

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ DE 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 :
Master II en génétique physiologie

Thème :

**Dépistage des hémoglobinopathies lors du dosage de l'hémoglobine glyquée
par la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC)
dans la région de Blida**

Présenté et soutenu publiquement le 18 décembre 2014

Par :

Mme : KEMMANE Safia

Devant le jury composé de :

Mme. AISSANI.R	MAA (UB 1)	Présidente de jury
Mme. HERKAT.S	MAA (UB 1)	Examinatrice
Mme. GUESSAIBIA.N	MCB (UB 1)	Promotrice
Mr. BENHELLAL. A	MCB (UB 1)	Co- Promoteur

Dédicaces

À L'ÉTERNEL NOTRE DIEU

Pour ce souffle de vie que Tu m'as donné et pour m'avoir permis d'en arriver jusque-là et de me permettre de m'en aller par-delà.

A ceux pour qui j'ai une grande gratitude et reconnaissance, pour l'amour et la patience qu'ils m'ont donnés afin que je sois là où je suis. A ceux qui n'ont jamais cessé de me soutenir, de veiller sur moi durant toute la période de mes études.

Pour l'amour qu'ils me portent, pour toutes les peines et les sacrifices qu'ils se sont portés.

À

*Ma très chère maman et mon très cher père
Que ce travail soit l'expression de mon attachement, de mon dévouement et de mon grand amour.*

À

*Mon mari,
Pour ses conseils, ses encouragements, sa gentillesse et pour nous avoir guidés ainsi que pour tout le temps qu'il m'a consacré.*

A

Ma petite fille ISRAA

À

Mes grandes mères, ma sœur RAHIL et mes frères ALI, MOUHAMMED et AYOUB

*En signe de mon profond attachement et de ma profonde tendresse.
Je vous souhaite longue vie, prospérité et réussite.*

À

*Mes oncles et tantes
Merci pour vos prières et vos encouragements.*

À mes cousins et cousines

Je vous adore.

Remerciements

Louange à Dieu le clément, le miséricordieux, qui m'a donné le courage et la patience de mener à bien ce travail et pour sa grâce infinie pour moi

*Je tiens à adresser ma profonde gratitude et respects à :
Le responsable de stage : **Dr BENHELLAL A,**
Pour sa générosité, de nous avoir accepté au sein de son laboratoire,
pour réaliser mon projet de fin d'étude.*

***Mr MEDANE N,**
Pour ses conseils, ses encouragements, sa gentillesse et pour nous avoir guidés ainsi que pour tout le temps qu'il m'a consacré.*

*J'ai le plaisir d'adresser mes profondes gratitude et respects à :
Mme GUESSAIBIA,
Pour sa générosité, ses encouragements infatigables, ses directives précieuses, sa patience, ses apports scientifiques qui étaient d'une grande aide pour l'élaboration de ce mémoire.*

***Mr MOHAMED SAÏD R** chef d'option génétique et physiologie,
Pour sa qualité d'enseignant et pour l'esprit et la curiosité scientifiques qu'il a développés en nous.*

***Mes enseignants** du département de biologie,
Pour la qualité de leur enseignement et leur disponibilité, leurs encouragements et leurs conseils*

*Je remercie très sincèrement, les membres de jury madame la présidente de jury **AISSANI.R** et madame l'examinatrice **HERKAT.S** d'avoir bien voulu accepter examiner ce travail.*

*À Tout notre entourage, qui nous a permis d'avancer tous les jours.
Et à toute personne ayant contribué à la réussite de ce travail.
À Tous mes professeurs durant notre cursus universitaire.*

A tous mes amis et collègues pour leur soutien moral et leur encouragement, merci d'être mes amis !

A tous ceux qui je suis chers.

Merci à tous et à toutes

Résumé

Les hémoglobinopathies sont très souvent responsables d'anémies hémolytiques et représentent la catégorie la plus fréquente des troubles héréditaires cliniquement significatives à l'état homozygote, et leur transmission se fait selon le mode autosomique récessif.

L'hémoglobine glyquée est considérée comme étant un des paramètres le plus objectif du contrôle glycémique.

Afin d'effectuer un dépistage biologique des hémoglobinopathies chez la population diabétique de la région de Blida, (la détection des anomalies de l'hémoglobine est fortuite lors du dosage de l'hémoglobine glyquée HbA1c) ; notre étude a été réalisée sur 1150 patients diabétiques , tous les cas ont bénéficié d'un test biochimique tel que la chromatographie liquide a haute performance (HPLC) en échange d'ions par variant II BIO-RAD cette technique permet de séparer différentes hémoglobines normale et anormale, et d'un autre test hématologique tel que l'hémogramme (numération des hématies, VGM et TCMH, le taux de l'hémoglobine...). Il s'ensuit une enquête génétique pour recherche les hémoglobinopathies au sein d'une famille.

Les résultats obtenus ont montré : 20 cas d'hémoglobinopathies ont été trouvés sur 1150 cas étudiés. Les cas de drépanocytose héréditaire représentent l'anomalie la plus fréquente (hétérozygote HbS 35%) puis (l'hétérozygote HbC 25% et l'hétérozygote HbE ou HbD 25%), ensuite (l'hétérozygote inconnu X 10%), et enfin (le double hétérozygote C/E ou C/D 5%).

L'intérêt de l'étude de ces anomalies est le dépistage des porteurs et la prévention d'hémoglobinopathies, à la recherche de cas familiaux, et développer, à terme, un conseil génétique.

Mots clés :

Hémoglobinopathies, hémoglobine glyquée, chromatographie liquide a haute performance, analyseur Variant II de Bio-Rad.

Summary

The hémoglobinopathies are very often responsible of hemolytic anemia and represent the most frequent category of the hereditary disorders clinically significant to the state homozygote; their transmission is done according to the recessive autosomic mode.

Glyquée hemoglobin is considerate as one of the most objective parameter to control the glycemia.

In order to sexeaite a biological detection of hémoglobinopathies in diabetic population in Blida, (the detection of hemoglobin anomaly is accidental during the dosage of glycated hemoglobin HbA1c); our study was carried out on 1150 diabetic patients, all cases profited of biochemical test such as the high performance liquid chromatography (HPLC) in exchange of ions by variant II BIO-RAD this technique makes it possible to separate various normal and abnormal hemoglobins, and another hematologic test such as the hemogramme (numeration of red blood corpuscles, VGM and TCMH, the rate of hemoglobin...). It followed by a genetic investigation to research hémoglobinopathies inside a family.

The obtained results showed: 20 cases of hémoglobinopathies were found on 1150 studied cases. The hereditary cases of drépanocytose represent the most frequent anomaly (heterozygote HbS 35%) then (the heterozygote HbC 25% and the heterozygote HbE or HbD 25%), then (the heterozygote unknown X 10%), and finally (the double heterozygote C/E or C/D 5%).

The aim of the anomaly's study is the detection of the carriers and the prevention of hémoglobinopathies, in the search of family cases, and to provide, in the long term, a genetic council.

Key words:

Hémoglobinopathies, the glycated hemoglobin, high performance liquid chromatography, analyzer Variant II of Bio-Rad, diabetes.

ملخص

امراض خضاب الدم في كثير من الأحيان مسؤولة عن فقر دم انحلالي وتمثل الفئة الأكثر شيوعا في الاضطرابات الوراثية الخطيرة في حالة اللواقح المتماثلة ، ويكون انتقالها حسب صيغة التنحي على الصبغيات الجسمية. يعتبر الهيموغلوبين السكري واحدا من احد المعلمات الأكثر موضوعية في مراقبة نسبة السكر في الدم. من أجل إجراء الفحص البيولوجي لأمراض خضاب الدم عند فئة مرضى السكري في منطقة البليدة (الكشف عن امراض خضاب الدم بمحض الصدفة و هذا عند معايرة نسبة الهيموغلوبين السكري HbA1c)؛ وقد أجريت الدراسة على 1150 مريض يعانون من السكري وخضعت جميع الحالات لاختبار الكيمياء الحيوية (HPLC) متبادل الأيونات من خلال هذه التقنية تستخدم لفصل مختلف انواع الهيموغلوبين الطبيعي والغير طبيعي واختبار اخر هو فحص الدم (عدد كريات الدم الحمراء، ونسبة الهيموغلوبين ...). يجب إجراء تحقيق وراثي للبحث عن امراض خضاب الدم داخل الأسرة الواحدة. أظهرت النتائج المتحصل عليها : 20 حالة من امراض خضاب الدم وجدت في 1150 حالة مدروسة. حالات فقر الدم المنجلي الوراثي تمثل النسبة الأكثر شيوعا (HbS مختلف اللواقح 35%) ثم (HbC مختلف اللواقح 25% Hb E أو HbD مختلف اللواقح 25%)، ثم (مختلف اللواقح المجهول 10%)، وأخيرا (مختلف اللواقح المزدوج C / E أو 5C / D%). الهدف من دراسة هذه المفارقات هو كشف الأشخاص الحاملين للمرض و الوقاية من امراض خضاب الدم بالبحث عن الحالات العائلية وتقديم المشورة الوراثية.

الكلمات الدالة:

امراض خضاب الدم ، الهيموغلوبين السكري (HPLC) ، محلل Variant II de Bio-Rad .

Liste des abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNase1 : Acide désoxyribonucléase 1.

ALA : Acide delta Amino Lévulinique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

CDM: Clinical Data Management System.

Cl : Clore.

DPG: Di-Phosphoglyceraldehyde.

EDTA : Ethylène-Diamine-Tétra-Acétate.

EMG : Exponentially Modified Gaussian.

FNS : La formule Numération Sanguine.

GB : Globule Blanc.

GR : Globule Rouge.

Hb : Hémoglobine.

HbA: Hémoglobine adulte.

HbA1c : Hémoglobine glyquée.

HbF: Hémoglobine Feotale.

Hb S: Hémoglobine drépanocytaire.

HPLC : Chromatographie Liquide a Haute Performance.

IVS : Intervening sequences.

K : Potassium.

LCR: Locus Control Region.

μL : Microlitre.

mL : Millilitre.

NGSP : National Glycohemoglobin Standardization Program.

Ph : Potentiel d'hydrogène.

R: Relaxée.

SDM : Syndromes Drépanocytaires Majeurs.

T : Tendue.

TCMH : Teneur Corpusculaire Moyen en Hémoglobine.

VCS: VARIANT II Chromatographic Station

VGM : Volume Globulaire Moyen.

VSS: VARIANT II Sampling Station

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. physiologie de l'hémoglobine.....	3
1.1. Structure de l'hémoglobine.....	3
1.1.1. L'hème.....	4
1.1.2. La globine.....	4
1.2. La biosynthèse de l'hémoglobine.....	5
1.3. La fonction de l'hémoglobine.....	6
1.4. Les différents types de l'hémoglobine.....	6
1.5. Aspect génétique.....	8
1.5.1. Les gènes de l'hémoglobine.....	8
1.5.1.1. La famille des gènes des chaînes α - globine.....	9
1.5.1.2. La famille des gènes des chaînes β -globine.....	9
1.6. Dégradation de l'hémoglobine.....	10
2. La physiopathologie de l'hémoglobine.....	10
2.1. Les anomalies qualitatives.....	10
2.1.1. L'hémoglobinose S ou drépanocytose.....	10
2.1.1.1. Présentation de la drépanocytose.....	11
2.1.1.2. Génétique et physiopathologie de la drépanocytose.....	11
2.1.1.3. Les caractéristiques cliniques.....	13
2.1.2. L'hémoglobinose C.....	14
2.1.3. L'hémoglobinose E.....	14
2.1.4. L'hémoglobinose D.....	14
2.1.5. L'hémoglobinose O.....	15
2.2. Les anomalies quantitatives.....	15
2.2.1. Les β -thalassémies.....	15
2.2.1.1. β thalassémie homozygote.....	15
2.2.1.2. β thalassémie hétérozygote.....	15
2.2.1.3. β thalassémie intermédiaire.....	16
2.2.1.4. Mode de transmission de β -thalassémie.....	16
2.2.2. Les α -thalassémies.....	16
3. Diagnostic biologique d'une anomalie de l'hémoglobine	17

4.	Les techniques d'étude de l'hémoglobine.....	17
4.1.	La chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	17
4.2.	L'électrophorèse.....	18
4.2.1.	L'électrophorèse de zone à pH alcalin.....	18
4.2.2.	L'électrophorèse capillaire.....	18
4.2.3.	Focalisation isoélectrique sur gel d'agarose en couche mince.....	19
4.3.	La spectrophotométrie de masse.....	19
5.	Le diabète.....	19
5.1.	Définition du diabète.....	19
5.2.	L'hémoglobine glyquée (HbA1c).....	20

Chapitre II : Matériel et méthodes

1.	Présentation d'étude.....	21
1.1.	Cadre d'étude.....	21
1.2.	type d'étude.....	21
1.3	Population cible.....	21
2.	Le paramètre biochimique : la chromatographie liquide a haute performance (HPLC) par variant II TM BIO-RAD	21
2.1.	Le prélèvement sanguin.....	21
2.2.	La technique HPLC.....	22
2.3.	Appareillage.....	22
2.4.	Les programmes utilisés.....	23
2.5.	Les réactifs du Programme de l'hémoglobine A1c du VARIANT II.....	23
3.	Le paramètre hématologique.....	24
3.1.	Technique de FNS (Formule Numération Sanguin).....	24
4.	L'enquête génétique.....	24
5.	Analyses statistiques.....	25

Chapitre III : Résultats et discussion

1.	Résultat du test hématologique.....	26
2.	Etude des profils chromatographique des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies.....	26
2.1.	L'hémoglobine normale (A/A).....	26
2.2.	Drépanocytoses hétérozygotes (A/S).....	28
2.3.	Hémoglobinose C (hétérozygote) (A/C).....	29

2.4.	Hémoglobinosse inconnu (hétérozygote) (A/X).....	31
2.5	L'association E ou D avec C (E/C) ou (D/C).....	32
2.6.	Hémoglobinosse E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E).....	34
3.	Résultat de l'enquête génétique.....	35
3.1.	Questionnaire sur les antécédents familiaux.....	35
3.2.	L'arbre généalogique.....	36
3.3.	Mode de transmission.....	36
3.4.	Le risque de transmission.....	36
4.	L'étude statistique.....	37
4.1.	La répartition des anomalies selon la population.....	37
4.2.	Répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies.....	38
4.3.	Répartition de la population selon l'âge et le sexe des sujets.....	40
4.3.1.	Selon l'âge.....	40
4.3.2.	Selon le sexe.....	42

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux :

Tableau I :	Les différents types d'hémoglobine normale en fonction du stade de la vie.....	08
Tableau II :	Sites de glycation de l'HbA.....	20
Tableau III :	tableau chromatographiques d'une hémoglobine normale.....	26
Tableau IV:	tableau chromatographiques d'une drépanocytose hétérozygote (A/S).....	28
Tableau V:	tableau chromatographiques d'une Hémoglobinosé C (hétérozygote) (A/C).....	30
Tableau VI:	tableau chromatographiques d'une Hémoglobinosé inconnu (hétérozygote) (A/X).....	31
Tableau VII:	tableau chromatographiques de l'association E ou D avec C (E/C) ou (D/C).....	32
Tableau VIII:	tableau chromatographiques d'une Hémoglobinosé E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E).....	34
Tableau IX:	Répartition des anomalies selon la population.....	37
Tableau X:	Répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies.....	39
Tableau XI:	Répartition de la population selon l'âge.....	40
Tableau XII:	Répartition de la population selon le sexe.....	42

Liste des figures

Figure 01 :	Schéma de la molécule complète d'hémoglobine.....	3
Figure 02 :	Structure de l'hème.....	4
Figure 03 :	Modification de la conformation de l'hémoglobine après oxygénation.....	5
Figure 04 :	courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine.....	6
Figure 05 :	(a) ; les tétramères d'hémoglobine au cours du développement embryonnaire, foétale, et adulte. (b) ; la synthèse de la chaîne de globine au cours de développement.....	7
Figure 06 :	structure des gènes de globine ; les carrés noirs correspondent aux exons. Les carrés hachurés sont les séquences non traduites et les carrés blancs les introns (IVS).....	8
Figure 07 :	Structure et organisation des deux familles de gènes-globine.....	10
Figure 08 :	Frottis sanguin d'un sujet drépanocytaire.....	11
Figure 09 :	Schéma physiopathologique de la drépanocytose.....	12
Figure 10 :	Le graphe chromatographiques d'une hémoglobine normale.....	27
Figure 11 :	Le graphe chromatographiques d'une drépanocytose hétérozygote (A/S).....	28
Figure 12 :	Le graphe chromatographiques d'une Hémoglobinose C (hétérozygote) (A/C).....	30
Figure 13 :	Le graphe chromatographiques d'une Hémoglobinose inconnu (hétérozygote) (A/X).....	31
Figure 14 :	Le graphe chromatographiques de l'association E ou D avec C (E/C) ou (D/C).....	33
Figure 15 :	Le graphe chromatographiques d'une Hémoglobinose E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E).....	34
Figure 16 .:	L'arbre généalogique d'une famille hétérozygote A/E ou A/D.....	36
Figure 17 :	pourcentage des hémoglobinopathies par rapport à l'Hb normale.....	38
Figure 18 :	les pourcentages des anomalies selon le totale des hémoglobinopathies.....	40
Figure 19 :	Répartition de la population selon l'âge.....	41
Figure 20 :	Répartition de la population selon le sexe.....	43

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

Introduction

Les hémoglobinopathies sont le plus souvent responsables d'anémies hémolytiques. Les thalassémies et les hémoglobines anormales, dont la plus fréquente est la drépanocytose, sont endémiques dans certaines populations (origine africaine, antillaise, méditerranéenne, asiatique), mais du fait des mouvements de populations elles sont de plus en plus souvent rencontrées (Galacteros et *al.*, 1996).

