ Le profil d'électrophorèse est constitué de 5 pics représentant :

P1 : Hemoglobine fœtal (HbF) ;

P2 : HbA1c : l'hémoglobine glyquée qui fixe le glucose ;

P3 : Autres HbA (HbA1a qui fixe le fructose-6-phosphate et HbA1b qui fixe le pyruvate) ;

P4 : HbA0 : l'hémoglobine AA dont les deux gènes sont normaux ;

P5 : HbA2 : Elle représente entre 1,5 et 3,1 % de l'hémoglobine totale d'un homme adulte en bonne santé, seulement l'électrophorèse qui permet de différencier l'HbA2 de l'HbA0.

Le temps en minute représente le temps de rétention pour chaque fraction à éluer, le temps de rétention pour chaque fraction est représenté par un pic.

Ces techniques sont considérées par de nombreux laboratoires comme les méthodes de choix pour dépister et quantifier les différentes fractions d'Hb normales et anormales (programmes de contrôle de qualité internationaux).

II.2. Drépanocytose hétérozygote

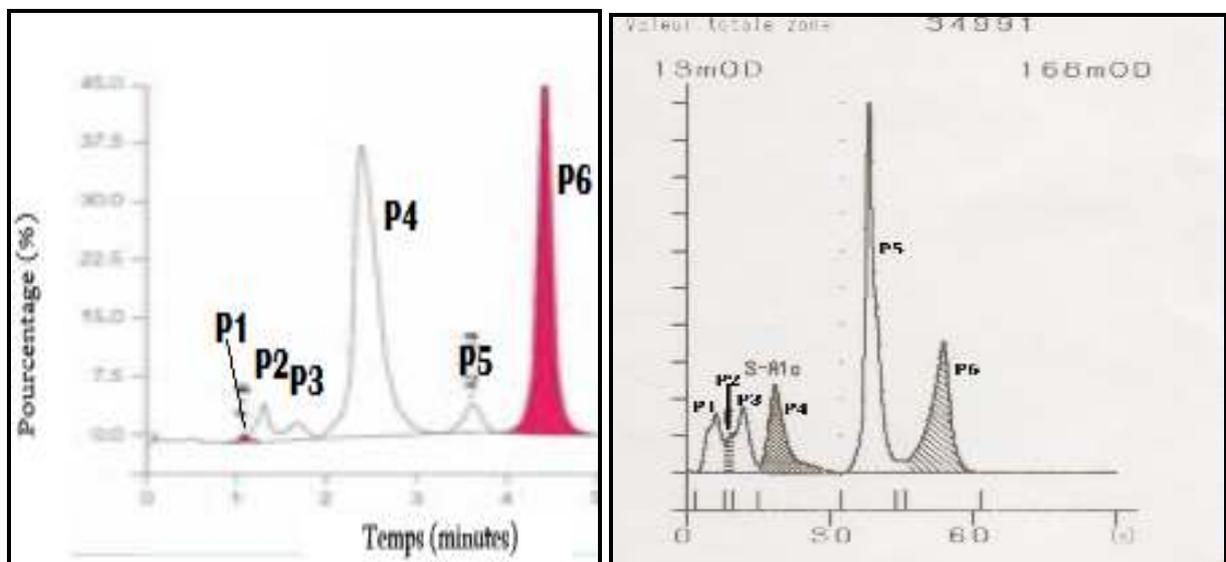


Figure (15) : Exemples d'un profil drépanocytaire hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

La figure (15) représente un profil caractéristique d'un sujet drépanocytaire hétérozygote A/S, qui est constitué de six (06) pics , avec la présence des cinq (05) fractions habituels plus

une fraction supplémentaire représentant la HbS A/S (pic n°6) avec un pourcentage de 38% par rapport à l'hémoglobine totale .

Selon **Rees et al. (2010)** , les sujets hétérozygotes pour ce mutant (A/S) sont des porteurs du trait drépanocytaire et sont asymptomatiques (anémie hémolytique régénérative en général compensée, ictère,...), ce qui nécessite dans ce contexte le recours aux techniques de biologie moléculaire afin de caractériser ces mutants).

Selon **Bardakdjian et al. (2003)** et **Aguilar et al. (2010)** : le diagnostic de l'HbS est donc important. La présence en électrophorèse d'une bande dans la « S-Window » ou S-like, et en chromatographie d'un pic d'éluion compatible avec l'HbS, sont deux éléments présomptifs de la présence d'HbS. Compte tenu de l'existence de mutants présentant des propriétés équivalentes, une confirmation par un troisième test, classiquement le test de falciformation.

L'association de ces 3 tests permet de distinguer facilement l'HbS des principaux mutants dits « S-like » en électrophorèse à pH alcalin . Une fois la présence d'HbS certaine, c'est le taux d'expression de l'HbS et les données clinico-biologiques qui vont permettre de conclure .

II.3. Drépanocytose homozygote et la composite S/C

❖ **Cas d'homozygote SS**

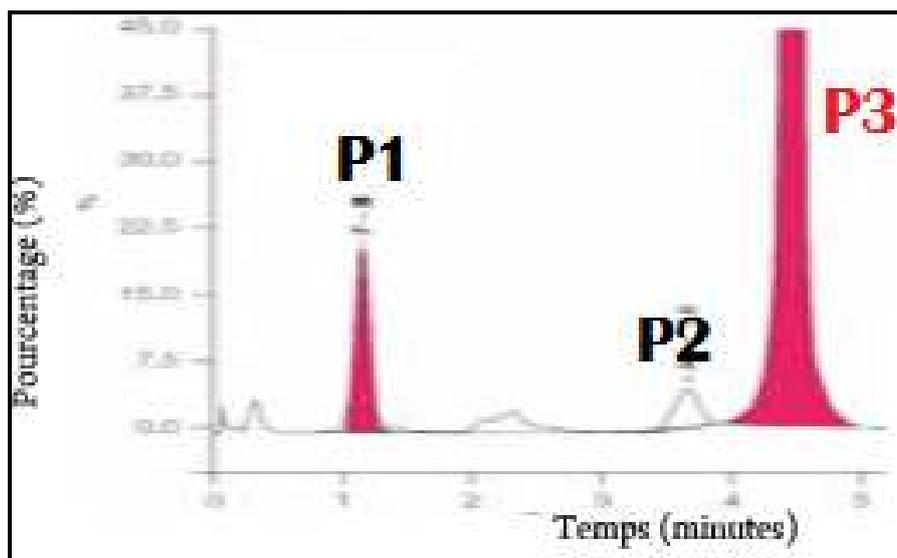


Figure (16) : Exemple d'un profil drépanocytaire homozygote par électrophorèse capillaire.

La figure (16) présente uniquement le profil électrophorétique puisque il y a une impossibilité à détecter et à quantifier les fractions d'Hb par HPLC pour les cas de drépanocytose homozygotes ou composites S/C.

Ce profil représente un sujet homozygote S/S, qui montre 3 pics caractéristiques des 3 fractions d'Hb principales :

- ✓ P1 : l'HbF (fœtale) avec un pourcentage de 1.5% ;
- ✓ P2 : Hb A2 avec un pourcentage de 2.4% ;
- ✓ P3 : L'Hb SS avec un pourcentage de 83%.

Plusieurs éléments diagnostiques sont observés avec la présence d'HbS, l'absence d'HbA et la présence d'HbF et HbA2 à un taux variable.

D'après **Ngo et al. (2012)**, Les taux d'HbA2 et D'HbF, sont classiquement augmentés de façon artéfactuelle en présence d'HbS en électrophorèse avec les tests hématologiques.

Ce type de profil est pathologique et s'accompagne d'éléments cliniques tel que une anémie hémolytique grave, crises douloureuses vaso-occlusives, ictère... . Il s'agit d'un patient atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur (**SDM**) : homozygote S/S.

Selon **Labie et al. (2005)**, la physiopathologie des SDM résulte de la propriété de polymérisation de l'HbS désoxygénée, jusqu'à former des réseaux de fibres au sein du globule rouge. Cette polymérisation de l'HbS désoxygénée est responsable de déformations cellulaires typiques : les drépanocytes, ou hématies en « faucilles ». Ce phénomène de base entraîne les deux manifestations majeures de la maladie : l'anémie hémolytique par fragilisation des globules rouges, et la crise vaso-occlusive par obstruction des micro-capillaires. Même si la globule rouge est l'acteur principal mais l'environnement cellulaire, aussi bien endothélial que circulant, sont également des éléments clés dans la physiopathologie de la maladie .

Le diagnostic différentiel peut se faire facilement par l'analyse de l'étude de l'hémoglobine des parents ou par biologie moléculaire en cas d'impossibilité d'étude familiale complète.

❖ La composite S/C

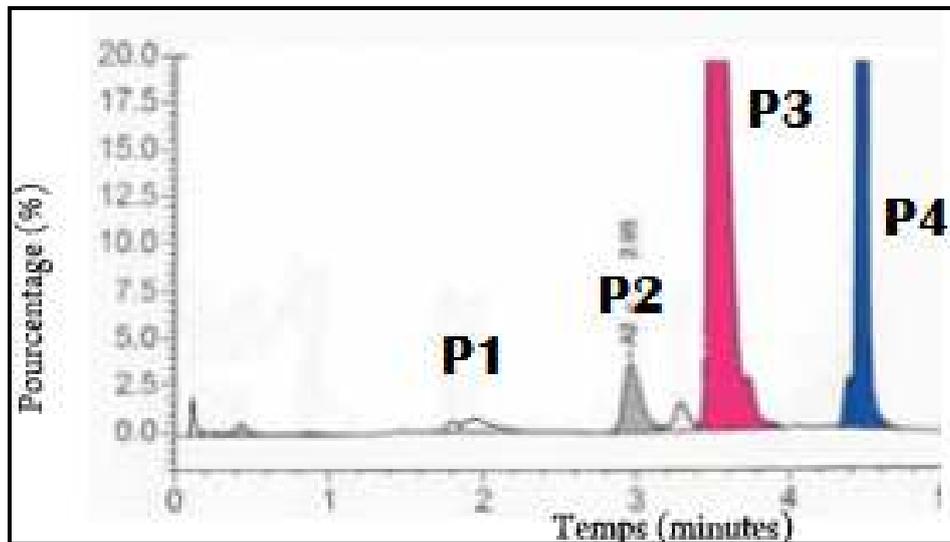


Figure (17) : Profil de la double hétérozygotie (composite) S/C par électrophorèse capillaire.

La figure (19) montre un profil qui représente un sujet d'hétérozygotie composite S/C (HbS A/S + HbC A/C) à 4 pics séparatif qui sont caractéristiques à 4 fractions d'Hb principales :

P1 : l'HbF (fœtale) avec un pourcentage de 0.5% par rapport à L'Hb totale ;

P2 : Hb A2 avec un pourcentage de 3.7 % par rapport à L'Hb totale ;

P3 : HbS avec un pourcentage de 48,4 % par rapport à L'Hb totale ;

P4 : HbC avec un pourcentage de 44,2 % par rapport à L'Hb totale .

Cette pathologie présente des éléments cliniques quasi-identiques à ceux de la forme SS. Selon **Kohne (2011)**, les porteurs des formes hétérozygotes de ces variants ne présentent pas habituellement de symptômes alors que ceux qui portent les formes homozygotes ou les formes hétérozygotes composées sont symptomatique à la gravité.

Selon **Galanello et Origa. (2010)**, Dans le contexte d'une hétérozygotie composite S/X, il faut rechercher en priorité l'association C/S, qui constitue un SDM. Classiquement décrit comme moins sévère que les SDM de type homozygote S/S, ce SDM expose cependant à des complications qui peuvent être certes plus tardives, mais tout aussi sévères voire plus sévères : ostéonécrose de hanche, rétinopathie, atteinte auditive, syndrome thoracique aigu...

II.4. Autres hétérozygoties

❖ Hémoglobine C hétérozygote

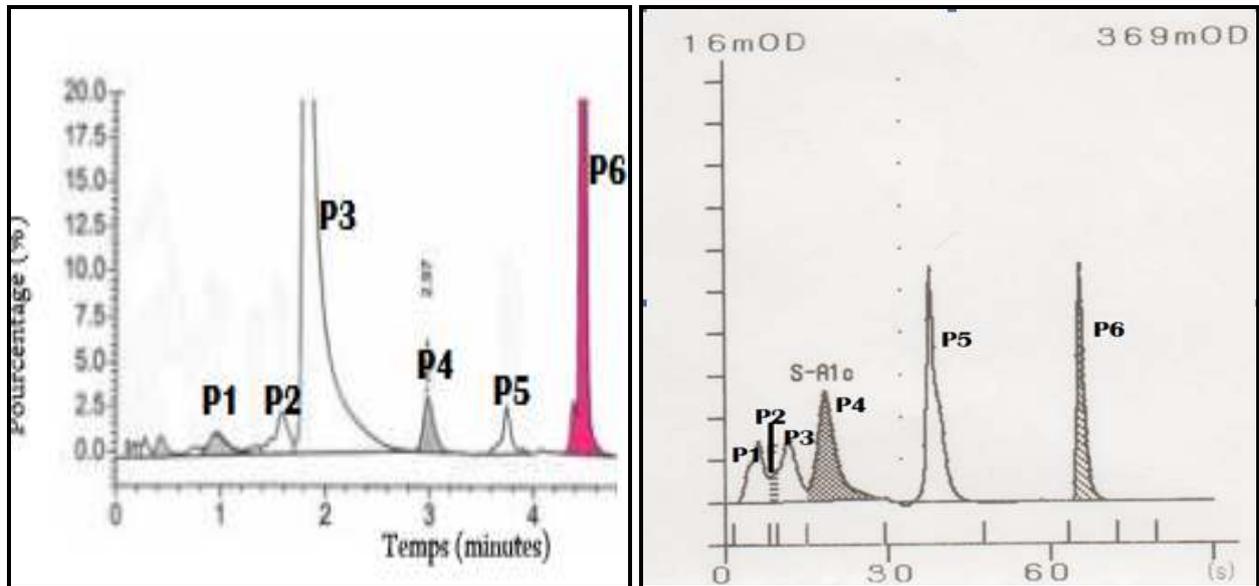


Figure (18) : Exemples d'un profil d'HbC hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

En figure (18), nous observons la présence de 6 pics qui caractérisent les 5 fractions habituelles plus une fraction de HbC A/C (pic n°6) avec un pourcentage de 34 % par rapport à l'hémoglobine totale.

D'après **Bardakdjian et al. (2003)**, C'est le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquemment rencontré dans le monde. La mutation affecte le sixième acide aminé de la chaîne bêta-globine, cette anomalie provoque la formation de cristaux intra-érythrocytaires qui sont responsables d'une augmentation de la densité du globule rouge et de sa déshydratation ce qui provoque largement une microcytose hypochrome. En effet la présence en électrophorèse d'une bande dans la « C-Window » ou C-like, et en chromatographie d'un pic d'élution compatible avec l'HbC, sont deux éléments présomptifs de la présence d'HbC. Ces associations sont nécessaires afin de distinguer facilement l'HbC des principaux mutants dit C-like en électrophorèse à pH alcalin.

