

UNIVERSITE MOHAMMED V

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2011

THESE N°: 64

**Hémoglobinoses D-Punjab : Résultats d'une enquête réalisée
chez une famille marocaine (HMIMV-Rabat)**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mme. Leila ESSAID

Née le 1 Novembre 1985 à Kénitra

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Hémoglobine D-Punjab – β_0 -thalassémie - Double hétérozygotie -
Conseil génétique.

JURY

Mr. A. BELMEKKI

Professeur d'Hématologie

Mme. Z. OUZZIF

Professeur Agrégé de Biochimie

Mme. N. MESSAOUDI

Professeur Agrégé d'Hématologie

Mr. K. DOGHMI

Professeur Agrégé d'Hématologie Clinique

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِمَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



MOHAMMED V- SOUISSI
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

- 1962 - 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ
1969 - 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH
1974 - 1981 : Professeur Bachir LAZRAK
1981 - 1989 : Professeur Taieb CHKILI
1989 - 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI
1997 - 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

ADMINISTRATION :

- Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BENOMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLI Abdeslam Neurochirurgie
4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie -Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
12. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire
13. Pr. BENSOUA Mohamed Anatomie
14. Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique

15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Physiologie

Novembre 1983

16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*

Pneumo-phtisiologie

17. Pr. BALAFREJ Amina

Pédiatrie

18. Pr. BELLAKHDAR Fouad

Neurochirurgie

19. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia

Rhumatologie

20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine

Cardiologie

Décembre 1984

21. Pr. BOUCETTA Mohamed*

%/ nNeurochirurgie

22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil

Radiothérapie

23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz

Médecine Interne

24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi

Anesthésie -Réanimation

25. Pr. NAJI M'Barek *

Immuno-Hématologie

26. Pr. SETTAF Abdellatif

Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27. Pr. BENJELLOUN Halima

Cardiologie

28. Pr. BENSALD Younes

Pathologie Chirurgicale

29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa

Neurologie

30. Pr. IHRAI Hssain *

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale

31. Pr. IRAQI Ghali

Pneumo-phtisiologie

32. Pr. KZADRI Mohamed

Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33. Pr. AJANA Ali

Radiologie

34. Pr. AMMAR Fanid

Pathologie Chirurgicale

35. Pr. CHAHED OUZZANI Houria ép.TAOBANE

Gastro-Entérologie

36. Pr. EL FASSY FHIRI Mohamed Taoufiq

Pneumo-phtisiologie

37. Pr. EL HAITEM Naïma

Cardiologie

38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*

Chimie-Toxicologie Expertise

39. Pr. EL YAACOUBI Moradh

Traumatologie Orthopédie

40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah

Gastro-Entérologie

41. Pr. LACHKAR Hassan

Médecine Interne

42. Pr. OHAYON Victor*

Médecine Interne

43. Pr. YAHYAOUI Mohamed

Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib

Chirurgie Pédiatrique

45. Pr. DAFIRI Rachida

Radiologie

46. Pr. FAIK Mohamed

Urologie

47. Pr. HERMAS Mohamed

Traumatologie Orthopédie

48. Pr. TOLOUNE Farida*

Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

50. Pr. ADNAOUI Mohamed

Médecine Interne

- | | | |
|-----|-------------------------------------|--------------------------|
| 51. | Pr. AOUNI Mohamed | Médecine Interne |
| 52. | Pr. BENAMEUR Mohamed* | Radiologie |
| 53. | Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali | Cardiologie |
| 54. | Pr. CHAD Bouziane | Pathologie Chirurgicale |
| 55. | Pr. CHKOFF Rachid | Pathologie Chirurgicale |
| 56. | Pr. FARCHADO Fouzia ép. BENABDELLAH | Pédiatrique |
| 57. | Pr. HACHIM Mohammed* | Médecine-Interne |
| 58. | Pr. HACHIMI Mohamed | Urologie |
| 59. | Pr. KHARBACH Aïcha | Gynécologie -Obstétrique |
| 60. | Pr. MANSOURI Fatima | Anatomie-Pathologique |
| 61. | Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda | Neurologie |
| 62. | Pr. SEDRATI Omar* | Dermatologie |
| 63. | Pr. TAZI Saoud Anas | Anesthésie Réanimation |

Février Avril Juillet et Décembre 1991

- | | | |
|-----|--------------------------------------|--|
| 64. | Pr. AL HAMANY Zaïtounia | Anatomie-Pathologique |
| 65. | Pr. ATMANI Mohamed* | Anesthésie Réanimation |
| 66. | Pr. AZZOUZI Abderrahim | Anesthésie Réanimation |
| 67. | Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM | Néphrologie |
| 68. | Pr. BELKOUCHI Abdelkader | Chirurgie Générale |
| 69. | Pr. BENABDELLAH Chahrazad | Hématologie |
| 70. | Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif | Chirurgie Générale |
| 71. | Pr. BENSOU DA Yahia | Pharmacie galénique |
| 72. | Pr. BERRAHO Amina | Ophtalmologie |
| 73. | Pr. BEZZAD Rachid | Gynécologie Obstétrique |
| 74. | Pr. CHABRAOUI Layachi | Biochimie et Chimie |
| 75. | Pr. CHANA El Houssaine* | Ophtalmologie |
| 76. | Pr. CHERRAH Yahia | Pharmacologie |
| 77. | Pr. CHOKAIRI Omar | Histologie Embryologie |
| 78. | Pr. FAJRI Ahmed* | Psychiatrie |
| 79. | Pr. JANATI Idrissi Mohamed* | Chirurgie Générale |
| 80. | Pr. KHATTAB Mohamed | Pédiatrie |
| 81. | Pr. NEJMI Maati | Anesthésie-Réanimation |
| 82. | Pr. OUAALINE Mohammed* | Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène |
| 83. | Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH | Pharmacologie |
| 84. | Pr. TAOUFIK Jamal | Chimie thérapeutique |

Décembre 1992

- | | | |
|-----|-----------------------------|-------------------------|
| 85. | Pr. AHALLAT Mohamed | Chirurgie Générale |
| 86. | Pr. BENOUDA Amina | Microbiologie |
| 87. | Pr. BENSOU DA Adil | Anesthésie Réanimation |
| 88. | Pr. BOUJIDA Mohamed Najib | Radiologie |
| 89. | Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza | Gastro-Entérologie |
| 90. | Pr. CHRAIBI Chafiq | Gynécologie Obstétrique |
| 91. | Pr. DAOUDI Rajae | Ophtalmologie |
| 92. | Pr. DEHAYNI Mohamed* | Gynécologie Obstétrique |
| 93. | Pr. EL HADDOURY Mohamed | Anesthésie Réanimation |

95. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
96. Pr. FELLAT Rokaya
97. Pr. GHAFIR Driss*
98. Pr. JIDDANE Mohamed
99. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
100. Pr. TAGHY Ahmed
101. Pr. ZOUHDI Mimoun

Neurochirurgie
 Cardiologie
 Médecine Interne
 Anatomie
 Gynécologie Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie

Mars 1994

102. Pr. AGNAOU Lahcen
103. Pr. AL BAROUDI Saad
104. Pr. BENCHERIFA Fatiha
105. Pr. BENJAAFAR Noureddine
106. Pr. BENJELLOUN Samir
107. Pr. BEN RAIS Nozha
108. Pr. CAOUI Malika
109. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
110. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT
111. Pr. EL AOUAD Rajae
112. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
113. Pr. EL HASSANI My Rachid
114. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur
115. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*
116. Pr. ERROUGANI Abdelkader
117. Pr. ESSAKALI Malika
118. Pr. ETTAYEBI Fouad
119. Pr. HADRI Larbi*
120. Pr. HASSAM Badredine
121. Pr. IFRINE Lahssan
122. Pr. JELTHI Ahmed
123. Pr. MAHFOUD Mustapha
124. Pr. MOUDENE Ahmed*
125. Pr. OULBACHA Said
126. Pr. RHRAB Brahim
127. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR
128. Pr. SLAOUI Anas

Ophtalmologie
 Chirurgie Générale
 Ophtalmologie
 Radiothérapie
 Chirurgie Générale
 Biophysique
 Biophysique
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Gynécologie Obstétrique
 Immunologie
 Traumato-Orthopédie
 Radiologie
 Médecine Interne
 Chirurgie Cardio- Vasculaire
 Chirurgie Générale
 Immunologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Médecine Interne
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique
 Traumatologie - Orthopédie
 Traumatologie- Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Gynécologie -Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

129. Pr. ABBAR Mohamed*
130. Pr. ABDELHAK M'barek
131. Pr. BELAIDI Halima
132. Pr. BRAHMI Rida Slimane
133. Pr. BENTAHILA Abdelali
134. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
135. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
136. Pr. CHAMI Ilham
137. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae

Urologie
 Chirurgie - Pédiatrique
 Neurologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Gynécologie - Obstétrique
 Traumatologie - Orthopédie
 Radiologie
 Ophtalmologie

- | | |
|--|--|
| 138. Pr. EL ABBADI Najia | Neurochirurgie |
| 139. Pr. HANINE Ahmed* | Radiologie |
| 140. Pr. JALIL Abdelouahed | Chirurgie Générale |
| 141. Pr. LAKHDAR Amina | Gynécologie Obstétrique |
| 142. Pr. MOUANE Nezha | Pédiatrie |
|
 | |
| 143. <u>Mars 1995</u> | |
| 144. Pr. ABOUQUAL Redouane | Réanimation Médicale |
| 145. Pr. AMRAOUI Mohamed | Chirurgie Générale |
| 146. Pr. BAIDADA Abdelaziz | Gynécologie Obstétrique |
| 147. Pr. BARGACH Samir | Gynécologie Obstétrique |
| 148. Pr. BEDDOUCHE Amokrane* | Urologie |
| 149. Pr. BENAZZOUZ Mustapha | Gastro-Entérologie |
| 150. Pr. CHAARI Jilali* | Médecine Interne |
| 151. Pr. DIMOU M'barek* | Anesthésie Réanimation |
| 152. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine* | Anesthésie Réanimation |
| 153. Pr. EL MESNAOUI Abbas | Chirurgie Générale |
| 154. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila | Oto-Rhino-Laryngologie |
| 155. Pr. FERHATI Driss | Gynécologie Obstétrique |
| 156. Pr. HASSOUNI Fadil | Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène |
| 157. Pr. HDA Abdelhamid* | Cardiologie |
| 158. Pr. IBEN ATTYA ANDALOSSI Ahmed | Urologie |
| 159. Pr. IBRAHIMY Wafaa | Ophtalmologie |
| 160. Pr. MANSOURI Aziz | Radiothérapie |
| 161. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia | Ophtalmologie |
| 162. Pr. RZIN Abdelkader* | Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale |
| 163. Pr. SEFIANI Abdelaziz | Génétique |
| 164. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali | Réanimation Médicale |
|
 | |
| <u>Décembre 1996</u> | |
| 165. Pr. AMIL Touriya* | Radiologie |
| 166. Pr. BELKACEM Rachid | Chirurgie Pédiatrie |
| 167. Pr. BELMAHI Amin | Chirurgie réparatrice et plastique |
| 168. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim | Ophtalmologie |
| 169. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan | Chirurgie Générale |
| 170. Pr. EL MELLOUKI Ouafae* | Parasitologie |
| 171. Pr. GAOUZI Ahmed | Pédiatrie |
| 172. Pr. MAHFOUDI M'barek* | Radiologie |
| 173. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid | Chirurgie Générale |
| 174. Pr. MOHAMMADI Mohamed | Médecine Interne |
| 175. Pr. MOULINE Soumaya | Pneumo-phtisiologie |
| 176. Pr. OUADGHIRI Mohamed | Traumatologie-Orthopédie |
| 177. Pr. OUZEDDOUN Naima | Néphrologie |
| 178. Pr. ZBIR EL Mehdi* | Cardiologie |
|
 | |
| <u>Novembre 1997</u> | |
| 179. Pr. ALAMI Mohamed Hassan | Gynécologie-Obstétrique |

180. Pr. BEN AMAR Abdesselem	Chirurgie Générale
181. Pr. BEN SLIMANE Lounis	Urologie
182. Pr. BIROUK Nazha	Neurologie
183. Pr. BOULAICH Mohamed	O.RL.
184. Pr. CHAOUIR Souad*	Radiologie
185. Pr. DERRAZ Said	Neurochirurgie
186. Pr. ERREIMI Naima	Pédiatrie
187. Pr. FELLAT Nadia	Cardiologie
188. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra	Radiologie
189. Pr. HAIMEUR Charki*	Anesthésie Réanimation
190. Pr. KANOUNI NAWAL	Physiologie
191. Pr. KOUTANI Abdellatif	Urologie
192. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid	Chirurgie Générale
193. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ	Pédiatrie
194. Pr. NAZI M'barek*	Cardiologie
195. Pr. OUAHABI Hamid*	Neurologie
196. Pr. SAFI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
197. Pr. TAOUFIQ Jallal	Psychiatrie
198. Pr. YOUSFI MALKI Mounia	Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

199. Pr. AFIFI RAJAA	Gastro-Entérologie
200. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*	Pneumo-phtisiologie
201. Pr. ALOUANE Mohammed*	Oto-Rhino-Laryngologie
202. Pr. BENOMAR ALI	Neurologie
203. Pr. BOUGTAB Abdesslam	Chirurgie Générale
204. Pr. ER RIHANI Hassan	Oncologie Médicale
205. Pr. EZZAITOUNI Fatima	Néphrologie
206. Pr. KABBAJ Najat	Radiologie
207. Pr. LAZRAK Khalid (M)	Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

208. Pr. BENKIRANE Majid*	Hématologie
209. Pr. KHATOURI ALI*	Cardiologie
210. Pr. LABRAIMI Ahmed*	Anatomie Pathologique

Janvier 2000

211. Pr. ABID Ahmed*	Pneumophtisiologie
212. Pr. AIT OUMAR Hassan	Pédiatrie
213. Pr. BENCHERIF My Zahid	Ophtalmologie
214. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd	Pédiatrie
215. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine	Pneumo-phtisiologie
216. Pr. CHAOUI Zineb	Ophtalmologie
217. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer	Chirurgie Générale
218. Pr. ECHARRAB El Mahjoub	Chirurgie Générale
219. Pr. EL FTOUH Mustapha	Pneumo-phtisiologie

220. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
 221. Pr. EL OTMANYAzzedine
 222. Pr. GHANNAM Rachid
 223. Pr. HAMMANI Lahcen
 224. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
 225. Pr. ISMAILI Hassane*
 226. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
 227. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
 228. Pr. TACHINANTE Rajae
 229. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Neurochirurgie
 Chirurgie Générale
 Cardiologie
 Radiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Traumatologie Orthopédie
 Gastro-Entérologie
 Anesthésie-Réanimation
 Anesthésie-Réanimation
 Médecine Interne

Novembre 2000

230. Pr. AIDI Saadia
 231. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
 232. Pr. AJANA Fatima Zohra
 233. Pr. BENAMR Said
 234. Pr. BENCHEKROUN Nabihia
 235. Pr. CHERTI Mohammed
 236. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
 237. Pr. EL HASSANI Amine
 238. Pr. EL IDGHIRI Hassan
 239. Pr. EL KHADER Khalid
 240. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
 241. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
 242. Pr. HSSAIDA Rachid*
 243. Pr. LACHKAR Azzouz
 244. Pr. LAHLOU Abdou
 245. Pr. MAFTAH Mohamed*
 246. Pr. MAHASSINI Najat
 247. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
 248. Pr. NASSIH Mohamed*
 249. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Neurologie
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Générale
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Pédiatrie
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Urologie
 Rhumatologie
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques
 Anesthésie-Réanimation
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Neurochirurgie
 Anatomie Pathologique
 Pédiatrie
 Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
 Neurologie

Décembre 2001

250. Pr. ABABOU Adil
 251. Pr. AOUAD Aicha
 252. Pr. BALKHI Hicham*
 253. Pr. BELMEKKI Mohammed
 254. Pr. BENABDELJLIL Maria
 255. Pr. BENAMAR Loubna
 256. Pr. BENAMOR Jouda
 257. Pr. BENELBARHDADI Imane
 258. Pr. BENNANI Rajae
 259. Pr. BENOACHANE Thami
 260. Pr. BENYOUSSEF Khalil
 261. Pr. BERRADA Rachid
 262. Pr. BEZZA Ahmed*

Anesthésie-Réanimation
 Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Néphrologie
 Pneumo-phtisiologie
 Gastro-Entérologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Dermatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Rhumatologie

263. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi	Anatomie
264. Pr. BOUHOUCHE Rachida	Cardiologie
265. Pr. BOUMDIN El Hassane*	Radiologie
266. Pr. CHAT Latifa	Radiologie
267. Pr. CHELLAOUI Mounia	Radiologie
268. Pr. DAALI Mustapha*	Chirurgie Générale
269. Pr. DRISSE Sidi Mourad*	Radiologie
270. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira	Gynécologie Obstétrique
271. Pr. EL HIJRI Ahmed	Anesthésie-Réanimation
272. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid	Neuro-Chirurgie
273. Pr. EL MADHI Tarik	Chirurgie-Pédiatrique
274. Pr. EL MOUSSAIF Hamid	Ophtalmologie
275. Pr. EL OUNANI Mohamed	Chirurgie Générale
276. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil	Radiologie
277. Pr. ETTAIR Said	Pédiatrie
278. Pr. GAZZAZ Miloudi*	Neuro-Chirurgie
279. Pr. GOURINDA Hassan	Chirurgie-Pédiatrique
280. Pr. HRORA Abdelmalek	Chirurgie Générale
281. Pr. KABBAJ Saad	Anesthésie-Réanimation
282. Pr. KABIRI El Hassane*	Chirurgie Thoracique
283. Pr. LAMRANI Moulay Omar	Traumatologie Orthopédie
284. Pr. LEKEHAL Brahim	Chirurgie Vasculaire Périphérique
285. Pr. MAHASSIN Fattouma*	Médecine Interne
286. Pr. MEDARHRI Jalil	Chirurgie Générale
287. Pr. MIKDAME Mohammed*	Hématologie Clinique
288. Pr. MOHSINE Raouf	Chirurgie Générale
289. Pr. NABIL Samira	Gynécologie Obstétrique
290. Pr. NOUINI Yassine	Urologie
291. Pr. OUALIM Zouhir*	Néphrologie
292. Pr. SABBAH Farid	Chirurgie Générale
293. Pr. SEFIANI Yasser	Chirurgie Vasculaire Périphérique
294. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia	Pédiatrie
295. Pr. TAZI MOUKHA Karim	Urologie

Décembre 2002

296. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*	Anatomie Pathologique
297. Pr. AMEUR Ahmed *	Urologie
298. Pr. AMRI Rachida	Cardiologie
299. Pr. AOURARH Aziz*	Gastro-Entérologie
300. Pr. BAMOU Youssef *	Biochimie-Chimie
301. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
302. Pr. BENBOUAZZA Karima	Rhumatologie
303. Pr. BENZEKRI Laila	Dermatologie
304. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*	Gastro-Entérologie
305. Pr. BERNOUSSI Zakiya	Anatomie Pathologique
306. Pr. BICHERA Mohamed Zakariya	Psychiatrie
307. Pr. CHOHO Abdelkrim *	Chirurgie Générale

308. Pr. CHKIRATE Bouchra
 309. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 310. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 311. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 312. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 313. Pr. EL MANSARI Omar*
 314. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 315. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 316. Pr. HADDOUR Leila
 317. Pr. HAJJI Zakia
 318. Pr. IKEN Ali
 319. Pr. ISMAEL Farid
 320. Pr. JAAFAR Abdeloïhab*
 321. Pr. KRIOULE Yamina
 322. Pr. LAGHMARI Mina
 323. Pr. MABROUK Hfid*
 324. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 325. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 326. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 327. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 328. Pr. OUJILAL Abdelilah
 329. Pr. RACHID Khalid *
 330. Pr. RAISS Mohamed
 331. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 332. Pr. RHOU Hakima
 333. Pr. SIAH Samir *
 334. Pr. THIMOU Amal
 335. Pr. ZENTAR Aziz*
 336. Pr. ZRARA Ibtisam*

Pédiatrie
 Chirurgie Pédiatrique
 Urologie
 Gynécologie Obstétrique
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Traumatologie Orthopédie
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

337. Pr. ABDELLAH El Hassan
 338. Pr. AMRANI Mariam
 339. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
 340. Pr. BENKIRANE Ahmed*
 341. Pr. BENRAMDANE Larbi*
 342. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
 343. Pr. BOULAADAS Malik
 344. Pr. BOURAZZA Ahmed*
 345. Pr. CHAGAR Belkacem*
 346. Pr. CHERRADI Nadia
 347. Pr. EL FENNI Jamal*
 348. Pr. EL HANCHI ZAKI
 349. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
 350. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*

Ophtalmologie
 Anatomie Pathologique
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Gastro-Entérologie
 Chimie Analytique
 Anesthésie Réanimation
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Neurologie
 Traumatologie Orthopédie
 Anatomie Pathologique
 Radiologie
 Gynécologie Obstétrique
 Pédiatrie
 Cardiologie

- 351. Pr. HACHI Hafid
- 352. Pr. JABOUIRIK Fatima
- 353. Pr. KARMANE Abdelouahed
- 354. Pr. KHABOUZE Samira
- 355. Pr. KHARMAZ Mohamed
- 356. Pr. LEZREK Mohammed*
- 357. Pr. MOUGHIL Said
- 358. Pr. NAOUMI Asmae*
- 359. Pr. SAADI Nozha
- 360. Pr. SASSENOU ISMAIL*
- 361. Pr. TARIB Abdelilah*
- 362. Pr. TIJAMI Fouad
- 363. Pr. ZARZUR Jamila

Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Traumatologie Orthopédie
 Urologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Gastro-Entérologie
 Pharmacie Clinique
 Chirurgie Générale
 Cardiologie

Janvier 2005

- 364. Pr. ABBASSI Abdellah
- 365. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
- 366. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
- 367. Pr. ALLALI Fadoua
- 368. Pr. AMAR Yamama
- 369. Pr. AMAZOUZI Abdellah
- 370. Pr. AZIZ Nouredine*
- 371. Pr. BAHIRI Rachid
- 372. Pr. BARKAT Amina
- 373. Pr. BENHALIMA Hanane
- 374. Pr. BENHARBIT Mohamed
- 375. Pr. BENYASS Aatif
- 376. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
- 377. Pr. BOUKLATA Salwa
- 378. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
- 379. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
- 380. Pr. EL HAMZAOUI Sakina
- 381. Pr. HAJJI Leila
- 382. Pr. HESSISSEN Leila
- 383. Pr. JIDAL Mohamed*
- 384. Pr. KARIM Abdelouahed
- 385. Pr. KENDOUSI Mohamed*
- 386. Pr. LAAROUSSI Mohamed
- 387. Pr. LYAGOUBI Mohammed
- 388. Pr. NIAMANE Radouane*
- 389. Pr. RAGALA Abdelhak
- 390. Pr. SBIHI Souad
- 391. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
- 392. Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Rhumatologie
 Néphrologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Pédiatrie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

- 423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*

Rhumatologie

424. Pr. AFIFI Yasser
 425. Pr. AKJOUJ Said*
 426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra
 427 Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 428. Pr. BENCHEIKH Razika
 429 Pr. BIYI Abdelhamid*
 430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 432. Pr. CHEIKHAOUI Younes
 433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 434. Pr. DOGHMI Nawal
 435. Pr. ESSAMRI Wafaa
 436. Pr. FELLAT Ibtissam
 437. Pr. FAROUDY Mamoun
 438. Pr. GHADOUANE Mohammed*
 439. Pr. HARMOUCHE Hicham
 440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 441 Pr. IDRIS LAHLOU Amine
 442. Pr. JROUNDI Laila
 443. Pr. KARMOUNI Tariq
 444. Pr. KILI Amina
 445. Pr. KISRA Hassan
 446. Pr. KISRA Mounir
 447. Pr. KHARCHAFI Aziz*
 448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 450. Pr. MANSOURI Hamid*
 451. Pr. NAZIH Naoual
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak
 453. Pr. SAFI Soumaya*
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 455. Pr. SEFIANI Sana
 456. Pr. SOUALHI Mouna
 457. Pr. TELLAL Saida*
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

- Dermatologie
 Radiologie
 Dermatologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio - Vasculaire
 Chirurgie Cardio - Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie - Pédiatrique
 Médecine Interne
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo - Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo - Phtisiologie

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *
 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
 463. Pr. TOUATI Zakia
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra *
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *

- Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie
 Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire

468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *	Chirurgie cardio vasculaire
469. Pr. EL ABSI Mohamed	Chirurgie générale
470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *	Chirurgie générale
471. Pr. ACHOUR Abdessamad *	Chirurgie générale
472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq *	Chirurgie générale
473. Pr. GHARIB Nouredine	Chirurgie plastique
474. Pr. TABERKANET Mustafa *	Chirurgie vasculaire périphérique
475. Pr. ISMAILI Nadia	Dermatologie
476. Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
477. Pr. RABHI Monsef *	Médecine interne
478. Pr. MRABET Mustapha *	Médecine préventive santé publique et hygiène
479. Pr. SEKHSOKH Yessine *	Microbiologie
480. Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
481. Pr. LOUZI Lhoussain *	Microbiologie
482. Pr. MRANI Saad *	Virologie
483. Pr. GANA Rachid	Neuro chirurgie
484. Pr. ICHOU Mohamed *	Oncologie médicale
485. Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
486. Pr. BOUTIMZINE Nouridine	Ophtalmologie
487. Pr. MELLAL Zakaria	Ophtalmologie
488. Pr. AMMAR Haddou *	ORL
489. Pr. AOUI Sarra	Parasitologie
490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
492. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
493. Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib *	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
500. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
501. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
502. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
503. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
504. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
505. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. AZENDOUR Hicham *	Anesthésie Réanimation
Pr. BELYAMANI Lahcen *	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUHSAIN Sanae *	Biochimie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal *	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADE Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire

Pr. AMAHZOUNE Brahim *
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. ABOUZAHIR Ali *
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. EL OUENNASS Mostapha
 Pr. ZOUHAIR Said*
 Pr. L'kassimi Hachemi*
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. BASSOU Driss *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 Pr. KADI Said *

Chirurgie Cardio-vasculaire
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Dermatologie
 Gastro-entérologie
 Gynécologie obstétrique
 Hématologie biologique
 Hématologie biologique
 Hématologie clinique
 Médecine interne
 Médecine interne
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Neuro-chirurgie
 Neurologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phtisiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Rhumatologie
 Traumatologie orthopédique
 Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. CHERRADI Ghizlan
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. KANOUNI Lamya
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. BOUSSIF Mohamed*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL SAYEGH Hachem

Médecine interne
 Gastro entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie réanimation
 Radiothérapie
 Radiologie
 Radiologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Médecine aérologique
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Chirurgie pédiatrique
 Urologie

Pr. MOUJAHID MOUNTASSIR*
 Pr. RAISSOUNI Zakaria*
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. LEZREK Mounir
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. ZOUAIDIA Fouad
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. CHADLI Mariama*

Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 ORL
 Ophtalmologie
 Hématologie
 Anatomie pathologique
 Anatomie pathologique
 Physiologie
 Biochimie chimie
 Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

1. Pr. ABOUDRAR Saadia
2. Pr. ALAMI OUHABI Naima
3. Pr. ALAOUI KATIM
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
5. Pr. ANSAR M'hammed
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed
9. Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia
10. Pr. DAKKA Taoufiq
11. Pr. DRAOUI Mustapha
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen
13. Pr. ETTAIB Abdelkader
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbas
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine
17. Pr. KABBAJ Ouafae
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine
19. Pr. REDHA Ahlam
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
21. Pr. TOUATI Driss
22. Pr. ZAHIDI Ahmed
23. Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
 Biochimie
 Pharmacologie
 Histologie-Embryologie
 Chimie Organique et Pharmacie Chimique
 Applications Pharmaceutiques
 Génétique Humaine
 Microbiologie
 Biochimie
 Physiologie
 Chimie Analytique
 Pharmacognosie
 Zootechnie
 Pharmacologie
 Chimie Organique

 Biochimie
 Biologie
 Biochimie
 Chimie Organique
 Pharmacognosie
 Pharmacologie
 Chimie Organique

* * * *Enseignants Militaires*

Dédicaces





A Ma très chère mère Fatima ESSAID

A ma mère, à mon adorable mère, à celle qui est toujours présente et continue de l'être pour faire mon bonheur. Merci pour t'être sacrifiée pour que tes enfants grandissent et prospèrent. Merci de trimer sans relâche, malgré les péripéties de la santé et de la vie, au bien-être de tes enfants.

Merci tout simplement d'être... ma mère

Il est à vous ce travail, ainsi que tout mon cœur, il est à vous, ma Mère !

Puisse Allah le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.



A Mon très cher père Lahcen ESSAID

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Vous n'avez pas cessé de m'encourager tout au long de mes études et surtout aux moments les plus pénibles.

J'espère que vous appréciez cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a la chance d'avoir un exceptionnel père, enseignant, et ami unique au monde .

Que Allah vous garde et qu'il m'aide à vous satisfaire d'avantage.



A mon très cher mari Jaouad AJEBLI

*Pour l'intérêt que tu portes à ma vie, pour ta compréhension, tes
encouragements et ton aide précieux.*

*Aucun mot ni expression ne suffirait pour te remercier et traduire mes
bons fonds sentiments d'amour et de respect.*

Que dieu t'accorde une vie pleine de santé et de bonheur.



À mes très chères soeurs Siham, Sanaa et Maha

*À travers ce travail je vous exprime toute mon affection mon
attachement et mon amour éternel.*

*Que DIEU vous préserve un bon avenir plein de bonheur et de
réussite.*

Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.



A la mémoire de mon cousin Ali ESSAID

Puisse Allah, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.

*A mes chers oncles, chères tantes, ainsi que mes chers
cousins et cousines*

*J'espère du fond du coeur que tout ce petit monde familial,
mon monde à moi, trouve ici un mot de reconnaissance. J'espère aussi
que l'effort déployé dans le présent travail réponde aux attentes des uns et
des autres.*



À mes très chères amies

*Assia, Hassna, Ibtissam, Maria, Rajae, Nadia, Noura et Siham.
Vos encouragements, étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait
dans les moments pénibles, de solitude et de souffrance, où l'on a
terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il,
de soutien moral.*

*Que ce modeste travail soi un gage de nos liens les plus
solidaires.*



A Tous Mes enseignants tout au long de mes études.

A tous ceux que j'aime....

A toute ma promotion

*A tous ceux qui ont participé de près ou
de loin à la réalisation de ce travail.*

*A tous ceux qui ont cette pénible tâche
de soulager les gens et diminuer leurs
souffrances.*

Remerciements





A Notre Maître Et Président De Thèse
Monsieur ABDELKADER BELMEKKI
Professeur d'Hématologie
HMIMV-RABAT

Permettez-nous de vous exprimer nos sincères remerciements. C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse avec plaisir et sans conditions.

Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont énormément marqués.

Veillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.



*A Notre Maître Et Rapporteur De Thèse
Madame ZOÛRA OÛZZIF
Professeur Agrégé de Biochimie
HMIMV-RABAT*

Nous vous remercions vivement de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail.

Vous nous avez aidé jusqu'au dernier moment avec un grand savoir et des orientations éclairantes accompagnées d'une grande gentillesse.

Sans votre Clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables.

Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Qu'ALLAH vous protège et vous accorde santé, bonheur et prospérité à vous et à vos enfants.



*A Notre Maître Et Juge De Thèse
Madame Nezha MESSAOUDI
Professeur agrégé d'hématologie
HMIMV-RABAT*

*Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites
en acceptant de juger ce travail.*

*Nous sommes très sensibles à votre gentillesse et à votre accueil très
aimable.*

*Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre
admiration ainsi que notre gratitude.*

Veillez croire, cher maître, en nos sentiments les plus respectueux,



A Notre Maître Et Juge De Thèse
Monsieur KAMAL DOGHMI
Professeur Agrégé d'hématologie clinique
HMIMV-RABAT

Nous sommes particulièrement touchés par la spontanéité et la gentillesse avec lesquelles vous avez bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous sommes très sensibles à votre accueil très aimable.

Votre compétence et votre sérieux sont pour nous un noble idéal.

Veillez accepter, cher maître, ce travail avec toute notre estime et notre profond respect.



Dr MOHAMMED ABDELLATIFI

Directeur du laboratoire IBN SINA-Rabat

Nous portons une grande considération tant pour votre gentillesse que pour vos qualités professionnelles.

Merci infiniment pour l'aide précieuse que vous m'avez apporté pour

La réalisation de ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance la plus sincère.



Dr ANAS YAHYAOUI
Médecin Résidant en Biologie
HMIMV-Rabat

*Nous portons une grande considération tant pour votre
gentillesse que pour vos qualités professionnelles.*

Vous nous avez énormément aidé à la réalisation de ce travail.

*Veillez trouver ici, l'expression de notre profond respect
et de notre sincère reconnaissance.*

**LISTES DES ABREVIATIONS,
DES FIGURES ET DES
TABLEAUX**

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adénine
ADN	Acide Désoxy ribonucléique
AFSC	Hémoglobines A, F, S et C
Ala	Alanine
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ASAT	Aspartate Amino Transférase
C	Cytosine
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CNTS	Centre Nationale de Transfusion Sanguine
CRP	C-Réactive Protéine
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycérate
ddNTP	didésoxynucléotides triphosphates
EC	Electrophorèse Capillaire
Fl	Femtolitre
G	Guanine
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
GR	Globule Rouge
Hb	Hémoglobine
Hb A	Hémoglobine Adulte
Hb F	Hémoglobine Foetale
HbP	Hémoglobinopathie
HMIMV	Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V
IEF	Immunoélectrofixation

Ile	Isoleucine
IMG	Interruption Médicale de Grossesse
Kb	Kilo bases
LDH	Lactate Déshydrogénase
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCV	Mean Corpuscular Volume
NFS	Numération Formule Sanguine
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pg	Picogramme
PHHF	Persistence Héritaire de l'Hémoglobine Foétale
PO ₂	Pression partielle en Oxygène
RBC	Red Blood Cell
RDW	Red blood cell Distribution Width
Structure R	Structure Relachée
T	Thymine
Thr	Thréonine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Automate Beckman® de la société Coulter.....	6
Figure 2 : Automate Hydrasys® de chez Sebia.....	7
Figure 3 : Automate Capillarys® de chez Sebia.....	7
Figure 4 : Profil de migration des fractions de l'Hb sur gel d'agarose à pH alcalin.....	8
Figure 5 : Profil normal de l'électrophorèse de l'Hb sur gel d'agarose à pH alcalin.....	8
Figure 6 : Profil normal de l'électrophorèse capillaire de l'Hb à pH alcalin.....	10
Figure 7 : Position des hémoglobines normales et anormales sur gel d'agarose après électrophorèse à pH acide.....	11
Figure 8 : Automate Dimention RXL® de la société Dade Behring.	12
Figure 9 : Electrophorégramme obtenu après séquençage.	15
Figure 10 : Photo-lame montrant une Anisocytose	17
Figure 11 : Photo-lame objectivant des Hématies cibles.....	17
Figure 12 : Photo-lame présentant une hypochromie microcytaire.....	17
Figure 13 : Profil électrophorétique de l'Hb du propositus à pH alcalin.	18
Figure 14 : Résultat de l'électrophorèse de l'Hb du propositus à pH acide.	18
Figure 15 : Profils électrophorétiques de l'Hb à pH alcalin des membres de la famille du propositus.....	27
Figure 16 : Structure tétramérique de l'hémoglobine.	32
Figure 17 : Structure tertiaire de l'une des quatre chaînes	32
Figure 18 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine.....	34
Figure 19 : Expression des gènes globine au cours du développement ontogénique.....	37
Figure 20 : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine.....	39
Figure 21 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule de l'Hb adulte (HbA). Les régions fonctionnellement importantes sont indiquées ainsi que les conséquences physiopathologiques des différents variants selon la localisation de la mutation dans la molécule.....	44
Figure 22 : Répartition géographique des principales Hb anormales	46
Figure 23 : Répartition géographique des thalassémies dans le monde	47

Figure 24 : Transmission autosomique récessive.....	49
Figure 25 : La pseupolyglobulie microcytaire dans les thalassémies hétérozygotes.....	58
Figure 26 : Démarche diagnostique au laboratoire pour la détection d'une Hb anormale.	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principes analytiques et réactifs utilisés pour le dosage des paramètres biochimiques.....	13
Tableau II : Résultats du bilan biologique du Propositus/Valeurs de référence.....	19
Tableau III : Données démographiques et hématologiques des membres de la famille du propositus.....	21
Tableau IV : Données biochimiques des membres de la famille du propositus.....	22
Tableau V : Données électro phorétiques des cas de la famille du propositus.....	23
Tableau VI : Structure comparée des peptides β T-13 de l'Hb A et de l'Hb D-Punjab....	51
Tableau VII : Répartition et incidence de l'Hb D-Punjab	53
Tableau VIII : Données biologiques des cas de la double hétérozygotie Hb D-Punjab/ β 0-thalassémie rapportés dans la littérature.....	59
Tableau IX : Techniques électrophorétiques et chromatographiques de l'exploration phénotypique de l'Hb.....	64

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PATIENTS & METHODES	4
1. Patients	4
2. Méthodes	4
2.1. La phase pré-analytique	4
2.1.1. Fiche d'exploitation.....	4
2.1.2. Les prélèvements.....	5
2.2. L'exploration biologique	5
2.2.1. Détermination des paramètres hématologiques.....	6
2.2.2. Analyses biochimiques.....	7
2.2.2.1. Electrophorèse de l'Hb	7
2.2.2.2. Technique chromatographique (CLHP)	11
2.2.2.3. Autres examens biochimiques	12
2.2.3. Analyse génétique (PCR Séquençage)	13
2.2.3.1. Amplification génique	13
2.2.3.2. Réaction de séquence.....	13
2.2.3.3. Migration et analyse	15
1. Le propositus	17
2. La famille du propositus	20
DISCUSSION.....	28
1. Discussion générale	29
1.1. L'hémoglobine	29
1.1.1. Définition.....	29
1.1.2. Structure	29
1.1.2.1. Structure primaire	30
1.1.2.2. Structure secondaire	30
1.1.2.3. Structure tertiaire	31
1.1.2.4. Structure quaternaire.....	31

1.1.2.5.	Structure supra quaternaire	31
1.1.3.	Fonction	32
1.1.3.1.	Transport de l'O ₂	33
1.1.3.2.	Transport du CO ₂	35
1.1.3.3.	Effet Bohr	35
1.1.4.	Evolution ontogénique des hémoglobines humaines	36
1.1.5.	Les gènes de globine	37
1.1.5.1.	Localisation et organisation des gènes de globine	37
1.1.5.2.	Structure des gènes de globine	40
1.2.	Les hémoglobinopathies (HbP)	40
1.2.1.	Les hémoglobinopathies qualitatives ou structurales	40
1.2.2.	Les hémoglobinopathies quantitatives ou thalassémies	41
1.2.2.1.	La β- thalassémie	42
1.2.2.2.	L'alpha thalassémie	43
1.2.3.	Bases moléculaires des maladies dues à une hémoglobine anormale ..	43
1.2.3.1.	Mutations de la poche de l'hème	44
1.2.3.2.	Mutations des zones de contact	45
1.2.3.3.	Mutations de la cavité centrale	45
1.2.4.	Répartition géographique des principales hémoglobinopathies	45
2.	Discussion des résultats	47
2.1.	L'hémoglobine D-Punjab	47
2.1.1.	C'est quoi ?	47
2.1.2.	Quelles Propriétés physicochimiques ?	48
2.1.3.	Qu'en est-il de sa Pathogénie ?	48
2.1.4.	Distribution et incidence ?	51
2.1.5.	Quels tableaux clinique et Biologique ?	54
2.1.5.1.	La forme hétérozygote	54
2.1.5.2.	La forme homozygote	54
2.1.5.3.	La double hétérozygotie Hb S/Hb D-Punjab	55
2.1.5.4.	Hb D-Punjab / Hb O-Indonésie	55
2.1.5.5.	Hb D-Punjab / Hb G-Philadelphie	56

2.1.5.6. Hb D-Punjab/ α -thalassémie.....	56
2.1.5.7. La double hétérozygotie Hb D-Punjab / β -thalassémie.....	56
2.2. Démarche diagnostique au laboratoire	60
2.2.1. Circonstances de l'étude de l'hémoglobine au laboratoire	60
2.2.2. Etape pré-analytique.....	61
2.2.2.1. Renseignements à mentionner sur la demande d'examen	61
2.2.2.2. Prélèvement.....	61
2.2.3. Phase analytique.....	62
2.2.3.1. Exploration phénotypique	62
2.2.3.1.1. Techniques électrophorétiques et chromatographiques	62
2.2.3.1.2. Paramètres hématologiques.....	69
2.2.3.1.3. Autres examens complémentaires.....	70
2.2.3.2. Analyse génotypique	71
2.2.4. Phase post analytique	72
2.2.4.1. Interprétation des résultats	72
2.2.4.2. Conseil génétique	80
CONCLUSION & RECOMMANDATIONS	74

INTRODUCTION

Les hémoglobinopathies (HbP), ou maladies de l'hémoglobine, sont des anomalies héréditaires autosomiques récessives les plus répandues dans le monde chez l'humain [1].

Elles sont provoquées par les changements (ou mutations) des séquences codantes, non codantes ou régulatrices des gènes de globine responsables d'anomalies qualitatives générant des hémoglobines anormales ou variants d'Hb et/ou quantitatives touchant les chaînes de globine α ou β à l'origine d'alpha ou bêta-Thalassémie [1]. Ces anomalies sont parfois graves et se manifestent généralement par une anémie hémolytique [2].

De par leur fréquence et leur sévérité, ces premières maladies génétiquement déterminées constituent un sérieux problème de santé publique [2].

Elles présentent une répartition mondiale bien particulière, comparable à celle de l'endémie paludéenne. Toutefois, cette répartition tend à devenir historique du fait des mouvements de population qui ont eu lieu vers l'Amérique du Nord et du Sud puis, plus récemment, vers l'Europe du Nord-Ouest [3].

Les taux de prévalence sont en croissance continue à cause de la migration, l'analphabétisme et la consanguinité [4].

A l'heure actuelle, on estime que 5% de la population mondiale est concerné par les hémoglobinopathies dont les plus courantes sont la thalassémie et la drépanocytose. Plus de 350.000 enfants atteints par ces maladies sont nés chaque année, un pourcentage important d'entre eux meurt dans les pays concernés à faible et moyen revenu [5].

La prévalence varie de moins de 0,1 cas pour 1000 naissances dans certaines régions du monde à plus de 20 pour 1000 en Afrique. Aux Etats-Unis d'Amérique, 10 % de la population sont exposés au risque d'anémie drépanocytaire et dans le Nord-Ouest de l'Europe, entre 2 et 9% des gens appartiennent aux minorités ethniques exposées à un risque de maladie de l'hémoglobine. Dans certains pays d'Asie du Sud-Est, il peut y avoir jusqu'à 40 % de porteurs de mutations importantes des gènes de l'hémoglobine, ce qui entraîne un accroissement des taux de nourrissons nés avec une thalassémie [6].