Les hémoglobinopathies représentent la catégorie la plus fréquente des troubles héréditaires cliniquement significatives, provoquant un énorme fardeau sur la santé publique. Leur transmission se fait selon le mode autosomique récessif, mais elles représentent une variation significative de la sévérité clinique. Il est maintenant évident que le patrimoine génétique des individus touchés donne une partie importante de la variation dans le phénotype clinique (Djamaa, 2012).

L'anomalie hémoglobinique est l'apparition d'une hémoglobine pathologique qui se distingue des hémoglobines normales par une modification structurale affectant certaines chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine. Les anomalies les plus fréquentes affectent les chaînes polypeptidiques β , plus rarement les chaînes α , exceptionnellement les chaînes γ ou δ . La modification la plus habituelle est la substitution d'un acide aminé de la chaîne par un autre acide aminé. C'est ainsi que dans les trois hémoglobinopathies à diffusion mondiale, la drépanocytose, l'hémoglobinose C et l'hémoglobinose E, l'anomalie structurale est la substitution d'un seul acide aminé des chaînes β de l'hémoglobine A par un autre acide aminé (Kafando et *al.*, 2008).

L'hémoglobine glyquée, et plus particulièrement la fraction A1c, est reconnue depuis une vingtaine d'années comme le paramètre le plus objectif du contrôle glycémique à moyen terme. En effet, l'hémoglobine A1c, fraction glyquée de l'hémoglobine, est le résultat d'une réaction de fixation non enzymatique, lente et irréversible de glucose sur au moins une extrémité N-terminale (résidu valine) des chaînes beta de l'hémoglobine. Elle s'accumule dans les hématies au cours de leur vie ; sa valeur constitue donc un reflet de la glycémie pendant les 2 à 3 mois qui précèdent le prélèvement.

L'HbA1c est dosée au laboratoire de biochimie selon une technique de chromatographie liquide haute pression (CLHP) en échange d'ions. Ce dosage, fréquemment prescrit, entraîne un recrutement important et permet, de ce fait, de mettre en évidence fortuitement des anomalies de l'hémoglobine (Lemée et *al.*,1999).

Les objectifs de notre travail :

La recherche de certaines anomalies de l'hémoglobine les plus fréquentes par HPLC chez les patients diabétiques dans la population de la région de Blida.

La recherche de la prévalence des hémoglobinopathies dans la région de Blida par rapport à la population étudiée.

Suivi d'une enquête génétique pour rechercher les anomalies de l'hémoglobine au sein d'une famille.

1. Physiologie de l'hémoglobine

1.1. Structure de l'hémoglobine :

Les hémoglobines possèdent quatre protomères (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. Les différences entre hémoglobines portent sur la séquence des chaînes peptidiques, alors que l'hème est identique dans toutes (Crossley et Orkin, 1993). Il existe chez l'homme quatre variétés physiologiques d'hémoglobines et de nombreuses formes pathologiques n'ayant pas toutes d'expressions cliniques. On trouve chez l'adulte un type prédominant, l'hémoglobine A ou A0 (97 à 98%), un type mineur, l'hémoglobine A2, représentant 2 à 3 % de l'hémoglobine totale et l'hémoglobine fœtale est appelée hémoglobine F (Donzeet et *al.*, 1995).

Toutes les hémoglobines renferment 0.34% de fer impliquant une masse moléculaire de 16500 daltons par atome de fer. La masse moléculaire de l'hémoglobine est d'environ 67000 daltons (Vanbourdolleet et *al.*, 2007) (Figure 1).

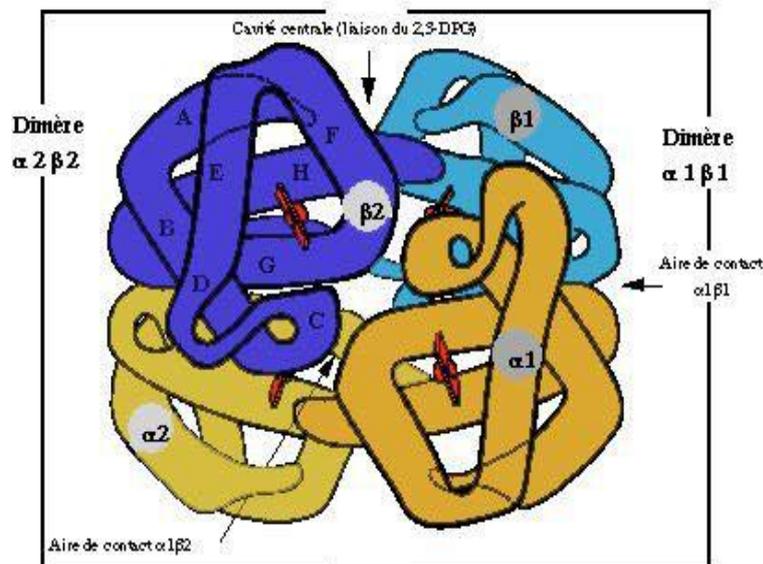


Figure 1 : Schéma de la molécule complète d'hémoglobine (Serge, 2004).

- Tétramère : (2 α 2 β).
- Un hème
- Un atome de fer ferreux

1.1.1. L'hème :

C'est une molécule associant un atome de fer à l'état ferreux et une protoporphyrine. La protoporphyrine est un anneau tétra pyrrolique comportant des radicaux fixés de manière asymétrique : quatre radicaux méthyles (-CH₃) en positions 1,3, 5, 8 ; deux radicaux propanoïques (-CH₂ - CH₂ - COOH) en 6 et 7 (Figure1). Le fer est relié par quatre valences à l'azote des noyaux pyrroles. La synthèse de l'hème est réalisée à partir de la glycine et de l'acide succinique. La combinaison d'une molécule de glycine et d'une molécule d'acide succinique aboutit à la formation d'une molécule d'acide delta-amino-lévulinique (ALA) sous l'action d'une enzyme, la ALA synthétase, en présence de vitamine B6. La condensation de deux molécules cyclique pentagonale, le porphobilinogène. Quatre molécules de porphobilinogène s'unissent pour constituer l'anneau de porphyrine sur lequel l'atome de fer sera fixé sous l'action d'une enzyme, l'hème-synthétase (Orsini et Vovan, 1982).

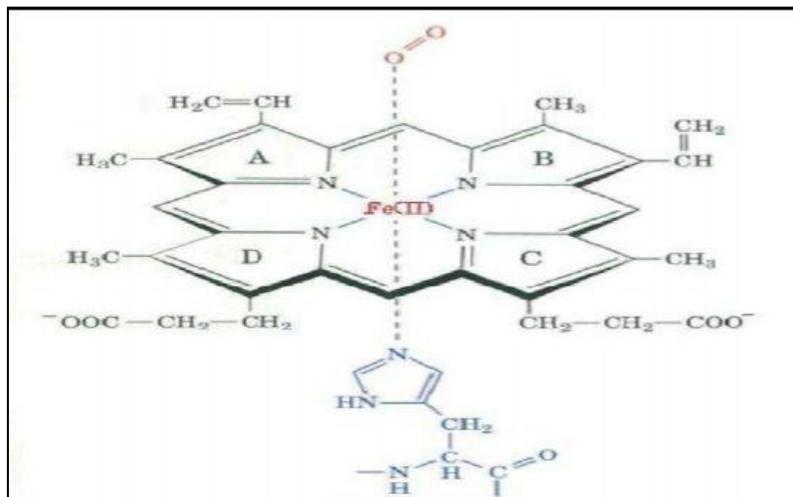


Figure 02 : Structure de l'hème (Diakité, 2005).

1.1.2. La globine :

C'est un ensemble de quatre chaînes polypeptidiques avec pour chaque molécule de l'Hb quatre chaînes semblables deux à deux sont appelées α et β pour l'HbA. (Globine de l'HbA=2 α 2 β) (Hargrove et *al.*, 1997).

Chaque chaîne est un polypeptide c'est-à-dire qu'elle est constituée d'acide aminé (146 pour la chaîne β et 141 pour la chaîne α) réunis par des liaisons peptidiques.

La chaîne ainsi formée 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 hélices E et F où s'insère une molécule d'hème (Rivière et Sadelain, 1997).

Ces segments sont séparés par de courts segments non hélicoïdaux au niveau des quels se font des coudures pour donner à chaque chaîne sa forme définitive. Des liaisons de nature diverses entre acides aminés mise en évidence en contact par les courbures de la molécule la stabilisent (structure tertiaire). Enfin la réunion de 02 chaînes α et de 02 chaînes β forme une molécule symétrique globulaire (Bernard et *al.*, 1998).

La forme désoxygénée de l'hémoglobine présente une conformation T (tendue), la forme oxygénée une conformation R (relaxée) (Bachir et Beauvais, 1992).

L'architecture de cette protéine globulaire compacte avec des dépressions, interfaces entre domaines et crevasses lui permet d'assurer ces fonctions dynamiques (Zack, 1992; Vanbourdolle, 2007) (Figure 03).

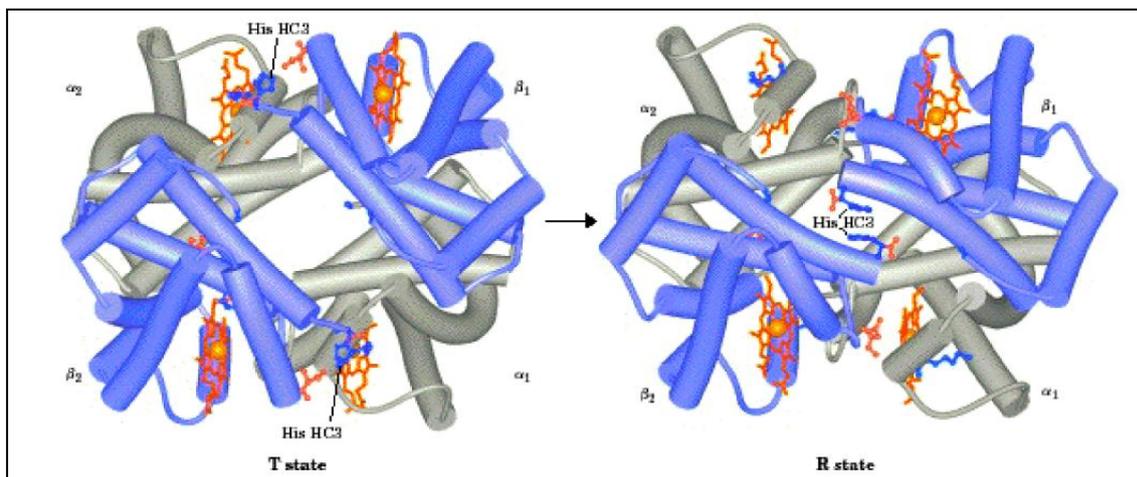


Figure 03 : Modification de la conformation de l'hémoglobine après oxygénation.

(Lehninger, 2000)

1.2. La biosynthèse de l'hémoglobine :

Union de l'hème et la globine : se fait :

- Par une liaison de coordination entre l'histidine F8 de la chaîne α ou β de la globine et le fer de l'hème.
- Par une série d'interactions faibles entre le noyau tétrapyrolique et les parois de la poche de l'hème.

1.3. Fonction de l'hémoglobine :

Le rôle essentiel de l'hémoglobine est le transport de l'oxygène des poumons aux tissus et de l'anhydride carbonique des tissus aux poumons. Au niveau des poumons, l'oxygène se fixe sur l'hémoglobine désoxygénée pour former l'oxyhémoglobine. La fixation réversible de l'oxygène se fait à raison de quatre molécules d'oxygène par molécule d'hémoglobine selon une courbe d'aspect sigmoïde caractéristique appelée courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (Figure 04) (Auclerc et Khayat, 1990).

Deux paramètres sont particulièrement importants dans l'étude de l'oxygénation : l'affinité pour l'oxygène et le coefficient d'interaction (Orsini et Vovan, 1982).

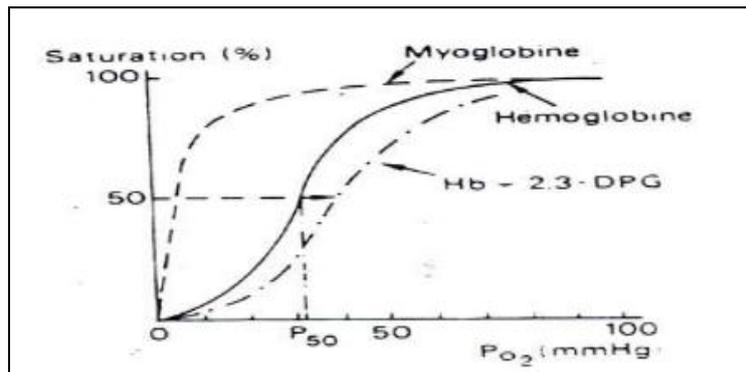


Figure 04 : courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine

- ___ Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine
- Courbe de dissociation de l'oxymyoglobine
- .-.- Le 2,3 - DPG déplace la courbe vers la droite

(Orsini et Vovan, 1982)

Chaque chaîne de globine possède une poche à hème qui permet à l'hémoglobine d'assurer sa fonction oxyphorique. En effet, chaque chaîne s'enroule sur elle-même en aménageant un repli central dans lequel se loge une molécule d'hème. L'hème s'arrime à la globine, et fixe un atome de fer, qui lui-même fixe une molécule d'oxygène. Ainsi, chaque molécule d'hémoglobine fixe 4 molécules d'oxygène et constitue l'oxyhémoglobine.

1.4. Les différents types de l'hémoglobine :

Les monomères de l'hémoglobine sont de deux types assemblés par l'intermédiaire de liaison de faible énergie: deux chaîne α (type α : ζ et α -globine) constituées chacune de 141 acides aminés et deux chaînes non α (type β : ϵ , γ , δ , et β -globine) composées de 146 acides aminés,

Plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie. Ces hémoglobines se distinguent par la nature des sous-unités qui les constituent. Durant la vie embryonnaire, deux chaînes de la famille α coexistent : ζ , qui apparaît la première, puis α . De même, il existe deux chaînes de type β : ϵ , spécifique à cette période initiale de la vie et les chaînes γ (ou fœtales) (figure 05). Ces diverses sous-unités permettent de réaliser les trois hémoglobines de l'embryon, l'Hb Gower 1 (ζ_2, ϵ_2), l'Hb Gower 2 (α_2, ϵ_2) et l'Hb Portland (ζ_2, γ_2) (Gale RE et al., 1979; Kamuzora H et al., 1974). L'hémoglobine fœtale (Hb F) de structure (α_2, γ_2) est détectable à partir de la 5^{ème} semaine de vie intra-utérine. Parallèlement à cette modification de la nature des sous-unités de globine, il y a un changement du lieu où s'effectue l'érythropoïèse : le sac vitellin dans la vie embryonnaire puis le foie et la rate dans la vie fœtale et enfin la moelle osseuse chez l'adulte (Stamatoyannopoulos, 2000).