❖ Hb D-Los Angeles (D Punjab)

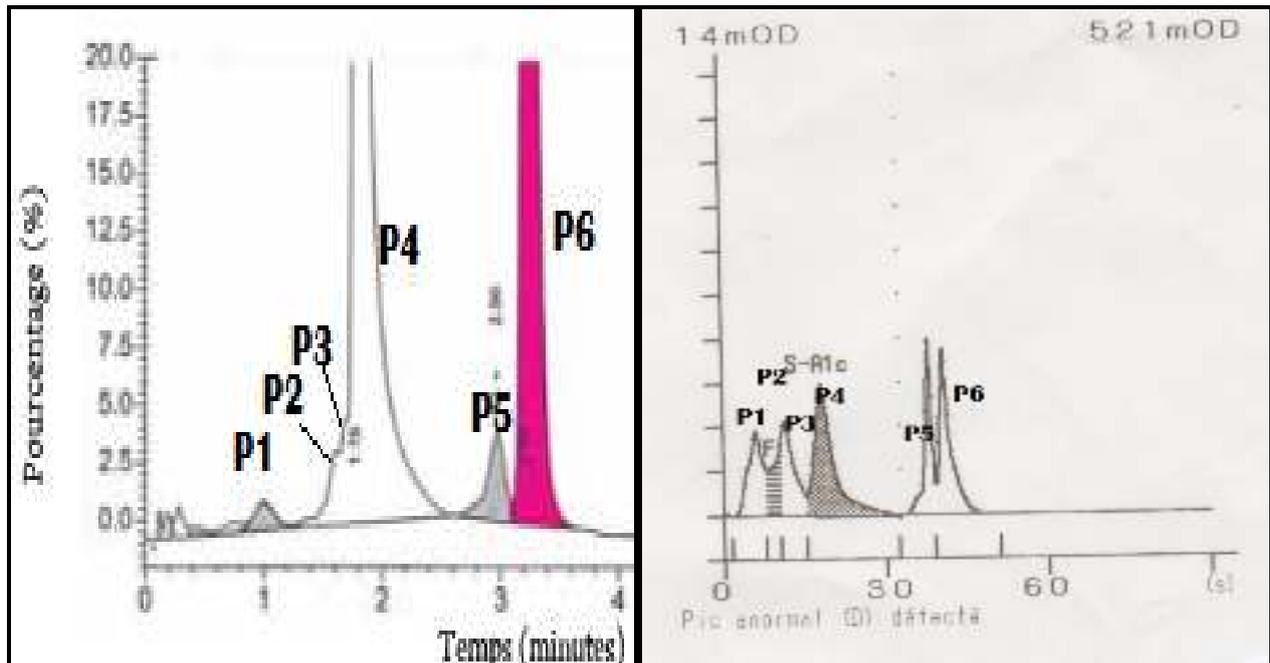


Figure (19): Exemples d'un profil d'HbD hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

Dans ce cas nous avons six (06) pics qui caractérisent les cinq (05) fractions habituelles plus une fraction supplémentaire représentant la HbD A/D (pic n°6) avec un pourcentage de 40% par rapport à l'hémoglobine totale .

Ce variant est « S-like » en électrophorèse à pH alcalin, mais distinct de l'HbS en CLHP. Le diagnostic différentiel entre HbD et HbS est donc simple.

Selon **Aguilar et al. (2010)**, cette hémoglobinopathie est asymptomatique à l'état hétérozygote ou homozygote. Son importance clinique tient du fait que l'hétérozygotie composite S/D-Punjab qui constitue un SDM sévère. En effet d'après **Bardakdjian et al.(2003)**, L'HbD Punjab favorise les propriétés de polymérisation de l'HbS qui constitue en association avec l'HbS une entité pathologique. Il est donc nécessaire chez les hétérozygotes composites, ou dans le contexte d'un conseil génétique, d'avoir recours à un laboratoire de référence pour le diagnostic de certitude.

❖ Hémoglobinoses E hétérozygote

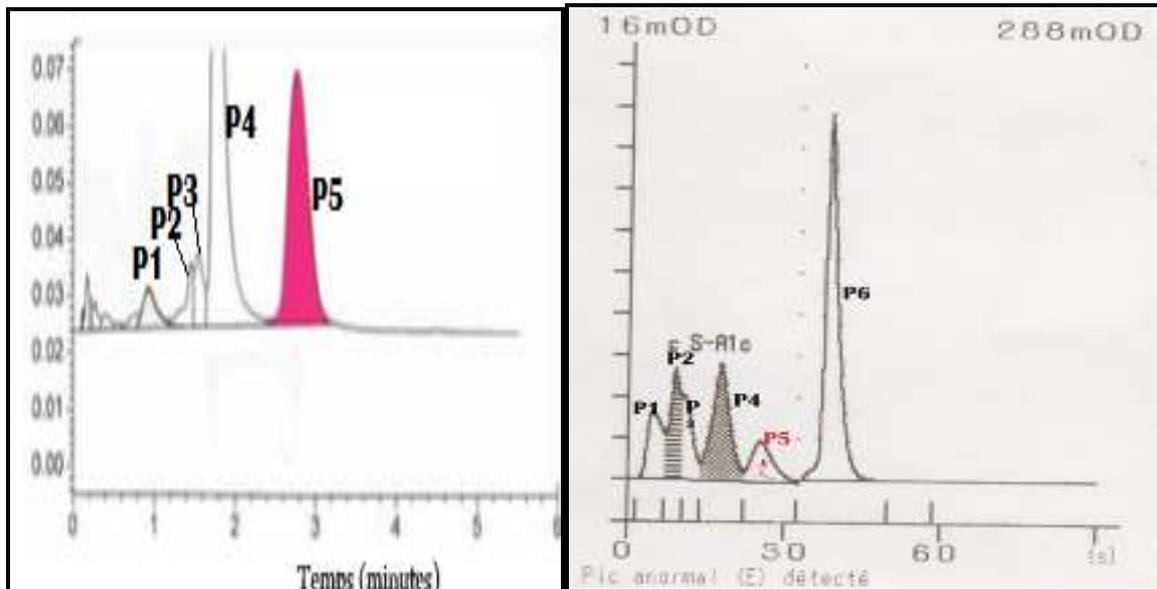


Figure (20) : Exemples d'un profil d'HbE hétérozygote par électrophorèse capillaire (à gauche) et HPLC (à droite).

Ce profil est caractéristique du sujet hétérozygote A/E, et présente les mêmes pics que les autres hétérozygoties, excepté la présence de l'HbE A/E (pic n°5 en profil électrophorétique et pic n°6 en chromatogramme) à 21 % par rapport à l'Hb totale. En effet l'absence de l'HbA2 dans le profil électrophorétique est expliquée par la présence de l'HbE, puisque ces deux fractions d'Hb ont la même zone de migration.

Selon **Bardakdjian et al. (2003)**, la présence de ce variant en électrophorèse dans la zone « C-Window » ou C-like, en CE d'un pic dans la zone d'identification de l'HbE, et en chromatographie d'un pic d'élution compatible avec l'HbE (co-migration ou pic très proche de celui de l'HbA2), sont des éléments présomptifs de la présence d'HbE.

III. Étude d'un exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte la drépanocytose

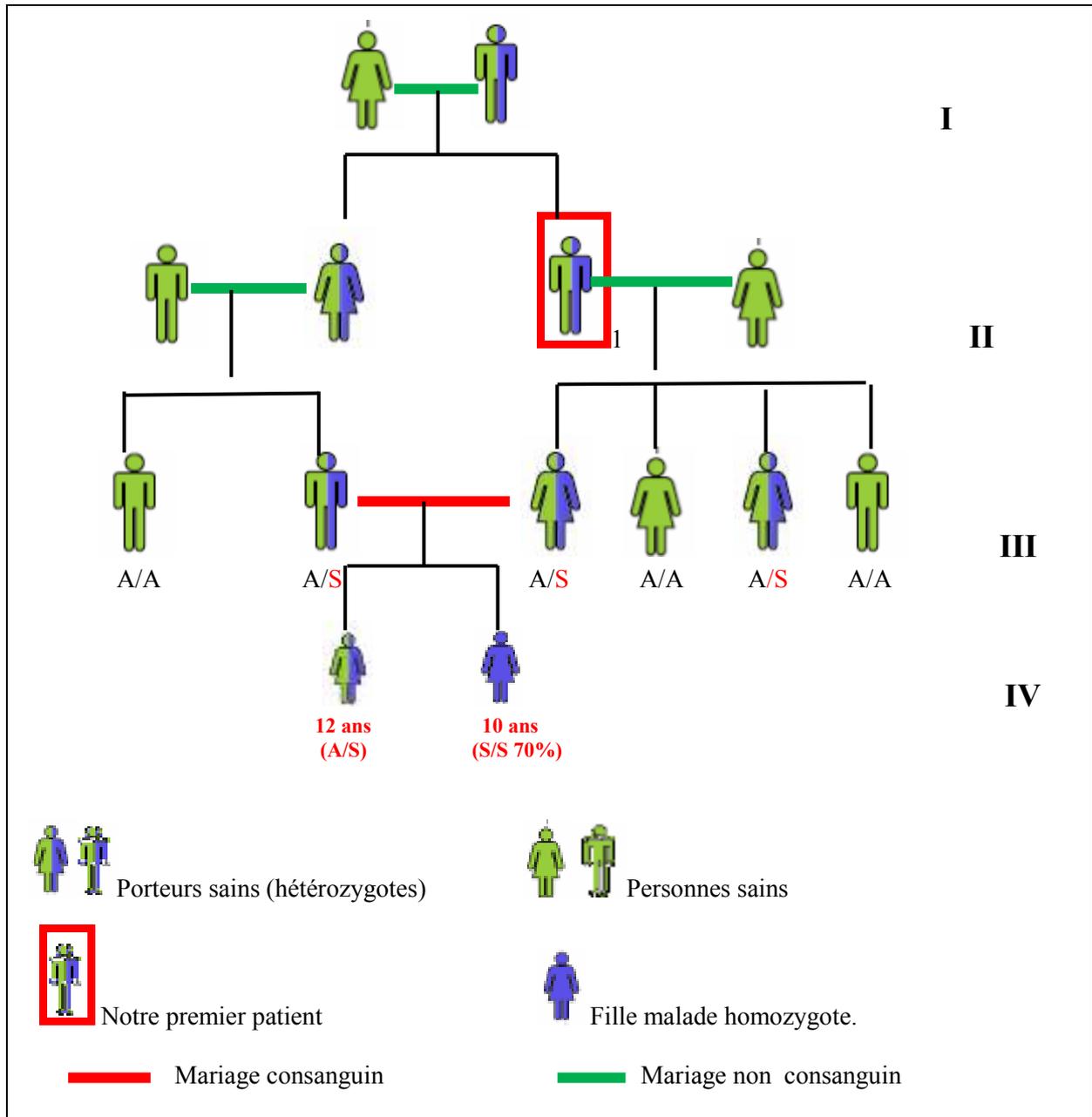


Figure (21): Exemple d'arbre généalogique d'une famille atteinte de la drépanocytose.

Comme indiqué sur l'arbre généalogique familiale (figure 21) sept (07) personnes souffrent de la drépanocytose dont six (06) sont des porteurs hétérozygotes et une (01) jeune fille est malade homozygote. la plus jeune membre de la famille est âgée de 10 ans et le plus âgé est de 63 ans.

Il n'y a aucune consanguinité entre les parents de la première (I) et de la deuxième (II) génération, ces derniers ne présentent aucun membre malade Homozygote au sein de leurs antécédents.

La présence de la consanguinité entre les parents dans la troisième (III) génération donne malheureusement une fille malade (Homozygote S/S) et une fille porteuse de la drépanocytose (Hétérozygote A/S).

Mode de transmission

Étant donné que les hétérozygotes sont asymptomatiques (non malades), et sachant que le gène de l'hémoglobine est situé sur le chromosome 11 (autosome), on en déduit que le mode de transmission des hémoglobinopathies est transmis héréditairement selon un mode autosomique récessif.

Selon **Neel. (1979)**, la transmission du gène βS muté, obéit aux lois de Mendel et se transmet sous le mode récessif et autosomique. La transmission du gène βS par les deux géniteurs détermine le génotype SS chez l'enfant. En effet d'après **Maniatis et al. (1980)**, Les transmetteurs possèdent deux gènes β globine codominants, le normal βA , l'autre muté βS . Chacun des gènes codera pour la synthèse d'hémoglobine en quantité équivalente, une normale, une mutée. Dès lors, les hétérozygotes pour une hémoglobine anormale ont deux hémoglobines différentes

VI. L'étude statistique des anomalies

VI.1. La répartition des anomalies selon la population globale des patients

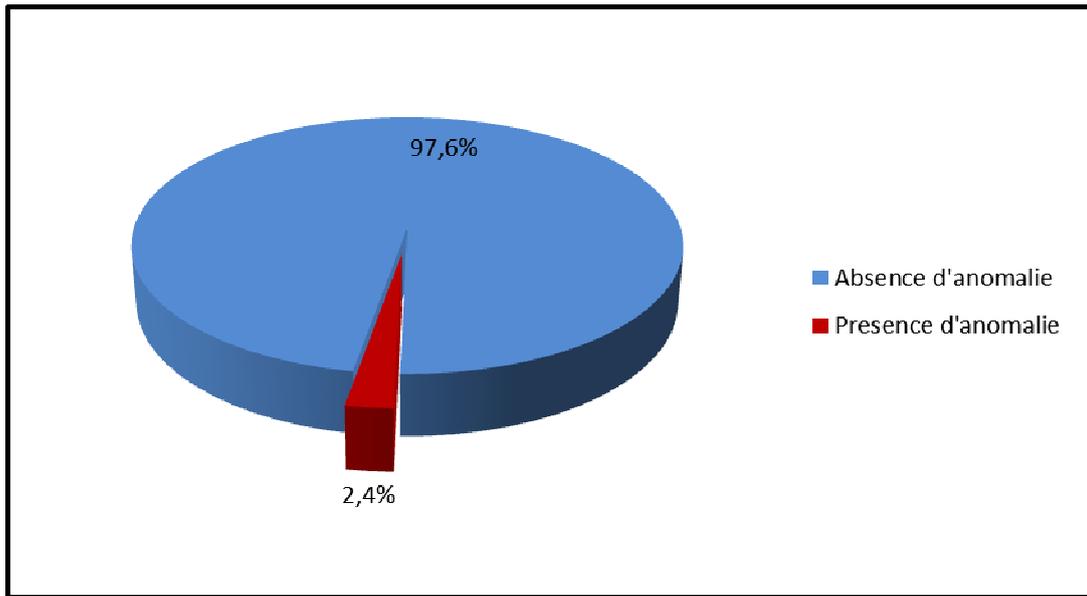


Figure (22) : Pourcentage de la présence des hémoglobinopathies par rapport à la population globale.

Les résultats de l'HPLC et l'EPH confirment l'existence de différents types d'hémoglobinopathies dans la population des patients de la région Blida-Alger, 400 malades ont été dépistés parmi 16900 sujets. Ce qui représente un pourcentage de 2.4% de la présence de l'Hb pathologique par rapport à notre population globale.