Il s'agit bien, en effet, de maladies différentes dans leur expression clinique et leur physiopathologie. Dans leur forme classique, ni la présentation, ni l'évolution ne sont les mêmes. Au niveau génétique, le mode de transmission est autosomique récessif. Des dizaines de mutations ponctuelles et délétionnelles ont été répertoriées dans les clusters α et β globine. Selon leur localisation (promoteurs, régions codantes ou non codantes), leur taille (délétions de 1 paire de base à plusieurs kilo bases) et leur présence à l'état homozygote ou hétérozygote, ces défauts moléculaires causent différentes hémoglobinopathies dont l'expression phénotypique varie des formes les plus bénignes aux plus sévères [7].

Les Hb anormales ont été les variants protéiques les mieux décrits depuis la mise en évidence en 1949 du premier d'entre eux, l'HbS, responsable de la drépanocytose [7]. Très rapidement de nombreux mutants de l'hémoglobine ont été identifiés [8].

Plus de 1000 variants sont aujourd'hui répertoriés dans la banque de données HbVar [9]. Seuls un tiers d'entre eux ont des répercussions cliniques, la mutation intervenant dans une zone critique pour le fonctionnement de la molécule [10].

Les anomalies structurales de l'hémoglobine sont généralement classées en variants fréquents ou relativement fréquents (hémoglobine S, hémoglobine E, hémoglobine C...) et en variants moins fréquents de gravité variable, allant de la simple curiosité génétique jusqu'à des tableaux cliniques sévères [10].

Parmi les mutants ponctuels rares figure le groupe des hémoglobines D, dont appartient le variant Hb D-Punjab [11].

Dans le présent travail, nous tenterons à travers une étude de cas marocains d'une même famille atteinte de la double hétérozygotie Hb D-Punjab/ β -thalassémie, de faire la lumière sur ce mutant rarement (jamais) rapporté dans la littérature (marocaine), de présenter la démarche diagnostique requise pour son exploration et son suivi, et surtout de souligner l'intérêt dans ce contexte du conseil génétique, outil incontournable dans la prévention de ce type de pathologie.

1. PATIENTS

Il s'agit d'une étude de cas d'hémoglobinopathie D-Punjab, issus de la même famille, répertoriés de façon transversale au laboratoire de biochimie, à l'HMIMV.

A partir de la découverte d'un cas de double hétérozygotie Hb D-Punjab / β -thalassémie chez une patiente (propositus) de 40 ans originaire de Rabat (Zaër), adressée par le service d'hématologie clinique, nous avons mené une enquête familiale qui a initialement intéressé la petite famille composée du mari et des trois enfants du propositus, pour englober par la suite la fratrie et leur descendance.

2. METHODES

2.1. La phase pré-analytique

2.1.1. Fiche d'exploitation

L'identification adéquate d'une anomalie de l'hémoglobine suppose de disposer de renseignements précis accompagnant la demande d'examen [12]. Pour cela, une fiche d'exploitation a été renseignée pour chaque membre inclus. Elle comporte des données relatives au patient, notamment son identité (nom, prénom, sexe, âge, origine ethnique), les renseignements cliniques fournis par le médecin prescripteur ou par le patient lui-même (signes cliniques, antécédents pathologiques, antécédents familiaux, notion de consanguinité dans le couple).

Ont également été reportés sur la fiche, outre les données de l'électrophorèse de l'Hb aux deux pH alcalin et acide et de la technique chromatographique, les résultats du bilan biologique, en particulier ceux de l'hémogramme, de l'étude du frottis sanguin, du bilan martial (fer sérique, ferritine, transferrine) ainsi que les chiffres d'autres paramètres biochimiques comme la CRP, les LDH, la bilirubine.

2.1.2. Les prélèvements

Pour chacun des patients inclus dans la présente étude, des prélèvements sanguins ont été effectués sur:

- *Un tube sec (bouchon rouge), pour le bilan martial, CRP, LDH, bilirubine...*
- *Deux tubes EDTA (bouchon violet) dont l'un a été adressé au service d'hématologie pour l'hémogramme, l'étude du frottis sanguin et le test d'Emmel. Le second a été utilisé pour l'étude de l'hémoglobine (électrophorèse aux pH alcalin et acide, analyse chromatographique).*

L'analyse génétique n'a été réalisée que pour le cas index (propositus) et a nécessité l'obtention de son consentement éclairé ainsi que le prélèvement de sang sur un 3^{ème} tube EDTA adressé à un laboratoire spécialisé sur le territoire français.

2.2. L'exploration biologique

L'exploration des HbP a inclus, dans le présent travail, un bilan hématologique (NFS, étude du frottis sanguin) réalisé au laboratoire d'hématologie de l' HMIMV, le dosage de certains paramètres biochimiques notamment la ferritine, la bilirubine totale, l'activité des ASAT et des LDH, ainsi que la séparation et l'estimation quantitative des fractions d'Hb. La détermination d'autres paramètres comme le fer ou encore l'haptoglobine, faisant partie respectivement du bilan martial et celui d'hémolyse, n'a pu être réalisé en raison de l'indisponibilité des réactifs respectifs au moment de l'étude.

L'électrophorèse de l'Hb en milieu alcalin et acide a été utilisée en première intention. Cette technique de séparation physique, disponible au sein du laboratoire de biochimie de l'HMIMV, met en évidence des variants dont la charge ou l'affinité pour un support permettent de les séparer des fractions normales, notamment les hémoglobines A ou Ao (HbAo), A₂ (HbA₂) et foétale (HbF) [13].

La détermination quantitative des fractions mineures, notamment le taux d'HbA₂ particulièrement important pour le diagnostic des syndromes thalassémiques et celui

d'HbF qui représente un critère essentiel du diagnostic des persistances héréditaires de l'HbF et un critère pronostique dans les syndromes drépanocytaires majeurs [13]. Elle a été réalisée par une analyse en CLHP sur échangeur de cations (Variant II® de Bio-Rad) au laboratoire Ibn Sina à Rabat.

Le propositus a bénéficié, en plus, d'une analyse de son ADN par technique de biologie moléculaire (PCR Séquençage) effectuée au laboratoire Cerba en France.

2.2.1. Détermination des paramètres hématologiques

L'hémogramme a été réalisé avec un compteur automatique d'hématologie de type Beckman® de la société Coulter (*figure 1*).



Figure 1 : Automate Beckman® de la société Coulter
(Laboratoire d'Hématologie, HMIMV)

2.2.2. Analyses biochimiques

2.2.2.1. Electrophorèse de l'Hb

La structure spatiale de l'Hb dépend de la nature et de la séquence des acides aminés constituant les chaînes. Les liaisons qui se forment entre les différents acides aminés sont responsables de la forme de la molécule, de sa stabilité et de ses propriétés. Placées dans un champ électrique, les Hb se déplacent en fonction de leur charge, de la taille de la molécule, de la force ionique, du pH du tampon et de la nature du support. Les variants de l'Hb sont dus à des mutations de certains acides aminés, entraînant des charges de surface différentes et donc des mobilités différentes en électrophorèse [14].

a. Electrophorèse de l'hémoglobine à PH alcalin (PH=8,5) sur Hydrasys® de Sebia.

L'HYDRAGEL 7 HEMOGLOBINE et L'HYDRAGEL 15 HEMOGLOBINE permettent la séparation des Hb normales (A et A₂) et la détection des principales Hb anormales : S ou D et C ou E, par électrophorèse sur gel d'agarose dans le système semi-automatique HYDRASYS (*figure 2*). L'analyse est faite sur l'hémolysât des GR lavés. Le système HYDRASYS permet de réaliser toutes les séquences jusqu'à l'obtention du gel prêt pour l'identification des différentes hémoglobines [14].



Figure 2 : Automate Hydrasys®



Figure 3 : Automate Capillarys®

De chez Sébia

(Laboratoire de biochimie, HMIMV)

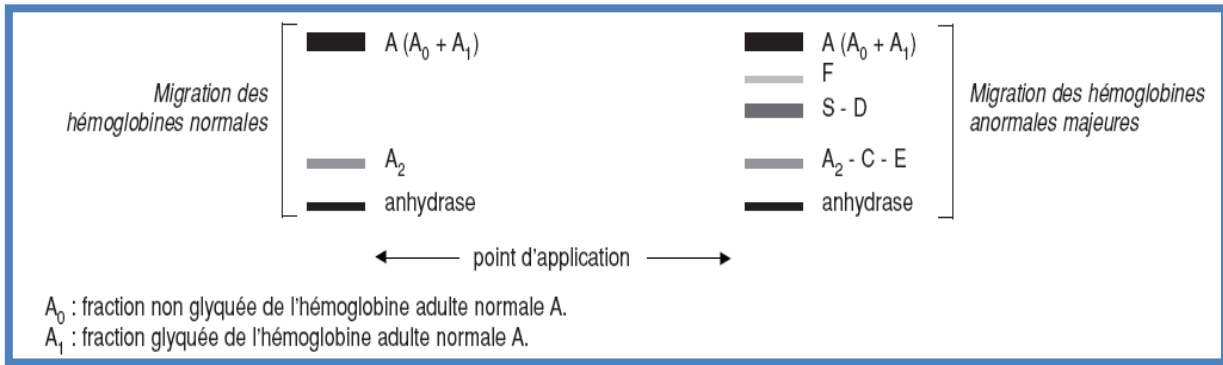


Figure 4 : Profil de migration des fractions de l'Hb sur gel d'agarose à pH alcalin

(HYDRASYS DE SEBIA)

Les Hb sont séparées en tampon alcalin (pH=8,5) et colorées par une solution d'amidoschwarz. La densitométrie donne une qualification relative précise de chaque zone individualisée. La lecture à 570 nm par densitométrie permet de définir les concentrations relatives (pourcentages) de chaque fraction [14] (figure 5).

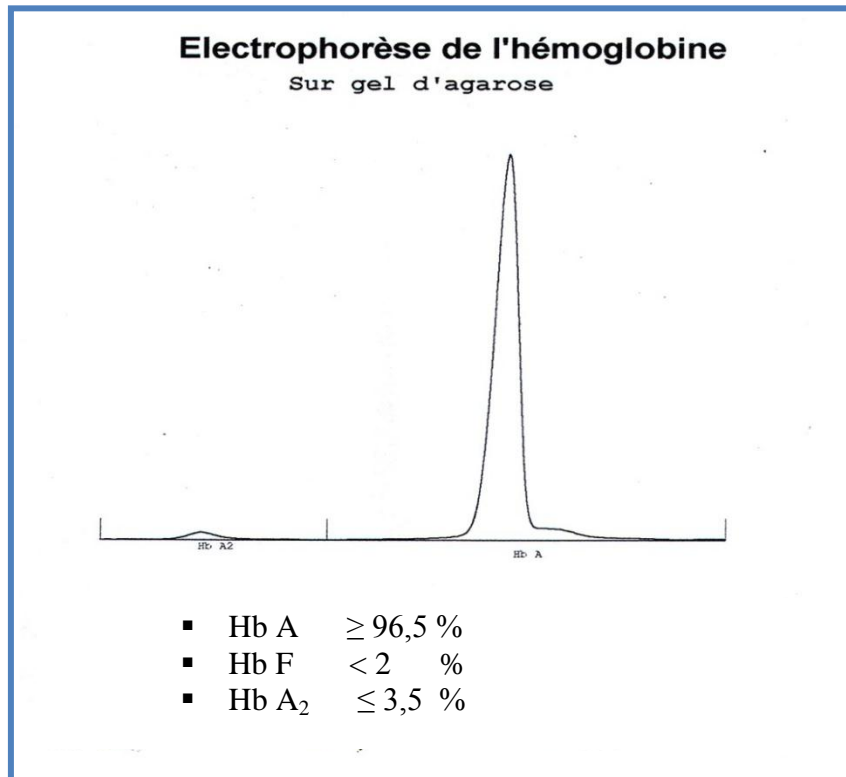


Figure 5 : Profil normal de l'électrophorèse de l'Hb sur gel d'agarose à pH alcalin.
(Laboratoire de Biochimie, HMIMV)

Les valeurs normales pour chaque fraction d'hémoglobine ont été établies à partir d'une population d'adultes (hommes et femmes), en bonne santé.

b. Electrophorèse de l'Hb à pH alcalin sur Capillarys® de Sebia

Le kit CAPILLARYS HEMOGLOBINE permet de séparer en milieu basique (pH=9,4) des hémoglobines normales du sang humain (A, F et A₂) et la détection des principales hémoglobines anormales (notamment S, C, E et D) par électrophorèse capillaire dans le système automatique CAPILLARYS (*figure 3*). Le système CAPILLARYS permet de réaliser toutes les séquences de l'électrophorèse jusqu'à l'obtention du profil d'hémoglobine pour l'analyse qualitative ou quantitative. L'analyse peut être réalisée sur l'hémolysat de globules rouges sédimentés, centrifugés ou lavés ; en effet le lavage des globules rouges est indispensable.

Les hémoglobines, séparées dans des capillaires en silice fondue, sont détectées directement au niveau d'une cellule sur le capillaire par spectrophotométrie d'absorbance à 415 nm, longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines.

Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies. La détection directe donne automatiquement une quantification relative précise de chaque fraction individualisée. De plus, la bonne séparation des différentes fractions permet de confirmer l'identification des fractions de l'hémoglobine, en particulier, de différencier l'hémoglobine S de l'hémoglobine D, et l'hémoglobine E de l'hémoglobine C.

La quantification de l'hémoglobine A₂ est également possible en présence d'hémoglobine E.

La détection directe sur capillaire à 415 nm permet de déterminer les concentrations relatives (pourcentages) de chaque fraction [15] (*figure 6*).

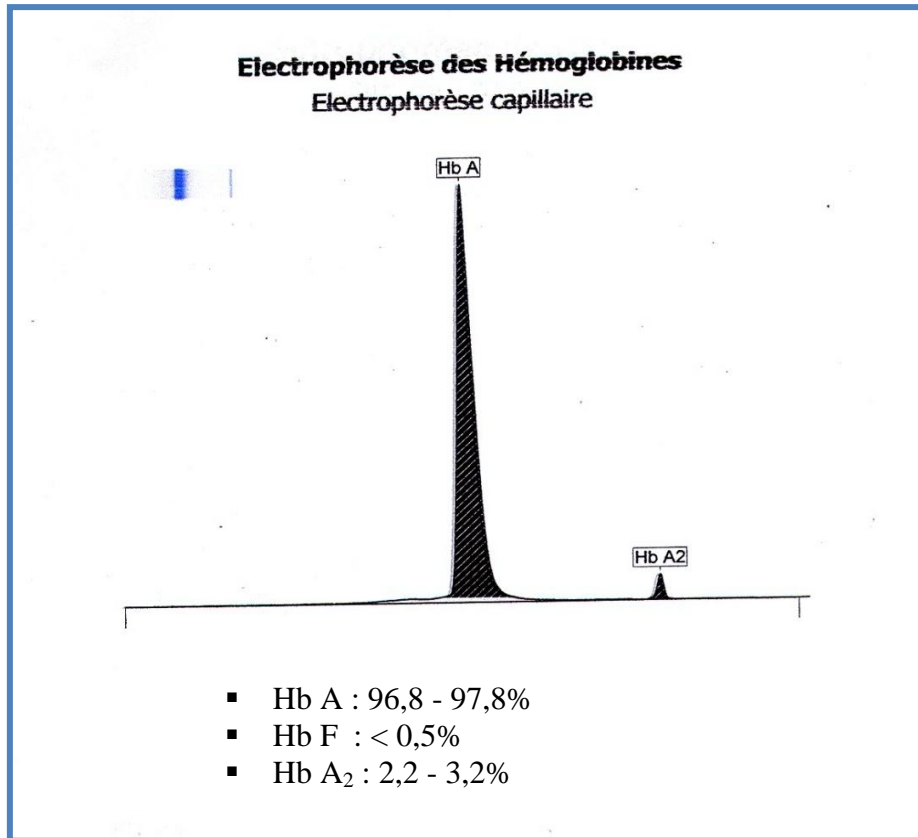


Figure 6 : Profil normal de l'électrophorèse capillaire de l'Hb à pH alcalin.
(Laboratoire de Biochimie, HMIMV)

Les valeurs normales pour chaque fraction d'hémoglobine ont été établies à partir d'une population d'adultes (hommes et femmes), en bonne santé, présentant des valeurs normales en HPLC.

c. Electrophorèse de l'hémoglobine à pH acide (pH = 6,0) sur citrate-agar

La migration des hémoglobines sur gel d'agar en citrate à pH acide n'est pas à proprement parler une électrophorèse puisque la migration n'y est pas en rapport avec la charge. Dans ces conditions, l'hémoglobine se lie de façon réversible à l'agaropectine, et le complexe formé migre vers l'anode. D'autre part, le courant d'électro-endosmose provoque une diffusion continue vers la cathode. Ces deux mouvements de directions opposées séparent donc les hémoglobines en fonction de leur affinité pour

l'agaropectine. Cette affinité est directement liée à la conformation de certaines régions de la molécule, en particulier celle où se situe la substitution de l'HbS, et toutes les zones impliquées dans les interactions avec les anions.

L'électrophorèse sur citrate-agar à pH acide est l'un des tests classiques de diagnostic positif de l'HbS et l'Hb C.

Les hémoglobines HbD et HbE migrent au même endroit que les hémoglobines HbA (figure 7).

L'électrophorèse à PH acide constitue un indispensable complément de l'électrophorèse en gel alcalin, notamment pour différencier les hémoglobines S et C des hémoglobines D et E, respectivement [16].

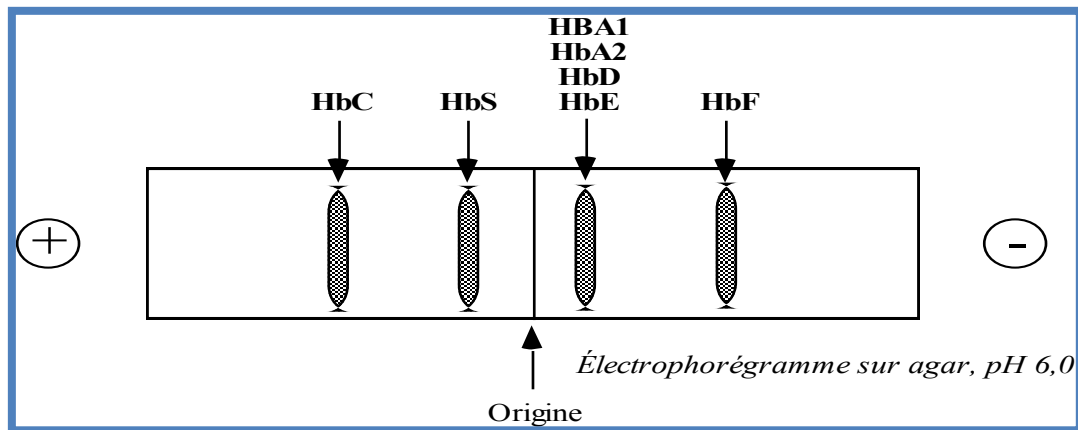


Figure 7 : Position des hémoglobines normales et anormales sur gel d'agarose après électrophorèse à pH acide [16].

2.2.2.2. Technique chromatographique (CLHP) [17]

Elle est appliquée sur le Variant II® de Bio-Rad. La colonne analytique (« CLHP A₂ ») est une colonne échangeuse de cations (150 x 4 mm). Cette colonne est placée dans une enceinte thermostatée maintenue à 34 °C, et montée en parallèle de la colonne destinée au dosage de l'HbA_{1c}.

La détection est réalisée à deux longueurs d'onde, 415 et 690 nm. Un système micro-informatique d'analyse des chromatogrammes sur logiciel « HBSCR » calcule les pourcentages des différentes fractions d'hémoglobine de chaque échantillon à partir des

surfaces des pics. Le taux d'HbA₂ étant corrigé par un facteur de réponse établi à partir du chromatogramme de l'étalon passé en début de série.

Les réactifs utilisés (réactif hémolysant, tampons d'élution phosphates de force ionique croissante et de pH différents 1, 2 et 3, solution de lavage, étalon) sont contenus dans le kit Bio-Rad A₂.

C'est la seule technique permettant un dosage précis de l'Hb F et de l'Hb A₂. De plus, grâce à l'analyse des temps de rétention, la CLHP est un outil précieux pour préciser ou confirmer l'identification d'hémoglobines anormales.

Les valeurs de référence chez l'adulte (> 6 mois) :

- *Hb A* : 96-98%
- *Hb A₂* : 2-3.2%
- *Hb F* < 1%

2.2.2.3. *Autres examens biochimiques*

Les autres paramètres biochimiques analysés, notamment le fer sérique, la ferritine, la bilirubine totale, l'activité des ASAT et des LDH ont été déterminés sur un auto-analyseur multiparamétrique de type *Dimension RXL*® de la société Dade Behring (*figure 8*). Les réactifs répertoriés dans le **tableau I** ont été utilisés pour les dosages.



Figure 8 : Automate Dimention RXL® de la société Dade Behring.
(Laboratoire de Biochimie et de toxicologie, HMIMV)

Tableau I : Principes analytiques et réactifs utilisés pour le dosage des paramètres biochimiques.