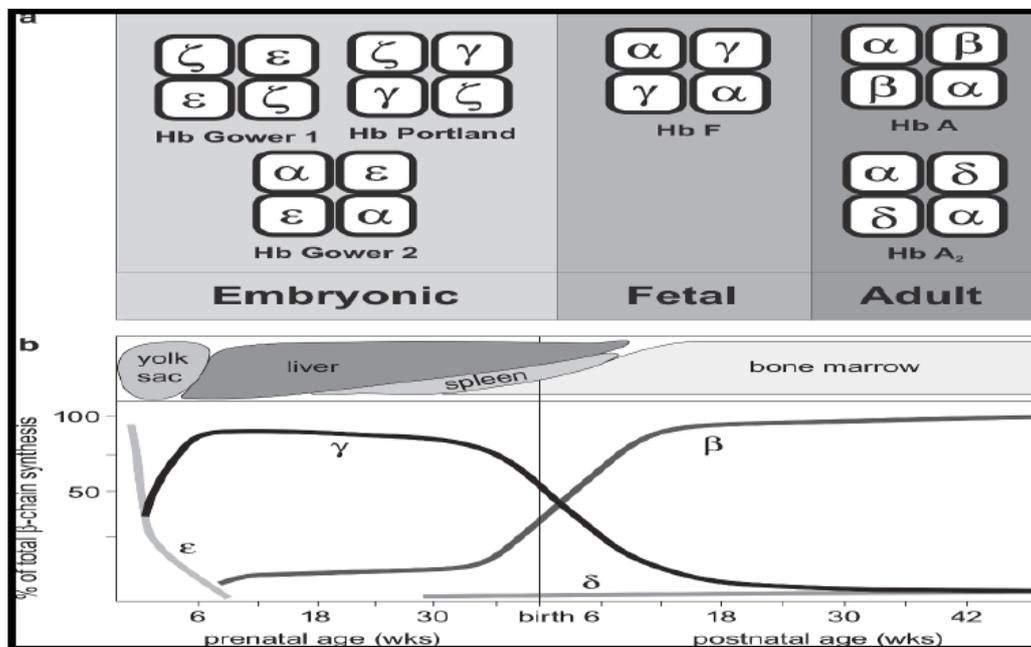


Figure 05: (a) ; les tétramères d'hémoglobine au cours du développement embryonnaire, fœtale, et adulte. (b) ; la synthèse de la chaîne de globine au cours de développement et les différents tissus qui contribuent à l'hématopoïèse aux différents stades du développement (Speicher et al., 2010).

Tableau I : Les différents types d'hémoglobine normale en fonction du stade de la vie. (Huret et Troussard, 2009)

Stade de la vie	Type d'hémoglobine
Embryon	Hémoglobine Gower 1 : $\zeta_2\varepsilon_2$ Hémoglobine Gower 2 : $\alpha_2\varepsilon_2$ Hémoglobine Portland : $\zeta_2\gamma_2$
Fœtus	Hémoglobine fœtale HbF : $\alpha_2\gamma_2$
A la naissance (sang de cordon)	HbF : $\alpha_2\gamma_2$; 75-80% HbA : $\alpha_2\beta_2$; 20-25%
Adulte (au-delà de deux ans)	Hémoglobine HbA : $\alpha_2\beta_2$: 97% Hémoglobine HbA ₂ : $\alpha_2\delta_2$: 2-3% Hémoglobine fœtale HbF : $\alpha_2\gamma_2$: <1%

1.5. Aspect génétique :

1.5.1. Les gènes de l'hémoglobine :

Les gènes de la globine humaine sont regroupés en familles multigéniques (cluster : « agrégat ») : le cluster α (ζ , α_2 , α_1) et le cluster β (ε , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β). Ces gènes sont organisés sur un même modèle à 3 exons et dérivent de duplications successives d'un ancêtre commun. L'ordre des gènes, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', au sein de chaque complexe, reflète l'ordre de leur expression séquentielle au cours de l'ontogénèse (Kazazian et Antonarakis, 1997).

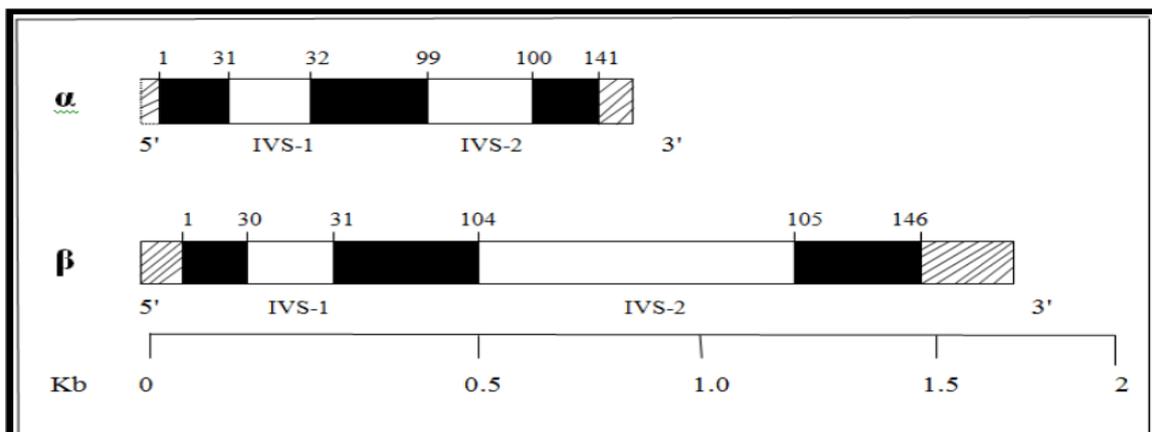


Figure 06 : structure des gènes de globine ; les carrés noirs correspondent aux exons. Les carrés hachurés sont les séquences non traduites et les carrés blancs les introns (IVS) (Djamaa, 2012).

1.5.1.1. La famille des gènes des chaînes α - globine :

Cette famille est localisée sur la partie distale du bras court du chromosome 16 (16p13.3) (Deisseroth et *al.*, 1977) elle s'étend sur 30 kb. Le gène ζ , le plus télomérique, est le premier exprimé durant l'embryogenèse. Le gène α -globine existe en deux exemplaires : $\alpha 1$ et $\alpha 2$ qui sont exprimés dès la vie fœtale et continueront à fonctionner durant la vie adulte. Les séquences exoniques des gènes $\alpha 2$ et $\alpha 1$ sont identiques, ainsi que celles de leur 1^{er} intron (IVS-I : Intervening sequences). Une région cis-régulatrice a été identifiée à 40 kb en amont de ζ nommée HS40, elle contrôle l'expression des gènes ζ et α . Le phénomène de la commutation des gènes (le switch), c'est-à-dire le passage de l'expression du gène ζ à celle des gènes α , au début de la vie fœtale, n'est pas encore clairement décrypté.

1.5.1.2. La famille des gènes des chaînes β -globine :

La famille des gènes des chaînes β -globines s'étend, elle, sur environ 50 kb à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 (11p15.5) (Deisseroth et *al.*, 1978 ; Lebo et *al.*, 1979 ; Fritsch et *al.*, 1980). Le gène ϵ , le plus proche en 5' du complexe, est le premier à être exprimé, durant la vie embryonnaire. Les gènes $G\gamma$ et $A\gamma$ s'expriment durant la vie fœtale. Leurs séquences exoniques sont identiques à une position près : le codon 136 (glycine pour la chaîne $G\gamma$ et alanine pour la chaîne $A\gamma$). Entre les paires $G\gamma / A\gamma$ et δ / β est localisé un pseudogène de type β ($\psi\beta$) (Figure 07). L'expression du gène β commence dès la vie fœtale et atteindra son plateau d'expression quelques mois après la naissance. Le gène δ , dont l'expression débute seulement après la naissance, est faiblement transcrit. Il n'intervient que pour 2 à 3% des tétramères (hémoglobine A2 : $\alpha 2\delta 2$). En amont du locus β -globine, cinq sites hypersensibles à l'ADNase I (HS1-5, numérotés de 3' à 5') constituent une zone régulatrice majeure : le LCR (Locus Control Region). Un autre site, a été identifié en aval (3'HS1). La commutation des gènes de la famille β , sous le contrôle des éléments du LCR entre autres, se fait en deux étapes : ϵ vers $G\gamma$ et $A\gamma$, au début de la vie fœtale, puis β et δ dans la période périnatale.

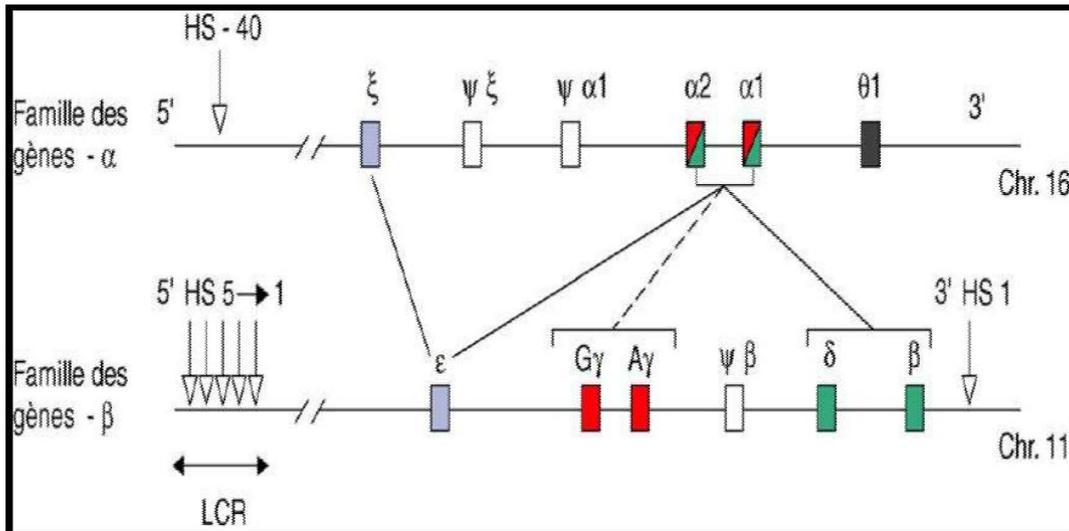


Figure 07 : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine (Labie et *al.*,2005)

1.6. Dégradation de l'hémoglobine

L'hémoglobine est dégradée dans la rate et le foie en bilirubine (porphyrine sans fer) de couleur verte, puis excrétée par la vésicule biliaire dans la bile. La bile se déverse dans l'intestin et la bilirubine est dégradée par des bactéries en biliverdine de couleur brune, qui donne sa couleur aux selles. La bilirubine est également évacuée dans les urines. Lorsque la bilirubine ne peut pas être excrétée (cas de certains cancers), sa concentration augmente dans le sang. Elle est alors essentiellement éliminée par les urines, ce qui provoque des urines foncées et des selles décolorées, presque blanches.

2. La physiopathologie de l'hémoglobine :

Les hémoglobinopathies se subdivisent en deux grands groupes.

2.1. Les anomalies qualitatives :

Les anomalies qualitatives ou les anomalies de structure sont la conséquence d'une modification de la séquence des acides aminés de la globine. Elles conduisent à une hémoglobine anormale appelée variant. Les anomalies les plus fréquentes affectent les chaînes β , plus rarement les chaînes α , exceptionnellement les chaînes gamma ou delta.

2.1.1. L'hémoglobinose S ou drépanocytose

2.1.1.1. Présentation de la drépanocytose :

La drépanocytose est une maladie génétique, transmise selon le mode autosomique récessif et est caractérisée par la présence d'hémoglobine S. Il s'agit d'une anémie hémolytique chronique provoquée par une mutation ponctuelle du gène de la globine entraînant une substitution de l'acide glutamique en position 6 sur la chaîne de la bêta globine par la valine. Ceci rend l'Hb insoluble sous sa forme désoxygénée. Les chaînes insolubles cristallisent dans les érythrocytes en provoquant une déformation de lame de faux (figure 08).

On distingue cliniquement:

- la forme hétérozygote ou trait drépanocytaire qui est typiquement asymptomatique sur le plan clinique;
- et les syndromes drépanocytaires majeurs (SDM) qui regroupent la forme homozygote SS et les hétérozygoties composites par association de l'hémoglobine S à d'autres hémoglobinopathies (SC, S β thalassémie, etc...).

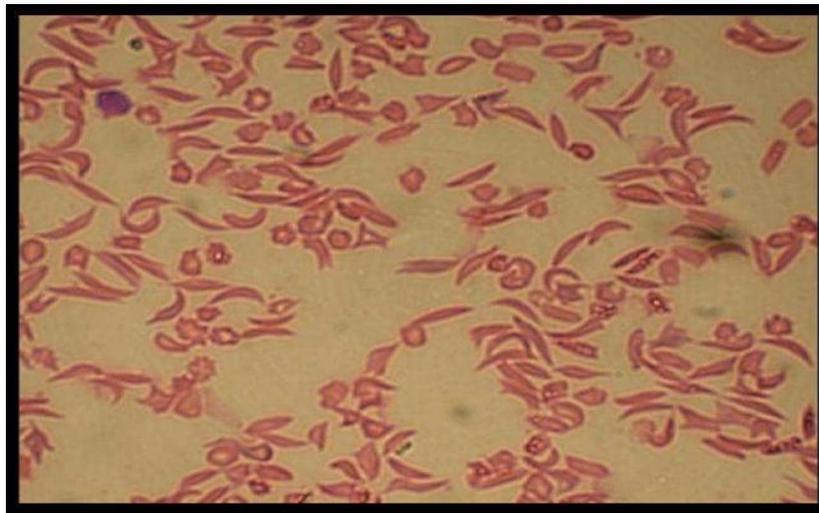


Figure 08 : Frottis sanguin d'un sujet drépanocytaire (Robert et *al.*, 2003).

2.1.1.2. Génétique et physiopathologie de la drépanocytose :

a. Mode de transmission :

La 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 sujets hétérozygotes (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 %.

b. Physiopathologie:

Première maladie moléculaire décrite en 1949, son étude a été entreprise par des abords multiples. Son mécanisme physiopathologique de base a été très précisément décrit, centré sur la polymérisation de l'Hb S désoxygénée et les déformations cellulaires subséquentes observées chez les homozygotes SS (figure 11) (Bunn, 1997). Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, la molécule d'Hb S subit un changement de conformation. Celui-ci permet à la valine β_6 d'établir des liaisons hydrophobes avec la chaîne β d'une autre molécule d'Hb, en particulier avec la phénylalanine β_{85} et la leucine β_{88} . Une seule des deux valines opère ce contact, de sorte que l'interaction β - β entraîne la formation d'un polymère qu'on a pu représenter comme l'enchaînement de deux rangées de molécules (figure 09).

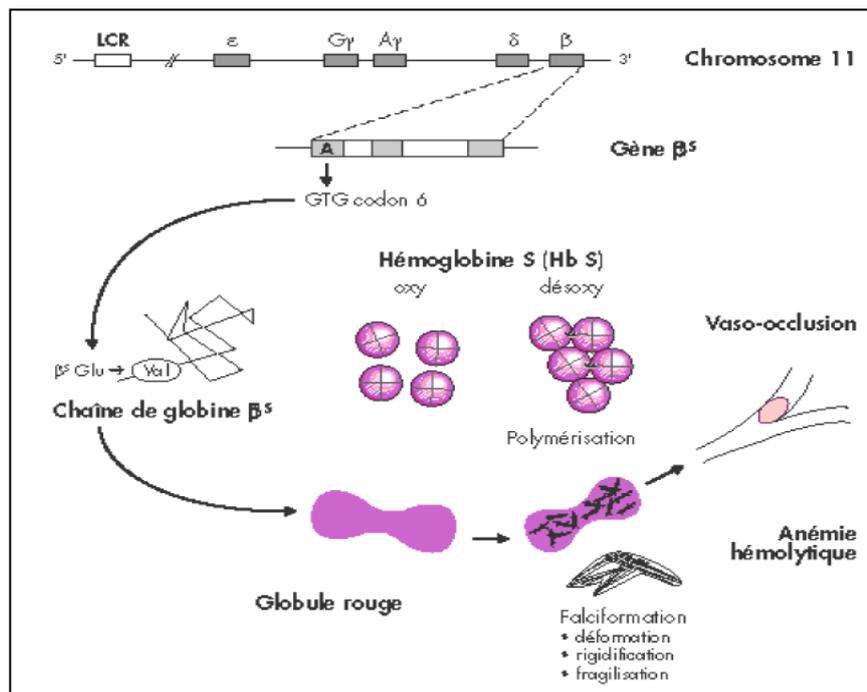


Figure 09 : Schéma physiopathologique de la drépanocytose. La polymérisation de l'Hb S dans sa forme désoxygénée est au centre du processus physiopathologique. Déformation, rigidification et fragilisation du globule rouge qui en résultent sont responsables de deux des grandes manifestations de la maladie : crise vaso-occlusive douloureuse et anémie hémolytique (Bunn, 1986)

Le processus met toujours un certain temps à s'amorcer (delay time), et ce délai est inversement proportionnel, à une puissance élevée, à la concentration intracellulaire de l'hémoglobine.