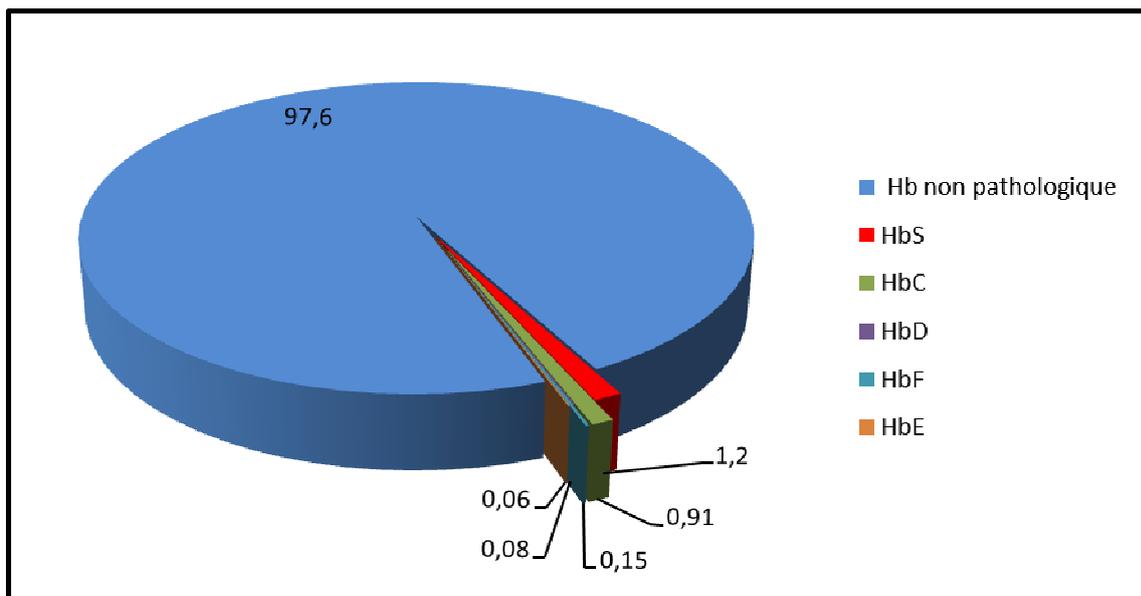


Figure (23) : la répartition des anomalies par rapport à la population

La figure (23) illustre les pourcentages des différents types d'hémoglobines anormales par rapport à l'ensemble de la population étudiée :

- HbS à 1.2% ;
- HbC à 0.91% ;
- HbD à 0.08% ;
- HbE à 0.06% ; HbF à 0.15%.

Selon **OMS (2000)**, le rapport statistique de la répartition des hémoglobinopathies est de 5 à 11% dans les régions de l'Afrique du Nord.

Nos résultats sont proches de ceux présentés en 2015 la journée mondiale de la drépanocytose. « Ces pathologies touchent 2 à 3% de la population algérienne. Très répandue, notamment au nord-est du pays, et dans plusieurs autres wilayas, la drépanocytose pose un réel problème de santé publique, qui n'est, cependant, pas reconnu en tant que tel en Algérie. l'OMS a décrété le 19 juin Journée mondiale de la drépanocytose.

VI.2. La répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies

Sur l'ensemble des 400 patients dépistés et selon la figure 26, nous avons obtenu :

- 205 sujets de drépanocytose Hétérozygote AS avec un pourcentage de 51.25% par rapport à la population dépistée ;
- 148 sujets de la hétérozygotie AC avec un pourcentage de 37% par rapport à la population dépistée ;
- 13 sujet de l'hémoglobinosse AD avec un pourcentage de 3.25% par rapport à la population dépistée ;
- 09 sujets de la hétérozygotie AE avec un pourcentage de 2.25% par rapport à la population dépistée ;
- 15 sujets à hémoglobine fœtale élevée HbF avec un pourcentage de 3.75 % par rapport à la population dépistée ;
- 05 sujets de la composite S/C avec un pourcentage de 1.25% par rapport à la population dépistée ;
- 02 sujets de drépanocytose homozygote avec un pourcentage de 0.5% par rapport à la population dépistée ;

➤ 03 sujets d'autres hémoglobinopathies avec un pourcentage de 0.75% par rapport à la population dépistée;

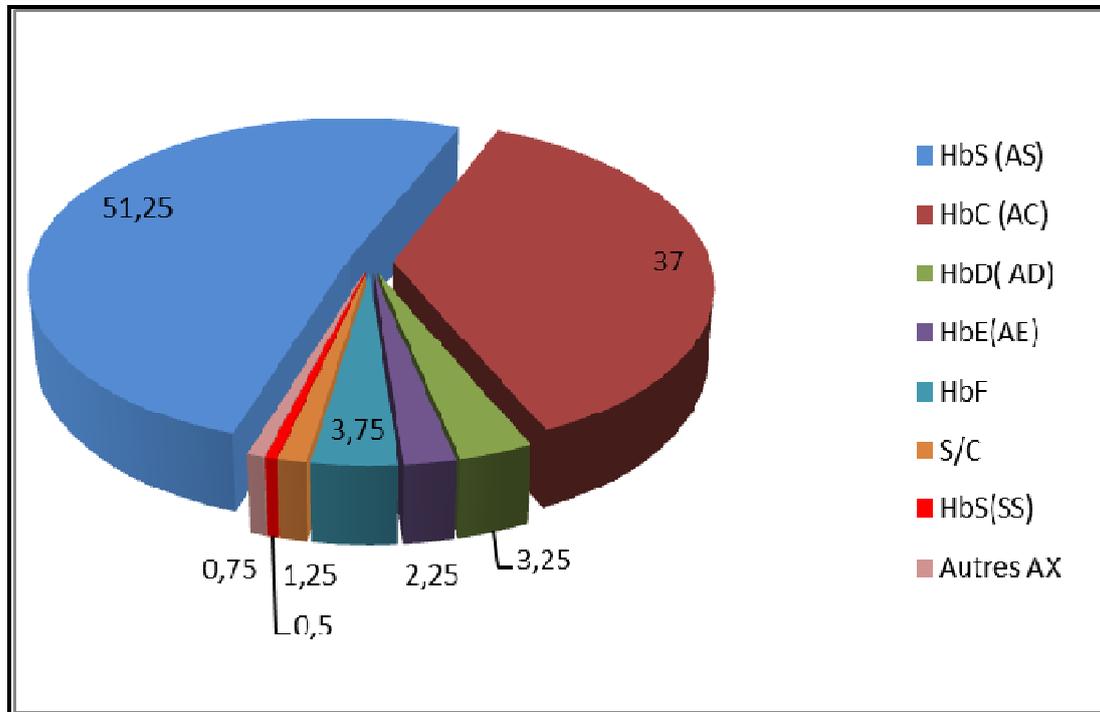


Figure (24) : Répartition des anomalies selon leurs différents types.

D'après nos résultats le pourcentage de la drépanocytose hétérozygote est le plus fréquent, par rapport aux autres hémoglobinopathies.

D'après **Girot. (1999)**, la drépanocytose caractérise l'anomalie de l'hémoglobine la plus fréquente observée en Afrique, dans toutes les régions où les natifs d'Afrique sont retrouvés, et sur l'ensemble du pourtour méditerranéen. Selon **l'OMS (2000)**, la drépanocytose est la maladie génétique la plus répandue dans le monde par 1 pour 3000 naissances.

D'après **Giabmonaa et al. (1997)**, La drépanocytose est suivie des hémoglobinoses C, D et E. L'hémolobinose C, est représentée chez la population africaine, Maghrébine aussi que chez les noirs américains.

Enfin la drépanocytose homozygote avec la composite SC sont les hémoglobinopathies les plus rares.

Selon **Baradai. (2014)**, La diminution des formes homozygotes est justifiée par l'efficacité du conseil génétique qui conduit à la diminution du mariage consanguin, et par l'information sur la drépanocytose dans le système scolaire.

VI.3. La répartition des anomalies selon le sexe des patients

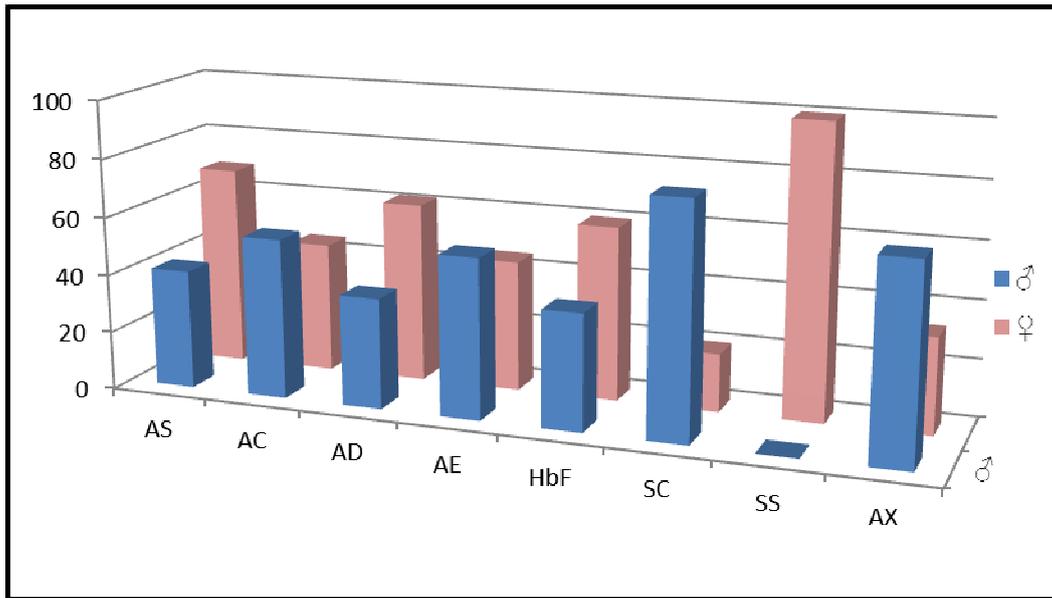


Figure (25) : Répartition de la population selon le sexe.

D'après ce diagramme en figure (25) nous remarquons que les anomalies de l'hémoglobine touchent le sexe masculin que le féminin.

Nos résultats confirment que le sexe ne modifie rein la répartition des hémoglobinopathies car ces anomalies sont liées à une transmission récessive et sont par conséquent indépendantes du sexe.

Selon **Neel. (1979)**, les gènes qui codent pour la synthèse des chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine (α , β , γ et λ) sont autosomiques et la transmission de l'anomalie est indépendante du sexe.

I. Rappels sur l'hémoglobine

I.1. Définition de l'hémoglobine

Hoppe-Seyler en 1862 a introduit le terme, hémoglobine pour désigner le pigment respiratoire du globule rouge. Chaque globule rouge contient de nombreuses molécules d'hémoglobine qui caractérise l'aspect moléculaire du globule rouge et est responsable de la fonction principale des globules rouges de l'organisme. C'est un hétéro-tétramère chez tous les vertébrés du monde vivant. A chaque stade d'évolution de la vie, cette protéine voit son contenu modifié au niveau de la nature des différentes chaînes qu'elle porte (Najman et al., 1994 ; Bernard et al., 1998).

I.2. Structure de la molécule d'Hb

L'hémoglobine humaine avec un poids moléculaire de 64500 daltons, possède quatre protomère (sous-unités) identiques deux à deux, les sous-unités sont constituées de l'association d'une chaîne polypeptidique, la globine, et d'un groupement prosthétique, l'hème (Figure 01). Chaque complexe hème + globine forme une sous-unité: les quatre sous-unités s'adaptent les unes aux autres pour former un tétraèdre = la molécule d'hémoglobine. (Najman et al., 1994 ; Vander et al., 2001).

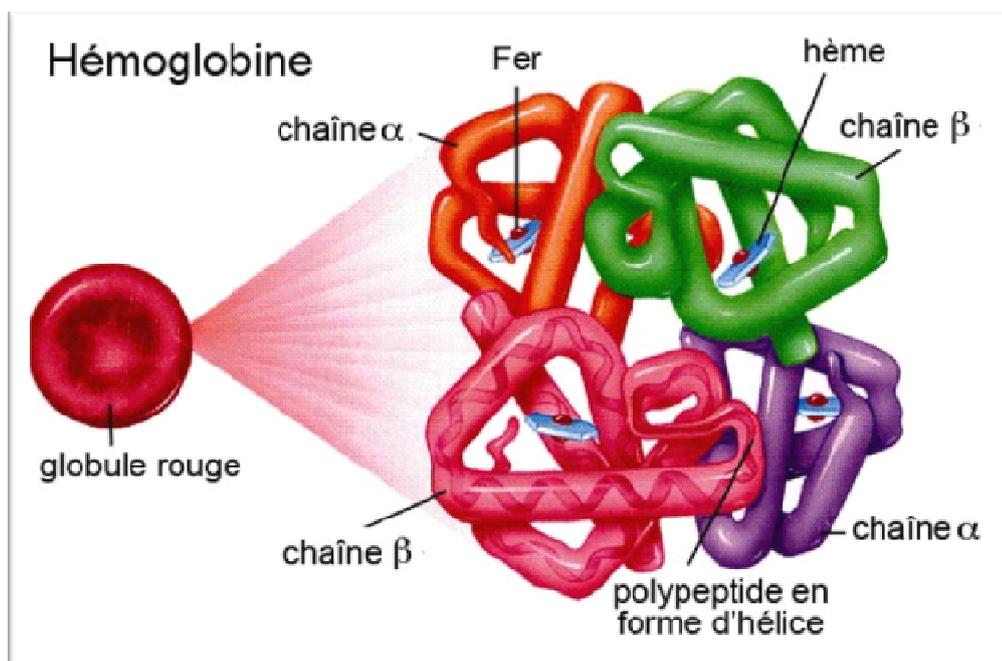


Figure (01) : Schémas de la molécule complète d'hémoglobine (Serge., 2004).

I.2.1. L'hème

L'hème est une protoporphyrine (quatre noyaux pyrroles unis par les ponts méthényles, à laquelle est lié un atome de fer à l'état ferreux en position centrale de l'hème (Figure02), qui se lie aux quatre atomes d'azote de la protoporphyrine, et de part et d'autre du plan de l'hème avec l'O₂ et avec l'un des acides aminés de la globine (Vaubourdolle., 2007).

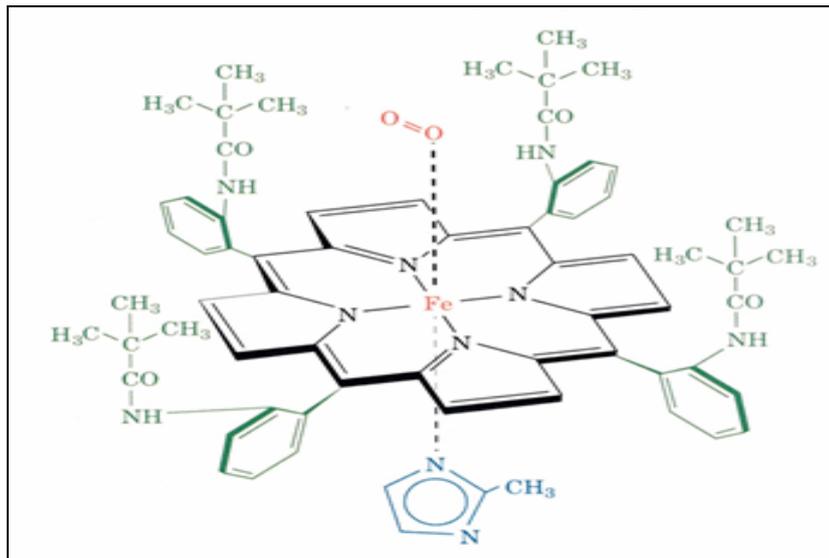


Figure (02) : L'hème dans l'oxyhémoglobine (Vaubourdolle., 2007).

I.2.2. La globine

C'est une protéine au sein de laquelle se positionne une molécule d'hème, dans une poche hydrophobe. Chaque globine est subdivisée en 8 zones (A à H), utiles pour positionner les anomalies moléculaires en pathologie (Rivière et Sadelain., 1997).

C'est un ensemble de quatre chaînes polypeptidiques, qui sont semblable deux à deux. Par exemple l'hémoglobine A est l'hémoglobine adulte, constituée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes bêta (Rivière et Sadelain., 1997).