<i>Paramètre Biochimique</i>	<i>Méthode de dosage</i>	<i>Réactif</i>	<i>Valeurs de références</i>	<i>Fabricant</i>
Ferritine	Immunodosage en phase Hétérogène	Flex® FERR	8-252 ng/mL	SIEMENS
Bilirubine	Technique bi chromatique en point final	Flex® T-BIL	0-10 mg/L	SIEMENS
ASAT	Technique cinétique bi chromatique	Flex® ASAT	0-35 U/L	SIEMENS
LDH	Technique cinétique bi chromatique	Flex® LDH	0-248 U/L	SIEMENS

(Laboratoire de Biochimie, HMIMV)

2.2.3. Analyse génétique (PCR Séquençage) [18,19]

Cette analyse comporte plusieurs étapes : l'amplification génique, réaction de séquence, migration et analyse.

2.2.3.1. Amplification génique

Après extraction de l'ADN à partir du sang total prélevé sur tube EDTA, une amplification génique est réalisée par une PCR classique. Le produit amplifié a été séquencé sur un séquenceur automatique.

2.2.3.2. Réaction de séquence

Le principe de cette technique repose sur la méthode de Sanger : la succession de nucléotides de l'ADN est déterminée grâce à l'utilisation des didésoxynucléotides

triphosphates (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) (ou ddNTP) marqués chacun par un fluorochrome distinct.

Les ddNTP ne possédant de groupement OH en 3', aucune liaison phosphodiester ne peut être établie par la suite. Ainsi, lorsqu'ils sont incorporés de façon aléatoire dans le brin d'ADN complémentaire, l'élongation est aussitôt stoppée.

Pour chaque gène, les deux brins sens et anti-sens sont séquencés indépendamment selon cette méthode dont le principe comporte plusieurs phases ou étapes :

- ◆ *Le mélange réactionnel contient le produit de PCR nichée à séquencer, des désoxynucléotides (dNTPs), des didésoxynucléotides triphosphates (ddNTP) marqués chacun par un fluorochrome distinct, l'amorce et l'ADN polymérase,*
- ◆ *Au cours de la PCR, l'ADN polymérase, à partir de l'amorce, ajoute au hasard un dNTP ou un ddNTP complémentaire au brin d'ADN étudié. L'élongation du brin en cours de synthèse est stoppée dès qu'un didésoxynucléotide est incorporé. Cette réaction aboutit à la synthèse de brins d'ADN de différentes longueurs, se terminant tous par un didésoxynucléotide marqué par un fluorochrome.*
- ◆ *Ces fragments, de tailles diverses, sont alors séparés par électrophorèse capillaire sur gel de polyacrylamide. Ce dernier a la capacité de discriminer des fragments d'ADN dont la taille ne diffère que d'une seule base.*
- ◆ *Le système optique du séquenceur détermine ensuite la nature du fluorochrome de chaque ddNTP terminant les différents fragments ayant migré. L'ensemble des signaux est intégré par le système informatique de l'automate qui les traduit en électrophorégramme. La séquence du brin séquencé est alors obtenue.*

Une étape de purification des produits de séquence par gel-filtration a pour but d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces en excès.

2.2.3.3. Migration et analyse

Les produits de séquence purifiés sont mélangés avec du formamide pour les dénaturer.

Le contenu de chaque puits est transféré sur une plaque échantillon et recouvert d'une goutte d'huile afin de limiter l'évaporation. Cette plaque est insérée dans l'automate. Ce dernier, relié à un ordinateur, effectue ensuite les autres opérations : migration des fragments obtenus lors de la réaction de séquence dans des capillaires contenant du gel d'acrylamide liquide, lecture par un spectrophotomètre laser orienté sur le capillaire du fluorochrome porté par chaque ddNTP au fur et à mesure de la migration des différents fragments et conversion en électrophorogramme (*figure 9*). L'analyse de ces séquences à l'aide d'un logiciel se fait en comparant le brin sens et le brin anti-sens aux séquences de référence.

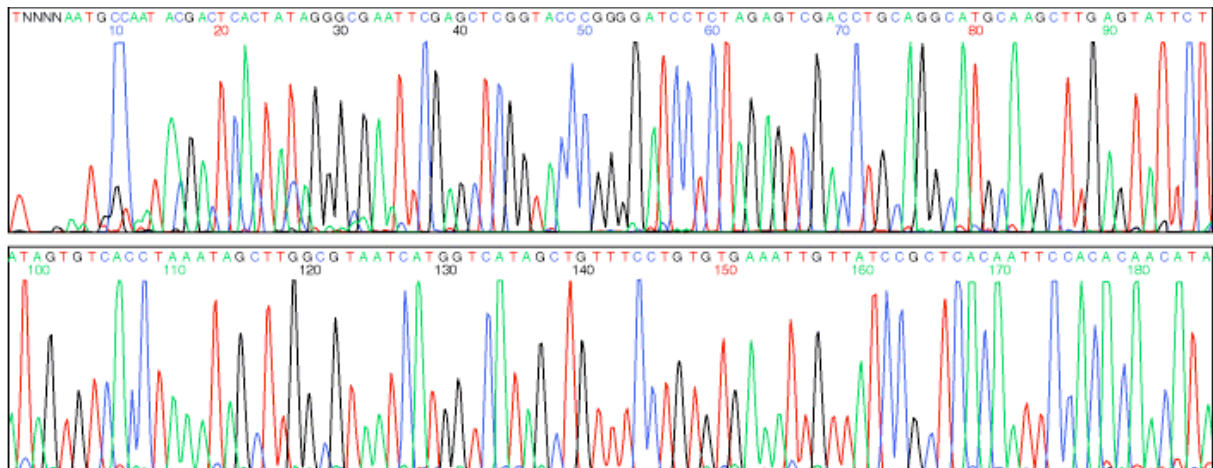


Figure 9 : Electrophorogramme obtenu après séquençage [18].

RESULTATS

1. LE PROPOSITUS

Il s'agit de Madame B. Naima, une femme âgée de 40 ans, originaire de Zaïre dans les environs de Rabat, mariée mais sans aucun lien de consanguinité avec son époux et mère de trois enfants : Fatima Zahra, Mehdi et Halima. Elle est suivie en hématologie clinique pour la prise en charge d'un syndrome anémique.

L'hémogramme révèle, en effet, une pseudo-polyglobulie (GR à $6,47 \cdot 10^6/\mu\text{L}$) contrastant avec un taux d'Hb chiffré à 10,2 g/dL. Il existe aussi une microcytose (MCV à 58,5 fl), une hypochromie (MCH à 18,2 pg) et une augmentation de l'Indice de Distribution Cellulaire (RDW à 16,7 %).

L'étude du frottis sanguin révèle une anisocytose (*figure 10*), la présence des hématies cibles (*figure 11*) ainsi qu'une hypochromie microcytaire (*figure 12*).

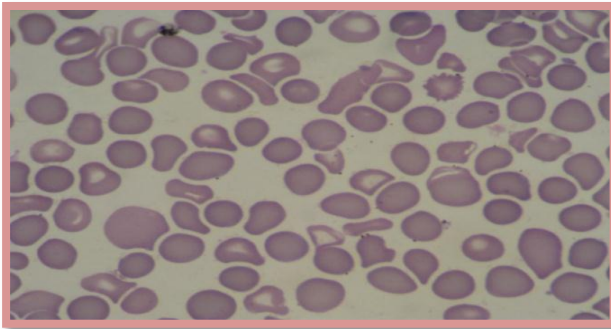


Figure 10 : Photo-lame montrant une Anisocytose

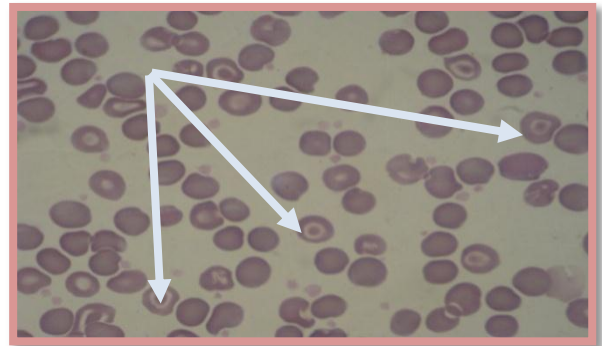


Figure 11 : Photo-lame objectivant des Hématies cibles

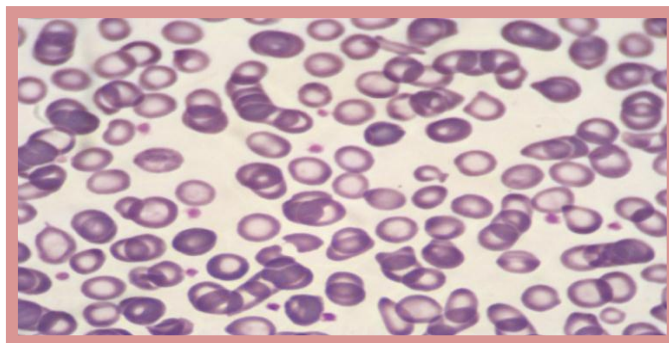
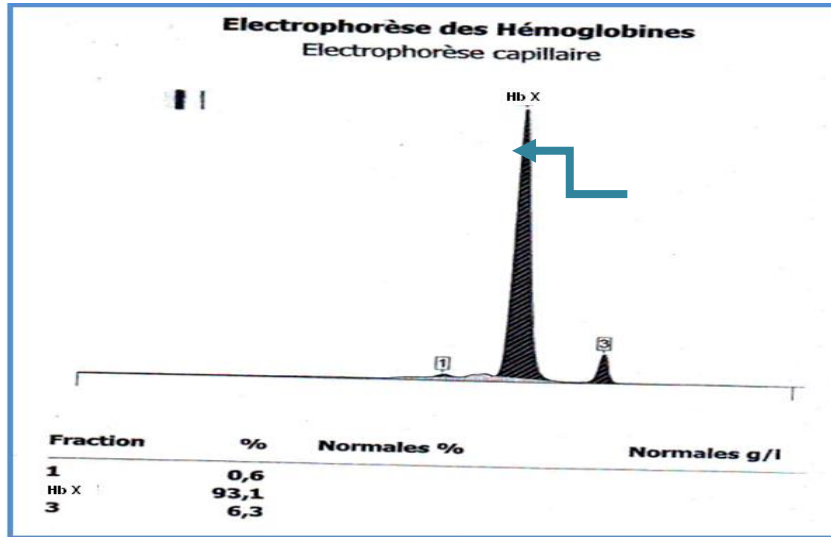


Figure 12 : Photo-lame présentant une hypochromie microcytaire

Fig. 10, 11, 12 : Photo-Lames/Laboratoire d'Hématologie, HMIMV

- ✚ Les résultats du bilan martial (fer sérique, ferritine) de même que les paramètres du bilan de l'hémolyse (bilirubine, ASAT, LDH, excepté l'haptoglobine non disponible au moment de l'étude) sont normaux.
- ✚ L'électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin (électrophorèse capillaire) révèle la présence d'un variant de l'hémoglobine qui migre à distance égale entre A et A₂ et dont le taux chiffre à 93,1% associé à un taux d'hémoglobine A₂ à 6,3% (**figure 13**).



(1→Hb A/ 3→Hb A₂)

Figure 13 : Profil électrophorétique de l'Hb du propositus à pH alcalin.
(Laboratoire de Biochimie, HMIMV)

- ✚ L'électrophorèse à pH acide réalisée sur gel d'agar montre que le constituant anormal migre au même niveau que l'Hb A (**figure 14**).

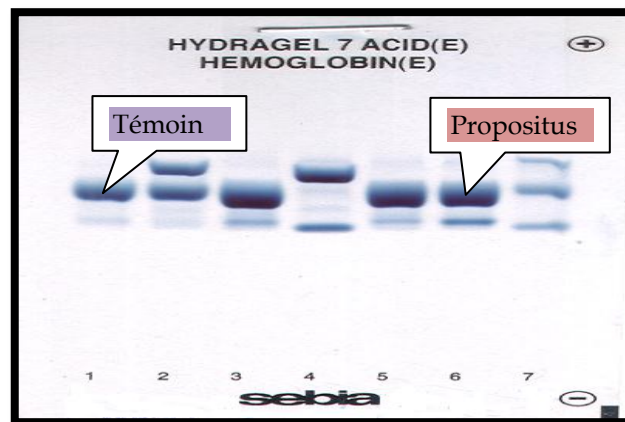


Figure 14 : Résultat de l'électrophorèse de l'Hb du propositus à pH acide.
(Laboratoire de Biochimie, HMIMV)

✚ L'analyse en CLHP sur le Variant II objective les résultats suivants :

- Hb A < 0.3%
- Hb A2 : 9.6%
- Hb F < 0.3%
- Hb X : 90.2%

✚ Le tableau II présente l'ensemble des résultats du bilan biologique du propositus ainsi que les valeurs de référence.

Tableau II : Résultats du bilan biologique du Propositus/Valeurs de référence.

		Résultats du bilan biologique du propositus	Valeurs de référence
HEMOGRAMME	RBC (10 ⁶ /µl)	6,47	4-5,2
	HGB (g/dl)	10,2	12-16
	MCV (fl)	58,5	82-98
	MCH (pg)	18,2	27-33
	RDW (%)	16,7	15
BILAN D'HEMOLYSE	Bilirubine (mg/L)	2	0-10
	ASAT (U/L)	11	0-35
	LDH (U/L)	100	0-240

BILAN MARTIAL	Ferritine (ng/mL)	22	8-252
	CRP (mg/L)	2,6	0,5-3,0
ELECTROPHORESE DE L'HEMOGLOBINE	Hb A (%)	0,6	96,8-97,8
	Hb A2 (%)	6,3	2,2-3,2
	Hb F (%)	-	≤ 0,5
	Hb X (%)	93,1	-

A l'issue de cette panoplie d'analyses, on a conclu à l'existence d'un variant rare de l'hémoglobine (non S, non C ou non E) dont l'identification précise n'est pas possible par les techniques utilisées et nécessite le recours à des techniques de biologie moléculaire.

Ce profil est en faveur d'une hétérozygotie composite associant un trait β_0 thalassémique à un autre variant de la chaîne β d'hémoglobine. Les données de l'hémogramme sont compatibles avec cette interprétation.

L'identification du variant de l'hémoglobine a été faite par la technique PCR séquençage qui a permis de révéler l'existence de **l'hémoglobine D-Los Angeles (D-Punjab)**, pour laquelle la mutation est la suivante : $\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Gln}$.

2. LA FAMILLE DU PROPOSITUS

Les autres cas ont été étudiés dans le cadre de l'enquête familiale. Les **tableaux III** et **IV** regroupent les données démographiques, hématologiques et biochimiques concernant ces cas.

HEMOGLOBINOSE D-PUNJAB : RESULTATS D'UNE ENQUETE REALISEE CHEZ UNE FAMILLE MAROCAINE (HMIMV-RABAT)

Tableau III : Données démographiques et hématologiques des membres de la famille du propositus

	lien de parenté avec Propositus	AGE (ans)	SEXE	RBC (10 ⁶ /µl)	HGB (g/dL)	MCV (fl)	MCH (pg)	RDW (%)	Données du frottis
A. Mohamed	Mari	44	M	4,97	15,6	92,3	31,4	13,4	Frottis normal
Mehdi	Fils	8	M	6.69	11.5	55.6	17.2	18.2	Anisopoikilocytose Quelques elliptocytes Quelques Hématies en cible Quelques schizocytes Quelques sphérocytes
Halima	Fille	10	F	6.6	12.7	62.6	19.2	16.6	Anisopoikilocytose Assez nombreux elliptocytes Quelques schizocytes Quelques Hématies en cible
Fat. Zahra	Fille	14	F	6.23	12.2	62.6	19.6	15.9	Anisopoikilocytose Assez nombreux elliptocytes Quelques schizocytes Quelques Hématies en cible
B. Mbarka	Sœur 1	40	F	6.47	12.7	61.8	19.6	17.4	Anisocytose Hématies en cible
Aya	Nièce 1	6	F	5.49	10.5	61.7	19.2	16	Anisopoikilocytose Hématies en cible Elliptocytes
Aarif	Neveu 1	10	M	5.23	12.4	73.3	23.8	14.1	Frottis normal
A.Elghafour	Neveu 2	14	M	5.77	10.7	61.7	18.5	17.6	Anisopoikilocytose
B. Najat	Sœur 2	47	F	4.67	12.9	84.9	27.6	13.7	Frottis normal Rares hématies en cible
B. Fatna	Sœur 3	54	F	7.20	13.4	58.5	18.6	19.0	Anisocytose Rares hématies en cible
Fatine	Nièce 2	7	F	5.43	12.6	73.2	23.2	17.1	Anisocytose Microcytose Rares hématies en cible
Sara	Nièce 3	11	F	4.84	10.2	70.6	21.1	16.5	Anisocytose Microcytose Rares hématies en cible

HEMOGLOBINOSE D-PUNJAB : RESULTATS D'UNE ENQUETE REALISEE CHEZ UNE FAMILLE MAROCAINE (HMIMV-RABAT)

Les résultats de l'hémogramme révèlent une pseudoplyglobulie, associée à une microcytose hypochrome avec ou sans anémie chez les trois enfants du propositus, les deux sœurs 1 et 3, les deux nièces 1 et 2 et le neveu 2.

Les données biochimiques concernant les membres du propositus semblent sans anomalie notable.

Tableau IV : Données biochimiques des membres de la famille du propositus.

	Bilan d'hémolyse			Bilan martial	
	Bilirubine mg/L	ASAT (U/L)	LDH (U/L)	Ferritine ng/mL	CRP mg/L
A. Mohamed	7	28	189	236	4
Mhdi	8	32	194	30	2
Halima	6	26	197	35	3
Fat. Zahra	10	25	119	9	4
B.Mbarka	9	30	127	31	3
Aya	5	18	110	22	2
Aarif	6	21	184	26	6
A.Elghafor	8	28	164	30	4
B.Najat	2	24	173	5	3
B.Fatna	5	33	216	69	2
Fatine	3	20	180	38	4
Sara	2	16	210	33	5

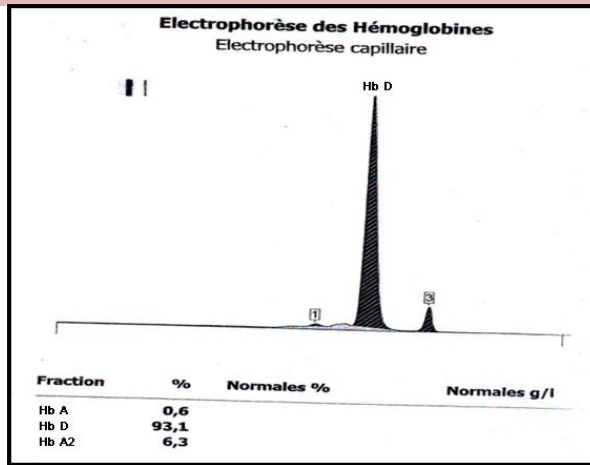
Les données électrophorétiques concernant ces différents cas sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau V : Données électrophorétiques des cas de la famille du propositus.

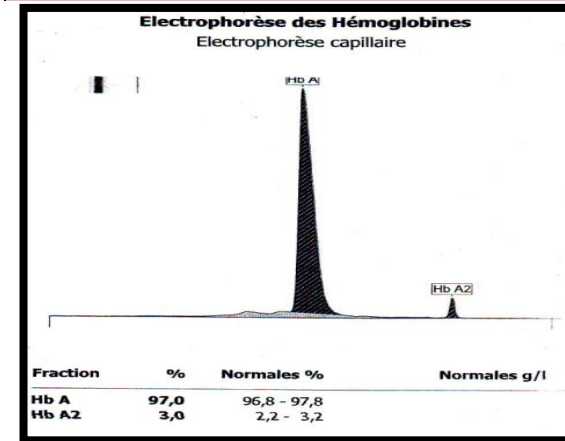
	Hb A (%)	Hb f (%)	Hb α_2 (%)	Hb D (%)	Type d'Hb
A. Mohamed	97.0	-	3.0	-	A/A
Mhdi	94.2	0.3	5.5	-	A/ β_0 -thalassémie
Halima	93.6	0.6	5.8	-	A/ β_0 -thalassémie
Fat. Zahra	93.8	0.4	5.8	-	A/ β_0 -thalassémie
B.Mbarka	0.9	-	6.2	92.9	D-Punjab/ β_0 -thalassémie
Aya	93.9	-	6.1	-	A/ β_0 -thalassémie
Aarif	61.0	-	3.0	36.0	A/D-Punjab
A.Elghafor	93.7	0.4	5.9	-	A/ β_0 -thalassémie
B.Najat	56.7	-	3.3	40.0	A/D-Punjab
B.Fatna	0.7	1.0	6.5	91.8	D-Punjab/ β_0 -thalassémie
Fatine	60.9	0.2	3.2	35.7	A/D-Punjab
Sara	93.6	0.4	6.0	-	A/ β_0 -thalassémie

Les profils électrophorétiques à pH alcalin correspondant à ces résultats chiffrés figurent dans les pages qui vont suivre.