Ce phénomène de base entraîne une cascade d'autres anomalies qui participent au mécanisme physiopathologique. Une dérégulation de l'homéostasie des cations, avec activation des canaux ioniques, cotransport K/Cl et canal potassique dépendant du calcium, ou canal Gardos, entraîne la perte de potassium et une déshydratation cellulaire qui favorise la polymérisation de la désoxy-HbS. Il y a simultanément dénaturation de l'Hb, dont les hémichromes s'agglomèrent à la face interne de la membrane avec les protéines du cytosquelette, en particulier la bande 3. Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération de Fe³⁺, qui favorise l'existence d'un microenvironnement oxydant (Stuart et *al.*, 2004).

2.1.1.3. Les caractéristiques cliniques :

Tous les désordres de falciformation sont associés avec des caractéristiques cliniques similaires (Mehta et *al.*, 2003) :

- Anémie hémolytique : qui se traduit par une fatigue. Lorsque l'anémie est assez sévère, le malade peut avoir des difficultés à respirer (essoufflement) et une tachycardie. Parfois, les seuls signes visibles sont la pâleur, l'ictère, l'augmentation de la fatigue, les calculs biliaires, et une mauvaise croissance.
- Crises aplasiques consécutives à une infection par le parvovirus B19, ou à un manque en vitamine B9 (acide folique).
- Crise de séquestration viscérale provoquée par la déformation falciforme avec formation d'un pool d'érythrocytes dans le foie, la rate ou les poumons.
- Les crises douloureuses ou crises vaso-occlusives : qui sont dues à la « mauvaise » irrigation en sang de certains organes, se manifestent par des douleurs vives et brutales dans certaines parties du corps et peuvent, à la longue, entraîner la destruction de certains organes ou parties d'organes.
- Sensibilité accrue aux infections. La fonction splénique est réduite parce que l'infarctissement entraîne une auto-splénectomie dans les cas graves chez l'enfant.
- Les autres caractéristiques cliniques incluent les lithiases vésiculaires pigmentaires avec cholécystite, des ulcères de jambe chroniques, une nécrose

2.1.2. L'hémoglobinosse C :

HbC (Hb β :p.Glu6Lys)

C'est le deuxième variant de l'hémoglobine le plus fréquemment rencontré. Sa distribution géographique initiale a été celle du plateau voltaïque en Afrique de l'Ouest. Cette anomalie de l'hémoglobine est la conséquence d'une mutation unique ponctuelle du gène β globine entraînant la substitution de l'acide glutamine en position 6 par la Lysine, comme pour l'HbS - mais ne provoque pas la formation de polymères. En revanche, 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. L'intérêt clinique du diagnostic de l'HbC est essentiellement en rapport avec le diagnostic de SDM que constitue l'association hétérozygote composite β S / β C. (Couque et Demontalembert, 2013)

2.1.3. L'hémoglobinosse E :

HbE (Hb β :p.Glu26Lys)

Ce variant de l'hémoglobine est fréquent en Asie, tout particulièrement en Asie du Sud-Est, dans le sud de la Chine et au nord du souscontinent Indien. La mutation ponctuelle à l'origine de ce variant présente une double propriété : d'une part, elle est responsable d'une substitution faux sens touchant le codon 26 de la chaîne bêta et 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 une maturation anormale aux dépens de la production d'ARNm normal. La substitution n'affecte pas la fonction de l'hémoglobine, mais la diminution de l'ARNm normal conduit à un défaut de production et constitue donc un défaut bêta thalassémique. (Couque et Demontalembert, 2013)

2.1.4. L'hémoglobinosse D :

HbD Punjab (Hb β :p.Glu121Gln)

Cette hémoglobinopathie est asymptomatique à l'état hétérozygote ou homozygote. Son importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite β S / β D-Punjab constitue un SDM sévère, l'HbD Punjab favorisant les propriétés de polymérisation de l'HbS. (Couque et Demontalembert, 2013).

2.1.5. L'hémoglobinoses O :

HbO Arab (Hb β :p.Glu121Lys)

Tout comme pour l'HbD Punjab, cette hémoglobinopathie est asymptomatique à l'état hétérozygote ou homozygote. Son importance clinique tient au fait que l'hétérozygotie composite β^S/β^O -Arab constitue un SDM, l'HbO Arab favorisant les propriétés de polymérisation de l'HbS. Comme précédemment, le diagnostic de certitude chez un cas index ou dans un contexte de conseil génétique chez un couple à risque, nécessite le recours à un laboratoire de référence. (Couque et Demotalembert, 2013)

2.2. Les anomalies quantitatives (Les thalassémies) :

Les anomalies quantitatives ou les anomalies de synthèse ou thalassémies correspondent à une diminution ou absence de production des chaînes de globine (α , β , γ , δ , ϵ et ζ). Du point de vue de la santé publique, seulement les α et β thalassémies sont importantes (Weatherall et Clegg, 2001)

2.2.1. Les β -thalassémies :

Il est découvert en 1925 chez des Italiens fixés dans la ville de Détroit par le docteur Cooley (Orsini, Vovan, 1982). Il est la conséquence d'un défaut congénital de la synthèse des chaînes β sur le chromosome 11 (Ritter, Fattorusso, 2001). C'est une anémie chronique très sévère fréquente chez les sujets originaires porteurs du Bassin Méditerranéen, on sait maintenant que la β -thalassémie est aussi répandue dans tout le Moyen – Orient, le Sud et l'Est de l'Asie, l'Afrique et les Antilles. la β thalassémie est rare dans les populations originaires de l'Europe du Nord (Baruche et *al.*, 1995).

2.2.1.1. β thalassémie homozygote :

Thalassémie majeure ou thalassémie de Cooley. La forme homozygote de la thalassémie bêta, forme habituelle dans le Bassin Méditerranéen, se traduit par une anémie hémolytique grave, se développe progressivement dans les premières années de la vie (Domart et Bourneuf, 1981).

2.2.1.2. β thalassémie hétérozygote :

Thalassémie mineure ou maladie de Rietti Greppi– Micheli est plus fréquente et bénigne ;

elle comporte une polyglobulie microcytaire et hypochrome (Delamare, 1992). Il faut distinguer la thalassémie mineure, où tous les symptômes de la maladie de Cooley peuvent être retrouvés, mais très atténués. Quant à la thalassémie dite minime, elle réalise une forme cliniquement latente de la maladie, donc la forme hétérozygote ne se traduit pas, en règle générale, par une anémie (forme minime) (Domart, Bourneuf, 1981). L'anémie de la thalassémie mineure est moins marquée dans les populations noires que dans les populations méditerranéennes (Ferrier, 1980).

2.2.1.3. β thalassémie intermédiaire :

Elle représente 10 % de la β -thalassémie homozygote. Sa définition est clinique, correspondant à une forme atténuée de la maladie de Cooley. Cette maladie est tout simplement une thalassémie moins grave, où le patient peut vivre sans transfusions régulières. Certains patients sont totalement bien portants, d'autres, plus fragiles, sont légèrement malades. La thalassémie intermédiaire est en général due à l'association d'un gène thalassémique majeure et d'un gène thalassémique intermédiaire responsable d'une maladie moins graves que la thalassémie majeure (Orsini et Vovan, 1982).

2.2.1.4. Mode de transmission de β -thalassémie :

La β -thalassémie est transmise héréditairement, selon un mode intermédiaire entre la dominance et la récessivité. Les manifestations cliniques et hématologiques de la maladie sont très atténuées à l'état hétérozygote, sont considérablement renforcés à l'état homozygote pour donner lieu à une anémie hémolytique particulièrement grave(Orsini,1982). Un porteur hétérozygote marié avec un sujet sain, transmet l'anomalie à la moitié de ses descendants qui sont également porteurs hétérozygotes. Par contre dans un couple dont les deux membres sont porteurs 25% des enfants hériteront le gène à la fois de leur père et de leur mère et présentent les manifestations très graves de la maladie de Cooley 50% des enfants seront porteurs hétérozygotes et 25% seront entièrement sains (Perelman, 1977).

2.2.2. Les α -thalassémies :

Deux éléments physiologiques permettent de comprendre la pathologie de type alpha-thalassémique : d'une part, sur chaque allèle, il existe 2 gènes α (gène dupliqué), un individu normal possédant donc 4 copies de gènes α ; d'autre part, les gènes alpha sont normalement

exprimés dès la vie foetale. L'inactivation du gène alpha est responsable de la formation de tétramères g₄ (Hb Bart's), visibles uniquement en anté-et néonatal lorsque l'expression des gènes g est prédominante, et ensuite de la formation de tétramères b₄ (HbH) lorsque l'expression des gènes b devient majoritaire.

Ces tétramères sont solubles, inaptés à la transition allostérique et donc à la fonction oxyphorique, et responsables, non pas d'une érythropoïèse inefficace comme dans les bêta-thalassémies, mais d'une destruction périphérique de cellules matures. Pour chaque allèle, l'expression d'un seul gène a est une α -thalassémie et l'absence d'expression des 2 gènes est une α^0 -thalassémie. (Couque, Demotalembert. 2013)

3. Diagnostic biologique d'une anomalie de l'hémoglobine :

Une anomalie de l'hémoglobine peut être recherchée devant des signes clinico-biologiques, le plus souvent une anémie (par extension devant une pâleur, un ictère, une hépatosplénomégalie, une asthénie, un essoufflement), plus rarement une cyanose ou une polyglobulie (par extension devant des céphalées, des acouphènes, des vertiges). Elle peut aussi être recherchée en raison de la constatation d'éléments purement biologiques comme une hémolyse ou une microcytose. Elle peut enfin être demandée lors d'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 un contexte anesthésique, anténatal, pré-greffe... Enfin, il peut s'agir d'un test de confirmation d'un dépistage néonatal. (Couque et Demotalembert, 2013).

4. Les techniques d'étude de l'hémoglobine :

4.1. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) :

Principe :

Le programme l'hémoglobine A1c de VARIANT II utilise les principes de la chromatographie liquide d'échange ionique de haute performance (HPLC). Les échantillons sont automatiquement mélangés et dilués sur la station de prélèvement VARIANT II (VSS) et injectés dans la cartouche analytique, et sur la station chromatographiques VARIANT II (VCS) les pompes duelles fournissent un gradient programmé d'amortisseur, d'augmenter la concentration ionique, à la cartouche où des hémoglobines sont séparés ont basé sur leurs

interactions ioniques avec le matériel de cartouche. Les hémoglobines séparées traversent alors la cellule d'écoulement du filtre-photomètre, où des changements de l'absorbance à 415nm sont mesurés. Un filtre additionnel à 690nm corrige l'absorbance de fond. Le logiciel clinique de gestion des données (CDM) effectue la réduction des données brutes rassemblées de chaque analyse. Le calibrage à deux niveaux est employé pour l'ajustement des teneurs calculés en HB A1. Un rapport d'échantillon et un chromatogramme sont produits par CDM pour chaque échantillon. La crête A1 est ombragée. Ce secteur est calculé selon un algorithme gaussien exponentiellement (EMG) modifié qui exclut Alc labile et de la zone de crête de l'HB A1. (Sujishi, 2000).

4.2. L'électrophorèse :

4.2.1. L'électrophorèse de zone à pH alcalin :

L'électrophorèse à pH alcalin est réalisée soit sur gel d'acétate de cellulose, soit sur gel d'agar, ces deux types de support étant disponibles dans le commerce. Après migration, plusieurs bandes sont visualisées chez un adulte normal après coloration : une bande correspondant à l'Hb A très majoritaire (environ 97 %), une bande correspondant à l'Hb A 2 située plus près du dépôt et représentant 2 à 3 % de l'hémoglobine totale, une ou deux bandes très discrètes proches du dépôt et correspondant aux anhydrases carboniques érythrocytaires. Il est possible d'évaluer par densitométrie optique les différentes fractions de l'hémoglobine mais cette méthode de dosage manque de précision, notamment pour les bandes de faible intensité (Clarke et Higgins, 2000).

4.2.2. L'électrophorèse capillaire :

Est une technique d'électrophorèse liquide plus récemment développée pour l'étude de l'hémoglobine. 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-osmose (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.

Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, reproductible et quantitative, avec des tracés simples à interpréter. (Couque et De montalembert, 2013).

4.2.3. Focalisation isoélectrique sur gel d'agarose en couche mince :

La focalisation isoélectrique est une technique hautement résolutive de séparation des hémoglobines en fonction de leur point isoélectrique dans un gradient de pH . Cette méthode permet, d'une part, la séparation rapide de la plupart des hémoglobines, notamment les Hb C et E, ou S et D, et d'autre part, elle permet la mise en évidence d'hémoglobines instables non identifiables par les techniques classiques d'électrophorèse à pH alcalin. De plus, grâce à la bonne séparation de l'Hb F et de l'Hb A, la focalisation isoélectrique constitue la méthode de choix dans le dépistage des hémoglobinopathies chez le nouveau-né. (Clarke et Higgins,2000)

4.3. La spectrophotométrie 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-Cleon et *al.*,2009).

5. Le diabète :

5.1. La définition du diabète :

Le diabète sucré est défini par l'élévation chronique de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie) et regroupe, dans un véritable syndrome, plusieurs maladies de pathogénie différente (trouble de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline). L'hyperglycémie chronique est la cause principale de la survenue des complications dégénératives de la maladie diabétique mais celles-ci sont néanmoins susceptibles d'être évitées ou tout au moins retardées par un traitement adéquat. (Rodier, 2001).

5.2. L'hémoglobine glyquée (HbA1c) :

Les hémoglobines glyquées correspondent à l'ensemble des molécules d'hémoglobines modifiées par fixation non enzymatique d'oses sur les fonctions aminées libres de la globine. La glycation est un phénomène physiologique lent dont la première étape réversible correspond à la formation d'une base de Schiff ou Hb glyquée labile. Le nombre de fonctions susceptibles de fixer un ose et le fait que d'autres oses que le glucose peuvent se fixer génèrent une multitude de formes glyquées de l'Hb. Le site principal de glycation de l'hémoglobine majoritaire de l'adulte, l'HbA constituée de 2 chaînes α et 2 chaînes β de globine, se situe sur la valine N-terminale de la chaîne β . Les autres sites de glycation correspondent aux lysines non terminales des chaînes α et β et à la valine N-terminale de la chaîne α (Tableau II). (Mario et Lasnier, 2006).

Tableau II : Sites de glycation de l'HbA (Mario et Lasnier, 2006).

Sites de glycation	% de glycation
Val β N-terminale (β Val 146)	60
Lys non terminale (α Lys 16, β Lys 66, β Lys 17, β Lys 7 et β Lys 120)	34
Val α N-terminale (α Val 141)	6

Chapitre II :

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

La détection et la caractérisation des hémoglobinopathies se fait en trois étapes : l'hémogramme, les techniques spéciales de séparation et identification des hémoglobines (électrophorèse, chromatographie) et l'analyse de l'ADN (biologie moléculaire) (Trent, 2006).

Dans notre étude La détection et la caractérisation des hémoglobinopathies se fait en trois étapes aussi : l'hémogramme, les techniques spéciales de séparation et identification des hémoglobines (chromatographie) et l'analyse génétique par enquête.

1. Présentation d'étude :

1.1. Cadre et durée d'étude :

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire privé de Dr BENHELLAL a Ouled Yaich BLIDA, sur 1150 sujets a majorité diabétique, de deux sexes, et de différents âges, provenant de différentes régions de la wilaya de BLIDA. L'étude a duré 2 mois de 13 juillet 2014 à 13 septembre 2014.

1.2. Type d'étude :

Il s'agit d'une part une étude de dépistage, caractérisation et détection des anomalies de l'hémoglobine qui a nécessité un recueil de prélèvement sanguin pour analyse et d'autre part, de faire une enquête génétique, à la recherche de cas familiaux.

1.3. Population cible :

La population de patients diabétiques qui est la population cible de notre étude par ce que l'observation porte sur les anomalies de l'hémoglobine dépistées sur les chromatogrammes réalisés lors du dosage de l'HbA1c.

Le diagnostic biologique repose sur des tests principaux et reproductibles :

2. Le paramètre biochimique : la chromatographie liquide a haute performance (HPLC) par variant IITM BIO-RAD

2.1. Le prélèvement sanguin :

Le travail s'effectue en routine sur tubes vacutainers primaires bouchés, tubes 5 ml contenant de l'EDTA, 4,5 ml de sang veineux frais est prélevé directement dans des tubes spéciaux

contenant 0,5 ml de anticoagulant d'EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétate) dans une température ambiante varie de 20 à 22°C), Si le volume d'échantillon est trop faible (inférieur à 1,5 mL), il est possible d'effectuer une dilution externe (lyse osmotique manuelle) dans la solution de dilution et de lavage (Wash) de l'automate (5 µL de sang dans 1,5 mL de solution Wash).

Sur les tubes de prélèvement sont apposées des étiquettes portant le nom, l'âge, le numéro d'identification des patients.