Chaque chaîne c'est un polypeptide constituée d'acide aminé (144 AA pour la chaîne α et 146 AA pour la chaîne β) réunis par des liaisons peptidiques (Rivière et Sadelain., 1997).

Une chaîne ainsi formé s'enroule sur elle-même en spirale pour réaliser une structure secondaire en hélice. En fait l'hélice est discontinue, l'ensemble de la chaîne

formant 8 segments hélicoïdaux (A à H) et porte une crevasse entre hélice E et F où s'insère une molécule d'hème (**Rivière et Sadelain., 1997**).

Ces segments sont séparés par des courts segments non hélicoïdaux au niveau des quels se font des coupures pour donner à chaque chaîne sa forme définitive. Des liaisons de natures divers entre acides aminés mise en évidence en contact par des courbures de la molécule et la stabilisent (structures tertiaire) en fin la réunion de deux chaînes α et deux chaînes β forme une molécule symétrique globulaire (**Bernard et al., 1998**).

L'architecture de cette protéine globulaire compacte avec des dépressions, interface entre domaine et crevasses lui permet d'assurer ces fonctions dynamiques (Figure 03). La forme désoxygénée de l'hémoglobine présente une conformation T (tendue), la forme oxygénée avec une conformation R (relaxée) (**Rivière et Sadelain., 1997**)

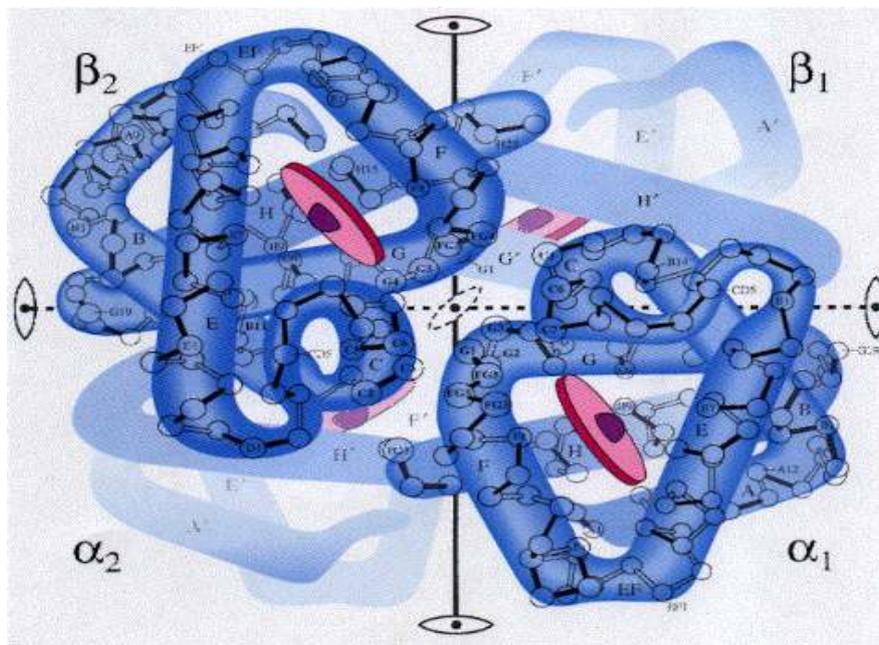


Figure (03) : Structure de la globine (Vaubourdolle., 2007).

I.3. Fonction de l'hémoglobine

Le rôle physiologique des globules rouges est en partie assuré par l'hémoglobine. L'hémoglobine fixe l'oxygène permettant ainsi son transport par le globule rouge au niveau des alvéoles pulmonaire vers les tissus de l'organisme. Mais elle facilite également l'élimination par le globule rouge du dioxyde de carbone des tissus aux poumons (**Labie et Elion., 2005**).

I.4. Les différents types de l'hémoglobine humaines

Il existe différentes variétés d'hémoglobines qui sont fonction des différents types de chaînes de globine synthétisées (Vinatier., 2006). Les monomères de globine sont deux types assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie : deux chaînes α (type ζ et α -globine) constituées chacune de 141 acides aminées et deux chaînes β (type ε , γ , δ et β -globine) composées de 146 acides aminées.

Selon Khadjetou (2013) , plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie , ces hémoglobines se distinguent par la nature de sous unités qui les constituent (figure 04)

I.4.1. Hémoglobines embryonnaires

On connaît quatre types d'hémoglobine embryonnaire chez l'homme dans le tableaux I.

Tableau I : Les différents types d'hémoglobine embryonnaire

Type d'Hb	Formule des chaînes de globine	Caractéristique
Hb Gower-1	$\zeta_2 \varepsilon_2$	Elle est relativement instable et se décompose facilement.
Hb Gower-2	$\alpha_2 \varepsilon_2$	Plus stable que la variante Gower-1, existe en petites quantités au cours de la vie embryonnaire et fœtale.
Hb Portland-1	$\zeta_2 \gamma_2$	est présente en faibles quantités au cours de la vie embryonnaire et fœtale.
Hb Portland-2	$\zeta_2 \beta_2$	Elle est encore plus instable que la variante Gower-1.

(Khadjetou., 2013)

I.4.2. Hémoglobine fœtale

L'hémoglobine fœtale **HbF**, de formule $\alpha_2\gamma_2$, remplace l'hémoglobine embryonnaire après 10 à 12 semaines de développement (figure 04). Elle constitue jusqu'à 95 % du sang du nouveau-né, et est progressivement remplacée par l'hémoglobine adulte HbA à partir du sixième mois suivant la naissance ; elle demeure cependant présente à l'état de traces chez l'adulte.

I.4.3. Hémoglobine Adulte

Chez l'adulte on retrouve :

- Hb A ($\alpha_2 \beta_2$) > 97 %
- Hb A2 ($\alpha_2 \delta_2$) 1 – 3 %
- Hb F ($\alpha_2 \gamma_2$) < 1 %

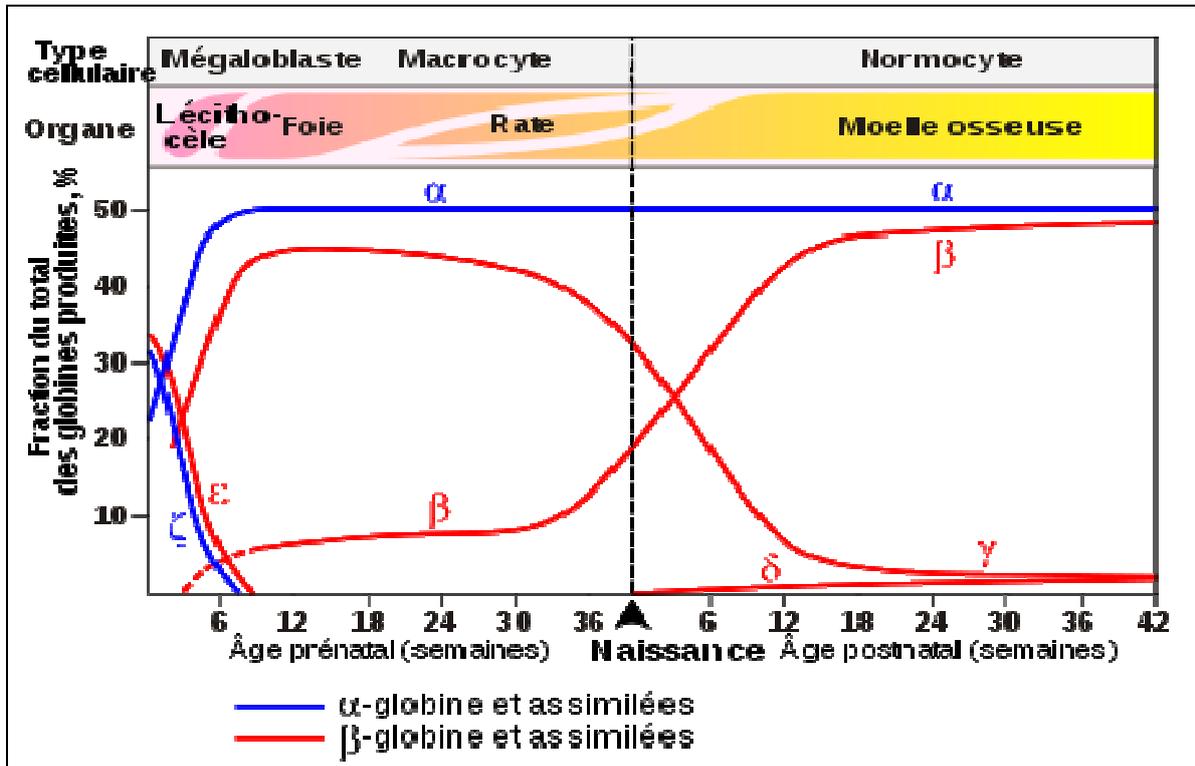


Figure (04) : Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines précédant et suivant la naissance (Rivière et Sadelain., 1997).

I.5. Les gènes de l'Hb

Les gènes de la globine dérivent tous d'un même gène ancestral qui codait pour une protéine de transport de l'oxygène. La duplication de gènes (800 millions d'années) a donné naissance à la myoglobine d'une part, protéine de stockage de l'O₂, et l'Hb d'autre part, protéine de transport de l'O₂ (Vinatier., 2006).

Les chaînes de type α correspondent à des chaînes polypeptidiques de 141 résidus dont la synthèse est sous le contrôle de gènes situés sur le chromosome 16. Les chaînes de type β

(auxquelles se rattachent les chaînes γ , δ et ϵ) comportent 146 résidus et dépendent de gènes situés sur le chromosome 11 (Vinatier., 2006).

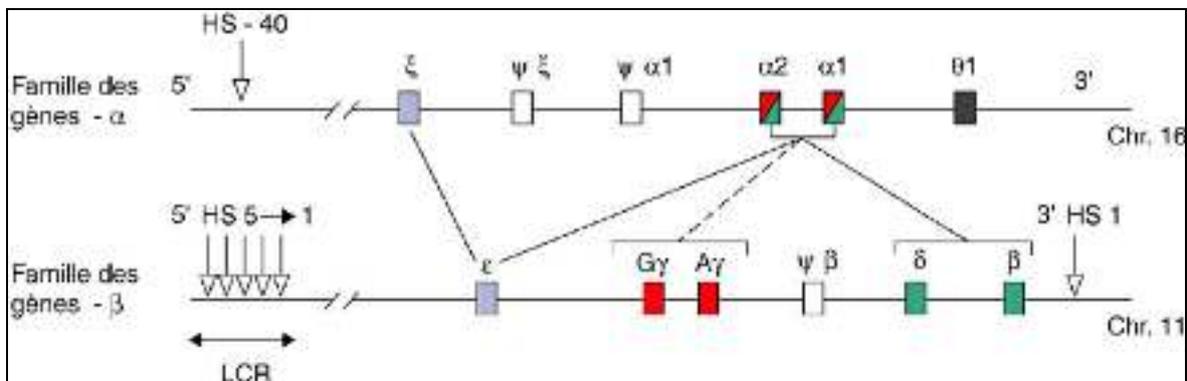


Figure (05) : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine (Rivière et Sadelain., 1997).

Les gènes sont organisés de 5`en 3` selon leurs ordre d`expression au cour du développement. Les gènes de globine comportent trois zones codantes (exon) séparés par deux zones non codantes (introns), ces introns débutent classiquement par une séquence GT et se terminent par une séquence AG (loi du Chambon) (Djamaa.,2012).

Les gènes α , β et ζ diffèrent considérablement par la taille des introns, un promoteur est situé en 5`de la région transcrite du gène, cette zone impliquée dans la fixation de l`ARN polymérase comporte la séquence ATA qui se situe à une trentaine de nucléotide du site codant pour la coiffe, localisée entre les nucléotides -70 à -80 et une séquence plus variable, située entre les nucléotides -80 et -100. Le gène γ possède entre les séquences -170 et -190 une région GATA fixant les facteurs de régulation érythroïde spécifique (khadijetou., 2013).

Il existent également des séquences activatrices (enhancers) et inhibitrices (silencers) régulant le niveau d`expression des gènes au cours de l`évolution. La séquence en 3`serait le signal de terminaison pour la polymérase ou un site de reconnaissance pour la polyadénylation (khadijetou., 2013).

II. La physiopathologie de l'hémoglobine

II.1. Types d'hémoglobinopathies

Selon **Diakite. (2005)** , les hémoglobinopathies sont de deux types :

✚ **Les anomalies qualitatives**, correspond à des anomalies de structure qui sont la conséquence d'une modification de la séquence de acides aminées de la globine. Elles conduisent à une hémoglobine anormale appelée «variant». les anomalies les plus fréquentes affectants les chaînes β , plus rarement les chaînes α , exceptionnellement les chaînes γ ou δ . La présence d'une Hb de structure anormale, entraînant ou non des signes fonctionnels.

✚ **Les anomalies quantitative**, correspond à un défaut de synthèse, partiel ou total des chaînes α et/ou β , qui s'exprime dans le groupe très hétérogène des thalassémies. Ce sont des pathologies différentes dans leur expression clinique et leur physiopathologie.

Néanmoins, il existe en réalité un certain chevauchement entre ces deux groupes puisque certaines Hb de structure anormale se comportent comme des variants thalassémiques. D'autre part, il n'est pas rare que les deux types d'anomalies soient présents chez un même individu (**Kutlar., 2007**).

Les hémoglobinopathies, qui étaient jusqu'à présent assez bien localisées dans certaines régions du monde, sont maintenant beaucoup plus dispersées du fait des migrations de populations (**Lubin et al., 1991**).

II.2. Les variants

Plus de 1000 variants sont aujourd'hui répertoriés dans la banque de données HbVar. Seuls 1/3 d'entre eux ont des répercussions cliniques, la mutation intervenant dans une zone critique pour le fonctionnement de la molécule. Quatre Hb anormales occupent une place prépondérante de par leur fréquence et leur caractère pathogène : HbS, HbE , HbD et HbC.

II.2.1. L'hémoglobine S ou la drépanocytose**II.2.1.1. Définition**

La drépanocytose est la plus fréquente des hémoglobinopathies, d'origine génétique, elle est due à une mutation sur le chromosome 11 du gène de la β -globine où l'acide glutamique en position 6 est substitué par une valine. Cette substitution, qui place un résidu d'acide aminé hydrophobe à la surface de la protéine, crée une zone d'adhérence qui favorise la précipitation de l'hémoglobine S en longs filaments qui allongent les érythrocytes en leur donnant une forme de faucille (*sicle* en anglais, d'où le « S » de cette variante), d'où le nom d'anémie falciforme également donnée à cette maladie, également appelée drépanocytose. Cette variation autosomique récessive rend l'Hb insoluble sous sa forme désoxygénée les chaînes insolubles cristallisent dans les érythrocytes en provoquant une déformation sous forme lame de faux (**Cotton., 2009**).

Selon **Cotton (2009)** on distingue cliniquement :

- La forme hétérozygote AS ou trait drépanocytaire qui est typiquement asymptomatique sur le plan clinique ;
- Les syndrome drépanocytaire majeurs (SDM) qui regroupent la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par l'association de l'Hb S à autre hémoglobinopathies (SC, S β thalassémie, ect....).

Cette pathologie hémolytique chronique est associée à un fond permanent de vaso-occlusion dont les poussées exposent les patients à des lésions ischémiques tissulaires 12 potentiellement graves avec parfois mise en jeu du pronostic vital. Si les sujets les plus gravement atteints sont les homozygotes S/S, l'expression de la maladie présente de grandes variations interindividuelles dans l'évolution de la pathologie (**Santin et Renaud., 2013**).