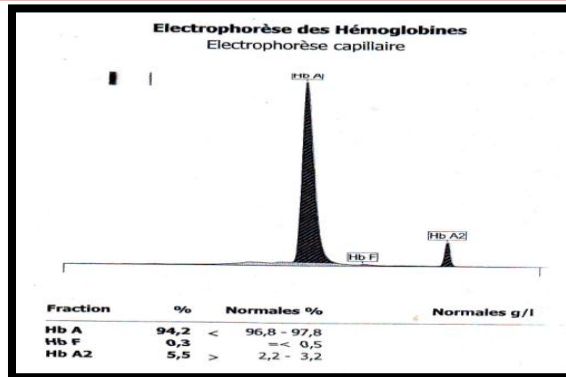
Naima (propositus, mère)



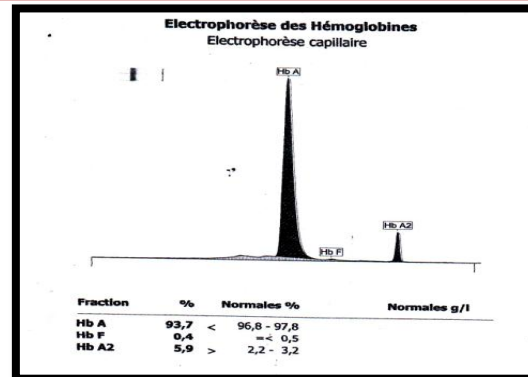
Mohammed (mari, père)



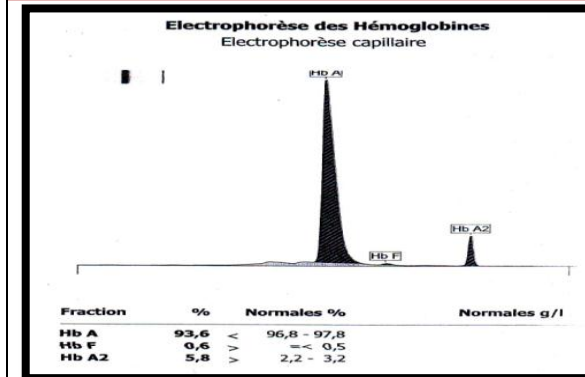
Mehdi (fils)



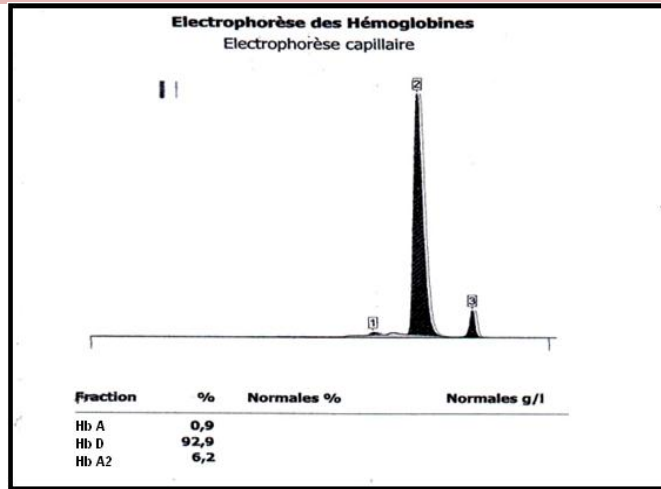
F. Zahra (fille)



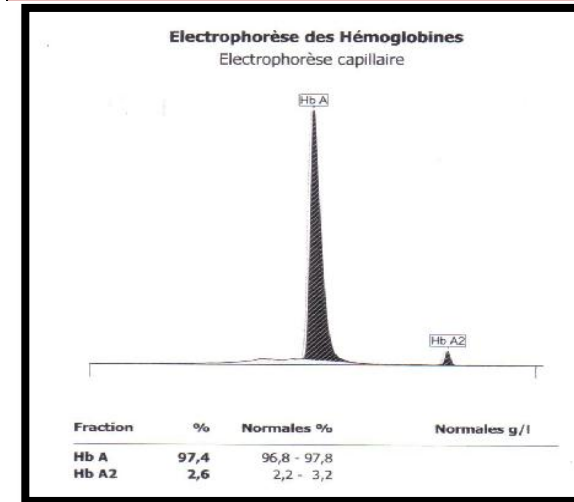
Halima (fille)



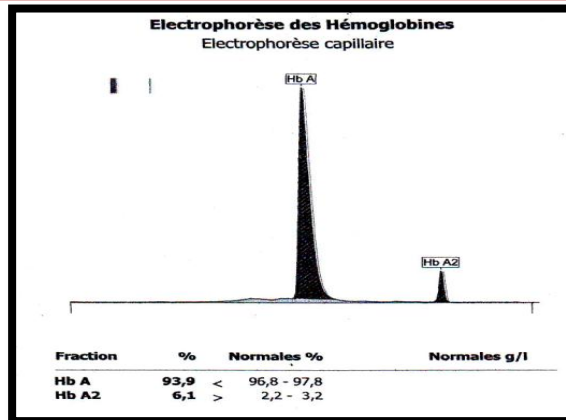
Mbarka (Sœur 1 du propositus)



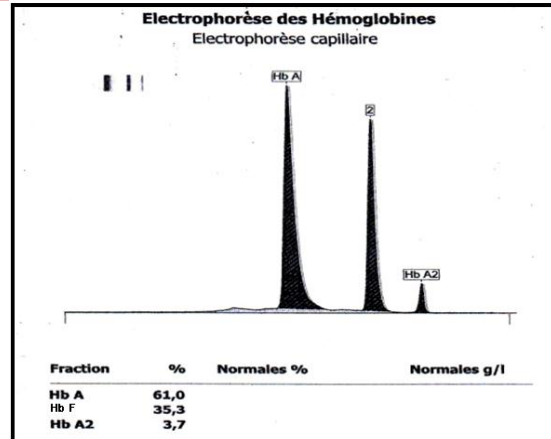
Mari



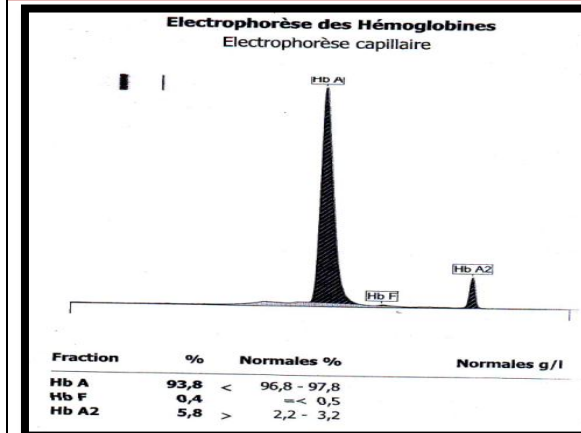
Aya



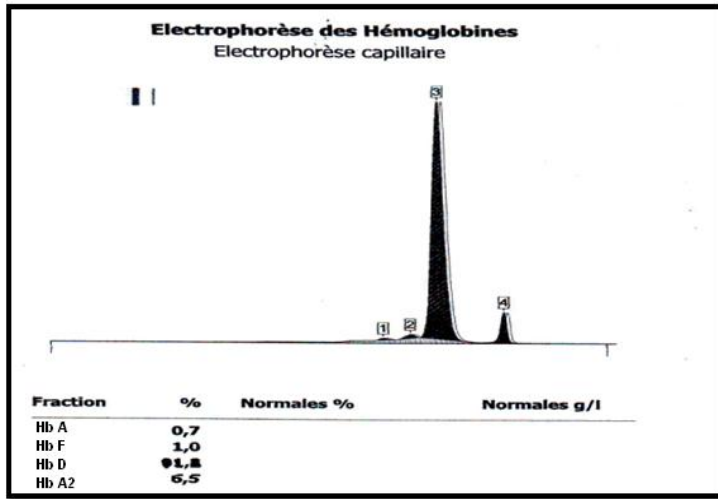
Aarif



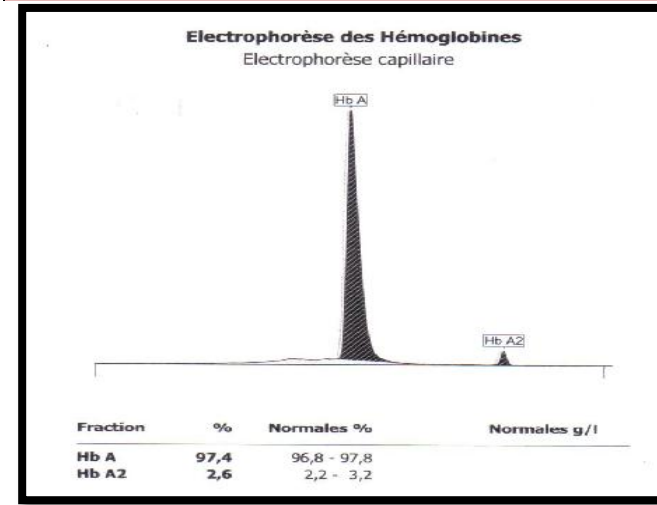
Abdelghafour



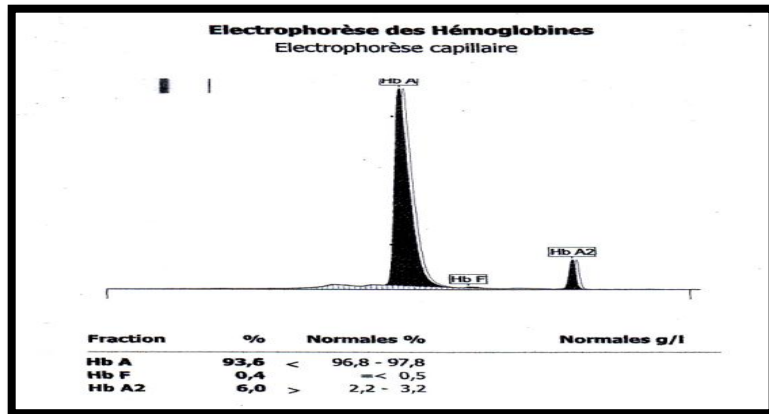
Fatna (Sœur 2 du propositus)



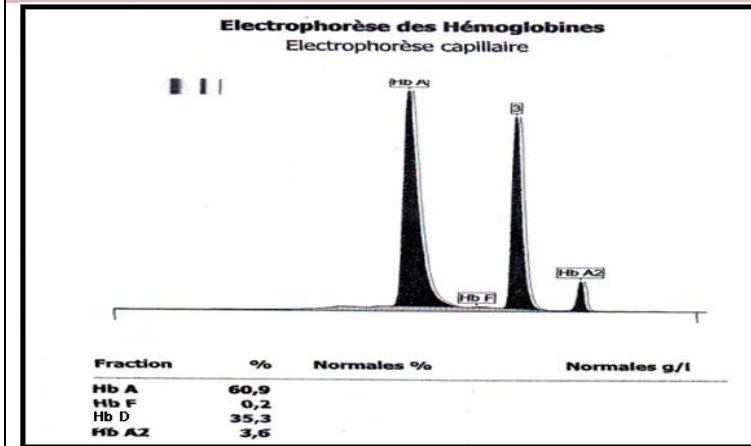
Mari



Sara



Fatine



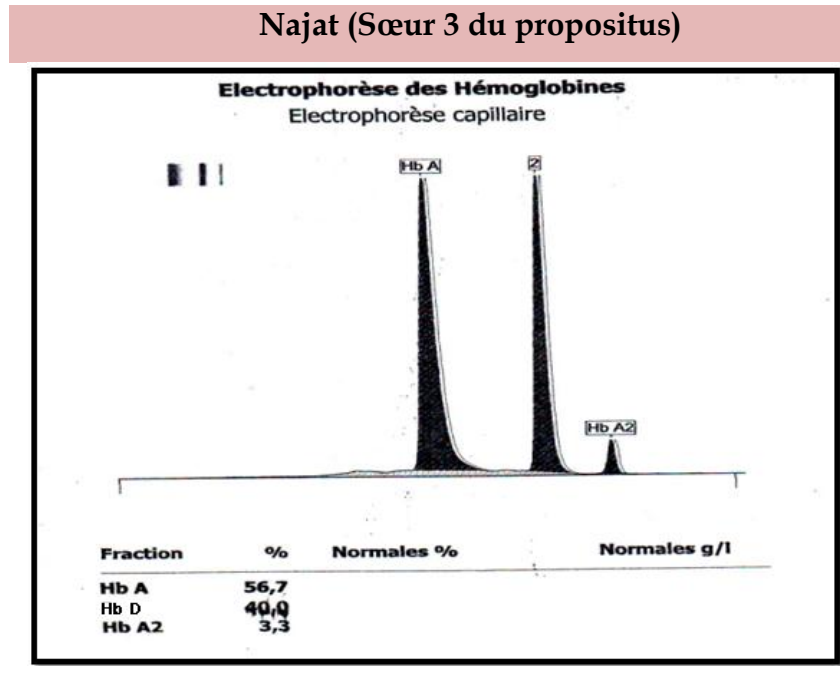


Figure 15 : Profils électrophorétiques de l'Hb à pH alcalin des membres de la famille du propositus

DISCUSSION

1. DISCUSSION GENERALE

Les progrès récents ont pu déterminer avec précision la structure de la molécule de l'Hb, les mécanismes moléculaires de sa fonction ainsi que l'organisation des gènes gouvernant sa biosynthèse.

Ces progrès font de l'Hb la protéine humaine la mieux connue et des hémoglobinopathies, un modèle à l'étude de toutes les maladies héréditaires [2].

1.1. L'hémoglobine

1.1.1. Définition

Constituant essentiel de l'hématie, l'Hb représente 33 pour cent du poids d'un globule rouge. Sa concentration moyenne est de **14 à 16 g/dl** et son poids moléculaire est de **64500** daltons. Il s'agit d'une hétéroprotéine ferroporphyrinique, constituée d'une partie protéique incolore, la globine et une partie non protéique colorée, l'hème [20].

Pour comprendre les maladies de l'Hb, ou hémoglobinopathies, quatre notions de base restent majeures :

- La structure tétramérique de la molécule d'Hb ($\alpha_2\beta_2$),
- Sa relation avec la fonction oxyphorique et le caractère coopératif de celle-ci,
- L'expression des différentes hémoglobines au cours du développement ontogénique,
- La structure et l'organisation des gènes de l'Hb [7].

1.1.2. Structure [2]

Les différentes hémoglobines humaines sont constituées de quatre sous-unités polypeptidiques ou globines identiques deux à deux : deux polypeptides ou globines alpha et deux globines non-alpha. Ainsi, seront distinguées à l'état physiologique:

- ✚ L'Hb A, composée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes bêta ($\alpha_2\beta_2$) (**figure 16**), elle représente la totalité de l'hémoglobine adulte (95,5% - 97%),
- ✚ L'Hb A₂, formée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes delta ($\alpha_2\delta_2$), son taux avoisine 2 - 3,5% de l'hémoglobine adulte,
- ✚ L'Hb F, comportant 2 chaînes alpha et 2 chaînes gamma ($\alpha_2\gamma_2$), elle représente 1% de l'hémoglobine adulte.

Chaque globine possède un groupe prosthétique, l'hème, constitué de la protoporphyrine et d'un atome de fer divalent qui fixe l'oxygène [20].

1.1.2.1. *Structure primaire*

La structure primaire de l'Hb correspond à l'agencement des différents acides aminés qui entrent dans la constitution de la chaîne polypeptidique. Chaque chaîne a une séquence différente d'acides aminés, mais sa structure dans l'espace est très similaire, analogue à celle de la myoglobine.

La chaîne alpha est formée de 141 résidus d'acides aminés, tandis que les chaînes bêta, delta, et gamma sont formées de 146 aminoacides.

La numérotation des acides aminés est faite à partir de l'extrémité N terminale. L'autre extrémité est appelée C- terminale, elle porte la fonction acide du dernier aminoacide de la chaîne.

1.1.2.2. *Structure secondaire*

Il s'agit de la configuration externe de la chaîne. Cette structure est en hélice discontinue à huit segments, avec des liaisons électrostatiques faibles entre acides aminés de deux spires voisines.

1.1.2.3. *Structure tertiaire*

Elle est globulaire, ménageant au centre une poche où s'insère l'hème (*figure 17*). Le fer divalent est lié au sommet des noyaux pyrroliques et à deux histidines de la poche.

1.1.2.4. *Structure quaternaire*

La structure quaternaire est la configuration de la molécule de l'Hb. Elle est tétramérique, avec des contacts réduits (2 ou 3 ponts salins) entre les deux chaînes homologues α ou β , étroits entre les chaînes hétérologues. Ces contacts, très rigides par liaison électrostatique entre α_1 - β_1 et α_2 - β_2 , sont moins nombreux et plus lâches entre α_1 - β_2 et α_2 - β_1 .

L'Hb peut être considérée comme une micelle, les groupements hydrophiles étant situés à l'extérieur alors que les groupements hydrophobes sont localisés à l'intérieur de la molécule. En particulier, la poche de l'hème est tapissée de résidus hydrophobes.

1.1.2.5. *Structure supra quaternaire*

C'est le mode de répartition de l'Hb à l'intérieur du G.R. Les molécules d'Hb sont distantes de 8Å, cette répartition semble surtout maximale à la périphérie, d'où l'explication de la forme spéciale des G.R.

Ainsi, la mutation d'un seul aminoacide peut suffire, selon sa position à modifier la charge électrique et la structure secondaire ou quaternaire de toute la molécule.

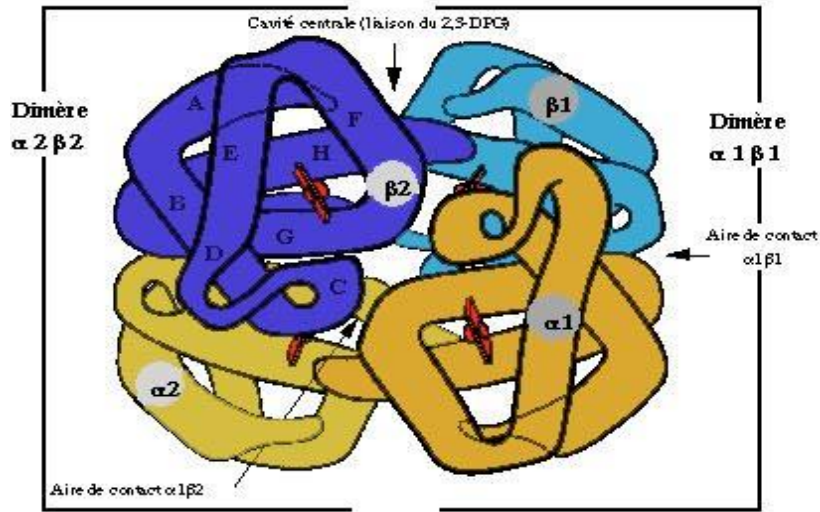


Figure 16 : Structure tétramérique de l'hémoglobine [20].

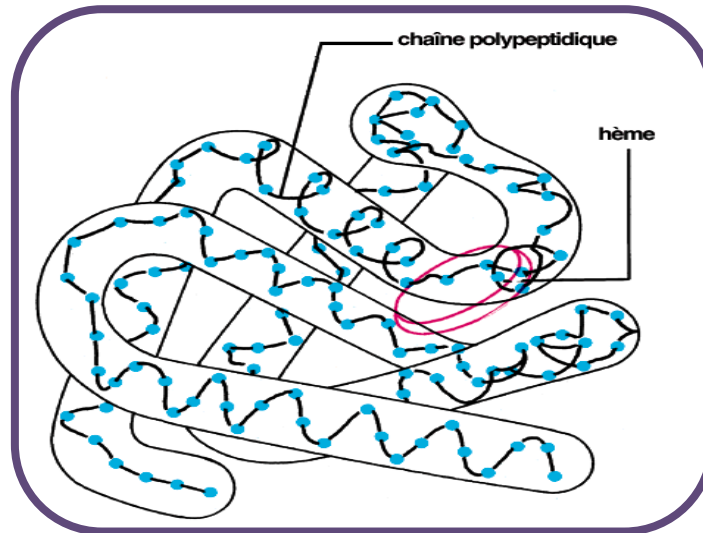


Figure 17 : Structure tertiaire de l'une des quatre chaînes polypeptidiques formant l'hémoglobine [20].

1.1.3. Fonction

En 1862, le physiologiste allemand Hoppe-Seyler a créé le terme « hémoglobine » pour désigner le pigment respiratoire des globules rouges. Outre son rôle principal

dans le transport de l'oxygène des poumons aux tissus, l'Hb est impliquée également dans l'élimination du gaz carbonique et le maintien du pH intra-érythrocytaire [21].

1.1.3.1. *Transport de l'O₂*

C'est la fonction principale de l'Hb. Chaque molécule d'Hb fixe quatre molécules d'O₂ sur le fer et constitue l'oxyhémoglobine (oxyHb).

La saturation en O₂ en fonction de sa pression partielle (pO₂) se fait selon une courbe sigmoïde très particulière qui assure un maximum d'efficacité tant pour la fixation dans les poumons que pour la libération dans les tissus.

L'affinité de l'Hb pour l'O₂ est médiocre aux faibles pO₂, considérablement élevée aux fortes pO₂ (*figure 18*).

La propriété de fixation et de libération de l'O₂ selon ce type de courbe est liée à l'existence de deux types de chaînes (alpha et bêta) dans la même molécule. Elle n'existe ni pour la myoglobine (qui ne possède qu'un seul type de chaîne), ni pour des Hb pathogènes comme l'Hb H (=tétramère β).

La rotation des chaînes β autour des chaînes α avec glissement des unes sur les autres est indispensable pour assurer cette efficacité de fixation et libération de l'O₂.

Au cours de ce processus, les sous unités se déplacent les unes par rapport aux autres avec dilatation de l'ensemble (à l'état désoxygéné) et contraction (à l'état oxygéné), ce qui a fait comparer la molécule d'Hb à un poumon à l'échelle moléculaire.

Les principaux mouvements se font au niveau des liaisons faibles α_1 - β_2 et α_2 - β_1 . Une anomalie à ce niveau fait que les mouvements seront gênés et l'affinité pour l'O₂ augmente (avec mauvaise libération vers les tissus) ou plus rarement diminue (avec meilleure libération vers les tissus).

La poche centrale située entre les quatre sous unités joue également un rôle important, car c'est à ce niveau que vient se fixer à l'état désoxygéné le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG). L'affinité pour l'O₂ est ainsi réglée, avec libération du

2,3-DPG et contraction de la poche centrale au cours de la fixation de l'O₂ sur les quatre molécules de l'hème.