On met les tubes sur les portoirs, et le blanc d'amorçage (1,5 mL de solution Wash + 5 µL d'échantillon d'un sang total quelconque frais ou du contrôle). Il faut placer le blanc dans la première position du portoir. Met en marche, l'échantillon étant prélevé directement après percement du bouchon par l'aiguille de prélèvement. Des adaptateurs sont fournis pour travailler sur microtubes (pédiatrie) et sur échantillons prédilués. Pour les tubes de 5 ml, aucune préparation n'est nécessaire. Le prélèvement est homogénéisé par un agitateur automatique (10 cycles de 3 secondes). L'échantillon est ensuite automatiquement prélevé (5 µl), dilué au 1/200 et hémolysé, filtré puis injecté sur la colonne.

La séparation des différentes fractions de l'hémoglobine s'effectue en trois minutes. Lors de chaque série

2.2. La technique HPLC :

C'est une technique de chromatographie liquide a haute performance en échange d'ions.

La technique est basée sur la séparation chromatographique de HbA1c sur une cartouche d'échange cationique.

L'utilisation de la chromatographie d'échange ionique permet à des molécules d'être séparées a basé sur leur charge. La séparation est optimisée pour éliminer des interférences des variantes d'hémoglobine (HbS, HbC, HbD et HbE), d'A1c labile, d'hémoglobine F...

2.3. Appareillage :

Variant IITM (BIO-RAD REF 270-2101NU Laboratories, Inc, Hercules) est un système CLHP utilisable pour la mesure des hémoglobines normales et anormales. Il est constitué de deux modules (annexe1) :

1. Un module chromatographique contenant le dégazeur (VARIANT II Chromatographic Station) (VCS), deux pompes, la valve d'injection, la valve de changement de tampons, un agitateur, une pompe-seringue, la colonne de chromatographie et son système de thermorégulation, et un dispositif de lecture optique constitué d'un spectrophotomètre avec lecture en continu à 415 nm pour détecter les pics d'hémoglobine et à 690 nm pour permettre l'élimination du bruit de fond .

2. Un module de traitement des échantillons (VARIANT II Sampling Station) (VSS) comportant un système de tapis roulant prévu pour 10 portoirs de 10 tubes, un système d'agitation, un lecteur d'étiquettes code-barres, une chambre de dilution, deux pompes-seringues, une pompe à vide, un réservoir pour les effluents à éliminer, et un plateau destiné au stockage des réactifs, équipé d'un système de détection par gravitation du niveau insuffisant des tampons.

3. L'ensemble est piloté par un PC équipé d'un logiciel (Bio-Rad Clinical Data Management System) (CDM) permettant une connexion bidirectionnelle avec l'informatique du laboratoire.

2.4. Les programmes utilisés :

Le variant utilise deux programmes déférant change par l'échange de réactives :

1. Programme de l'hémoglobine A1c du VARIANT II.
2. Programme de β -thalassémie A2 du VARIANT II.

2.5. Les réactifs du Programme de l'hémoglobine A1c du VARIANT II :

1. Tampon d'élution A : Une bouteille contenant 2500 ml, pH 6.0 de Bis-Tris/phosphate Contient l'azoture de sodium de <0.05% comme préservatif. Magasin à 15-30° C.
2. Tampon d'élution B : Une bouteille contenant 2500 ml, pH 6.7 de Bis-Tris/phosphate Contient l'azoture de sodium de <0.05% comme préservatif. Magasin à 15-30° C..
3. Wash/Diluent Solution: bouteille contenant de 2500 ml de l'eau désionisée, avec de l'azoture de sodium de <0.05% comme préservatif ; Magasin à 15-30° C

3. La formule Numération Sanguin (FNS) :

On l'appelle aussi: hémogramme complet, il comprend :

- La numération de ces éléments figurés (GR, GB, plaquettes).
- La mesure de l'hématocrite et La mesure des taux d'hémoglobine (Hb).
- Volume globulaire moyen (VGM).
- Teneur corpusculaire moyen en hémoglobine (TCMH).

Le développement technologique de ces dernières années permet l'utilisation des compteurs électroniques pour la numération des éléments figurés du sang. Ces compteurs existent en plusieurs modèles, l'un de ces compteurs est le « **Coulter d'hématologie** »

3.1.Principe :

Le **Coulter** est un monomètre permet à une certaine quantité de cellules en suspension dans une solution d'électrolytes (Isoton) de passer au travers d'un orifice de dimension spécifique un courant d'ouverture passe entre deux électrodes dont l'un est placé à l'intérieur du tube à orifice et l'autre à l'extérieur au passage de chaque cellule à travers l'orifice, l'impédance entre les deux électrodes change et ce changement produit une impulsion de tension dont l'amplitude est proportionnelle au volume de la particule. Les impulsions de tension sont amplifiées et transmises à un circuit de seuil d'examineur puis enregistrées sur un Oxilloscope et totalisées par un compteur électronique relié à un compteur mécanique où se lie le résultat de la numération des éléments comptés.

4. Enquête génétique :

Pour une famille :

- Questionnaire sur les antécédents familiaux.

Consanguinité: degré:

Nombre d'enfant par la petite famille:

Nombre d'enfant atteint par la petite famille:

Nombre des antécédents familiaux:

Nombre d'enfant atteint par la grande famille: Consanguinité: degré:

Nombre des décès:

- Etablissement de l'arbre généalogique.
- Etude du mode de transmission

5. Etude statistique :

Les calculs statistiques utilisées :

On fait les histogrammes (les répartitions d'âge et du sexe) et les secteurs (pourcentages) à l'aide d'Excel pour facilité d'interprétation et on a calculé les pourcentages suivant :

- Présence d'hémoglobinopathies par apport a notre population (les diabétiques).
- D'hémoglobine normal par apport a notre population.
- Des types de l'hémoglobine anormale chaque une par apport a notre population.

On calcule les pourcentages pour comparer au pourcentage mondial.

Chapitre III :
Résultats et discussion

1. résultat du test hématologique :

Les paramètres de la formule numérique sanguine ne présentent aucune carence, alors que les patients testés présentent une anomalie qualitative de l'hémoglobine. Cela, démontre que, à l'état hétérozygote, l'hémoglobinopathie est totalement asymptomatique. D'après Bernard et al, 1998, les sujets hétérozygotes (drépanocytose, Hb C....) ont une espérance de vie ne diffère pas de celle des sujets normaux.

2. Etude des profils chromatographiques des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies.

Au cours du dosage de ces différentes hémoglobines glyquées HbA1c, l'appareil présente les résultats sous forme de graphe et tableaux chromatographiques.

L'appareil est sensible aux produit des différents allèles de l'hémoglobine, donc il nous permet de génotyper les individus, c'est une approche à celle de la génétique.

2.1. L'hémoglobine normale (A/A):

Nous allons d'abord présenter les paramètres d'une hémoglobine normale :

Tableau III : tableau chromatographiques d'une hémoglobine normale

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	2.6	0.30	60988
F	---	0.7	0.57	16268
Unknown	---	1.0	0.79	23177
A1c	5.3	---	0.92	82964
P4	---	4.6	1.63	107790
Ao	---	87.6	1.76	2063084

Total Area: 2, 354,270

HbA1c (NGSP) = 5.3 %

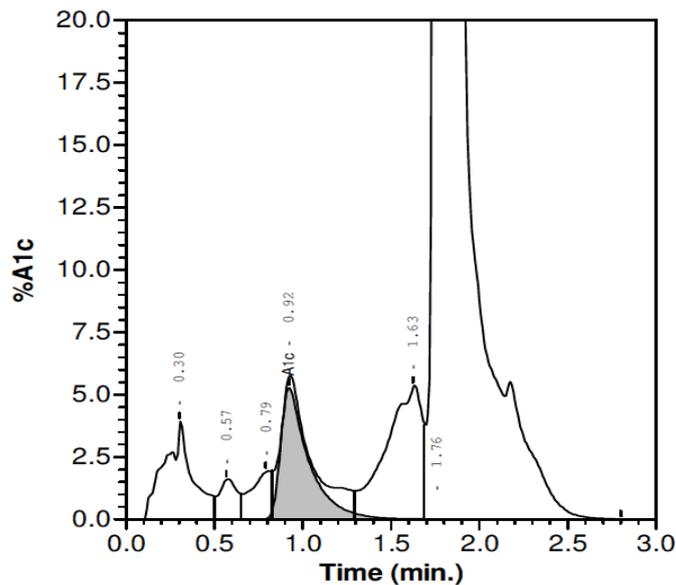


Figure 10 : Le graphe chromatographiques d'une hémoglobine normale

-Le dosage de l'hémoglobine A1c (HbA1c), principale forme d'hémoglobine glyquée caractérisée par la fixation non enzymatique de glucose à l'extrémité N-terminale des chaînes β de la globine, constitue aujourd'hui un élément essentiel de la prise en charge du patient diabétique.

-L'hémoglobine (HbA1) :

HbA 0 (l'HbA1 non modifiée), HbA1 et ont été désignées, en fonction de leur ordre d'éluion, par une lettre minuscule (HbA 1a, A 1b et HbA 1c). La molécule fixée par ces Hb est le glucose pour l'HbA 1c (4-6 % de l'Hb totale), le pyruvate pour l'HbA 1b (0,8 % de l'Hb totale) et le fructose 1-6 diphosphate ou le glucose 6 phosphate pour l'HbA 1a (0,5 % de l'Hb totale). (Mario et Lasnier, 2006)

P3 : glutathion-hémoglobine

-L'aire de HbA 0 est 87,6% (le cas normal A/A) les deux gènes sont normaux.

-On observe des pics dans le graphe, qui sont représentés par les lignes du tableau, le premier pic est de HbA1b après l'HbF

-le nombre de pics identifiés est plus important pour un même temps d'analyse (trois minutes).

-Time (min) représente le temps de rétention en minutes pour chaque fraction à éluer; Area % Représente le pourcentage d'hémoglobines dans le pic d'éluion, le temps de rétention pour chaque fraction est représenté par un pic.

2.2. Drépanocytoses hétérozygotes (A/S) :

Tableau IV : tableau chromatographiques d'une drépanocytose hétérozygote (A/S)

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.8	0.25	33125
F	---	2.5	0.57	46393
LA1c	---	0.9	0.68	15872
A1c	4.9	---	0.95	33496
P4	---	2.4	1.64	43144
Ao	---	49.9	1.77	909555
S	---	40.6	1.96	740225

Total Area: 1,821,809

HbA1c (NGSP) = 4.9 %

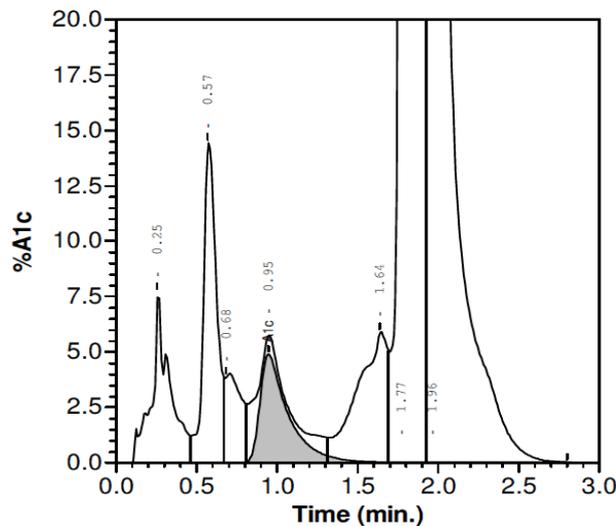


Figure 11 : Le graphe chromatographiques d'une drépanocytose hétérozygote (A/S)

-La drépanocytose est due à une mutation d'un acide glutamique de la chaîne β (acide aminé n°6) par une valine (acide aminé neutre) (Basset, 1978)

Les sujets AS ont un hémogramme normal et sont cliniquement asymptomatiques (Galactéros, 1995).

-Augmentation de l'HbF :

Chez l'adulte normal, le taux d'Hb F est inférieur à 0,5 % mais il existe des variations génétiques et liées à l'âge. (Redelsperger et Girot, 1996).

Usuellement, et pour un adulte sain, l'HbF représente moins de 1 % de l'hémoglobine totale. (Lemée et *al.*, 1999).

Dans le cas présent on observe une valeur de 2,5%, l'augmentation de l'HbF, lorsqu'elle reste modérée (inférieure à 3 %), ne nécessite pas l'invalidation du résultat de l'HbA_{1c} et ce marqueur peut alors être utilisé de façon fiable dans la surveillance du diabète (Lemée et *al.*, 1999).

Hémoglobines anormales :

-Présence d'un pic surnuméraire correspondait à l'existence de formes mutées de l'hémoglobine, en comparaison avec le graphe normal (figure 11)

-La détection d'une hémoglobine anormale par le variant est dans le graphe par la présence d'un pic après l'hémoglobine A₀ d'après Maquart *et al.*, 2000 La présence d'une hémoglobinopathie a été détectée par l'automate dans tous les cas, sous forme d'un pic retardé par rapport à l'HbA₀.

- L'aire de HbA₀ est 49,9% et HbS est 40,4% ce qui veut dire un des deux gènes est muté.

-les temps de rétention étaient compris entre 1,81 et 1,84 min pour l'HbA₀ 1,90-1,97 pour les HbS. (Maquart et *al.*, 2000).

D'après nos résultats le temps de rétention A₀ étaient compris de 1,77 et 1,96 pour HbS.

Le pic d'Hb anormale est alors automatiquement soustrait du calcul et le pourcentage d'HbA_{1c} est calculé en fonction des pics d'Hb normales uniquement. (Maquart et *al.*, 2000)

2.3. Hémoglobinoses C (hétérozygote) (A/C) :

Tableau V : tableau chromatographiques d'une Hémoglobine C (hétérozygote) (A/C)

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	0.5	0.12	7998
A1b	---	1.3	0.31	20422
F	---	0.2	0.57	3385
LA1c	---	0.8	0.75	12469
A1c	7.6*	---	0.95	50968
P4	---	3.1	1.64	50142
Ao	---	51.2	1.78	830467
C	---	39.8	2.14	646282

Total Area: 1,622,133

HbA1c (NGSP) = 7.6* %

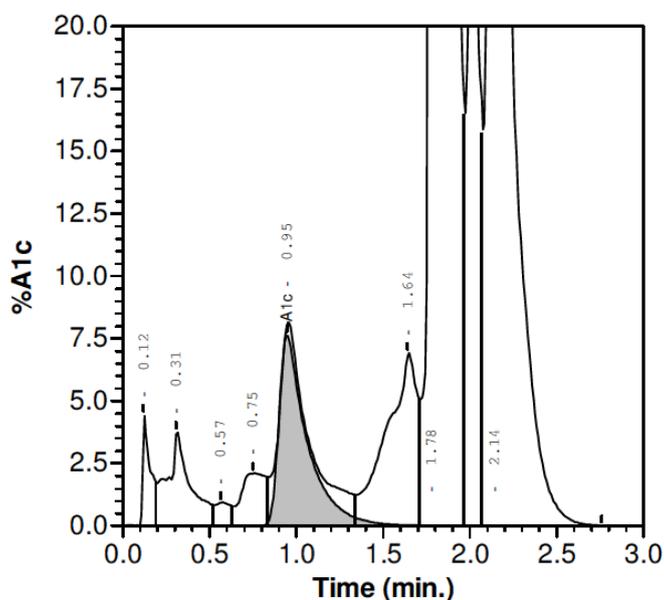


Figure 12 : Le graphe chromatographiques d'une Hémoglobine C (hétérozygote) (A/C)

-L'hémoglobine C est due à une substitution d'un acide glutamique de la chaîne β par une lysine (acide aminé basique n°6) (Krauss et *al.*, 1986).

-Les hétérozygotes (A/C) peuvent être assimilés aux hétérozygotes (AS) (Redelsberger et Girot, 1989), ils ne manifestent aucun symptôme de la maladie, à l'exception du risque génétique de transmettre le gène anormal à chaque procréation (Oda et *al.*, 1997). Ils sont détectés au cours d'une enquête familiale (Schneider, 1978).

-On observe un pic séparatif entre le pic de l'HbA₀ et le pic de l'HbC.

- L'aire de HbA 0 est 51,2% et HbC est 39,8% ce qui veut dire un des deux gènes est muté.

-les temps de rétention étaient compris entre 1,81 et 1,84 min pour l'HbA₀, 2,01-2,02 pour les HbC (Maquart et *al.*, 2000).

D'après nos résultats le temps de rétention de l'HbA₀ étaient compris de 1,78 et 2,14 pour HbC.