II.2.1.2. Epidémiologie

La drépanocytose est très répandue dans la race noire. Elle est considérée comme l'hémoglobinopathie la plus fréquente et concerne des millions de familles porteurs de traits drépanocytaires dans plusieurs dizaines de pays dans le monde. C'est un problème de santé publique (**Credos., 2005**).

Les principales régions à risque pour la drépanocytose sont certains départements d'outre-mer, tous les pays d'Afrique, l'Amérique du Sud (Bresil surtout), l'Amérique du Nord pour les sujets de race noire, l'océan indien et le pourtour Méditerranéen (**Santin et Renaud., 2013**).

II.2.1.3. Mode de transmission

Le drépanocytose est une affection génétique qui se transmet selon le mode autosomique récessif, car seuls les homozygotes sont considérés comme malades. Ainsi dans un couple de sujet hétérozygote AS, à chaque grossesse, la probabilité de naissance d'un enfant homozygote SS est de 25%, celle d'un homozygote AA de 25% et celle d'un hétérozygote AS de 50% (**Neel., 1979**).

II.2.1.4. Physiopathologie

L'anomalie initiale responsable de la drépanocytose est une transversion d'Adénine-thymine au niveau du 6ème codon du bêta-globine, traduite au niveau protéique par un ensemble d'interactions hydrophobes lors de la substitution Glu par Val en position 6 de cette chaîne. Le remplacement de l'acide glutamique neutre par un acide aminé apolaire hydrophobe la valine conduit à un changement de charge et de polarité induit à la surface de la molécule de l'hémoglobine S, modifie le rapport aussi bien entre les sous-unités de l'Hb qu'entre deux molécules d'Hb voisines. Cette substitution suffit donc pour rompre l'équilibre et amorcer une cristallisation en milieu désoxygéné. On observe alors une gélification du contenu cellulaire, des cristaux allongés en forme d'aiguille longue (figures 06) de 1 à 15 microns se forment, ce sont des tactoïdes (**Aguilar et al., 2010**).

Cette anomalie de structure est responsable de la polymérisation de l'hémoglobine S. Cette polymérisation aboutit à la formation de fibres protéiques plus ou moins organisées parallèlement au grand axe du globule rouge (**Aguilar et al., 2010**).

Cette phénomène ralentie par la présence d'hémoglobine foetale (HbF) constitue la gélification de l'hémoglobine. Elle s'associe à une diminution de la solubilité sans altération de la déformabilité du globule rouge. La poursuite de ce processus jusque-là réversible conduit à la formation d'un réseau rigide dans le globule rouge ; qui se déforme perd sa

souplesse et se fragilise constituant ainsi les drépanocytes. Les facteurs qui déclenchent ce phénomène sont : l'hypoxie, la déshydratation, l'acidose, la fièvre, le froid (**Françoise., 2004**).

La polymérisation de l'Hb S dans sa forme désoxygénée est au centre de processus physiopathologique. Déformation, rigidification et fragilisation des globules rouges qui en résultent sont responsables de deux des grandes manifestations : crise vaso-occlusive douloureuse (Figure 06) et anémie hémolytique (**Credos ., 2005**).

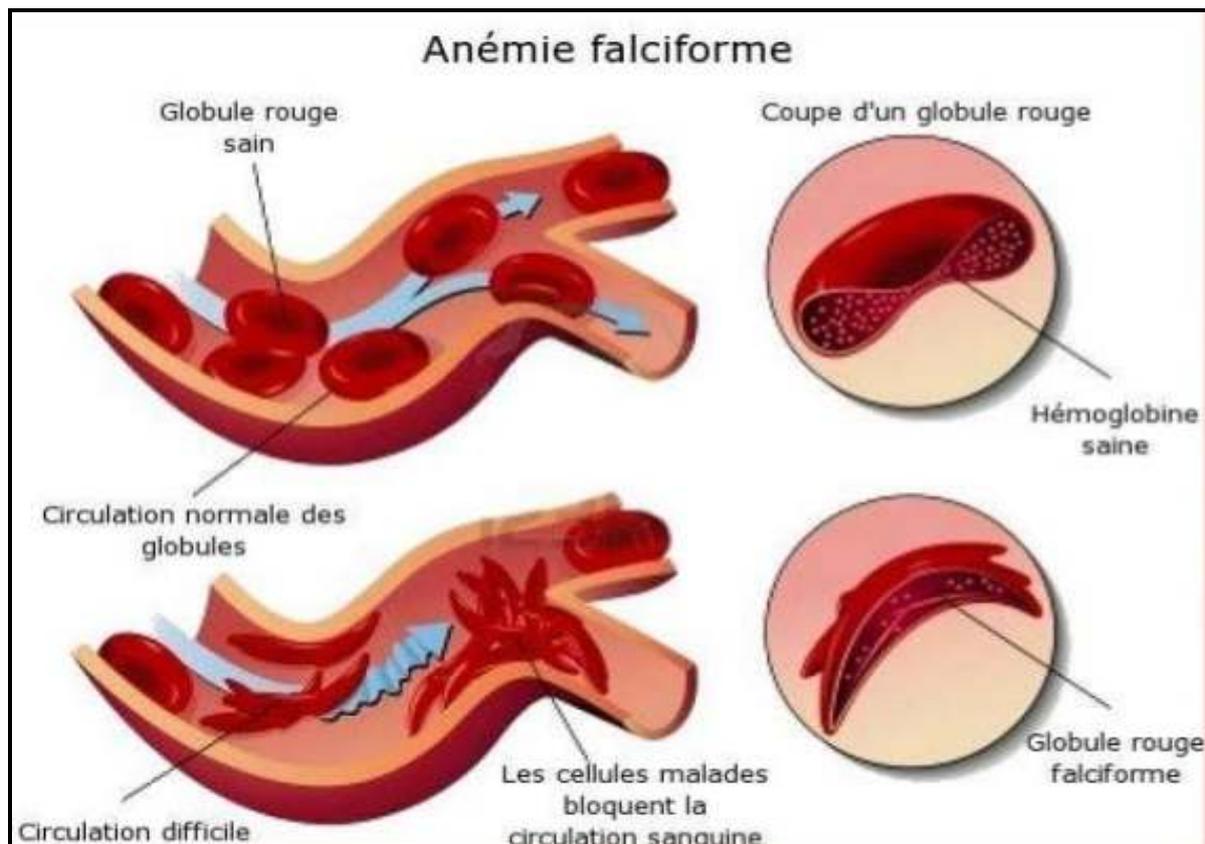


Figure (06) : Falciformation des globules rouges, perte d'élasticité et occlusion des vaisseaux de faible calibre (**Labie et al., 2003**).

II.2.1.5. Traitement de la drépanocytose

Les principaux traitements utilisés sont :

- A) La transfusion sanguine : elle permet de corriger le déficit quantitatif en transporteur d'oxygène que d'apporter des hématies déformable, et diminuer la proportion d'hémoglobine drépanocytaire afin d'éviter ou d'enrayer la falciformation (**Françoise., 2004**) ;

- B) La greffe de moelle osseuse (ou « greffe » de cellules souches hématopoïétiques) présente un pourcentage d'efficacité supérieur à 80% (**Redding et Knoll., 2006**) ;
- C) Les traitements pharmacologiques sont les plus fréquemment appliqués:
- Induction d'HbF: hémoglobine non polymérisant,
 - Modulation de la densité des érythrocytes et inhibition de la déshydratation ,
 - Inhibition du Co-transport K⁺- Cl⁻ (magnésium oral), et /ou du canal Gardos,
 - Inhibition de la perméabilité anionique; Inhibition des flux induits par la désoxygénation (**Redding et Knoll., 2006**).

II. 2.2. L'hémoglobine C

C'est le deuxième variant d'hémoglobine le plus fréquemment rencontré dans le monde, qui correspond à une substitution du résidu de glutamate en position 6 par un résidu de lysine de la chaîne β -globine . Le premier possède une chaîne latérale courte et chargée négativement, tandis que le second possède une chaîne latérale longue chargée positivement, ce qui affecte la plasticité générale des érythrocytes. Cette anomalie provoque la formation des cristaux intra-érythrocytaire qui sont responsables d'une augmentation de la densité du globule rouge et sa déshydratation (**Giro et al., 2003**).

Les hétérozygotes comptent de 28 % à 44 % d'hémoglobine C, ce qui demeure asymptomatique, tandis que les homozygotes comptent 100 % d'hémoglobine C, ce qui provoque une anémie hémolytique (**Steinberg., 2006**).

Le gène de l'hémoglobine C'est surtout présent en Afrique de l'Ouest, où il peut présenter un avantage préventif contre le paludisme à l'instar d'autres hémoglobinopathies, ainsi qu'en Europe du Sud, en Amérique latine et dans les Caraïbes (**OMS, 2011**).

II.2.3. L'hémoglobine D

L'hémoglobine D est due à une substitution de l'acide glutamique dans la position 121^{ème} de la chaîne β par une glutamine (glu→gln). Il s'agit d'une maladie génétique ubiquitaire, toute fois on le rencontre surtout dans le sous-continent indien (fréquence du gène 2-3 %). Sa transmission génétique est autosomique récessive (**Belhadi., 2010**).

À l'état hétérozygote AD , une absence d'anomalie clinique (mais nombreuses hématies en cible : 25 à 40% d'Hb D).

Chez l'homozygotie : parfois une anémie légèrement hémolytique , parfois discrète microcytose avec nombreuse hématies en cible (Hb D > 95%) **(Robert et al., 2003)**.

Son importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite β^S/β^D -Punjab qui favorise les propriétés de polymérisation de l'Hb S, et la composite de le double hétérozygote D / β Thal : la microcytose est plus nette ; l'Hb A2 est augmentée et l'Hb F est > 10% **(Steinberg., 2006)**.

II.2.4 . L'hémoglobine E

L'Hb E est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 26 est remplacé par une lysine. L'Hb E est considéré comme la seconde hémoglobinopathie dans le monde après l'Hb S. Cette hémoglobine est parfois classée parmi les hémoglobinopathies thalassémiques **(Couque et Demotalemenbrt., 2003)**.

La localisation géographique : Asie du sud-est (Thaïlande, Cambodge, Laos ; jusqu'à 35% de la population est porteuse) : 30 à 50 millions d'individus porteurs **(OMS., 2011)**.

La mutation ponctuelle à l'origine de ce variant présente une propriété : d'une part, elle est responsable d'une substitution faux sens créant un mutant de surface ; d'autre part, elle crée un site cryptique d'épissage partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARNm vers la maturation anormale qui dépend de la production d'ARN m normale .La substitution n'affecte pas la fonction d'hémoglobine, mais la diminution d'ARNm normale conduit à un défaut où constitue un déficit de production de β -globine normale, ce qui conduit à une bêta thalassémie . De plus, les sous-unités β^E interagissent moins fortement avec les sous-unités α , ce qui rend les molécules d'hémoglobine E moins stables en présence d'oxydants donc un défaut thalassémique **(Couque et Demotalemenbrt., 2003)**.

II.3. Les thalassémies

Les thalassémies sont un groupe hétérogène d'affections génétiques touchant la synthèse de l'hémoglobine et provoquant une diminution de la production de l'une ou plusieurs chaînes de globine (α , β , γ , δ), elles se distinguent en thalassémie α , β , $\delta\beta$ ou $\gamma\delta\beta$,

selon le type de chaîne produite en quantité insuffisante. Du point de vue de la santé publique, seulement les α et β thalassémies sont importantes (**Weatherall et Clegg., 2001**).

Lorsque la synthèse des chaînes de globine est nulle, les thalassémies seront appelées α^0 et β^0 , tandis que celle où persiste un certain degré de synthèse de globine sont appelées α^+ et β^+ (**Géorges.,1996**).

II.3.1. Les β -thalassémies

Les β -thalassémies sont très fréquentes dans une large région qui englobe le bassin méditerranéen, l'Afrique, le Moyen-Orient, le sous-continent indien, le sud-est asiatique. La fréquence de l'anomalie varie de 1 à 20 % dans ces régions. La présence d'un gène thalassémique assure un certain degré de protection contre le paludisme, ce qui explique cette large répartition (**OMS., 2011**).

Ils sont la conséquence d'un défaut congénitale de la synthèse des chaînes β sur le chromosome 11. Ce sont hritées selon le mode autosomique récessif, les parents d'enfant atteint sont obligatoirement hétérozygote et porteur d'une seul copie d'une mutation β -globine (**Djamâa., 2012**).

Dans les β -thalassémies, le défaut de chaînes β est responsable d'un excès de chaînes α , incapables de s'associer entre elles et extrêmement instables. Elles sont responsables d'une érythropoïèse inefficace. C'est le déséquilibre de synthèse entre chaînes qui augmente de façon croissante la sévérité du phénotype. Les modificateurs secondaires du phénotype sont les autres gènes de globine dont l'expression interagit avec celle du gène β anormal (**Djamâa, 2012**).

II.3.2. Les α -thalassémies

Les alpha-thalassémies se caractérisent par une insuffisance de la synthèse ou la délétion d'un ou de plusieurs des quatre gènes α -globines. Elles affectent donc la synthèse les trois sortes d'hémoglobine : HbA, HbA2 et HbF, puisque toutes contiennent la chaîne alpha ; dans ces cas la vie n'est possible que grâce à la formation de quantités importantes d'hémoglobines anormales. Ce sont hritées selon le mode autosomique récessif (**Weatherall., 1999**).

Les alpha-thalassémies sont particulièrement fréquentes en Asie du Sud Est et en Chine. Leur prévalence peut atteindre 30 à 40 % en Thaïlande et au Laos. Elles sont fréquentes en Afrique équatoriale (**OMS., 2011**).

Le sujet normal a deux gènes alpha sur chaque chromosome 16, donc quatre gènes alpha fonctionnels. La plupart des alpha-thalassémies sont expliquées par des délétions d'un ou de deux gènes alpha. L'inactivation d'un, deux, trois ou quatre gènes alpha va se traduire par des tableaux cliniques différents (**Bernini., 2001**).

En l'absence de quelque production d' α -globine que ce soit, ces fœtus sont entièrement incapables de produire de l'hémoglobine fœtale (HbF) ou adulte (HbA); ils ne peuvent produire que des hémoglobines embryonnaires, lesquelles ne peuvent généralement pas soutenir la vie au-delà du troisième trimestre (**Galacteros., 2000**).

II.4. Autres hémoglobinopathies

Il existe des hémoglobinopathies hétérozygotes dites composites, où le sujet atteint est aussi hétérozygote pour une autre maladie de l'hémoglobine. Ces formes hétérozygotes composites sont considérées comme des formes majeures mais se manifestant plus tardivement (vers l'âge adulte) que les formes homozygotes (**Monplaisir et al ., 1986**).

On peut citer des exemples comme la composite des hétérozygotes S/C qui est l'hémoglobinopathie la plus répandue après la drépanocytose SS, les thalasso-drépanocytaire (S/ β ou α – thal), les composites thalassémiques, l' hétérozygoties D/ β ou α – thalassémie...ect (**Monplaisir et al ., 1986**).

II.6. Diagnostique biologique d'une hémoglobinopathie

Une anomalie de l'hémoglobine peut être recherchée selon les signes clinico-biologiques, le plus souvent une anémie (par extension devant une pâleur, un ictère, une hépato-splénomégalie, une asthénie, un essoufflement, des acouphènes, des vertiges). Elles peuvent aussi être recherchées en raison de la constatation d' éléments purement biologiques come une hémolyse ou une microcytose. Elle peut enfin être demandée lors une enquête familiale ou du dépistage systématique chez une personne appartenant à une ethnie dite « à risque » (Afrique sub-Saharienne, Afrique du nord , Bassin méditerranéen, Antilles, Asie, Moyen-Orient et Proche Orient), ou encore dans le contexte anesthésique, anténatal, pré-

greffe... Enfin, il peut s'agir d'un test de confirmation d'un dépistage néonatale (**Couque et Demaontalembert ., 2013**).