Tout se passe comme s'il existait une compétition au niveau de l'Hb entre l'O₂ et le 2,3-DPG. L'Hb doit donc être considérée comme une enzyme allostérique dont les deux substrats sont l'O₂ et le 2,3-DPG.

Un déficit en DPG ou une mutation (entraînant une anomalie de l'Hb au niveau du site de fixation du DPG dans la poche centrale) conduit aussi à une affinité anormale de l'Hb pour l'O₂ qui est mal libéré dans les tissus.

Le pH est aussi un facteur influant sur l'affinité de l'O₂ car, sa baisse modifie les liaisons ioniques à l'intérieur de la molécule d'Hb et diminue l'affinité de l'Hb pour l'O₂. Théoriquement ceci conduit à une meilleure oxygénation tissulaire et l'inverse est vrai de l'élévation du pH [2].

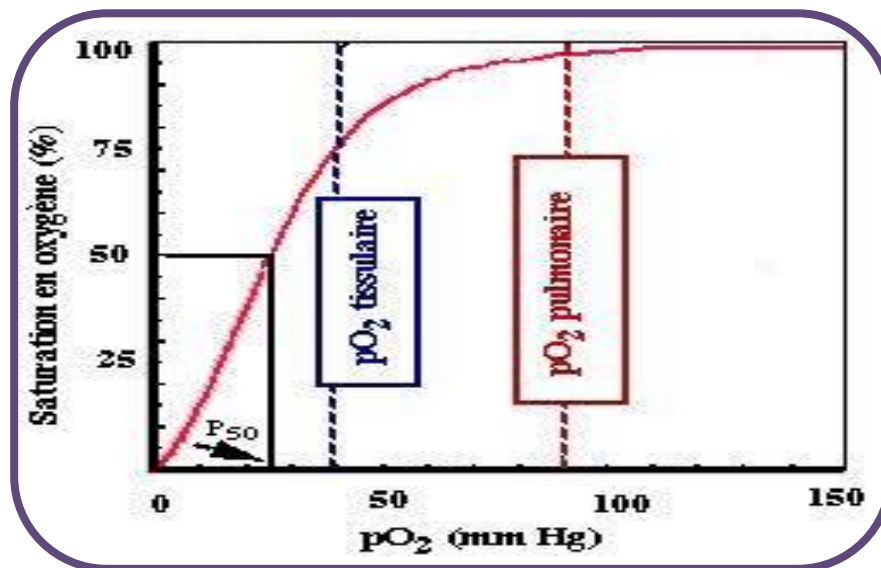
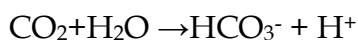


Figure 18 : Courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine [20].

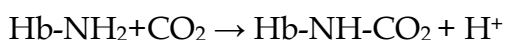
1.1.3.2. *Transport du CO₂* [2]

L'Hb fixe le CO₂, non sur le fer comme l'O₂, mais plutôt sur des groupes aminés latéraux de la globine pour constituer la carbaminohémoglobine (carbHb). Une partie du CO₂ (environ 40%) est transportée sous cette forme.

Le CO₂ libéré par les tissus est peu soluble. Cette solubilité augmente lorsqu'il se combine à l'eau pour former l'ion bicarbonate en libérant un proton.



En outre, l'Hb désoxygénée fixe environ 10% du CO₂ grâce à la carbamation de l'extrémité N des chaînes de l'Hb.



1.1.3.3. *Effet Bohr*

En **1904**, Bohr, Hasselbalch et Krogh ont montré que le CO₂ diminue l'affinité pour l'oxygène, action essentiellement due à l'abaissement du pH. Dans les tissus, le CO₂ libéré diffuse dans le plasma puis dans les globules rouges. Sous l'action de l'anhydrase carbonique, l'acide carbonique se forme et entraîne une baisse du pH intra-érythrocytaire. L'énorme quantité de bicarbonates formée retourne au plasma sous l'action d'une protéine de la membrane érythrocytaire, l'échangeur d'anion érythrocytaire. Dans les poumons, c'est la réaction inverse qui s'effectue. L'effet Bohr se résume donc à un effet régulateur de la fonction oxyphorique par le pH.

En **1964**, Wyman a montré que la libération de deux protons par tétramère et la baisse de l'affinité en fonction du pH sont deux phénomènes liés.

Dans l'hématie, l'hémoglobine fonctionne comme un tampon et fixe les protons H⁺, en particulier au niveau des ponts salins stabilisant la structure désoxygénée. L'élévation de la pCO₂ dans les tissus a ainsi pour effet d'augmenter la p50 de l'érythrocyte et de faciliter la libération d'oxygène. Dans les poumons, où le CO₂ est

libéré, la réaction inverse se produit. La structure R, à forte affinité pour l'oxygène, est favorisée, ce qui diminue la p50 et facilite la capture d'oxygène [21].

Une nouvelle fonction a été récemment mise en évidence : il s'agit du transport du monoxyde d'azote (NO) [2].

1.1.4. Evolution ontogénique des hémoglobines humaines [21]

Plusieurs hémoglobines se succèdent au cours de la vie, et, à tout moment, il en existe plusieurs simultanément (*figure 19*). Ces hémoglobines se distinguent par la nature des sous-unités qui les constituent.

Chez l'homme, au cours de l'évolution ontogénique, le profil des hémoglobines change deux fois. La première de ces commutations, ou « switch », coïncide avec le passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale, la seconde avec celui de la vie fœtale à la vie adulte.

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). Ces diverses sous-unités permettent de réaliser les trois Hb de l'embryon, l'Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), l'Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) et l'Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$). L'hémoglobine fœtale (Hb F), de structure $\alpha_2\gamma_2$, 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 : sac vitellin dans la vie embryonnaire, puis foie et rate dans la vie fœtale et enfin moelle osseuse chez l'adulte.

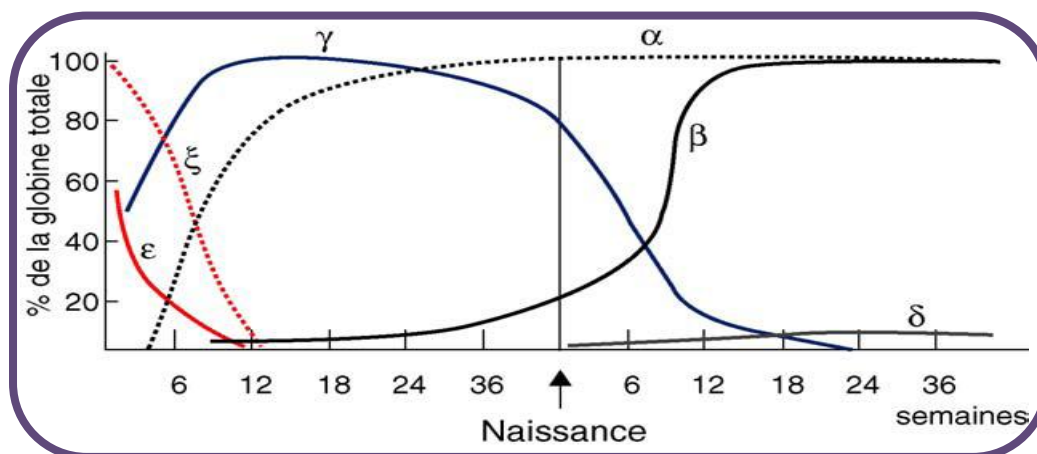


Figure 19 : Expression des gènes globine au cours du développement ontogénétique [7].

L'Hb F est donc le constituant principal de la période fœtale. Sa synthèse débute dès les stades précoces de la gestation et s'élève, entre les 8^{èmes} et 10^{èmes} semaines, à un taux de 90 %. Peu avant la naissance, entre les 32^{èmes} et 36^{èmes} semaines de gestation, les chaînes γ sont progressivement remplacées par les chaînes β de l'adulte. La sous-unité γ est elle-même un mélange de deux espèces moléculaires très voisines, produits de deux gènes distincts. Ces deux chaînes, $A\gamma$ et $G\gamma$, ne diffèrent que par la nature du résidu en position 136, Ala dans le premier cas, Gly dans le second. Leur proportion relative évolue avec l'âge : le type $G\gamma$, qui représente environ 75 % de l'ensemble des chaînes γ à la naissance, n'en constitue plus que 30 % dans les traces d'Hb F qui subsistent chez l'adulte. L'Hb F-Sardinia ($A\gamma T$), où une Thr remplace l'Ile en position 75, est un polymorphisme fréquent de la chaîne $A\gamma$ observé dans toutes les populations.

1.1.5. Les gènes de globine [22]

1.1.5.1. Localisation et organisation des gènes de globine

C'est par des techniques de fusion cellulaire et d'hybridation que la localisation exacte des gènes de globine a pu être déterminée. Ces gènes se répartissent en deux familles :

- ✚ Famille des gènes α situés sur le bras court du chromosome 16.
- ✚ Famille des gènes β sur le bras court du chromosome 11.

Le complexe α , qui s'étend sur une distance de 30 kb, comprend de 5' à 3': le gène ξ codant pour une chaîne présente uniquement au stade embryonnaire, 3 pseudogènes ($\psi\xi$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$), et les deux gènes α_2 et α_1 codant une chaîne polypeptidique identique α . En effet, ces deux gènes très homologues possèdent une séquence codante identique et ne diffèrent l'un de l'autre que par deux paires de bases et une insertion de 7 paires bases dans le second intron. Cette chaîne α est présente aussi bien au stade foetal qu'adulte. Le gène α_2 est plus exprimé que le gène α_1 avec un rapport de 3/1. En aval du gène α_1 , se trouve le gène θ_1 , récemment découvert et dont la fonction n'a pas encore été déterminée. Celui-ci dériverait du gène α_1 par duplication.

Cinq gènes fonctionnels et un seul pseudogène forment le complexe β globine qui s'étend sur 50 kilo bases. On retrouve de 5' à 3' le gène embryonnaire ε , les deux gènes foetaux $G\gamma$, $A\gamma$, et les gènes adultes δ et β qui codent les chaînes δ et β des Hb A_2 et A respectivement.

En amont du gène embryonnaire de chaque locus, se trouve une région régulatrice dont l'importance dans l'expression des gènes a été démontrée par de nombreux travaux: β LCR (Locus Control Region) pour le locus β et HS 40 (Site Hypersensible à 40 Kilo bases en amont de ξ) pour le locus α . Au niveau des deux clusters α et β , tous les gènes de globine sont disposés suivant l'ordre dans lequel ils s'expriment au cours du développement ontogénique: 5' ξ - α_2 - α_1 3' et 5' ε - $G\gamma$ - $A\gamma$ - δ - β 3' (*figure 20*).

Les gènes de globine présentent une double spécificité, tissulaire et du stade de développement.

La spécificité tissulaire s'explique par le fait que les gènes de globine ne s'expriment que dans les cellules et tissus strictement érythroïdes, dont l'emplacement

évolue en fonction du développement ontogénique : Sac vitellin lors de la période embryonnaire, foie et rate lors de la vie fœtale et moelle osseuse au stade adulte.

La spécificité du stade développement veut dire que les gènes sont activés d'une façon séquentielle au cours du développement ontogénique résultant en une double commutation (switch) d'hémoglobine, observée d'abord lors du passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale (hémoglobine embryonnaire → hémoglobine fœtale) puis de la vie fœtale à la vie adulte (hémoglobine fœtale → hémoglobine adulte) chez l'Homme.

Cette double spécificité de l'expression des gènes de globine est le reflet de multiples interactions entre les régions régulatrices (LCR β et HS40) et les régions promotrices des gènes d'une part et les facteurs protéiques agissant en *trans* d'autre part.

Il est important de souligner que durant toutes les étapes de l'ontogénèse, les transcrits des gènes des deux familles α et β globine sont produits dans les mêmes proportions, préservant ainsi une synthèse équilibrée des chaînes α et non α . Le ou les mécanisme(s) moléculaire(s) à l'origine de cette coordination d'expression de gènes situés dans deux chromosomes différents n'a (ont) pas été encore élucidé(s).

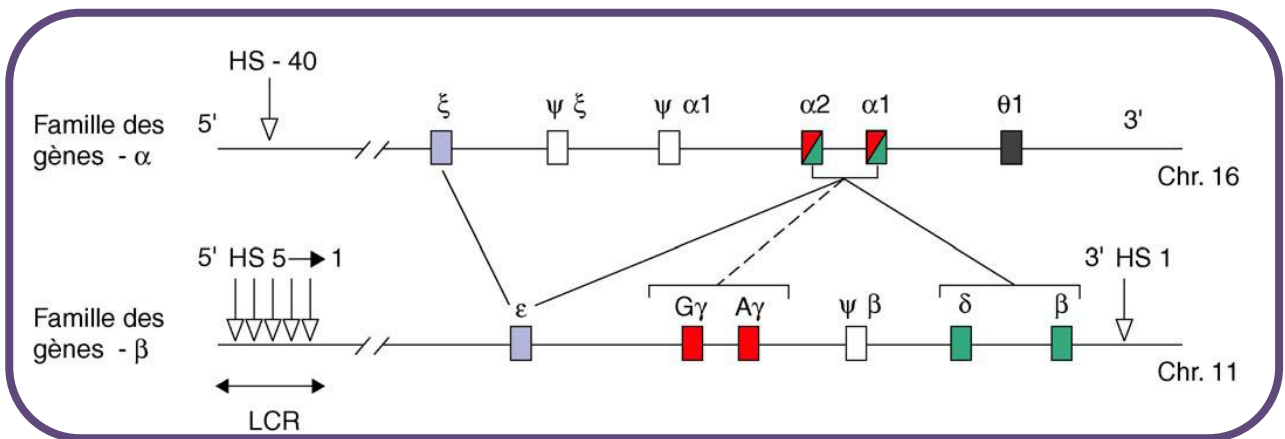


Figure 20 : Structure et organisation des deux familles de gènes-globine [7].

1.1.5.2. Structure des gènes de globine

La structure de tous les gènes de globine est identique : trois exons séparés par deux introns (intervening sequence ou IVS); le second intron étant plus long que le premier dans la famille des gènes β globine. Cette similitude de structure a été conservée tout au long de l'évolution des gènes de globine des Vertébrés depuis la divergence des gènes α et β à partir d'un gène ancestral commun il y'a 450 millions d'années jusqu'aux " récentes " duplication et conversion génique des gènes foetaux , il y'a moins de 40 millions d'années.

Comme chez tous les eucaryotes, la synthèse de globine débute par celle des transcrits primaires d'ARN, leur maturation nucléaire et leur transport vers le cytoplasme où se fera la traduction de l'ARNm. Les gènes ϵ , $A\gamma$, $G\gamma$, δ et β globine codent tous des chaînes de 146 acides aminés. Les chaînes δ et β ne diffèrent que par 10 acides aminés et les chaînes foetales par un seul acide aminé (position 136) alanine pour $A\gamma$ et glycine pour $G\gamma$.

1.2. Les hémoglobinopathies (HbP)

Les hémoglobinopathies sont classiquement scindées en deux catégories, selon que l'on observe un défaut qualitatif avec production en quantité normale d'une Hb « anormale » (HbP qualitatives), ou un défaut quantitatif de production de l'Hb normale (HbP quantitatives) [7].

1.2.1. Les hémoglobinopathies qualitatives ou structurales

Il s'agit d'hémoglobine pathologique qui se distingue des hémoglobines normales par une modification structurale affectant certaines chaînes polypeptidiques de l'hémoglobine. Les anomalies moléculaires à l'origine des hémoglobines anormales sont le plus souvent des mutations ponctuelles conduisant à des substitutions d'acides aminés des chaînes alpha ou beta, rarement gamma ou delta. Selon la position et la nature de

l'acide aminé en cause, la substitution, le plus souvent d'un acide aminé unique, entraîne ou non des anomalies de solubilité (Hb S), de fonction (Hb M, hémoglobines d'affinité anormale pour l'oxygène) ou de stabilité de l'hémoglobine (hémoglobines instables) [12].

Beaucoup de variants sont phénotypiquement «silencieux» et détectables seulement en raison d'une différence de leur migration électro phorétique. Il peut s'agir de variants rares, voire exceptionnels qui ne se retrouvent que dans certaines populations et constituent donc des marqueurs génétiques. Certains au contraire s'accompagnent de troubles cliniques variés ; les plus répandus sont les suivants : Hb S, Hb C et Hb E [11].

1.2.2. Les hémoglobinopathies quantitatives ou thalassémies [23]

L'anomalie hémoglobinique est caractérisée par la diminution ou l'absence de production des chaînes de globine α ou β normales. La modification du ratio α / β est responsable de la physiopathologie.

Cette insuffisance de synthèse d'une chaîne avec excès de l'autre type est responsable d'une anémie hémolytique, corpusculaire, microcytaire, dont la sévérité dépend du nombre résiduel de chaînes de globine α ou β fonctionnelles.

La gravité va dépendre du type de chaîne déficiente ou du caractère homozygote ou hétérozygote du déficit. Un mécanisme compensateur apparaît, tendant à pallier la synthèse insuffisante par une élaboration accrue des autres chaînes polypeptidiques. Quand la diminution de la synthèse affecte les chaînes bêta, le mécanisme compensateur est représenté par une élaboration accrue des chaînes gamma et delta, d'où l'augmentation des hémoglobines F et A₂. Quand la perturbation affecte les chaînes alpha, la compensation ne peut se faire que par l'apparition de tétramères à un seul type de chaînes : hémoglobine H de structure β_4 et hémoglobine Bart's de structure γ_4 , hémoglobines qui n'existent pas chez le sujet normal.

L'anomalie quantitative de la synthèse des chaînes polypeptidiques entraîne une altération de l'hématie par précipitation intra-globulaire des chaînes α libres dans la β -thalassémie, des fractions β_4 et γ_4 qui sont des fractions instables dans l' α -thalassémie.

1.2.2.1. *La β -thalassémie* [2]

La β -thalassémie est caractérisée par la diminution de synthèse des chaînes β . Le déficit de synthèse peut être total (β_0 -thalassémie) ou partiel (β^+ -thalassémie).

Cliniquement, 3 types de bêta-thalassémie sont à distinguer :

- ✚ la **bêta-thalassémie hétérozygote** ou thalassémie mineure où les sujets sont bien portants. Ils ne sont pas anémiques ; exceptionnellement, une splénomégalie de petite taille peut être palpée sous le grill costal ;
- ✚ la **thalassémie intermédiaire** qui désigne les formes atténuées de bêta-thalassémies homozygotes et de nombreuses formes d'Hb E/ β -thalassémie. Ces formes sont caractérisées par une bonne tolérance à l'anémie, une activité ludique et scolaire normale, une croissance staturo-pondérale normale chez l'enfant, une absence d'asthénie et une puberté souvent retardée, mais généralement complète. Ces patients peuvent mener une existence normale sans être transfusés puisque leur taux d'Hb est spontanément élevé (> 8 g/dL). Les thalassémies intermédiaires représentent 5 à 10 % de l'ensemble des bêta-thalassémies homozygotes ;
- ✚ la **bêta-thalassémie homozygote majeure** où le patient présente une anémie hémolytique, pouvant se compliquer de lithiase biliaire, des déformations morphologiques, une hypertrophie de la lignée érythroblastique, une splénomégalie, une hépatomégalie et une surcharge en fer. Le traitement actuel de la thalassémie majeure comporte deux volets principaux : le traitement

conventionnel (la transfusion sanguine, la chélation du fer, la splénectomie) et la transplantation médullaire.

Les mutations identifiées, se traduisant par un défaut de synthèse de la chaîne bêta-globine sont nombreuses, plus de 130 actuellement. La classification la plus habituellement retenue considère l'étape finale de la synthèse protéique selon qu'il persiste (bêta⁺-thalassémie) ou non (bêta₀-thalassémie) une production de chaînes bêta-globine. L'information des familles à risque doit faire partie de la lutte contre les maladies génétiques de l'hémoglobine.

1.2.2.2. L'alpha thalassémie

L'alpha thalassémie correspond à un déficit de synthèse des chaînes α de la globine. Elle affecte par conséquent la synthèse des trois hémoglobines physiologiques. Dans les formes les plus graves (atteinte d'au moins trois des quatre gènes α), on peut détecter des tétramères anormaux d'Hb, formés en période néonatale de quatre chaînes γ (hémoglobine Bart) et chez l'adulte de quatre chaînes β (hémoglobine H) [24].

1.2.3. Bases moléculaires des maladies dues à une hémoglobine anormale [7]

Les mécanismes génétiques des hémoglobinopathies sont multiples. La simple mutation d'une base de l'ADN codant pour la chaîne de la globine par une autre est le phénomène le plus fréquent. Dans la plupart des cas, cette mutation aboutit à la substitution d'un acide aminé par un autre dans la chaîne protéique synthétisée (cas de l'Hb S, Hb C, Hb E, Hb D...).

Certaines Hb anormales sont la conséquence de deux mutations affectant le même gène (cas de l'Hb C Harlem, pour laquelle les deux substitutions concernent les acides aminés en position 6 et 73).

Dans de rares cas, l'hémoglobinopathie est secondaire à une fusion de gènes par crossing-over (cas de l'Hb Lepore), par insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides.

En 1968, MF. Perutz et H. Lehmann classaient la pathologie moléculaire de l'hémoglobine en fonction de la structure de la molécule (*figure 21*).