2.4. Hémoglobinosé inconnu (hétérozygote) (A/X) :

Tableau VI : tableau chromatographiques d'une Hémoglobinosé inconnu (hétérozygote) (A/X)

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.8	0.31	45562
F	---	0.3	0.59	7694
LA1c	---	0.9	0.73	23047
A1c	7.7*	---	0.95	90612
P4	---	3.5	1.64	87249
Ao	---	58.4	1.77	1444689
Unknown	---	31.4	2.06	776967

Total Area: 2,475,821

HbA1c (NGSP) = 7.7* %

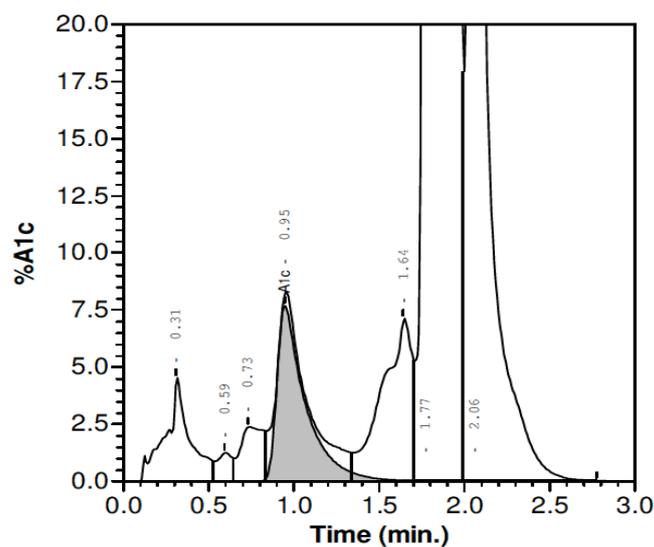


Figure 13 : Le graphe chromatographiques d'une Hémoglobinosé inconnue (hétérozygote) (A/X)

-Bien que plus de 700 variants structuraux de l'hémoglobine ont été identifiés, seulement 3 variants (HbS, HbC et HbE) ont diffusé avec une grande fréquence épidémiologique et représentent des problèmes de santé publique (Bardakdjian et *al.*, 2003). Dans ce cas on observe un des variants structuraux de l'hémoglobine inconnu.

- L'aire de HbA₀ est 58,4% et Hb inconnue est 31,4% ce qui veut dire un des deux gènes est muté.

-le temps de rétention étaient compris entre 1,81 et 1,84 min pour l'HbA₀, et dans ce cas le temps de rétention de l'HbA₀ étaient compris 1,77min, et 2,06 pour le pic d'anomalie inconnue.

2.5 L'association E ou D avec C (E/C) ou (D/C) :

Tableau VII : tableau chromatographiques de l'association E ou D avec C (E/C) ou (D/C)

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	0.8	0.25	21459
F	---	1.2	0.56	30936
LA1c	---	0.6	0.73	15849
P4	---	1.2	1.65	32406
Ao	---	6.0	1.69	159764
E,D	---	51.7	1.89	1373175
C	---	38.5	2.14	1023758

Total Area: 2,657,346

HbA1c (NGSP) = %

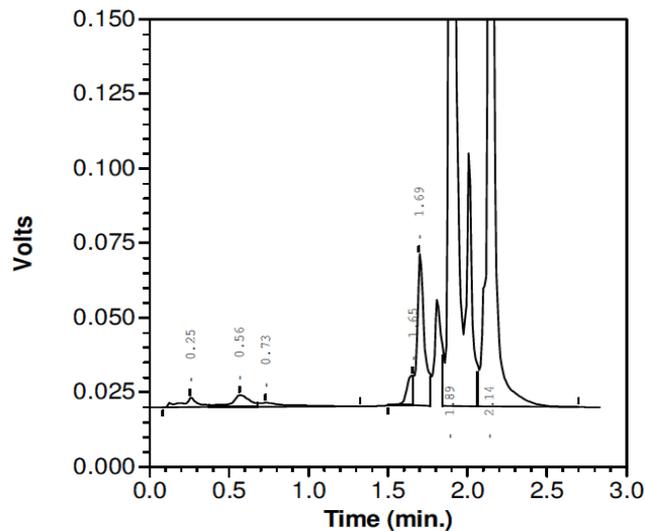


Figure 14 : Le graphe chromatographiques de l'association E ou D avec C (E/C) ou (D/C)

- L'aire de HbE ou HbD est 51,7% et HbC est 38,5% ce qui veut dire les deux gènes de A sont mutés.

-La présence d'une hémoglobine anormale homozygote ou en association comme le cas que nous avons les résultats de HbA1c reste interprétable et dans ce cas le suivi de ce patient est le dosage de fructosamine.

-La présence d'une hémoglobine anormale conduit à déconseiller l'utilisation de l'HbA1c dans ces situations, et à proposer un test de remplacement tel que le dosage des fructosamines. (Lemée *et al.*, 1999).

-La concentration des fructosamines n'est pas modifiée par l'existence d'une hémoglobinopathie.

Les fructosamines reflètent l'équilibre glycémique d'une période plus courte que celle reflétée par l'HbA1c (2 à 3 semaines au lieu de 2 à 3 mois). (Lemée *et al.*, 1999)

-Dans ce cas le résultat de fructosamines est de 567,3 μ mol/l, les normes [118-282 μ mol/l].

Dans tous les cas d'hémoglobinopathie homozygote ($A_{1c} = 0\%$), l'appareil affiche uniquement le signal (en volts) émis par le détecteur et pas les pourcentages de chaque fraction. (Maquart *et al.*, 2000).

2.6. Hémoglobinoses E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E) :

Tableau VIII : tableau chromatographiques d'une Hémoglobinoses E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E)

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	0.9	0.17	23116
A1b	---	0.6	0.31	14880
Unknown	---	0.5	0.49	14179
LA1c	---	0.6	0.78	15286
A1c	5.1	---	0.96	47218
Unknown	---	1.4	1.58	38384
P4	---	2.7	1.64	72149
Ao	---	43.0	1.77	1155739
E,D	---	48.6	1.85	1303746

Total Area: 2,684,698

HbA1c (NGSP) = 5.1 %

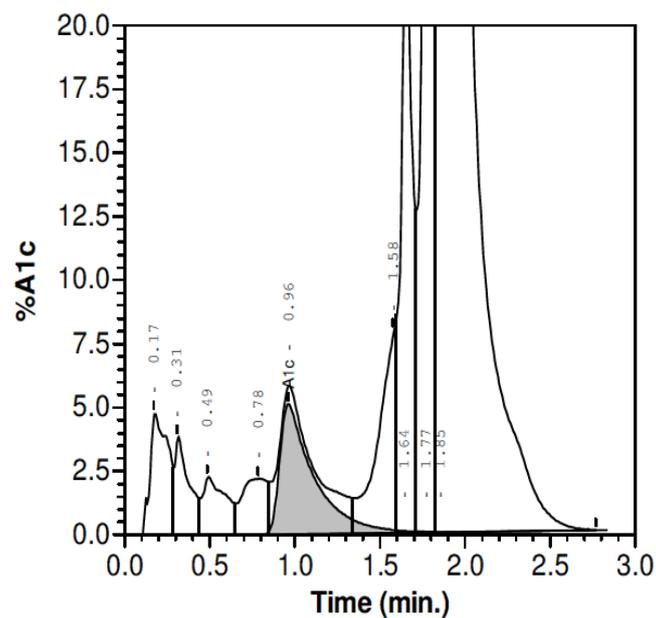


Figure 15 : Le graphe chromatographiques d'une Hémoglobinoses E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E)

- L'aire de HbA 0 est 43,0% et HbE ou HbD est 48,6% ce qui veut dire un des deux gènes de A est muté.

Les temps de rétention étaient compris entre 1,81 et 1,84 min pour l'HbA₀, 1,90-1,97 pour les HbE ou D (Maquart et *al.*, 2000).

D'après nos résultats le temps de rétention de l'HbA₀ étaient compris de 1,77 et 1,85 pour HbE ou D.

3. Résultat de l'enquête génétique :

Dans ce cas, l'enquête génétique n'est pas fonctionnelle car l'anomalie est récessive dont patient lui-même ne sait pas qu'il est porteur d'une maladie, au cours de la réalisation de notre stage pratique on a rencontré un cas très intéressant d'une même famille dont quelques membres inclues le père et ses trois filles et sa nièce avaient les résultats de l'HPLC, ou on a pu faire un arbre généalogique après le questionnaire.

3.1. Questionnaire sur les antécédents familiaux :

Consanguinité: non

Nombre d'enfant par la petite famille: 06

Nombre d'enfant atteint par la petite famille: 00

Nombre des individus pourtours de la maladie par la petite famille (on sait par HPLC) : 04

Nombre des individus pourtours de la maladie par la grande famille: 01

Nombre des antécédents familiaux: /

Consanguinité dans la grande famille: non

Nombre des décès par la grande famille: 02 (les grands parents)

3.2. L'arbre généalogique :

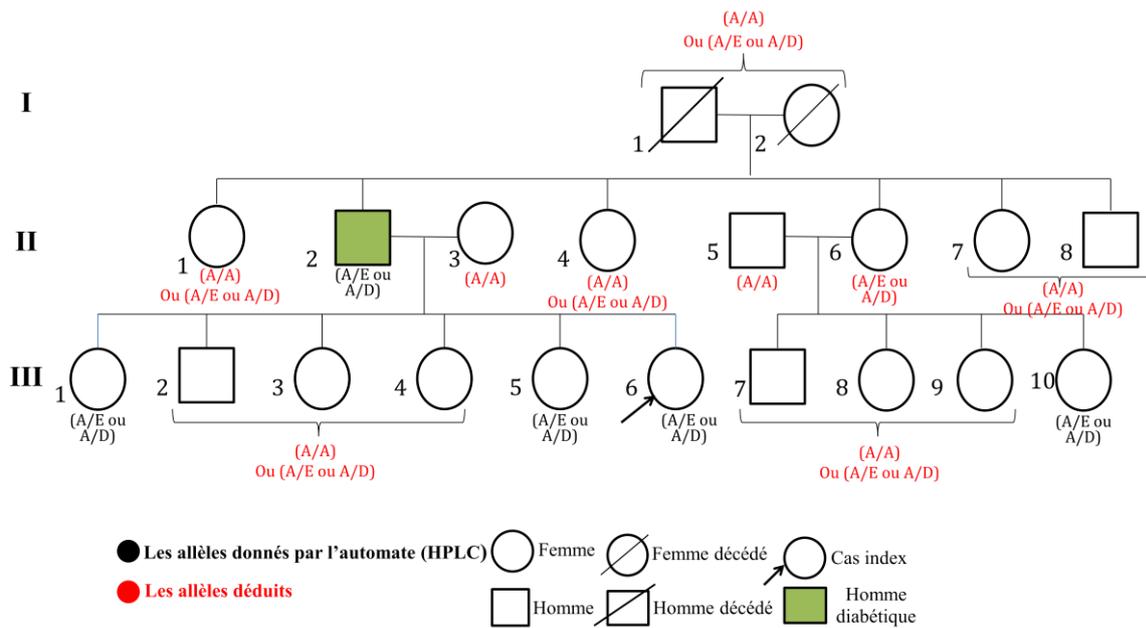


Figure 16 : L'arbre généalogique d'une famille hétérozygote A/E ou A/D.

Il n'y a aucune consanguinité entre les parents de la deuxième génération (entre II2, II3 et entre II5, II6), ces derniers ne présentent aucun membre malade (homozygotes E/E ou D/D) au sein de leurs antécédents.

Les allèles des grands parents :

- soit I1 (A/A) et I2 (A/E ou A/D).
- soit I1 (A/E ou A/D) et I2 (A/A).

3.3. Mode de transmission :

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

3.4. Le risque de transmission :

La maladie est transmise selon le mode autosomique récessif si le gène en cause est porté par un autosome et si la présence de deux allèles mutés du gène est nécessaire pour que la maladie se manifeste. Les malades sont homozygotes pour le gène en cause.

Dans ce cas nous avons :

Les allèles des parents : (A/A) // (A/E ou A/D) → homozygote sain // hétérozygote porteur sain.

A chaque grossesse :

5. un risque de 0% d'avoir un enfant atteint (homozygote E/E ou D/D).
6. une probabilité de 50% d'avoir un enfant porteur sain (hétérozygote A/E ou A/D) qui peut avoir un enfant atteint si, et seulement si son conjoint est lui-même porteur sain (avec un risque de 1/4).
7. une probabilité de 50% d'avoir un enfant sain (homozygote A/A).qui ne peut pas avoir d'enfant atteint.

4. L'étude statistique :

4.1. La répartition des anomalies selon la population :

Nos résultats confirment l'existence de différents types d'hémoglobinopathies dans la population diabétique de la région de Blida, 20 malades ont été trouvés parmi 1150 sujets diabétiques,

Les calculs des pourcentages :

1. Le pourcentage de Présence d'hémoglobinopathies par rapport à notre population (les diabétiques) est de 1,74%.
2. Le pourcentage d'hémoglobine normale par rapport à notre population est de 98,26%.
3. Les pourcentages des types de l'hémoglobine anormale chaque une par rapport à notre population : exemple 0,61% pour la drépanocytose hétérozygotes (A/S) ainsi de suite pour les autres (tableau IX).

Tableau IX : Répartition des anomalies selon la population

	Type de l'hémoglobine	Effectif	Pourcentages
Hb normale	(A/A)	1130	98,26%

Présence de l'hémoglobinopathie	(A/S)	07	0,61%	1,74%
	(A/C)	05	0,43%	
	(A/D) ou (A/E)	05	0,43%	
	(A/X)	02	0,17%	
	(E/C) ou (D/C)	01	0,09%	
Totale		1150	100%	

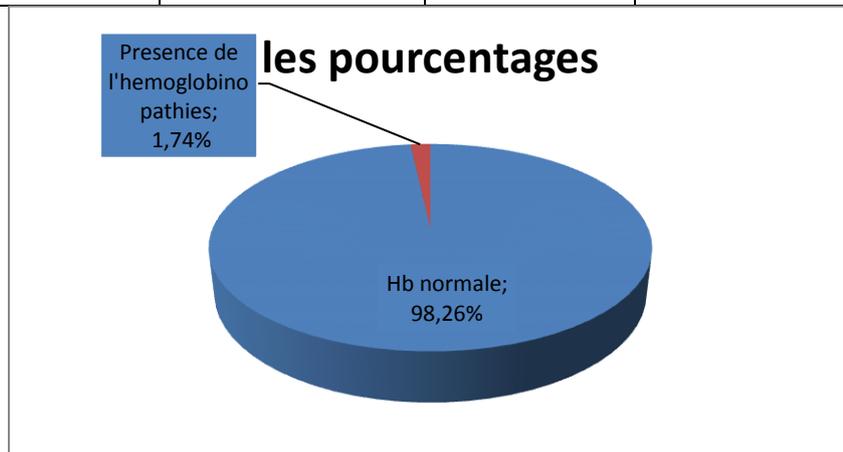


Figure17 : pourcentage des hémoglobinopathies par rapport à l'Hb normale

On remarque que les sujet présentant une anomalie représentent un pourcentage de 1,74% par rapport à la population étudiée.

4.2. Répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies :

Répartition des anomalies selon le total de types d'hémoglobinopathies, les anomalies ont été classés comme suit : 07 sujets drépanocytaires hétérozygotes (A/S), 05 d'hétérozygote (A/C), 05 hémoglobino E ou D hétérozygote (A/D) ou (A/E), 02 d'Hémoglobino inconnu hétérozygote (A/X), et un de double hétérozygote E ou D avec C (E/C) ou (D/C).

Le calcul des pourcentages des types de l'hémoglobine anormale chaque une par rapport a le nombre totale de l'hémoglobinopathie : exemple 35% pour la drépanocytoses hétérozygotes (A/S) ainsi de suite pour les autre (tableau X).