Selon la NABM (Nomenclature des Actes de Biologie Médicale), « un bilan standard pour la recherche d'une hémoglobine anormale » doit inclure 3 tests phénotypiques distincts, dont au moins une technique électrophorétique avec interprétation . Les techniques utilisées sont, soit séparatives permettant de différencier les hémoglobines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (électrophorèse et chromatographie), soit non séparatives, mais mettant en évidence des propriétés spécifiques : test Itano, recherche de corps de Heinz, test de précipitation à l'isopropanol, spectrophotométrie pour la méthémoglobine, courbe de dissociation de l'oxygène,...(**Wajcman et al., 2002**).

III. Les techniques d'étude biologique de l'hémoglobine

III.1 Les techniques d'étude séparatives

III.1.1. L'électrophorèse

L'électrophorèse sépare les hémoglobines en fonction de leur différence de charge dans un champ électrique.

◆ L'électrophorèse capillaire (EC)

C'est une technique d'électrophorèse liquide plus récemment développée pour l'étude de l'hémoglobine. Contrairement aux techniques citées ci-dessus, la migration se fait dans un capillaire de silice avec un tampon alcalin soumis à un haut voltage. Suite à l'injection de l'hémolysat dans le système et à l'application du courant électrique, les différentes fractions d'hémoglobines se séparent en fonction de leur mobilité électrophorétique (donc de leur charge) mais aussi en fonction du courant d'électro-endosmose (donc de leur rapport charge/masse). Les hauts voltages appliqués permettent une séparation rapide et sensible des différentes fractions. L'ordre de séparation est équivalent à celui observé pour l'électrophorèse sur gel à pH alcalin. La détection s'effectue par spectrophotométrie à 415 nm (maximum d'absorption de l'oxyhémoglobine). Un électrophorégramme (Figure 07) est alors généré avec les différents fractions d'hémoglobines « normales » (HbA, HbF, HbA2) et les fractions « anormales » de mutants caractérisés de façon présomptive en fonction de leur

position relative dans des zones spécifiques : HbS, HbC, HbE, HbO-Arab, HbD-Punjab... . Une quantification relative des différentes fractions est réalisée (Cotton *et al.*, 2009).

Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, reproductible et quantitative, avec des tracés simples à interpréter (Cotton *et al.*, 2009).

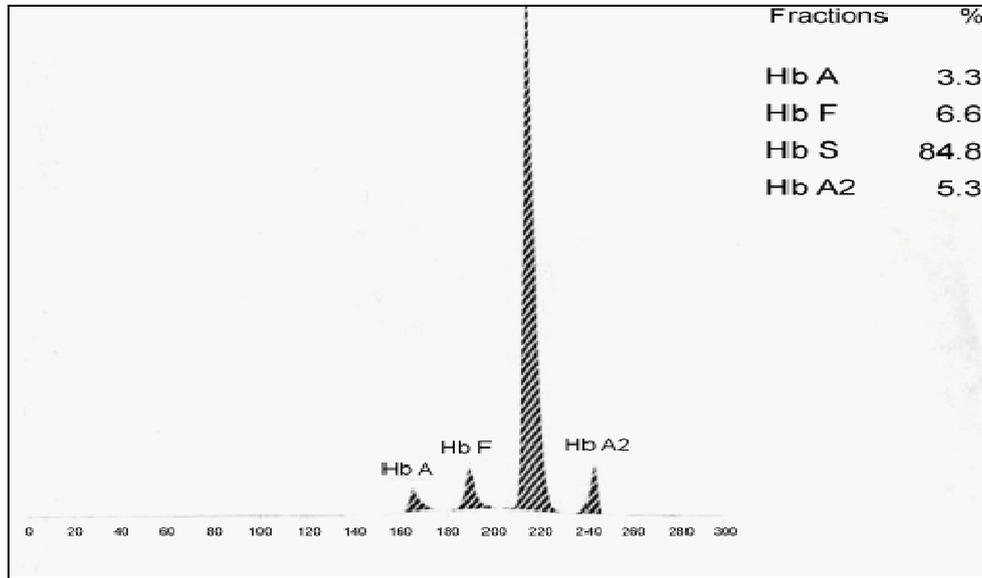


Figure (07) : Électrophorèse de l'hémoglobine (zone capillaire) montrant la drépanocytose homozygote (Cotton *et al.*, 2009).

III. 1.2. La chromatographie

◆ La chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La méthode reposant sur la charge électrique les plus courantes permettant de mesurer l'HbA1c. Par conséquent, la séparation est uniquement possible si la molécule cible a une charge électrique différente par rapport aux autres composants de l'échantillon (Sang totale).

Elle sépare les différentes fractions d'hémoglobines en fonction de la force de leurs interactions ioniques sur une colonne échangeuse de cations. Les molécules d'hémoglobine chargées positivement dans le tampon utilisé interagissent avec la colonne chargée négativement (résidu carboxyl greffé sur une résine). Suite à l'injection d'un gradient de tampon de haute force ionique, les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées au fur et à mesure que la force ionique du tampon devient supérieure à leur interaction avec la colonne.

Les différentes fractions d'hémoglobines sont éluées à un temps donné qui est caractéristique: c'est le temps de rétention. La détection est spectrophotométrie et s'effectue à 415 nm.

Les différents pics obtenus sont donc reconnus en fonction du temps de rétention : les hémoglobines normalement présentes (HbA, HbA2, HbF), ainsi que les variants d'hémoglobine les plus fréquents, sont reconnus de façon pré-somptive, avec séparation des HbS, HbC, HbE et HbD-Punjab; les variants dont le temps de rétention n'est pas répertorié par le fournisseur sont dits « unknown » (Riou *et al.*, 2005).

Cette technique est automatisée, rapide, reproductible et quantitative. La validation des profils obtenus par CLPH repose sur un certain nombre de critères : ligne de base droite, aire totale dans les limites préconisées, temps de rétention attendus respectés (par rapport aux données fournisseur), pics bien symétriques, absence de contamination (présence d'extra-pics) (Wajcman *et al.*, 2009).

III.1.3. La spectrophotométrie

La spectrophotométrie de masse ; technique permet la séparation de différents fragments protéiques de masses différentes. La révélation d'une chaîne de globine avec une masse « anormale » et le calcul de la différence de masse permet d'en déduire l'acide aminé impliqué. Cette technique peut être couplée à des digestions enzymatiques préalables, qui permettent une précision plus importante de masse .

Cette technique permet la séparation de différents fragments protéiques de masses différentes. La révélation d'une chaîne de globine avec une masse « anormale » et le calcul de la différence de masse permet d'en déduire l'acide aminé impliqué. Cette technique peut être couplée à des digestions enzymatiques préalables, qui permettent une précision plus importante (Zanella *et al.*, 2009).

III.2. Les techniques d'étude non séparatives

En condition de désoxygénation, l'hémoglobine S polymérise en longues fibres entraînant une rigidification et une déformation de l'hématie en forme de faucille (Figure 08).

◆ **Le test Itano** est essentiel pour confirmer la présence d'HbS entrepose sur le principe que seule l'HbS désoxygénée précipite en milieu réduit . C'est une technique manuelle facile

à mettre en œuvre et rapide (< 10 minutes) mais qui utilise des réactifs « maison » (Bardakdjian et al., 2003).

◆ **Le test de falciformation** de Emmel est une alternative au test Itano. C'est également une technique manuelle qui met en évidence les drépanocytes sur une lame lorsque le frottis est mis en condition hypoxique. Elle nécessite plus de temps (45 minutes) et présente les mêmes risques de faux négatifs que le test Itano quand le taux d'HbS est trop faible (Bardakdjian et al., 2003).

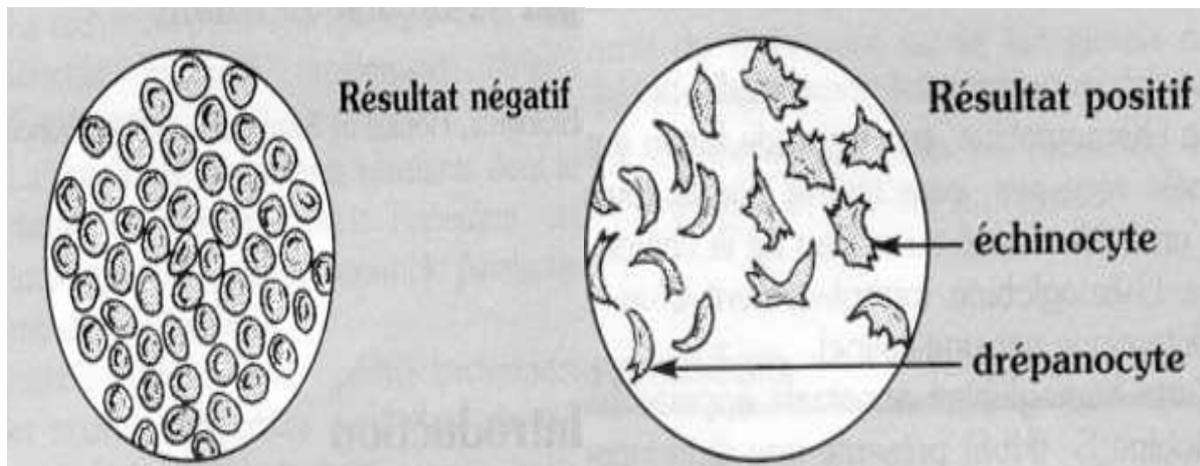


Figure (09) : Schémas comparatif des résultats positif (à droite) et négatif (à gauche) de teste falciformation sur microscope optique (Baledent., 2000).

Conclusion

Ce travail a porté sur l'étude de 400 cas d'hémoglobinopathies qui ont été détectées parmi une population de 16900 sujets de les régions de Blida et Alger. Il nous a permis de démontrer que : la prévalence des hémoglobinopathies dans ces régions est de 2.4% par rapport à la population étudiée. On a détecté l'existence de différentes types d'anomalies d'hémoglobine. Nous avons révélé que la drépanocyte hétérozygote est l'anomalie la plus fréquente (HbS AS à 51%), puis l'hétérozygote HbC (37%) et les hétérozygotes HbE et HbD (5.5%), et enfin la double hétérozygotie SC (1.25%) et la drépanocytose homozygote SS (0.5%).

Les sujets présentant des formes hétérozygotes (HbS, HbC, HbE et HbD) sont porteurs de la maladie et sont cliniquement asymptomatiques, mais l'association d'une double hétérozygotie SC et le cas de drépanocytose homozygote présentent un syndrome drépanocytaire majeur (SDM).

Les résultats de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC sur Arckray) et l'électrophorèse capillaire (sur Capilarys II) permettent d'une part d'évaluer la prévalence des hémoglobinopathies dans notre étude, et de préciser et quantifier l'anomalie d'hémoglobine.

Le diagnostic précoce des hémoglobinopathies est très important dans le but d'optimiser la prise en charge de personnes atteintes de formes majeures et la prévention de la survenue de la forme homozygote grave, mais malheureusement pas encore leurs traitement.

Les stratégies de prévention les plus efficaces pour réduire la fréquence des hémoglobinopathies consiste à :

- ✓ Des tests sanguins fiable permettant de déterminer si un couple a risque de donner naissance à des enfants malades.
- ✓ Les services de conseil informent les porteurs du trait génétique à des risques pour leurs futures enfants, du traitement dont ceux-ci auront besoin s'ils sont atteint d'une hémoglobinopathie et des solutions qui s'offrent au couple.
- ✓ Le dépistage prénatale des maladies génétiques pose des problèmes éthiques, juridiques et sociaux qui doivent durement pris en considération.

Conclusion

Cette étude a été réalisée sur une population limitée, il serait donc souhaitable de réaliser un dépistage des hémoglobinopathies étendue à la population générale, à la recherche des cas familiaux pour pouvoir instaurer un conseil génétique afin d'éviter au maximum les formes homozygotes.

Références Bibliographiques

HbVar: <http://globin.bx.psu.edu/hbvar/menu.html>

Vulgaris-medical : <https://www.vulgaris-medical.com>

ADAMS ® A1c HA-8180V (2006): Analyseur Automatique d'Hémoglobine glyquée. Manuelle d'utilisation. ARCKAY-EUROPE,B.V. 88p.

Capillarys 2 Flex Piercing (2014) : Capillarys hemoglobin(e) using the capillarys 2 flex-piercing instrument. SEBIA INSTRUCTIONS -American.429 p.

OMS (2000) : Comité régional de l'Afrique. Drépanocytose : une stratégie pour la région africaine de l'OMS. AFR/RC60/8 ; Juin 2000.

OMS, Comité régional pour l'Afrique (2011) : La drépanocytose dans la région africaine : situation actuelle et perspectives. AFR/RC56/17, 17 Juin 2011.

Aguilar-Martinez P., Badens C., Bonello-Palot N., Cadet E., Couque N., Ducrocq R, Elion J., Francina A., Joly P., Pissard S., Rochette J. (2010) : Réseau DHOS Pathologie héréditaire de l'érythrocyte. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. Ann Biol Clin (Paris). 464 p.

Baledent F (2000) : Physiologie de l'hémostase. Paris : Elsevier. 510 p.

Bardakdjian-Michau J., Dhondt JL., Ducrocq R., Galactéros F., Guyard A., Huchet FX., Lahary A., LenaRusso D., Maboudou P., North ML., Prehu C., Soummer AM., Verschelde M., Wajcman H. (2003) : Groupe de travail SFBC Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Ann Biol Clin (Paris). 400 pages.

Belhadi K (2010) : Étude des hémoglobinopathies dans la région de Batna. Thèse de Doctorat. Université Batna. 172 p.

Bernard J., Levy J.P., Varet B., Claurel J., Rain D., Sultant Y. (1998) : Abrégés d'hématologie, 9^e édition.- Paris : Manson. 405 p.

Bernini LF. (2001): « Geographic distribution of α thalassemia » : Steinberg MH, Forget B, Higgs DR, Nagel RL, éd. Disorders of hemoglobin. Genetics, pathophysiology, and clinical management, Cambridge : Cambridge University Press. 878 p.

Références Bibliographiques

Bourée P., Ensaf A. (2012) : La drépanocytose : une hémoglobinopathie tropicale qui devient cosmopolite. *Bio* 23. 320 p.

Carrell RW. (1972): A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol.* 615 p.

Credos. (2005) : Module de formation à la prise en charge de la drépanocytose. Paris : Elsevier. 700 p.

Cotton F., Malaviolle X., Vertongen F., Gulbis B. (2009): Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. *Clin Lab*; 55 . 217p.

Cotton F., Gulbis B., Hansen V., Vertongen F. (2003): Interference of hemoglobin D in hemoglobin A(2) measurement by cation-exchange HPLC. *Clin Chem* 45. 1318 p.

Couque N., Montalembert DE. (2003) : Diagnostique d'une hémoglobinopathie. *Hématologie* : 4. 289 p.

Diakite S. (2005) : Les mécanismes de protection de l'hémoglobine C contre les formes graves de al paludisme A. *P falciparum*. résultats d'études préliminaires in vitro. 100 p.

Djamâa I. (2012) : Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des bêta-thalassémies et drépanocytose. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. 152 p.