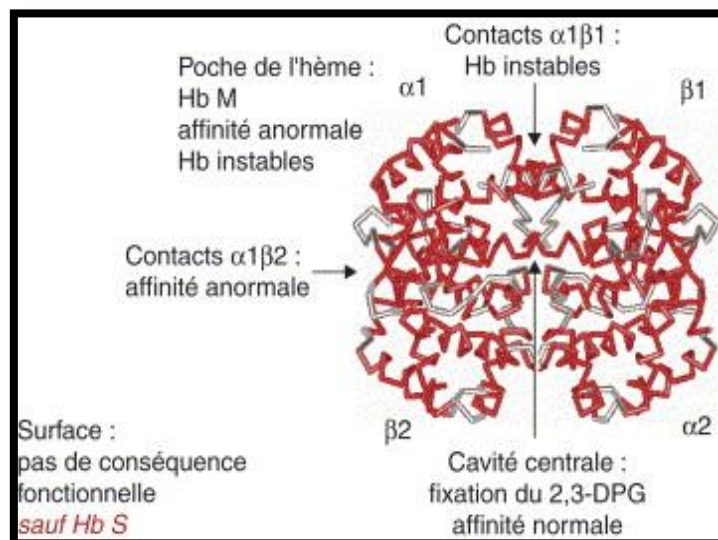


Figure 21 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule de l'Hb adulte (HbA). Les régions fonctionnellement importantes sont indiquées ainsi que les conséquences physiopathologiques des différents variants selon la localisation de la mutation dans la molécule [7].

Les différentes localisations possibles d'une mutation se manifestent par des signes hématologiques spécifiques, comme nous allons l'expliquer ci-dessous.

1.2.3.1. Mutations de la poche de l'hème

L'importance de la poche de l'hème fait que toute mutation de cette zone a une traduction pathologique. Dans les hémoglobines M, le fer de l'hème est oxydé en Fe^{3+} ; on observe cliniquement une cyanose due à une modification des propriétés spectrales de l'Hb. Les hémoglobines perdant leur hème sont instables, il en résulte une anémie

hémolytique. Enfin, l'affinité pour l'oxygène peut être modifiée, ce que traduit une polyglobulie (affinité augmentée) ou une cyanose (affinité diminuée).

1.2.3.2. Mutations des zones de contact

Des mutations peuvent toucher les zones de contact entre sous-unités. Les résidus du contact $\alpha_1\beta_1$ étant responsables de la stabilité de la molécule, leur mutation se traduira par une Hb instable et une anémie hémolytique. Ceux du contact $\alpha_1\beta_2$ étant le siège de la transition allostérique, une anomalie dans leur région produit une Hb à affinité modifiée pour l'oxygène.

1.2.3.3. Mutations de la cavité centrale

Quelques mutations ont été décrites, touchant les résidus de la cavité centrale, extrémité des chaînes polypeptidiques impliquées dans les ponts salins qui stabilisent la forme désoxygénée de la molécule, sites de fixation du 2,3-DPG. Chez ces variants, l'affinité pour l'oxygène est le plus souvent augmentée.

1.2.4. Répartition géographique des principales hémoglobinopathies [12]

L'hémoglobinoS ou drépanocytose est de loin l'anomalie de l'hémoglobine la plus fréquemment observée. Elle atteint surtout les populations originaires des régions suivantes : Afrique noire, Madagascar, Réunion, Antilles, Amérique centrale, bassin méditerranéen, Proche-Orient.

L'hémoglobinoC, qui vient en seconde position en terme de fréquence, est représentée chez les Africains mais aussi chez les Noirs américains et les Maghrébins.

L'hémoglobinoE atteint surtout les populations des pays du Sud-Est asiatique, notamment khmères : Cambodge, Laos, Thaïlande et Birmanie ; elle semble plus rare au Viêt-nam.

Les Hb D, plus rares, forment un groupe hétérogène dont la plus connue est l'Hb D-Punjab. Elles sont rencontrées en Inde, dans le bassin méditerranéen et chez les Noirs américains.

Les autres variants sont beaucoup plus rares.

La carte suivante indique la répartition géographique des principales hémoglobines anormales (*figure 22*).

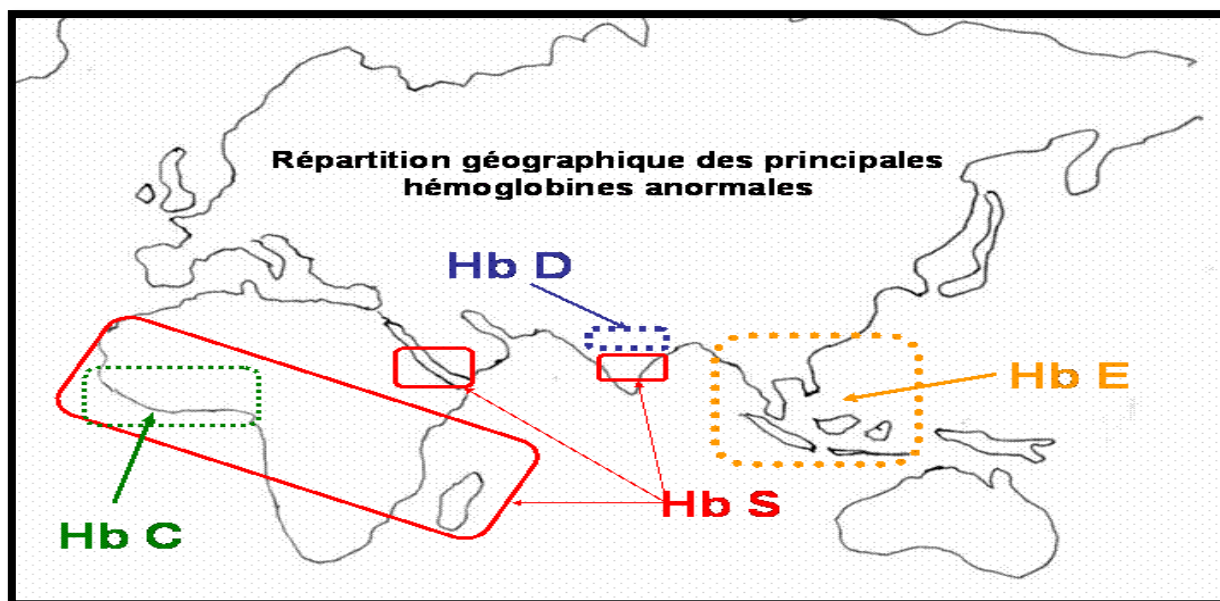


Figure 22 : Répartition géographique des principales Hb anormales [25].

Les β -thalassémies sont fréquemment identifiées chez des sujets originaires du pourtour méditerranéen (Italie, Sardaigne, Sicile, Grèce, Afrique du Nord). Mais, elles sont également rencontrées chez des sujets originaires d'Afrique noire et d'Asie (Iran, Inde, Viêt-nam, Thaïlande).

Les alpha-thalassémies se rencontrent surtout dans les populations du Sud-Est asiatique (Cambodge, Laos, Birmanie, Siam, Thaïlande), mais aussi dans celles du bassin méditerranéen et des pays d'Afrique centrale.

La carte suivante indique la répartition géographique des thalassémies dans le monde (*figure 23*).

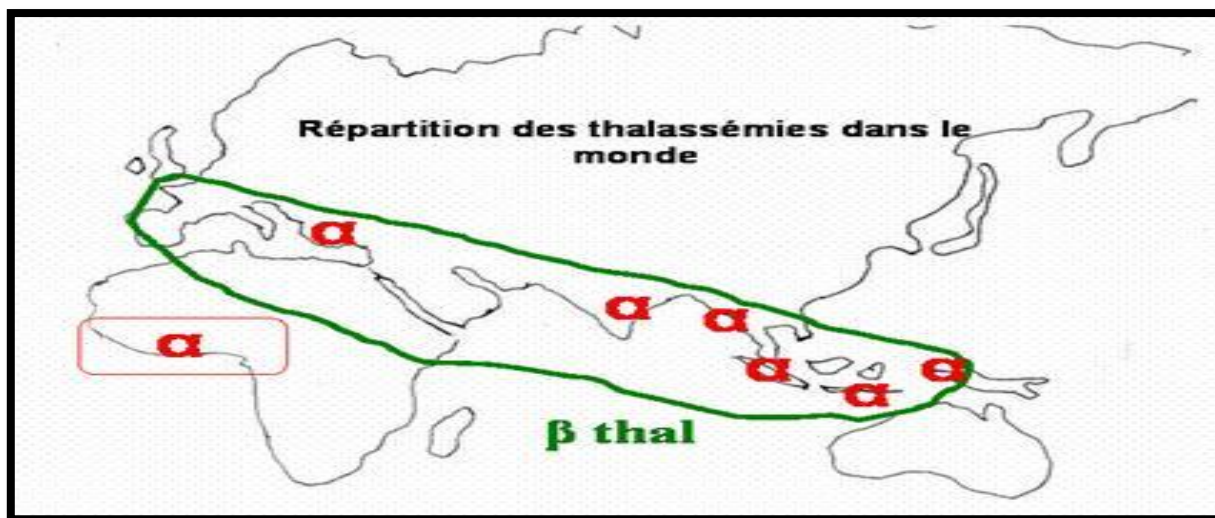


Figure 23 : Répartition géographique des thalassémies dans le monde [26].

Notons qu'il existe également de nombreuses formes où sont associées les anomalies qualitatives et quantitatives des chaînes de globine, comme c'est le cas par exemple pour les hémoglobinopathies de type S/ β_0 ou S/ β^+ , ou les Hb E associées à des alpha- ou beta-thalassémies dans le Sud-Est asiatique. Les anomalies hématologiques qui résultent de ces associations sont, selon le cas, soit aggravées, soit minorées.

2. DISCUSSION DES RESULTATS

Dans le présent travail, nous avons rapporté une série de cas issus d'une famille atteinte de la double hétérozygotie D-Punjab/ β_0 -thalassémie

2.1. L'hémoglobine D-Punjab

2.1.1. C'est quoi ?

L'Hb D-Punjab, également connue sous les noms de Hb D-Los Angeles, Hb D-North Carolina, Hb D-Portugal, Hb D-Chicago et Hb Oak Ridge, est une variante structurale de la chaîne β qui prévaut dans le Punjab de l'Inde d'où son nom Hb D-Punjab [27].

Elle a été d'abord découverte dans une famille de descendance britannique et indienne à Los Angeles par Itano en 1951[28]. Sa structure biochimique a été caractérisée par Baglioni, en 1961, qui a montré que 5 Hb D d'origines ethniques différentes avaient toutes une substitution de l'acide glutamique habituel en position 121 de la chaîne β par une molécule de glutamine ($\beta 121\text{Glu} \rightarrow \text{Gln}$) [29].

L'hémoglobine D-Punjab a été décrite dans plusieurs groupes ethniques. Elle fait partie du grand groupe des hémoglobinoses pauci-symptomatiques. Elle est répandue dans le monde entier, avec une prévalence maximale d'environ 2 à 3% chez les Sikhs du Punjab (Inde) [30].

L'Hb D-Punjab a été annoncée dans beaucoup de pays en incluant la Turquie, l'Arabie Saoudite, les Émirats arabes Unis (UAE) et le Koweït [27].

2.1.2. Quelles Propriétés physicochimiques ?

L'Hb D-Punjab présente la même mobilité électrophorétique que l'Hb S à pH alcalin, mais s'en distingue par l'absence de falcification des globules rouges après adjonction d'un réducteur tel que le méta bisulfite de soude en solution isotonique, mais aussi par sa migration électrophorétique à pH acide. Celle-ci est identique à celle de l'Hb A, comme en témoigne les résultats de la présente série.

A l'électrophorèse standard à pH 8.9, l'Hb A₂ est en quantité normale de même que l'Hb F [30].

2.1.3. Qu'en est-il de sa Pathogénie ?

La transmission de la maladie est autosomique récessive, c'est-à-dire indépendante du sexe et s'exprimant lorsque les deux chromosomes transmis par les parents sont porteurs du gène de la maladie (*figure 24*).

Deux gènes bêta hémoglobiniques s'expriment à égalité, l'un de provenance paternelle, l'autre d'origine maternelle.

Lorsqu'un seul chromosome est porteur du gène de l'Hb D (transmis par la mère ou par le père), la maladie est dite hétérozygote, le porteur est alors sain.

Lorsque les deux chromosomes sont porteurs du gène (transmis par la mère et par le père), la maladie est dite homozygote.

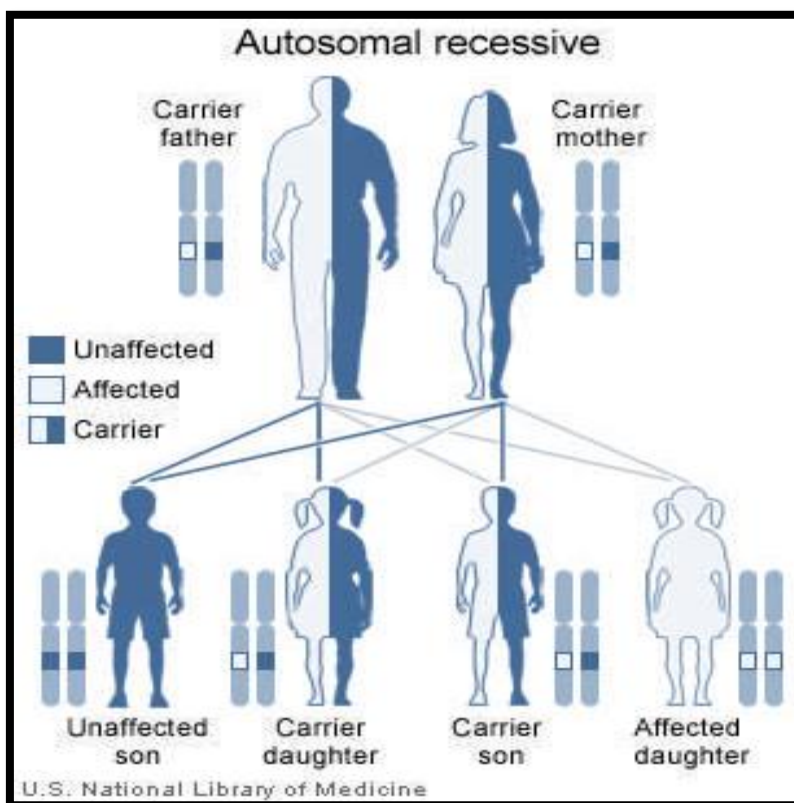


Figure 24 : Transmission autosomique récessive [31].

Dans la série rapportée, nous ne disposons pas de données biologiques concernant les parents du propositus qui sont décédés, mais nous pouvons admettre d'après les résultats obtenus que l'un d'eux serait porteur du gène de l'Hb D-Punjab, l'autre de celui de β_0 -thalassémie.

L'Hb D-Punjab est due à une mutation unique ponctuelle GAA→CAA dans le 121^{ème} codon du gène β globine situé sur le *chromosome 11* qui entraîne une substitution de l'acide glutamique de la chaîne β par une glutamine (β 121Glu→Gln) [31].

Différents travaux ont cherché à vérifier la nature de la mutation en cause. Parmi les techniques employées pour la mise en évidence de cette mutation, signalons en particulier la détermination de la séquence du peptide par dégradation d'Edman selon une microméthode dérivée de la technique des phénylthiohydantoïnes (PTH) (*annexe 1*). Les principales modifications portent sur une miniaturisation des quantités, une protection attentive de la lumière au moment de la cyclisation en milieu acide, enfin une identification par chromatographie sur couche mince et non plus sur papier.

La séparation des chaînes polypeptidiques, selon CLEGG et al. a permis d'individualiser une chaîne β éluée plus lentement que la chaîne β normale. La chromatographie sur colonne de l'hydrolysate trypsique, malgré un examen minutieux, n'a cependant révélé aucune anomalie. Le "finger-print" (*annexe 2*), sur couche mince de cellulose et sur papier, montrait, sans ambiguïté, le déplacement du peptide β T-13 vers la cathode. La tache éluée du papier avait, après hydrolyse chlorhydrique, la même composition en acides aminés que le peptide β T-13 normal.

L'examen de la séquence de ce peptide montrait que la seule mutation susceptible d'expliquer cet ensemble d'observations était le remplacement de l'acide glutamique en 121 par une glutamine neutre. C'est l'hypothèse qui a été retenue pour expliquer l'hémoglobine D Punjab ou D Los Angeles. Cet acide glutamique muté est en effet en position N-terminale (**Tableau VI**). En milieu alcalin ou neutre, le peptide muté, contenant une glutamine, présente une migration électrophorétique vers la cathode. En milieu acide, la glutamine N-terminale se cyclise en acide pyrrolidone carboxylique, et on n'observe plus aucune différence de migration électrophorétique ni chromatographique [32].

C'est la recherche de cette mutation par technique de biologie moléculaire, PCR Séquençage, qui a permis de porter le diagnostic chez le cas index de la présente série.

Tableau VI : Structure comparée des peptides β T-13 de l'Hb A et de l'Hb D-Punjab [32].

	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
Hb A	Glu	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gln	Lys
Hb D-Punjab	Gln	Phe	Thr	Pro	Pro	Val	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gln	Lys

2.1.4. Distribution et incidence ?

L'incidence de l'hémoglobine D-Punjab augmente de la Méditerranée orientale à la partie Ouest du sous-continent indien, et en particulier en Iran, le Punjab, et la moitié occidentale de l'Inde.

La répartition géographique actuelle de ce variant de l'Hb peut être expliquée par les migrations de population divisées en deux phases. La première phase porterait sur la période de l'apparition de la mutation et de sa distribution dans le nord de l'Inde, l'Iran et la Turquie et peut refléter le rythme des migrations qui ont eu lieu dans cette région au cours de la période de Darius I de Perse ou plus tard lors des invasions Mogol. La seconde phase porterait sur la propagation de la mutation dans l'Europe occidentale à cause des mariages mixtes entre les Européens et les Indiens au cours des deux ou trois derniers siècles. Konigsberg et al (1965) ont trouvé que cette hémoglobine a été introduite en Grande-Bretagne à partir du Punjab à la suite des mariages des troupes britanniques avec la population indienne au 18^{ème} siècle. Ils ont conclu que l'Hb D-Punjab trouvée lors des enquêtes chez les Européens (et surtout en Grande-Bretagne, France et Portugal) confirme les liens qui existaient entre ces pays et l'Inde entre le 17^{ème} et le 20^{ème} siècle [33].

La répartition et l'incidence de l'Hb D Punjab sont résumées dans le **tableau VII**. Ces données mettent en exergue la rareté de ce type de pathologie. Par ailleurs, mis à part les cas rapportés dans le présent travail et qui sont détectés durant une période de

18 ans (1992-2010), sur une cohorte d'à peu près 2916 cas, nous ne disposons pas de chiffres à l'échelle nationale pour ce type de pathologie. De plus, d'après la recherche bibliographique que nous avons réalisée, nous n'avons pas trouvé de cas marocains semblables à ceux étudiés dans cette série.

**HEMOGLOBINOSE D-PUNJAB : RESULTATS D'UNE ENQUETE REALISEE CHEZ UNE FAMILLE MAROCAINE
(HMIMV-RABAT)**

Tableau VII : Répartition et incidence de l'Hb D-Punjab [33].

Pays	Nombre		Référence
	Etudié	D –Punjab	
Royaume unis	36 826	7	Huntsman et al (1963) Konigsberg et al (1965) Black (1969)
Portugal	3042	0	Trincao & ferreira (1962)
France	-	-	-
Holland	991	1	De Jong and Went (1968)
Danemark	5000	1	Sick & al (1967)
Norvège	3000	1	Moon & al (1968)
Suède	4171	0	Nilsoon & Eriksson (1972)
Finlande	4418	0	Nilsoon & Eriksson (1972)
Russie	317	0	Nilsoon & Eriksson (1972)
Germany	-	-	-
Suisse	-	-	-
USA	-	-	-
Italie	13 187 3000	0 0	Quattrin & al (1966) Licenziati (1969)
Bulgarie	-	-	-
Yougoslavie	2860	2	Sadikario & al (1969)
Grèce	1000	0	Fessas (1959)
Türkiye	-	-	-
Lebanon	2938	0	Cabannes & al (1965)
Israël	397 190	0 0	Dreyfus & Pinkhas (1958) Beaven (1973)
Iran	400 200 184	1 2 3	Rahbar & al (1967) Rahbar & al (1967) Lehmann & al (1973)
Inde	1000 (Bengale) 129 (W. Pakistan)	1 1	Chatterjea (1959) Stern & al (1968)
Thaïlande	2790	0	Flatz & al (1965)
Indonésie	5400	0	Lie-Injo (1959)
Taiwan	100 000	0	Black-Well & liu (1970)
Japon	130 000	0	Shibata & al (1966)
Australie	-	-	-
South Afrique	3125	0	Botha & Van Zyl (1966)
Canada	207 300	21	-
Greenland	153	0	Nilsson & Eriksson (1972)
Iceland	1000	0	Nilsson & Eriksson (1972)
Jamaïque	10 000 3449	0 0	Milner (1967) Ahern & al (1973)
Venezuela	1666	0	Arends (1963)
Mexique	2336	0	Lisker & al (1963) Lisker (1971)
Maroc (Rabat)	2916	5	Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V. 1992-2010

2.1.5. *Quels tableaux clinique et Biologique ?*

L'Hb D-Punjab est connue sous les formes suivantes :

- ✚ La forme hétérozygote,
- ✚ La forme homozygote,
- ✚ La forme associée avec d'autres hémoglobinopathies.

2.1.5.1. *La forme hétérozygote*

La forme hétérozygote, habituellement asymptomatique, est la plus répandue. Sa découverte est généralement fortuite (maladie intercurrente, études de population, dons du sang).

Sur 31 cas rapportés dans la littérature, on note l'absence de signes d'hémolyse et la présence de cas d'anémie. A ce sujet, il faut mentionner que le taux moyen de l'hémoglobine est, pour les hommes, de $13,65 \pm 0,68$ g/100 ml et, pour les femmes, de $12,82 \pm 0,76$ g/100ml. La fragilité osmotique est normale. Alors que la morphologie des globules rouges est variable, anisocytose avec prédominance de microcytes, cellules en «cible», poikilocytose et hypochromie. Sur le plan clinique, des cas de splénomégalie sont objectivés sans que l'on puisse les attribuer spécifiquement à l'Hb D-Punjab. A l'électrophorèse de l'hémoglobine, la fraction anormale représente 30%-40% de l'hémoglobine totale [34].