Tableau X : Répartition des anomalies selon les différents types des hémoglobinopathies

Type de la maladie	Effectif	Pourcentage
Drépanocytoses hétérozygotes (A/S)	07	35%
Hémoglobinoze C (hétérozygote) (A/C)	05	25%
Hémoglobinoze E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E)	05	25%
Hémoglobinoze inconnu (hétérozygote) (A/X)	02	10%
Double hétérozygote E ou D avec C (E/C) ou (D/C)	01	05%
Totale	20	100%

Drépanocytoses hétérozygotes (A/S)	00	00	00	01	01	03	01	0	01
Hémoglobinoze C (hétérozygote) (A/C)	00	00	00	00	01	01	03	00	00
Hémoglobinoze E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E)	00	00	02	01	00	01	01	0	00
Hémoglobinoze inconnu (hétérozygote) (A/X)	00	00	00	01	00	00	00	01	0
Double hétérozygote E ou D avec C (E/C) ou (D/C)	00	00	00	00	00	01	00	00	0

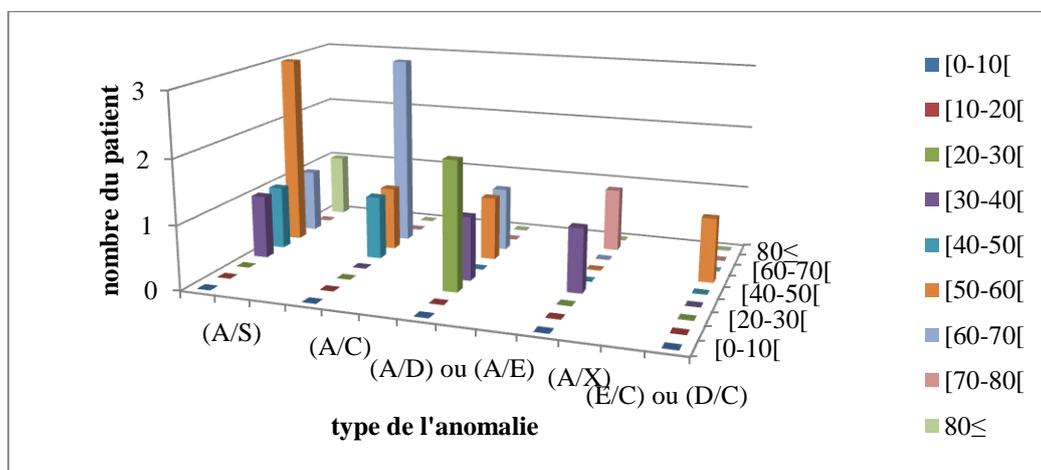


Figure19 : Répartition de la population selon l'âge

4.3.2. Selon le sexe :

Tableau XII : Répartition de la population selon le sexe

Type de la maladie	F	H
Drépanocytoses hétérozygotes (A/S)	04	03
Hémoglobinoase C (hétérozygote) (A/C)	03	02
Hémoglobinoase E ou D (hétérozygote) (A/D) ou (A/E)	04	01
Hémoglobinoase inconnu (hétérozygote) (A/X)	00	02
Double hétérozygote E ou D avec C (E/C) ou (D/C)	00	01
Totale	11	09
Le pourcentage	55%	45%

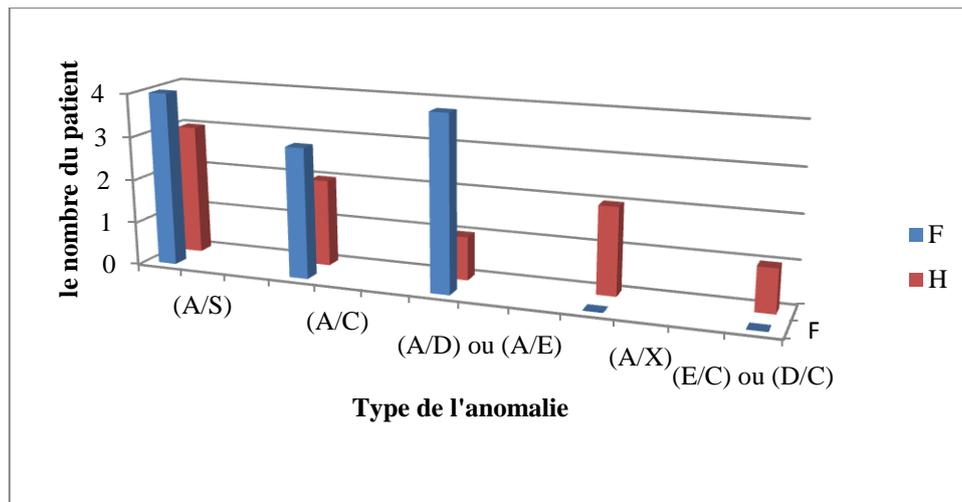


Figure20 : Répartition de la population selon le sexe

L'âge moyen des patients était de 56 ans avec des extrêmes de 26 et 86 ans, 11 femmes soit 55% et 09 hommes soit 45%.

D'après nos résultats (tableau XI), les formes hétérozygotes sont détectées à tous les âges. Nos résultats (tableau XII), confirme aussi que cette pathologie peut toucher approximativement les deux sexes.

Les sujets hétérozygotes (drépanocytose, Hb C....) ont une espérance de vie ne diffère pas de celle des sujets normaux (Bernard et *al.*, 1998).

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 symptomatiques (Kohne, 2011).

Conclusion :

Ce travail porte sur une étude effectuée sur 20 cas d'hémoglobinopathies ont été trouvés parmi 1150 de la population diabétique de la région de Blida. Il nous a permis de démontrer que : La prévalence des hémoglobinopathies dans la région de Blida est 1,73% par rapport à la population étudiée. On a détecté l'existence de différents types d'anomalies d'hémoglobine. On a révélé que la drépanocytose est l'anomalie la plus fréquente (hétérozygote HbS 35%) puis (l'hétérozygote HbC 25% et l'hétérozygote HbE ou HbD 25%), ensuite (l'hétérozygote inconnu X 10%), et enfin (le double hétérozygote C/E ou C/D 5%).

les formes hétérozygotes (drépanocytose hétérozygote et l'hétérozygote C, E, D) sont porteurs de la maladie et sont cliniquement asymptomatiques. L'association d'une hémoglobine C et l'hémoglobine E ou D est aussi asymptomatique.

Ainsi l'exploration biochimique (la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) par variant IITM BIO-RAD) permet d'une part d'évaluer la prévalence des hémoglobinopathies dans la région de Blida et de préciser le type de l'anomalie hémoglobinique.

L'intérêt de l'étude de ces anomalies est le dépistage des porteurs et la prévention des hémoglobinopathies, mais pas encore pour leur traitement. Cependant les manipulations génétiques pourraient dans un avenir proche, permettre de traiter réellement ces états pathologiques, en rétablissement le génome normal.

Ces hémoglobinopathies ont été découvertes de façon fortuite, au cours d'un suivi de routine chez les patients diabétiques. Il serait donc souhaitable, de réaliser un dépistage des hémoglobinopathies étendu à la population générale, à la recherche de cas familiaux pour pouvoir instaurer un conseil génétique afin d'éviter au maximum les formes homozygotes.

Références bibliographiques

1. Bachir D , Beauvais P. (1992). Prise en charge des patients drépanocytaires. Rev Prat ; 42 : 1900-7
2. Bradai M , Abad MT , Pissard S , Lamraoui F , Skopinski L , de Montalembert M .(2003).Hydroxyurea can eliminate transfusion requirements in children with severe β -thalassemia. Blood; 102: 1529-30.
3. Bardakdjian J, Dhondt.J.L, Ducrocq.R, Galactéros.F. (2003). Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. Annales de Biologie Clinique ;61 : 401-409.
4. Baruchel A, Schaison G, Leblanc T. (1995).Hématologie de l'enfant. ED.
Basset.P, Beuzard.Y, Garel.M-C and Rosa.J. (1978).Isoelectric focusing of human hemoglobin: its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. Blood; 51: 971-982.
5. Bernard J, Lévy JP, Bruno V, Pierre Clauvel J, Didier Rain J, YvetteS .(1998). Hématologie ; 352.
6. Bunn HF. (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. N Engl J Med ;337: 762-9.
7. Clarke GM, Higgins T. (2000). Laboratory Investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. ClinChem. 46 : 1284-90.
8. Couque N, Demotalembert M. (2013). Deagnostic des hémoglobinopathies. Vol liv; 311.
9. Crossley M, Orkin SH. ;(1993). Regulation of the beta-globin locus. CurrOpin Genet Dev ;1: 232-7.
10. Deisseroth A, Nienhuis A, Turner P, Velez R, Anderson WF, Ruddle FH, Lawrence J, Creagan R, Kucherlapati R; (1977), Localisation of the human α -globin structural

gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids. *Cell*; 12: 205-216.

11. Deisseroth A, Nienhuis A, Lawrence J, Giles R, Turner P, Ruddle, F H. (1978).

Chromosomal localization of human β -globin gene on human chromosome 11 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 75: 1456-1460.

12. Delamare G. (1992). Dictionnaire des termes de médecine. 22E édition. Maloine, Paris.

13. 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 ; 41 :8 -100.

14. Djamaa I. (2012). Mise au point de la DGGE en vue du diagnostic des bêta thalassémies et drépanocytose. Thèse de Magister. Université de Tlemcen.

15. Domart A, Bourneuf G., (1981).Nouveau Larousse médicale.ED.Larousse, Paris, :1012-1013.

16. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. (1995). Role of erythroidKrüppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J BiolChem* ; 270 : 1955-9.

17. Fritsh EF, Lawn RM, Maniatis T. (1980). Molecular cloning and characterization of the human β globine gene cluster. *Cell*, 19: 959-972.

18. Ferrier P. (1980).Précis de pédiatrie. Deuxième édition. Paris, :298-301.

19. Galactéros F. (1995).Drépanocytose. Physiopathologie et diagnostic. *Rev Prat* ; 45: 351.

20. Gale RE, Clegg JB, Huehns ER. (1979). Human e mbryonic haemo-globins Gower 1 and 2. *Nature* 280 :162-4.

21. Girot R. ;(1999) -Thalassémie, drépanocytose. Physiopathologie et diagnostic.*Rev Prat* ; 49 :667-674.

22. Hargrove PW, Vanin EF, Kurtzman GJ, Nienhuis AW. (1997). High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno- associated virus genome that contains the 3'

gamma globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells.
Blood ; 89 : 2167-75.

23. Huret.J-L, Troussard.X. (2009) Hemoglobin genes; Sickle-cell anemia
Thalasseмии. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.; 13: 2.

24. Kafando E , Savadogo LGB , Ayéroué J et coll. (2008). Les syndromes drépanocytaires
majeurs : une enquête anonyme auprès du corps médical au Burkina-Faso. Med. Trop, 68,
:241-246.

25. Kamuzora H, Jones RT, Lehmann H. (1974). The zeta-chain, an alpha-like chain of
human embryonic haemoglobin. FEBS Lett 46 :195–9.

26. Kazazian HH, Antonarakis S. (1997). Molecular genetics of the hemoglobin genes. In:
SINGER M & BERG P (Eds) – Exploring genetic mechanisms. University Science Book,
Sausalito, California, : 301-336.

27. Khayat D, Auclerc G. (1990). Hématologie. Deuxième édition. Maloine, Paris, :136- 139.

28. Kohne.E. (2011). Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and
Treatment. DtschArztebl Int. August; 108(31-32): 532–540.

29. Krauss JS, Drew PA, Jonah MH, Trinh M, Shell S, Black L, Baisden CR. (1986).
Densitometry and microchromatography compared for determination of the hemoglobin C
and A2 proportion in hemoglobin C and hemoglobin SC disease and in hemoglobin C trait
Clin. Chem. 32, 5, :860-863.

30. Labie D, Elion J. (2005). Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de
l'hémoglobine. EMC-Hématologie 2, :220–239.

31. Lebo RV, Carrano AV, Burkhart-Schultz K, Dozy AM, Yu LC, Kan YW. (1979).
Assignment of human β , γ and δ globin genes to the short arm of chromosome 11 by
chromosome sorting and ADN restriction enzyme analysis. Proc Natl Acad Sci U S A, 76:
5804-5808.

32. Lehninger AL. (2000). Principles of Biochemistry, 3rd Ed. Ed. Worth Publishers.

- 33.** Lemée V, Hue G, Lahary A, Lavoine A.(1999). Détection fortuite d'anomalies de l'hémoglobine lors du dosage de l'hémoglobine glyquée par une technique de chromatographie liquide haute pression. :713-6
- 34.** Mac Donald CB, Bauer PW, Cox LC Mac, Mahon L.(1999). Otologic findings in a pediatric cohort with sickle cell disease. Int J Pediatr Otorhinolaryngology; 47 : 23-28.
- 35.** Maquart F, Leroy N, Volondat A, Gillery P. (2000). Evaluation de l'analyseur Variant II® de Bio-Rad pour le dosage de l'hémoglobine A1c. : 199-203
- 36.** Mario N, Lasnier E. (2006). Les Difficultés d'interprétation du dosage de l'hémoglobine A1c. francophone des laboratoires.382 : 39-43.
- 37.** Mehta AB, Hoffbrand AV;(2003). Hématologie. Edition; De Boeck.
- 38.** Oda RP. (1997). Capillary electrophoresis as a clinical tool for the analysis of protein in serum and other body fluids. Electrophoresis , 18, :1715-1723.
- 39.** O'Keefe LJ, War MA.(1991). Sudden total deafness in sickle cell disease. J Laryngol Otol; 105: 653-655.
- 40.** Orsini A, Perrimon H, vovan L, mattei M. (1982). Hématologie pédiatrique. ED. Flammarion, Paris, :442.
- 41.** Perelman R. (1977). Pédiatrie pratique. Tome I. ED. Maloine, Paris, :420-422.
- 42.** Ritter O, Fattorusso V. (2001). Vademecum clinique du diagnostic au traitement. Paris, :566-568.
- 43.** Rivière I, Sadelain M.(1997). Methods for the construction of retroviral vectors and the generation of high titer producers. In : Totowa, NJ. Gene therapy protocols: methods in molecular biology. Humana Press, : 59-78.

- 44.** Robet G, Pierre B, Frédéric G. (2003), La drépanocytose. Edition; John Libbey, Eurotext, Paris, :1.
- 45.** Rodier M. (2001), Médecine Nucléaire – Imagerie fonctionnelle et métabolique, vol.25-n°2.
- 46.** Rosa J , Wajcman H, Blouquit Y. (1993). Hémoglobine. EncyclMédChir, Hématologie; 13000-S-10 :14 .
- 47.** Schneider RG. (1978) .Methods for detection of hemoglobin variants and hemoglobinopathies in the routine clinical laboratory. CRCCrit Rev. Clin. Lab. SCi9 :243-271.
- 48.** Serge P. (2004) Inter-relations métaboliques Physiopathologique Érythrocytaire et Métabolisme Énergétique,5 :23.
- 49.** Stamatoyannopoulos G. (2000), Molecular and cellular basis of hemoglobin s witching.
- 50.** Steinberg ML, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of hemoglobins, genetics, pathophysiology, and clinical management. New York: Cambridge University Press. : 131–45.
- 51.** Sujishik K. (2000). Hemoglobine A1c- Bio Rad Variant II. UCSF Clin Labs Chemistry,08182010. :9-1.
- 52.** Trent R J A. (2006). Diagnosis of the Haemoglobinopathies.ClinBiochem. Vol,27 February :27
- 53.** Vanbourdolle , M et collaborateurs. (2007) .Biochimie hématologie :6-1116.
- 54.** Weatherall.D.J, Clegg.J.B. (2001). Bulletin of the World Health Organization, 79 (8). :704-712
- 55.** Whitehead RE, Mac Donald CB, Melhem ER, Mac MahonL .(1998). Spontaneous labyrinthehemorrhage in sickle cell disease. Am JNeuroradiol; 19, september : 1437-1440.

56. Zack JA, Haislip AM, Krogstad P, Chen IS. (1992). Incompletely reverse-transcribed human immunodeficiency virus type 1 genomes in quiescent cells can function as intermediates in the retroviral life cycle. *J Virol* ; 66 : 1717-25.