Emmel V.E. (1977): Study of the erythrocytes in case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. *Arch. Inter Med.* 586 p.

Farce M-H.(2000) : Génétique moléculaire. Editions Quae. Paris. 262 p.

Frédéric B., Piel., Thomas N., Williams. ,(2013): Sickle Cell Anemia, Sickle Cell Anemia History and Epidemiology, London, Springer. 216 p.

Françoise R. (2004): Anémie à l'accouchement : Prévalence, facteurs de risques et répercussions chez le nouveau-né. Ed : *Rév Epidémiol*, 40 (4) .267 p.

Galacteros F. (2000) : Alpha thalassémie. *Br J Haematol.* 312 p.

Galanello R., Origa R. (2010): Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 470 p.

Références Bibliographiques

Giambona A., Passarello C., Renda D., Maggio A. (1997): The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. Clin Biochem 42. 880 p.

Girot L. (1999) : La drépanocytose. Rev Fr Lab. 540 p

Girot R., Bégué P., Galacteros F. (2003) : La drépanocytose. Ed : John Libbey Eurotext, Paris. 270 p.

Guis L., Chaumier A., Gall VL., Havrez S. (2013) : Intégration du Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée. Rev Francoph Lab. 140p.

Higgs DR. (2001): Molecular mechanisms of thalassemia.. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Ed: Steinberg MH, Cambridge : Cambridge University Press. 405 p.

ISO 22870 (2010) :Examens de biologie médicale délocalisée (EBMD). Exigences concernant la qualité et compétence.

Kafando E., Savadogo LGB., Ayéroué J. (2008): Les syndromes drépanocytaires majeurs : une enquête anonyme au près du corps médical au Burkina-Faso. Med. Trop. 246 p.

Keren DF., Hedstrom D., Gulbranson R., Ou CN., Bak R. (2008): Comparison of Sebia Capillarys capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. Am J Clin Pathol. 824 p.

Khadjetou B. (2013): Étude épidémiologique des hémoglobinopathies chez les femmes encientes et consultation prénatal. Thèse de Doctorat. Université de Nouakchott. 690 p.

Kohne A .(2011): Haemoglobinopathy Diagnosis. 2ème Edition. Blackwell Publishing Ed. Oxford. 328 p.

Kutlar A. (2007): Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder, Hemoglobin. 209 p.

Références Bibliographiques

Labie D., Elion J. (2005) : Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie. Paris : Elsevier. Pp : 20-31. 210 p.

Lodish., Balimore., Berk. et Darnell (2000): Biologie Moléculaire de la cellule. Boeck Université.

Lubin B., H H, Witkowska E., Kleman K. (1991): Laboratory diagnosis of hemoglobinopathies. Clin Biochim. 363p.

Mérault G., Diarra J.P., De Caunes F., Bibrac A., Loret H., Berchel C., Reinette P. (1996) : Dépistage néonatal et prise en charge coordonnée de la drépanocytose en Guadeloupe. In: "Drépanocytose et Santé publique", F. Ed : Galacteros, S. Dormont. 465 p.

Maniatis S., Conley CL., Waugh DF., Ugoretz RJ., Spurrell JR. (1980): Pathogenesis of hemolytic anemia in homozygous hemoglobin C disease. J Clin Invest. 795 p.

Monplaisir N., Merault G., Poyart C., Rhoda MD., Craescu C., Vidaud M., Galacteros F., Blouquit Y., Rosa J. (1986) : Hemoglobin S Antilles: a variant with lower solubility than hemoglobin S and producing sickle cell disease in heterozygotes. Proc Natl Acad Sci USA. 1450 p.

Neel H. (1979): Disorders of Hemoglobin : Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. 2ème Edition. Cambridge University Press Ed. 846 p.

Ngo DA, Aygun B., Akinsheye I., Hankins JS., Bhan I., Luo HY., Steinberg MH., Chui DH. (2012): Fetal haemoglobin levels and haematological characteristics of compound heterozygotes for haemoglobin S and deletional hereditary persistence of fetal haemoglobin. Br J Haematol. 259 p.

Redding-Lallinger R., Knoll C. (2006): .Sickle cell disease-pathophysiology and treatment. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care; 36(10). 346 p.

Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. (2010) : Sickle-cell disease. Lancet. 318 p.

Références Bibliographiques

Richard J-L., Ducrocq R., Guyard A., Huchet F-X., Lahary A., Lena-Russo D., Maboudou P., North M-L, Prehu C., Soummer A-M., Verschelde M., Wajcman H. (1999) : Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Ann Biol Clin (Paris) .409 p.

Riou J., Godart C., Mathis M., Hurtrel D., Wajcman H., Préhu C., Bardakdjian J. (2005) : Evaluation of the Bio-Rad /HbA1C Dual Program for measurement of hemoglobin concentrations and detection of variants. Clin Chem Lab Med. 237 p.

Rivière I., Sadelain M. (1997): Method for construction of removal vectors and the generation of high titer producers. In . Totowa, NJ. Gene therapy protocols: Method in modular biology. Humana Press. 590 p.

Robert N., Dunda BO., SchaeferRego KE. (2003): Sickle cell hemoglobin and its interactions with other variants haemoglobins and with thalassaemias. In: "Hemoglobinopathy diagnosis", B.J. Bain, Ed., Blackwell Pub., London. 880p.

Roberts W.L., Hedstrom D., Gulbranson R. (2003): The effect of increased fetal hemoglobin on 7 common Hb A1c assay methods. Clin Chem 58, 945 p.

Santin A., Renaud B. (2013) : Drépanocytose et complications aiguës, Maladies rares en médecine d'urgence. Paris, Springer-Verlag. 301 p.

Serge P. (2004) : Interrelations métaboliques Physiopathologique Érythrocytaire et Métabolisme Énergétique. 520 p.

Steinberg MH. (2006): Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. Trends PharmacolSci. 27(4). 204 p.

SYSMEX XT (2010) : Manuel of Automated Hematology Analyzer; Fluorescent Flow Cytometry Yields Optimized Productivity. Sysmex.70 p.

Terkia CR. (2008) : End stage renal disease in sickle cell disease: future directions. Postgrad Med. 775p.

Vaubourdolle M. (2007) : Toxicologie , Sciences mathématiques, Physiques et Chimique. 392 p.

Références Bibliographiques

Vinatier H. (2006) : Diagnostic biologique des hémoglobinoses. *Annales de Pédiatrie*. 32 (9) 789 p.

Wainsten J-P. (1990) : Dictionnaire Nouveau Larousse Médical. Librairie Larousse.

Wajeman H., Lantz B., Girot R. (1994) : Les maladies du globule rouge. 2^{ème} édition ; Paris : INSERM. 570 p.

Wajcman H., Riou J., Tapo AP. (2002): Globin chain analysis by reversed phase high performance liquid chromatography: recent developments. *Hemoglobin*; 950 p.

Wajcman H., Riou J. (2009): Globin chain analysis: an important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. *Clin Biochem* . 1802 p.

Weatherall DJ. (1999): « The thalassaemias », *BMJ*, vol. 314. 1675 p.

Weatherall DJ., Clegg JB. (2009): Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem , *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 79 . 704 p.

Zanella-Cleon I., Préhu C., Joly P., Riou J., Becchi M., Wajcman H., Francina A. (2009): Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in Cis in the beta-globin chain. *Hemoglobin* 2009 ; 33(3). 177 p .

Matériel non biologique

❖ **Appareillage**

Automate SYSMEX XT 4000 ;
Automate Arckray Adams HA 8180;
CAPILARYS 2 Flex Piercing- SEBIA;
Centrifugeuse;
Microscope optique ;
Automate Cellavision.

❖ **Consommables**

Tubes à essais de 5 ml;
Les gants stériles ;
Lames et lamelles ;
Embouts jaunes et bleux ;
Bacs de coloration ;
Portoir en plastique ;
Porte plaque ;
Papier absorbant ;
Micropipettes fixes et réglable ;
Eau distillée ;
Paraffine ;
Papier thermique.

❖ **Réactifs**

Solution de la coloration de May-Grünwald ;
Solution de la coloration Giemsa ;
Réactif de métabisulfite de sodium ($S_2O_5Na_2$) à 2 % (2 grammes pour 100 ml d'eau distillée);
Huile d'émersion ;
Les solutions échangeuse d'anions, cations et neutres ;
Solutions Wash

Le matériel utilisé :



Microscope optique



lames de lectures des frottis



Pack de coloration des frottis



Tubes vacutainer EDTA



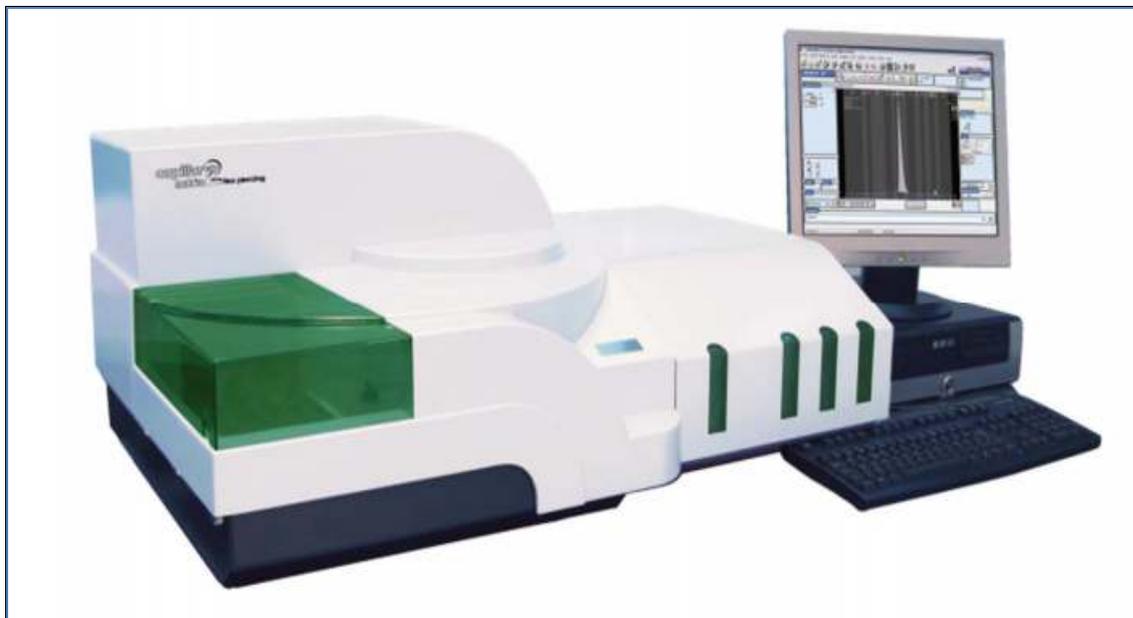
L'automate SYSMEX XT 4000.



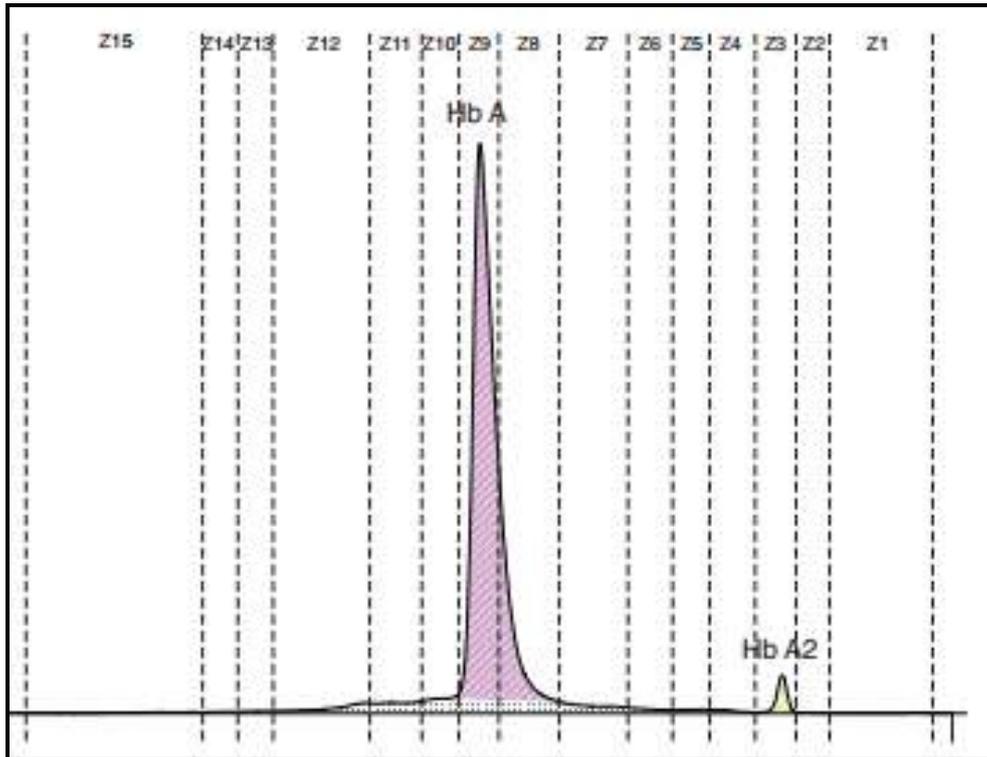
L'automate Arckray Adams HA 8180



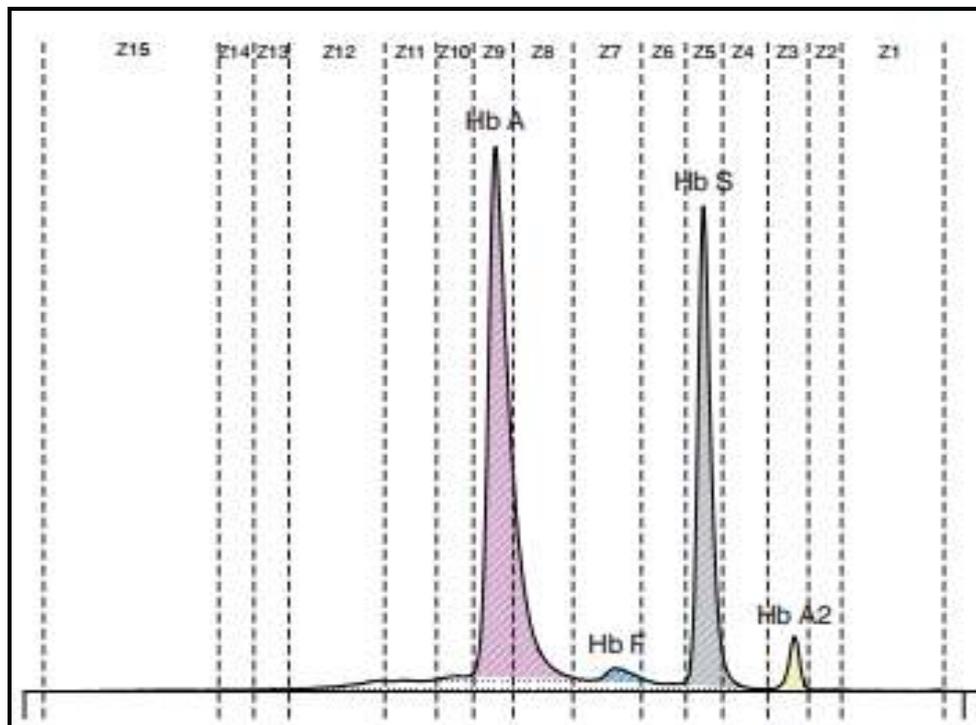
Cellavision : la visionneuse des frottis



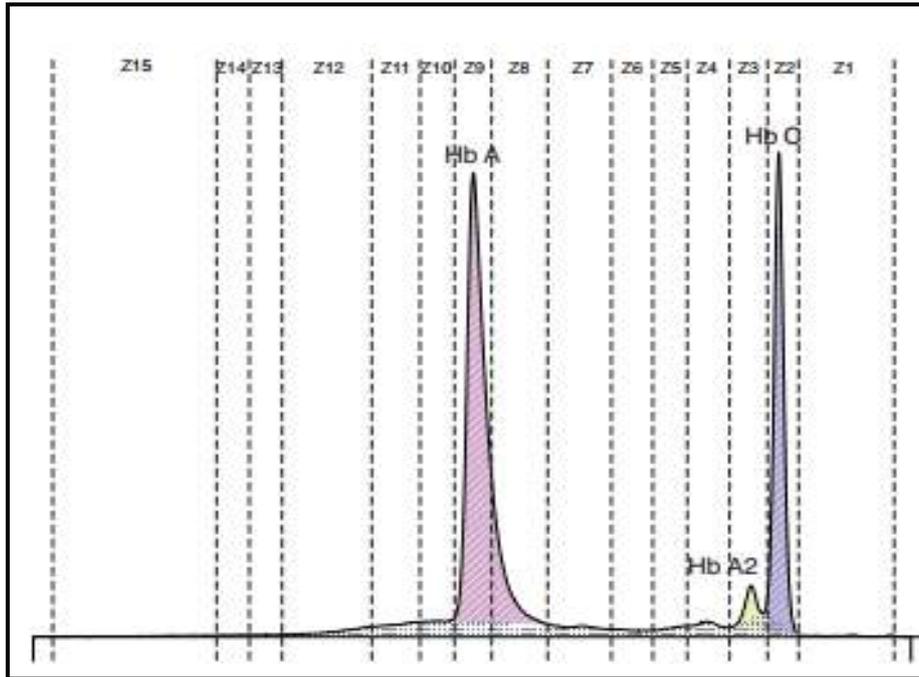
CAPILARYS 2 Flex Piercing- SEBIA.



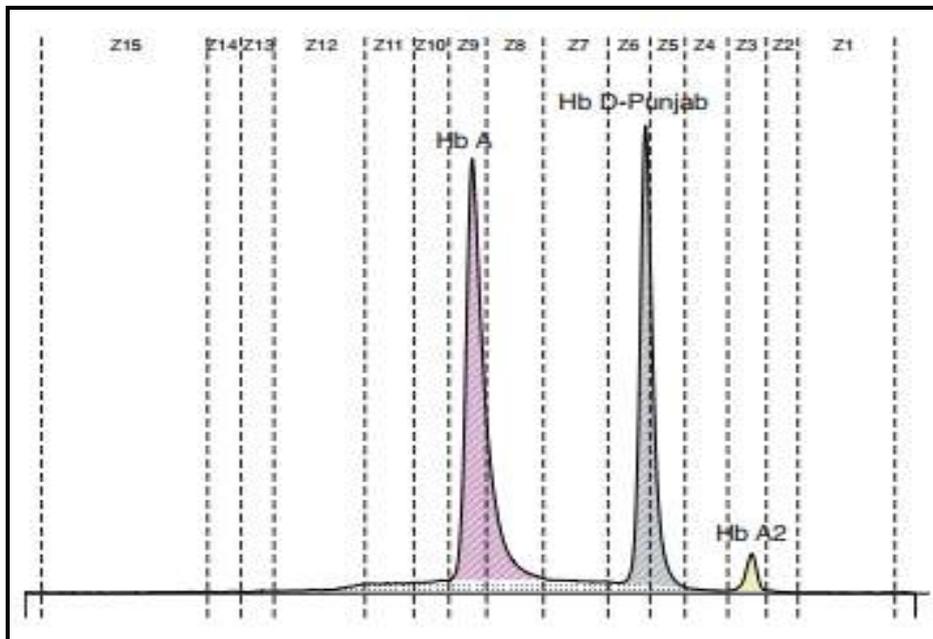
1. Profil électrophorétique normal de l'adulte.



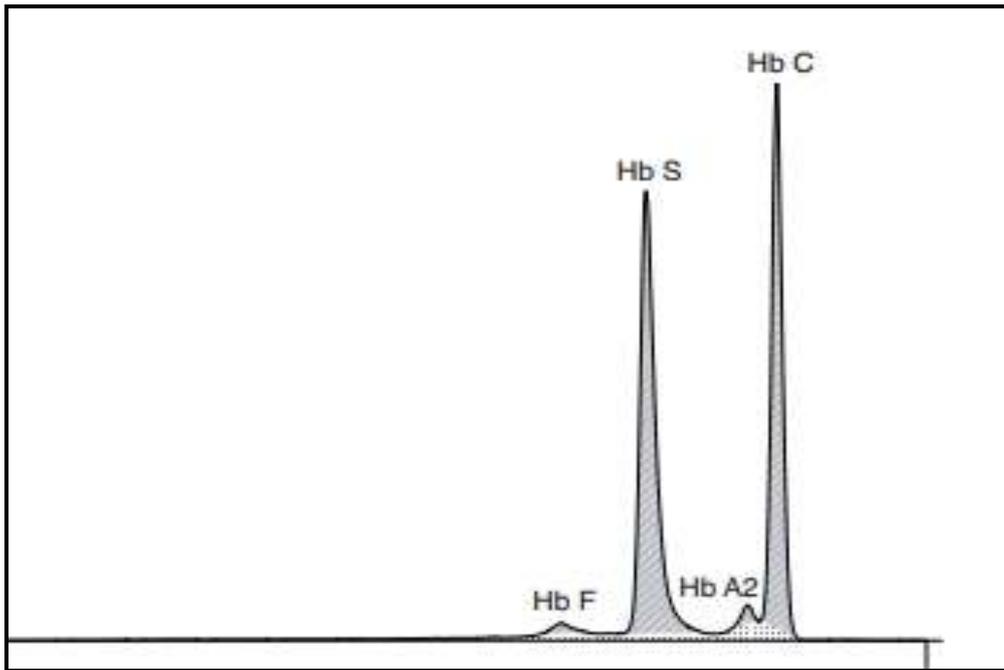
2. Profil électrophorétique anormal avec Hb S hétérozygote.



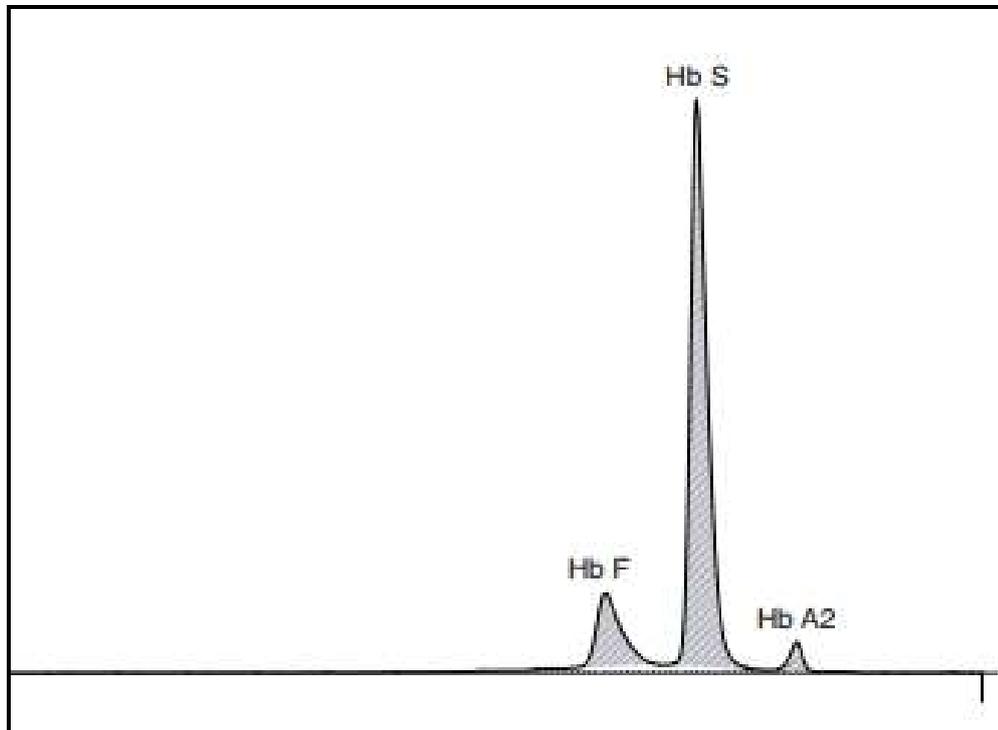
3. Profil électrophorétique anormal avec Hb C



4. Profil électrophorétique anormal avec Hb C.



5. Profil électrophorétique anormal avec la composite d'h hétérozygoties SC



6. Profil électrophorétique anormal avec HbS homozygote .

I. Les étapes de réalisation de frottis sanguin



1. La préparation de l'échantillon sanguin et matériel de travail



2. Mètre une petite goutte de sang sur la lame



3. L'étalement de la goutte du sang



4. Coloration de frottis sanguin par la 1^{ère} coloration de May-Grunwald (à gauche) puis la 2^{ème} coloration de Giemsa.



5. La mise de l'huile d'émersion avant la lecture

II. Les étapes de test falciformation



1. Préparation de la lame et les échantillons de travail.



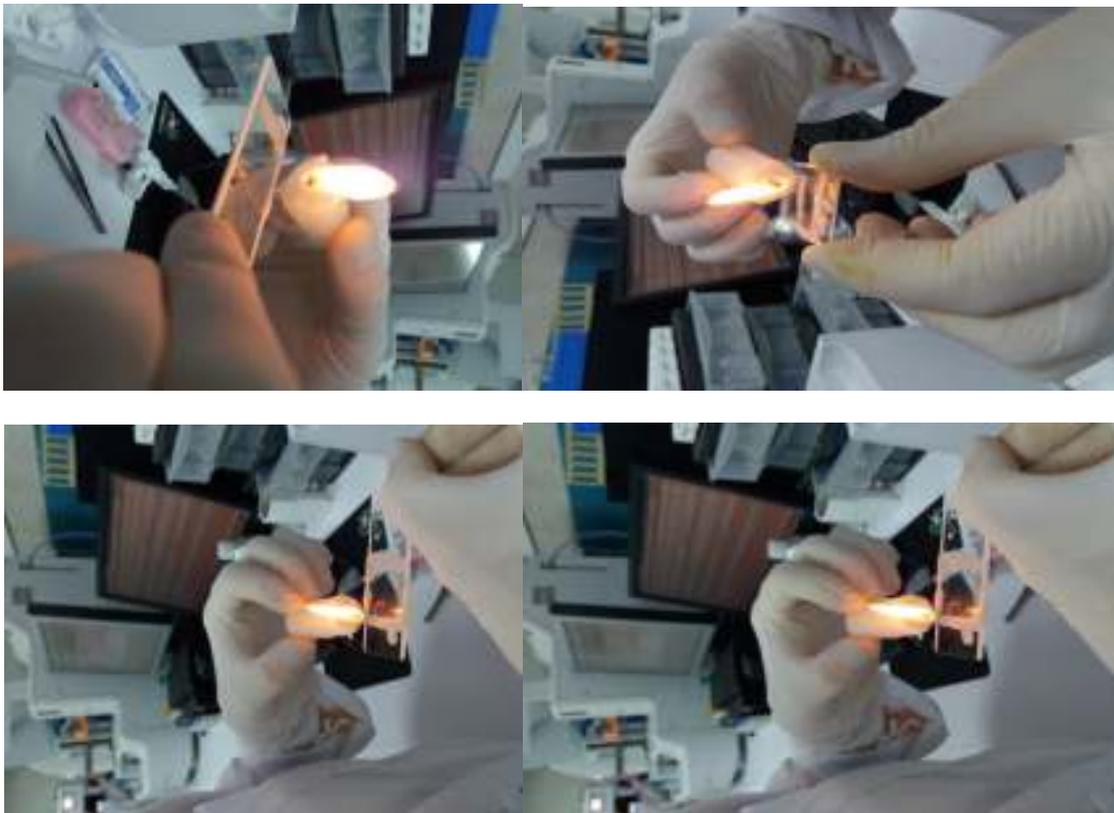
2. La mise d'une goutte de sang sur la lame



3. L'étalonnage de la goutte du sang sur la lame



4. Le couvrage de la lame étalé par une lamelle



5. Recouvrement des 4 bords de la lamelle par la paraffine .



6. L'incubation de la lame avant la lecture sous microscope .

Liste des abréviations

AINS : Anti inflammatoire non stéroïdien

CCMH : Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine

CVO : Crise vaso-occlusive

EDTA : acide éthylène-diamino-tétraacétique

EPH : Électrophorèse d'Hémoglobine

G/L : Giga par litre

G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GR : Globules Rouges

Hb : Hémoglobine

HbF : Hémoglobine fœtale

HbS : Hémoglobine S

IFCC : Fédération Internationale de la Chimie Clinique .

IgM : Immunoglobuline M

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

J : jour

Lys : Lysine

M/ μ l : million par microlitre

NFS : Numération Formule Sanguine

NGSP : Programme de Standardisation des Glycohémoglobine Nationale

PEC : Prise en charge

SDM : Syndromes Drépanocytaires Majeurs

TCMH : Teneur Moyenne en Hémoglobine

VGM : Volume globulaire moyen

Introduction

Avec plus de 300 000 naissances d'individus affectés par an, les anomalies qualitatives et quantitatives de l'hémoglobine figurent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Historiquement limitées à certaines régions du globe (Afrique et Asie principalement), elles se sont rapidement étendues aux pays occidentaux. C'est en Afrique que le nombre des malades est le plus élevé. 200 000 nouveaux cas sont détectés chaque année. (**Aguilar et al., 2010**). Au Maghreb on compte 12 000 malades, et on recense environ 400 cas parmi les nourrissons chaque année (**OMS, 2011**).

Un diagnostic précoce de certaines de ces anomalies permet une prise en charge précoce et une amélioration considérable de la qualité de vie des patients. Différentes techniques d'étude de l'hémoglobine ont été développées dans le passé, telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin et l'électrophorèse en gel d'agarose à pH acide. Cependant, en raison du manque de sensibilité de ces dernières, d'autres techniques ont été mises au point pour le diagnostic des anomalies de l'hémoglobine. Ainsi, la chromatographie liquide de haute performance a contribué à l'identification plus rapide d'un grand nombre de variants de l'hémoglobine et à une quantification plus précise de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F. (**Keren et al., 2008**). Plus récemment, au début des années 2000, une méthode automatisée d'électrophorèse capillaire de zone a été développée pour le diagnostic des hémoglobinopathies. En effet, le système Capillarys, initialement conçu pour l'électrophorèse capillaire, permet désormais la recherche des anomalies de l'hémoglobine (**Guis et al. 2013**).

L'objectif de notre travail consiste à rechercher certaines anomalies de l'hémoglobine les plus fréquentes dans la population dans les régions de ALGER et BLIDA , à travers une petite recherche épidémiologique dans l'archive de dossiers de cette maladie au niveau du service d' Hématologie de Biogroupe , pendant la période du janvier 2017 jusqu'au mois de mai 2017, et la réalisation de certains tests biologiques sur des échantillons frais.

Dans la première partie de ce travail, nous présentons un bref rappel sur l'hémoglobine, les hémoglobinopathies, ainsi que la drépanocytose et son diagnostic. La seconde partie rapporte les techniques utilisées, et en fin les résultats obtenus avec son discussion.