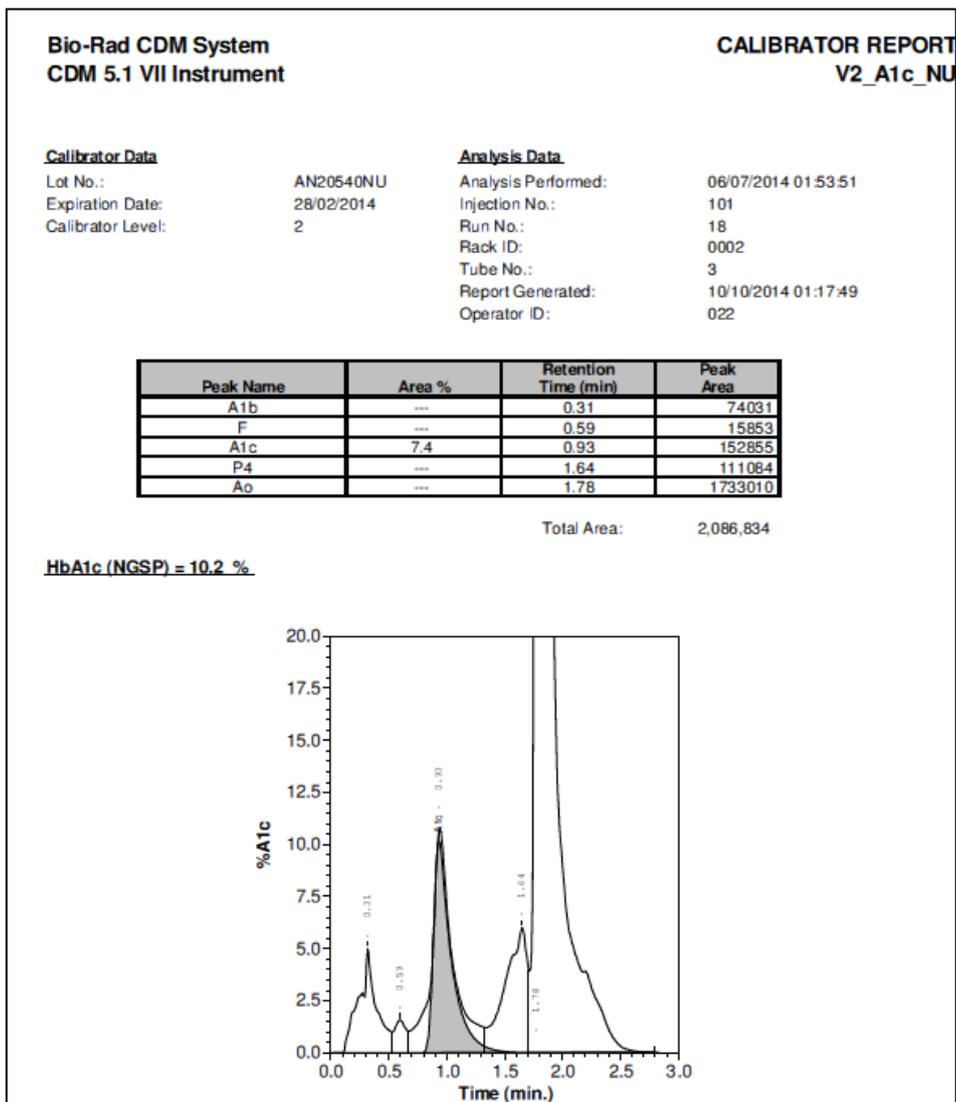
57. Zanella-Cleon I, Préhu C, Joly P, Riou J, Becchi M, Wajcman H, Francina A. Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in Cis in the beta-globin chain: Hb S-Clichy [$\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$; $\beta 8(A5) Lys \rightarrow Thr$]. *Hemoglobin* 2009 ; 33 (3) : 177-87.

Annexes

Annexes 01 : le variant II Bio Rad.



Annexe 02 : PDF du variant II :



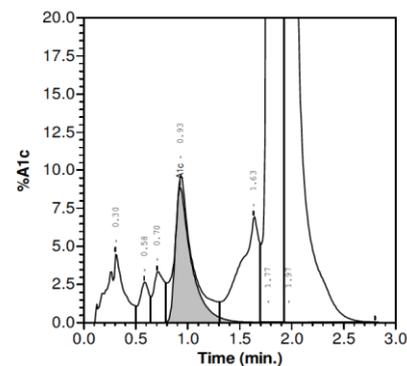
Annexe 03 : les graphes et les tableaux des nos patients :

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	2.1	0.30	38152
F	---	0.7	0.58	12327
LA1c	---	1.0	0.70	18622
A1c	8.9*	---	0.93	72007
P4	---	3.7	1.63	66085
Ao	---	54.4	1.77	966078
S	---	33.9	1.97	602376

*Values outside of expected ranges

Total Area: 1,775,646

HbA1c (NGSP) = 8.9* %

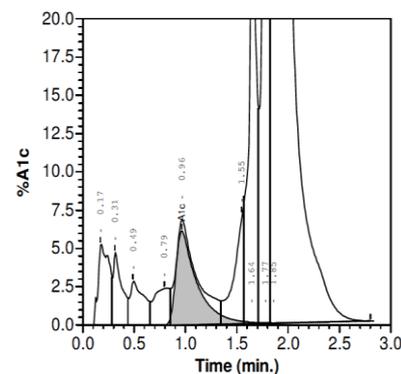


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	1.0	0.17	26567
A1b	---	0.7	0.31	18578
Unknown	---	0.7	0.49	17760
Unknown	---	0.6	0.79	17007
A1c	6.1*	---	0.96	57670
P3	---	1.2	1.55	32596
P4	---	3.5	1.64	93283
Ao	---	41.9	1.77	1118069
E,D	---	48.2	1.85	1287132

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,668,663

HbA1c (NGSP) = 6.1* %

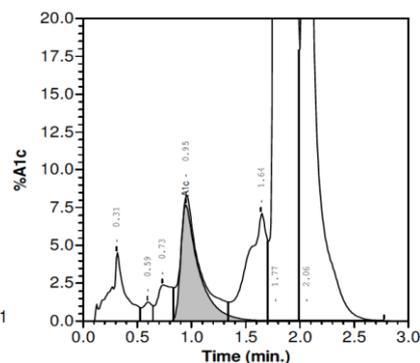


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.8	0.31	45562
F	---	0.3	0.59	7694
LA1c	---	0.9	0.73	23047
A1c	7.7*	---	0.95	90612
P4	---	3.5	1.64	87249
Ao	---	58.4	1.77	1444689
Unknown	---	31.4	2.06	776967

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,475,821

HbA1c (NGSP) = 7.7* %

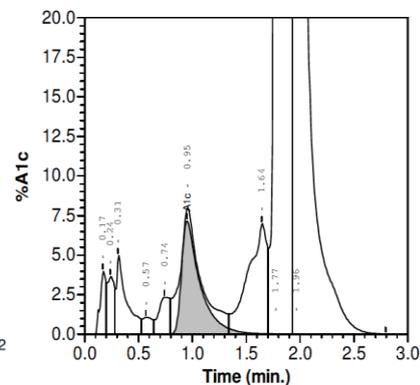


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	0.6	0.17	13975
Unknown	---	0.5	0.24	13807
A1b	---	1.1	0.31	28904
F	---	0.2	0.57	6158
LA1c	---	0.6	0.74	15178
A1c	7.2*	---	0.95	76452
P4	---	3.0	1.64	75726
Ao	---	52.1	1.77	1319981
S	---	38.8	1.96	981722

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,531,902

HbA1c (NGSP) = 7.2* %

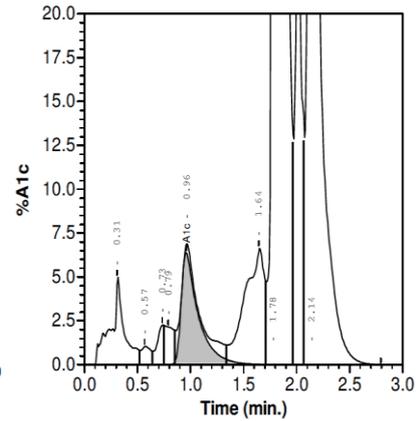


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.6	0.31	32403
F	---	0.2	0.57	4776
Unknown	---	0.4	0.73	7709
LA1c	---	0.5	0.79	9331
A1c	6.4*	---	0.96	52577
P4	---	3.2	1.64	62809
Ao	---	53.2	1.78	1045867
C	---	38.1	2.14	749345

*Values outside of expected ranges

Total Area: 1,964,819

HbA1c (NGSP) = 6.4* %

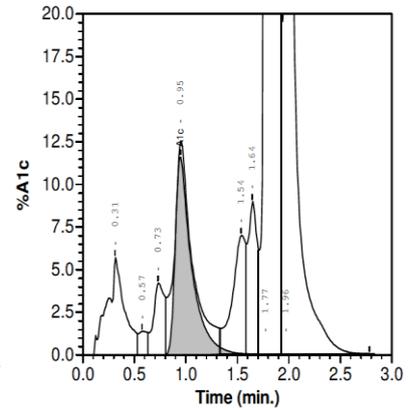


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	3.0	0.31	68447
F	---	0.4	0.57	8345
LA1c	---	1.4	0.73	32100
A1c	11.6*	---	0.95	130662
P3	---	2.8	1.54	63368
P4	---	2.4	1.64	54986
Ao	---	53.7	1.77	1224277
S	---	30.6	1.96	698929

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,281,114

HbA1c (NGSP) = 11.6* %

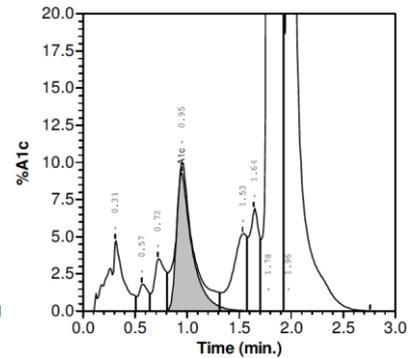


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	2.1	0.31	39783
F	---	0.5	0.57	8896
LA1c	---	1.1	0.72	20762
A1c	9.3*	---	0.95	77362
P3	---	2.0	1.53	39048
P4	---	1.8	1.64	34060
Ao	---	50.7	1.78	976546
S	---	37.9	1.96	728935

*Values outside of expected ranges

Total Area: 1,925,391

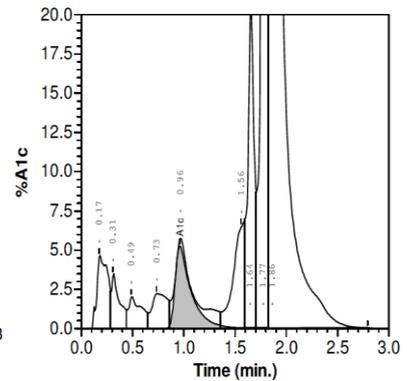
HbA1c (NGSP) = 9.3* %



Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	1.2	0.17	27176
A1b	---	0.6	0.31	14898
Unknown	---	0.6	0.49	14087
LA1c	---	0.8	0.73	18428
A1c	5.3	---	0.96	45364
P3	---	1.8	1.56	42007
P4	---	2.8	1.64	66018
Ao	---	45.0	1.77	1061240
E,D	---	45.3	1.86	1066905

Total Area: 2,356,123

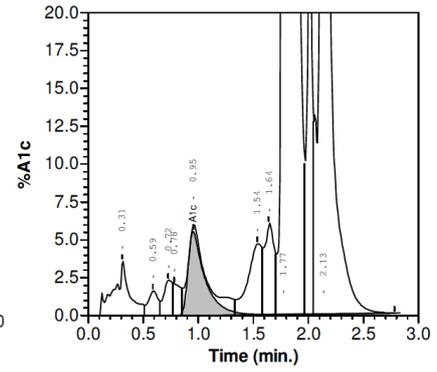
HbA1c (NGSP) = 5.3 %



Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.4	0.31	30690
F	---	0.4	0.59	8572
LA1c	---	0.5	0.72	11093
Unknown	---	0.4	0.78	8225
A1c	5.5	---	0.95	49563
P3	---	1.6	1.54	35334
P4	---	1.4	1.64	30904
Ao	---	54.2	1.77	1164136
C	---	37.7	2.13	809473

Total Area: 2,147,990

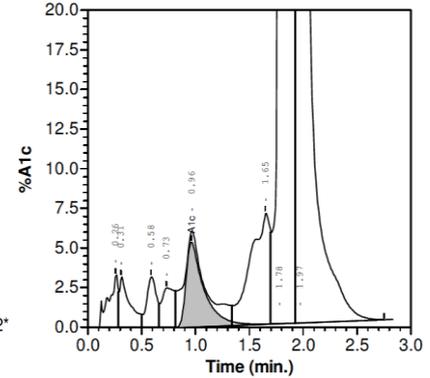
HbA1c (NGSP) = 5.5 %



Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.8	0.26	11028
A1b	---	0.8	0.31	11162
F	---	0.7	0.58	10144
LA1c	---	0.7	0.73	9926
A1c	5.4	---	0.96	30252
P4	---	3.1	1.65	43510
Ao	---	52.4	1.78	740119
S	---	39.3	1.97	555251

Total Area: 1,411,392*

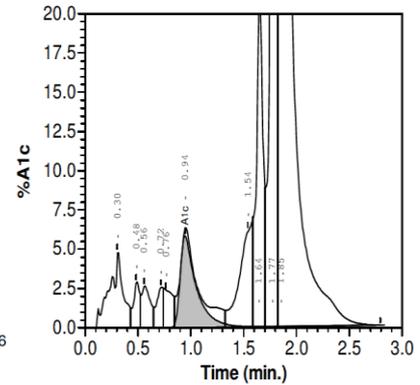
HbA1c (NGSP) = 5.4 %



Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.6	0.30	39735
Unknown	---	0.4	0.48	10548
F	---	0.5	0.56	13759
Unknown	---	0.4	0.72	10653
LA1c	---	0.5	0.76	12512
A1c	5.9	---	0.94	55523
P3	---	2.0	1.54	50765
P4	---	3.2	1.64	80760
Ao	---	44.7	1.77	1139968
E,D	---	44.6	1.85	1137285

Total Area: 2,551,506

HbA1c (NGSP) = 5.9 %

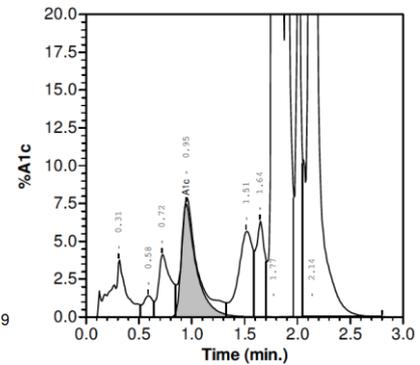


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.8	0.31	49008
F	---	0.4	0.58	10471
LA1c	---	1.5	0.72	40736
A1c	7.5*	---	0.95	89718
P3	---	2.4	1.51	64816
P4	---	1.7	1.64	44028
Ao	---	54.0	1.77	1437576
C	---	34.8	2.14	925777

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,662,129

HbA1c (NGSP) = 7.5 %

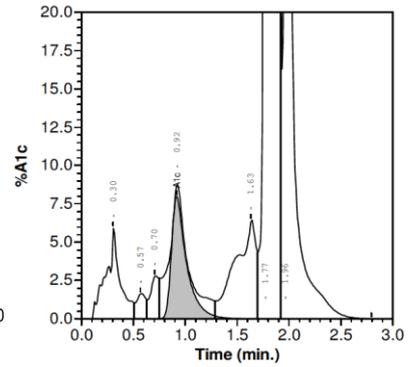


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	2.4	0.30	70456
F	---	0.4	0.57	12725
LA1c	---	0.7	0.70	20696
A1c	8.0*	---	0.92	102415
P4	---	3.8	1.63	110665
Ao	---	52.3	1.77	1524108
S	---	36.8	1.96	1071265

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,912,330

HbA1c (NGSP) = 8.0* %

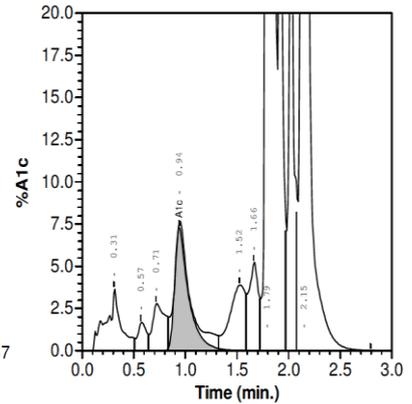


Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1b	---	1.7	0.31	44694
F	---	0.4	0.57	11899
LA1c	---	1.1	0.71	29750
A1c	7.3*	---	0.94	83962
P3	---	1.9	1.52	49766
P4	---	1.5	1.66	39742
Ao	---	52.7	1.79	1411958
C	---	37.6	2.15	1005598

*Values outside of expected ranges

Total Area: 2,677,367

HbA1c (NGSP) = 7.3* %



Annexe 04 : Résultat (FNS) d'un des patients avec les normes:

Paramètres	Résultats	Unité	Valeurs de référence
FORMULE NUMERATION SANGUINE			
Leucocytes :	8.7	10 ³ /µl	4.0 - 10.0
Hématies :	4.86	10 ⁶ /µl	4.5 - 5.2
Hémoglobine :	14.0	g/dl	11.0 - 17.0
Hématocrite :	38.0	%	35 - 54
V.G.M :	78.2	fl	82 - 96
T.C.M.H :	28.8	pg	27 - 36
C.C.M.H :	36.8	g/dl	32 - 37
Plaquettes :	150	10 ³ /µl	150 - 450
FORMULE LEUCOCYTAIRE APPROCHEE			
LYMPHOCYTES%	46.3	%	20 - 40
MXD%	10.1	%	< 10
NEUTROPHILES %	43.6	%	45 - 70
LYM	4.0	10 ³ /µl	2.0 - 4.0
MXD	0.9	10 ³ /µl	< 0.6
NEUT	3.8	10 ³ /µl	4.0 - 7.0
RDW_SD	33.5	fl	
RDW_CV	13.6	%	
PDW	17.5	fl	
MPV	12.0	fl	
P_LCR	40.2	%	