2.1.5.2. *La forme homozygote*

La forme homozygote est peu fréquente. Jusqu'à ce jour, 7 cas seulement ont été rapportés dans la littérature. La fragilité osmotique est très souvent diminuée. Des cas d'anémie ont été rapportés, montrant quelque fois des signes d'hémolyse (réticulocytose). Par ailleurs, les patients atteints d'anémie hémolytique présentent également un ictère. Toutefois, seul l'un de ceux-ci est porteur d'une hépatosplénomégalie isolée qui n'est peut être pas en rapport direct avec l'hémoglobinose D-Punjab. Mis à part la symptomatologie énumérée ci-dessus, les différents sujets

homozygotes sont en bonne santé. La fraction anormale de l'hémoglobine est voisine de 100%.

Ainsi, les homozygotes D/D ont une symptomatologie clinique et hématologique très discrète, contrairement à l'atteinte extrêmement sévère de l'hémoglobinoase S homozygote ou, en tout cas, marquée des hémoglobinoses C et E homozygotes [35].

Jusqu'à présent, l'Hb D-Punjab a été retrouvée en association avec l'hémoglobinoase S, la β -thalassémie, la α -thalassémie, l'hémoglobinoase O-Indonésie et l'hémoglobinoase G Philadelphie.

2.1.5.3. La double hétérozygotie Hb S/Hb D-Punjab

La double hétérozygotie HbS/Hb D-Punjab est l'association la plus fréquente. L'anémie est présente dans tous les cas et elle est nettement hémolytique. Toutefois, cette anémie est moins sévère que celle de la sicklémie.

La morphologie des globules rouges montre, de manière courante, des cellules en «cibles» outre la présence de drépanocytes, alors que, dans le trait falciforme, on ne trouve généralement pas de drépanocytes. L'association de l'Hb S avec l'Hb D-Punjab rend donc les globules rouges vulnérables au phénomène de falciformation. Sur le plan clinique, des cas d'ictère, d'hépatomégalie et/ou de splénomégalie, d'ulcères des jambes, ou encore de pyélonéphrite ont été rapportés [36].

2.1.5.4. Hb D-Punjab / Hb O-Indonésie

La double hétérozygotie Hb D-Punjab / Hb O-Indonésie a été découverte à l'occasion de l'investigation d'une hydronéphrose. Le sujet présente une légère anémie sans signes d'hémolyse. La morphologie des globules rouges n'est pas mentionnée. L'examen clinique est normal. Il est vrai semblable que cette légère anémie chez le probant soit en rapport avec son affection des voies urinaires, étant donné que le père et trois frères et sœurs, également porteurs de la même anomalie, ont un bilan hématologique et clinique tout à fait normal [30].

2.1.5.5. Hb D-Punjab / Hb G-Philadelphie

La double hétérozygotie Hb D-Punjab / Hb G-Philadelphie décrite chez une famille de 5 personnes d'origine afro-américaine, ne présente aucun signe clinique ou biologique excepté une anémie modérée avec une légère anisocytose chez 4 membres d'entre elle [30].

2.1.5.6. Hb D-Punjab/ α -thalassémie

L'association Hb D-punjab/ α -thalassémie est rare. La fragilité osmotique est abaissée et il existe une anémie sans signes d'hémolyse. La morphologie des globules rouges présente une aniso-poikilocytose marquée avec des cellules en «cibles» et une hypochromie. Sur le plan clinique, on observe un ictère et une splénomégalie. Toutefois, le cas est insuffisamment documenté pour savoir s'il s'agit d'une atteinte due à un ou à deux gènes thalassémiques [37].

2.1.5.7. La double hétérozygotie Hb D-Punjab / β -thalassémie

L'hétérozygotie composite Hb-D/ β -thalassémie, comme décrite dans la présente étude, est très rare [38]. La fragilité osmotique est diminuée dans 5 cas sur 7. L'évolution est très variable, rarement sévère. Les personnes atteintes ont une intensité légère à modérée de la maladie ressemblant à une thalassémie mineure ou intermédiaire.

Un sous-ensemble de patients peut manifester modérément une anémie sévère avec hémolyse chronique et splénomégalie, tandis que d'autres peuvent présenter une maladie très douce, sans aucun signe clinique apparent. Il peut exister, cependant, une tendance accrue aux infections respiratoires. La morphologie des globules rouges montrent une anisocytose constante avec prédominance de cellules en «cibles», de microcytes et une composante hypochrome. Les patients ont principalement l'Hb D et un petit pourcentage de l'hémoglobine A en fonction du type de mutation β -

thalassémie. L'Hb A₂ peut être normale ou augmentée, tandis que l'Hb F est habituellement normale, bien que légèrement augmentée dans quelques cas [39].

Ces résultats semblent concordants avec ceux des cas retrouvés dans la série que nous avons étudiée. En effet, sur le plan clinique, les cas rapportés sont considérés comme atteints de la forme mineure puisque seul le propositus présentait une anémie hypochrome microcytaire arégénérative.

Une pseudopolyglobulie ainsi qu'une anisocytose associée à la présence de microcytes et d'hématies cibles à l'étude du frottis sanguin ont, par ailleurs, été objectivées dans les trois cas (propositus et deux de ses sœurs). La pseudopolyglobulie microcytaire est une fausse polyglobulie. C'est une anomalie asymptomatique, dans laquelle la masse globulaire totale est normale mais où l'on trouve une augmentation du nombre de globules rouges. Décrite dans les syndromes thalassémiques hétérozygotes, comme dans les cas rapportés, elle se justifie par la microcytose en l'absence de carence martiale. En effet, l'augmentation du nombre des hématies compense la microcytose pour obtenir un hématoците et un taux d'hémoglobine sanguine normaux (*figure 25*) [40].

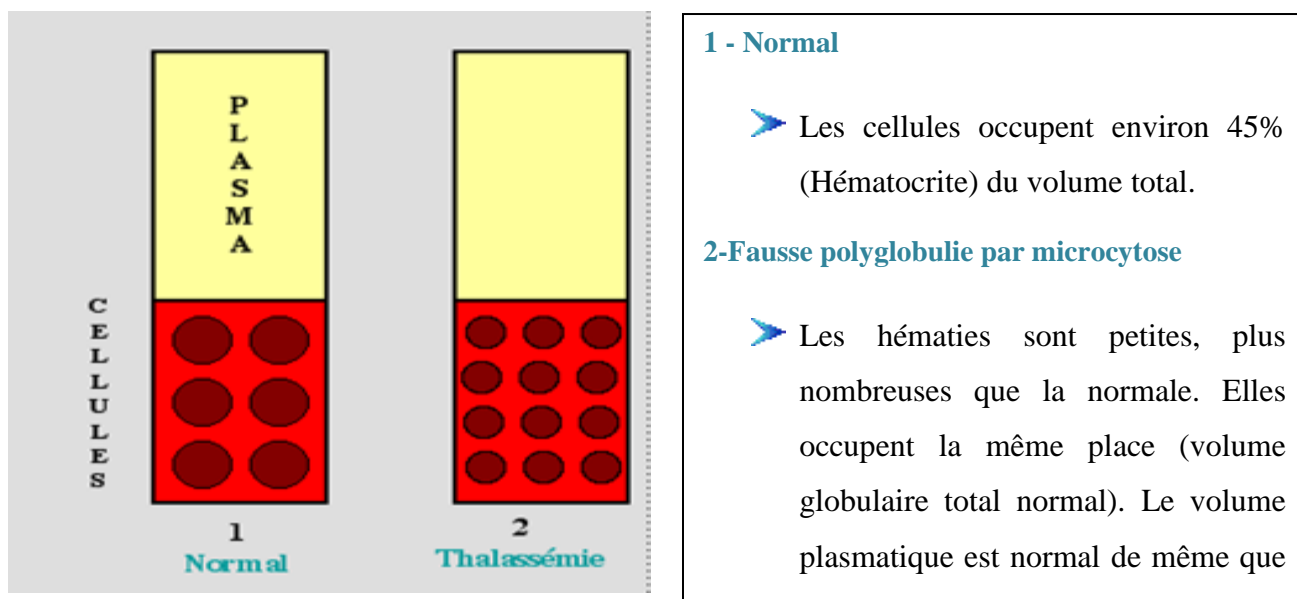


Figure 25 : La pseupolyglobulie microcytaire dans les thalassémies hétérozygotes [41].

Les résultats du bilan martial qui permettent d'exclure une éventuelle carence en fer responsable de la microcytose et/ou de l'hypochromie semblent normaux. Le taux d'Hb D, très élevé, était associé à un faible pourcentage de l'Hb A, un chiffre de l'Hb A₂ augmenté en faveur d'un trait thalassémique et une valeur de l'Hb F normale.

Des cas rares de la double hétérozygotie Hb D-Punjab / β_0 -thalassémie comparables ont été rapportés dans la littérature médicale [42]. Les données biologiques les concernant sont reportées dans le **tableau VIII**.

Tableau VIII : Données biologiques des cas de la double hétérozygotie Hb D-Punjab/β0-thalassémie rapportés dans la littérature [42].

Cas rapportés dans la littérature				
Auteur (Année)	Nombre	Origine	Signes biologiques	Référence
Hynes et Lehmann. (1956)	1	Perse	Anémie légère	[43]
Sukumaran et al. (1960)	4	Inde	2 cas d'anémie	[44]
Schneider. (1968)	3	Anglais Ecosais Irland	Anémie hypochrome microcytaire	[45]
Ramot et al. (1969)	1	Bulgare	Anémie modérée	[46]
Jam et al. (1970)	1	Inde	Anémie sévère	[47]
Oldrini et al. (1973)	1	Italie	96.5% Hb D, 3.5% HbA2, Valeur d'hématocrite est de 32%	[48]
RF Rieder (1976)	1	Italie	Anémie modérée	[49]
Wong et Mam. (1980)	3	Canada	Non renseigné	[50]
Sousa et al. (1983)	1	Portugal	Hypochromie microcytaire	[51]
Worthington et Lehmann. (1985)	1	Allemand	Hypochromie microcytaire	[52]
Casals et al. (1986)	1	Anglais	Non renseigné	[53]
Adkile et al. (1996)	3	Koweït	Hypochromie microcytaire importante Elévation modérée de l'Hb F (3-4%)	[39]
Ropero et al. (1996)	1	Inde	Non renseigné	[54]
Troitskaia et al. (1998)	1	Russe	Non renseigné	[55]
Ahmed et al. (2001)	2	Saoudite Arabie	Anémie hémolytique chronique d'intensité modérée	[56]
Owaidah et al. (2005)	3	Saoudite Arabie	Hypochromie microcytaire Elévation de l'Hb F	[57]
Zorah Rahimi et al. (2006)	2	Ouest Iran	Anémie sévère	[38]

Theodoridou et al. (2009)	1	Grèce	Anémie modérée	[58]
Notre série ESSAID L. : Pr. OUZZIF (2011)	3	Maroc (Zaïre)	Hypochromie microcytaire Anisocytose Hématies en cible	Thèse: Doctorat en Pharmacie. n°64

2.2. Démarche diagnostique au laboratoire

L'étude d'une HbP requiert une exploration phénotypique, à laquelle on doit associer pour certains cas (C, E et D ; thalassémies) une analyse génotypique.

Elle se déroule suivant les trois étapes du macro processus analytique : Pré-, per- et post-analytique que nous aborderons après avoir rappelé les circonstances de l'étude de l'Hb au laboratoire.

2.2.1. Circonstances de l'étude de l'hémoglobine au laboratoire [12]

Elles sont multiples, il peut s'agir notamment :

- De l'étude systématique de l'hémoglobine chez un sujet originaire d'un pays à risque. L'intérêt du dépistage des HbP se justifie en particulier chez les femmes enceintes et lors de tout bilan pré-opératoire ;
- Du diagnostic étiologique d'anomalies hématologiques évocatrices d'une maladie de l'hémoglobine (anémie hémolytique, microcytose, polyglobulie.....)
- D'une enquête familiale à la suite de la mise en évidence d'une anomalie de l'hémoglobine à l'état hétérozygote ou homozygote ;
- Du dépistage néonatal dans les populations originaires de pays à risque. Ce dépistage permet une prise en charge précoce des enfants atteints d'hémoglobinopathies, en particulier de syndromes drépanocytaires majeurs (S/S,S/C,S/ β -thalassémie) ;
- De la découverte fortuite d'un variant de l'Hb lors du dosage d'HbA1c.

Parfois, cette étude peut être entreprise devant des signes cliniques évocateurs d'une anomalie de l'Hb (cyanose, lithiase vésiculaire, fatigue...).

2.2.2. Etape pré-analytique [12]

2.2.2.1. Renseignements à mentionner sur la demande d'examen

L'identification d'anomalies de l'hémoglobine par analyse du phénotype suppose des renseignements précis accompagnant la demande d'examens : motivation de la demande, âge et origine ethnique du patient et de ses parents présumés, antécédents familiaux connus d'hémoglobinopathies, renseignements cliniques (notion d'ictère...). Toute transfusion récente, datant de moins de trois mois, doit être signalée, car elle risque de rendre difficile, voire erronée, l'interprétation des résultats.

En outre, il faut disposer des résultats d'un hémogramme récent, accompagnés de manière idéale d'un décompte des réticulocytes. Le taux d'hémoglobine, le volume globulaire moyen et le nombre d'hématies doivent être interprétés en fonction de l'âge du patient. L'examen du frottis sanguin doit permettre de reconnaître d'éventuelles anomalies des globules rouges : anisocytose, microcytose, polychromatophilie, présence de cellules cibles, de drépanocytes, de ponctuations basophiles intra-érythrocytaires.

Enfin, le bilan martial, s'il est connu, doit être précisé car il est primordial pour l'interprétation de certains examens comme celle du dosage de l'Hb A₂.

Dans le cadre d'un conseil génétique, lorsqu'est détectée une anomalie de l'hémoglobine chez un parent, il est important que l'autre parent soit examiné.

2.2.2.2. Prélèvement

Le sang est habituellement recueilli sur tubes contenant de l'EDTA comme anticoagulant, pour la réalisation de l'hémogramme, de l'électrophorèse de l'Hb, pour la séparation chromatographique des différentes fractions et leur dosage ainsi que pour l'analyse génotypique. Celle-ci requiert l'obtention du consentement éclairé du patient.

Pour la recherche d'anomalies chez le nouveau-né ou chez le très jeune enfant, le recueil d'une goutte de sang sur papier buvard, support facile à acheminer, peut suffire. La conservation du prélèvement, à 4 °C dans un tube hermétiquement clos, ne doit pas excéder cinq jours.

Toujours dans ce même contexte, et pour un complément d'investigation, un prélèvement de sang sur tube sec ou avec héparinate de lithium comme anticoagulant est requis pour la détermination des paramètres de l'hémolyse (Haptoglobine, Bilirubine, LDH, ASAT) et ceux du bilan martial (Ferritine ± CRP).

La conservation du sang total se fait à +4°C, sans excéder une semaine sinon l'apparition des bandes parasites dues aux formes dégradées de l'Hb rendra délicate l'interprétation des résultats.

En cas de suspicion d'une Hb instable, il est indispensable de faire les recherches rapidement après le prélèvement.

En cas d'envoi des prélèvements d'un laboratoire à un autre, il est important de tenir compte de ces impératifs.

2.2.3. Phase analytique

2.2.3.1. Exploration phénotypique

Elle fait appel à une panoplie très riche de techniques mises en œuvre en Biochimie et en Hématologie :

2.2.3.1.1. Techniques électrophorétiques et chromatographiques

Le principe des techniques électrophorétiques consiste en la migration, dans un champ électrique, d'un hémolysat d'hématies lavées, l'échantillon du patient étant analysé parallèlement à ceux de témoins normaux et pathologiques ou d'échantillons de contrôle AFSC.

Les hémolysats sont obtenus à l'aide de solutions hémolysantes contenant en général du cyanure de potassium. L'hémolyse peut être facilitée par addition de divers agents tensioactifs, comme la saponine par exemple. La concentration en hémoglobine de l'hémolysat est généralement ajustée en fonction des différents supports utilisés.

Il est recommandé de constituer une banque d'hémolysats de sujets normaux et présentant les hémoglobines anormales les plus courantes. Ces hémolysats doivent être préparés dans les mêmes conditions que les patients, et peuvent être stockés à - 20 °C pendant plusieurs semaines, ou mieux, à - 80 °C pendant plusieurs mois.

Il ne faut pas oublier que certaines hémoglobines instables ne peuvent être décelées que sur un prélèvement et un hémolysat frais [12].

Les techniques électrophorétiques et chromatographiques utilisées ainsi que leurs limites sont indiquées dans le **tableau IX**.

Tableau IX : Techniques électrophorétiques et chromatographiques de l'exploration phénotypique de l'Hb [59].

Techniques électrophorétiques		
	PRINCIPE	LIMITES
Electrophorèse à PH alcalin	<ul style="list-style-type: none"> ● L'électrophorèse à pH alcalin est réalisée sur gel d'acétate de cellulose actuellement abandonné au profit de gel d'agarose. ● Après migration, plusieurs bandes sont visualisées chez un adulte normal après coloration par le rouge ponceau ou l'amidoschwartz : <ul style="list-style-type: none"> - une bande correspondant à l'Hb A très majoritaire (97 %), - - une bande correspondant à l'Hb A₂ 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. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Manque de précision pour quantifier les fractions mineures, HbA₂ et HbF. ◆ Faible pouvoir résolutif ◆ Impossible de distinguer des variants de même zone de migration : <ul style="list-style-type: none"> - HbS/D-Punjab - HbE/HbC/HbD-Ara ◆ Mise en défaut chez le nouveau-né où l'HbF est mal séparée des hémoglobines A et S.
Electrophorèse capillaire	<ul style="list-style-type: none"> ● L'hémoglobine est fractionnée comme dans les autres méthodes et les courbes obtenues sont comparables à celles sur cellulose d'acétate. ● La modification essentielle 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Plusieurs variants ayant le même comportement que les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats à ceux obtenus par une autre

	<p>réside dans le fait que la migration se fait à un très haut voltage (9000 V environ) et s'effectue à travers un tube capillaire très fin de 20 µm à 200 µm.</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ce système permet de séparer très rapidement les fractions (quelques minutes) avec une excellente résolution, puisque les fractions séparées sont détectées directement dans le spectre ultraviolet lorsqu'elles passent devant la cellule du photomètre incorporée dans l'appareil. ● Par ailleurs, il serait possible de séparer sans confusion plusieurs variantes d'Hb. 	<p>technique</p>
<p align="center">Electrophorèse à pH acide</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Lorsque la séparation entre plusieurs bandes est insuffisante, l'électrophorèse sur gel d'agar à pH acide (pH 6,2) donne d'indispensables renseignements complémentaires. ● Elle permet, dans certains cas, de confirmer les résultats obtenus après électrophorèse à pH alcalin ou en focalisation isoélectrique. ● Ainsi, par exemple, l'Hb S peut 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Extrêmement sensible aux conditions expérimentales ◆ Reproductibilité difficile

	<p>être distinguée de l'Hb D, et l'Hb C de la E.</p>	
<p align="center">Isoélectrophocalisation</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● La focalisation isoélectrique est une technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide hautement résolutive permettant la séparation des hémoglobines en fonction de leur point isoélectrique dans un gradient de pH. ● La focalisation isoélectrique 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. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Technique semi automatisée, plus longue et plus complexe à mettre en œuvre que l'électrophorèse sur acétate de cellulose. ◆ Pas suffisamment précise pour quantifier les fractions mineures, HbA2 et HbF. ◆ Ne différencie pas HbS /HbD /HbG/ HbLepore, non plus HbC/HbE/HbD-Arab.

Techniques chromatographiques

CHP

- Les différentes fractions d'hémoglobine sont séparées par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants.
 - Les produits à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant.
 - Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant).
 - Suivant la nature des produits, ceux-ci sont adsorbés sur une colonne de silice micro granulaire (colonne chromatographique).
 - L'éluion de la colonne est faite par des gradients de solvants et le dosage s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultraviolet.
 - Ces techniques présentent l'avantage de permettre la quantification des différentes fractions de l'hémoglobine.
- D'autres variants pouvant co-éluer avec les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats avec ceux obtenus par une autre technique

Il est à signaler que pour un screening correct de l'hémoglobine, il faut **au minimum**

2 techniques sur 3 :

- ✚ La 1^{ère} Technique doit permettre une quantification fiable de l'HbA₂ et de l'HbF ainsi qu'une détection de la majorité des variants (séparation selon la charge électrique). C'est le cas de la CLHP par échange de cations (Variant II de Biorad), de l'Electrophorèse capillaire (Capillarys de Sebia).
- ✚ La seconde Technique 2 doit garantir la séparation d'autres variants de l'Hb. Cela permettra d'augmenter la sensibilité du screening: Focalisation isoélectrique, Electrophorèse à pH acide ou alcalin.
- ✚ La Technique 3 correspond à une technique de caractérisation spécifique de l'HbS ou une CLHP des chaînes de globine réalisée dans des laboratoires spécialisés. Dans ce cas, la séparation se fera selon l'hydrophobicité et non selon la charge électrique.

Seules les Hb *S, C et E* peuvent être caractérisées formellement *au phénotype* par des laboratoires non spécialisés [60].

La démarche diagnostique pour l'étude de l'Hb au laboratoire est résumée dans la *figure 26*:

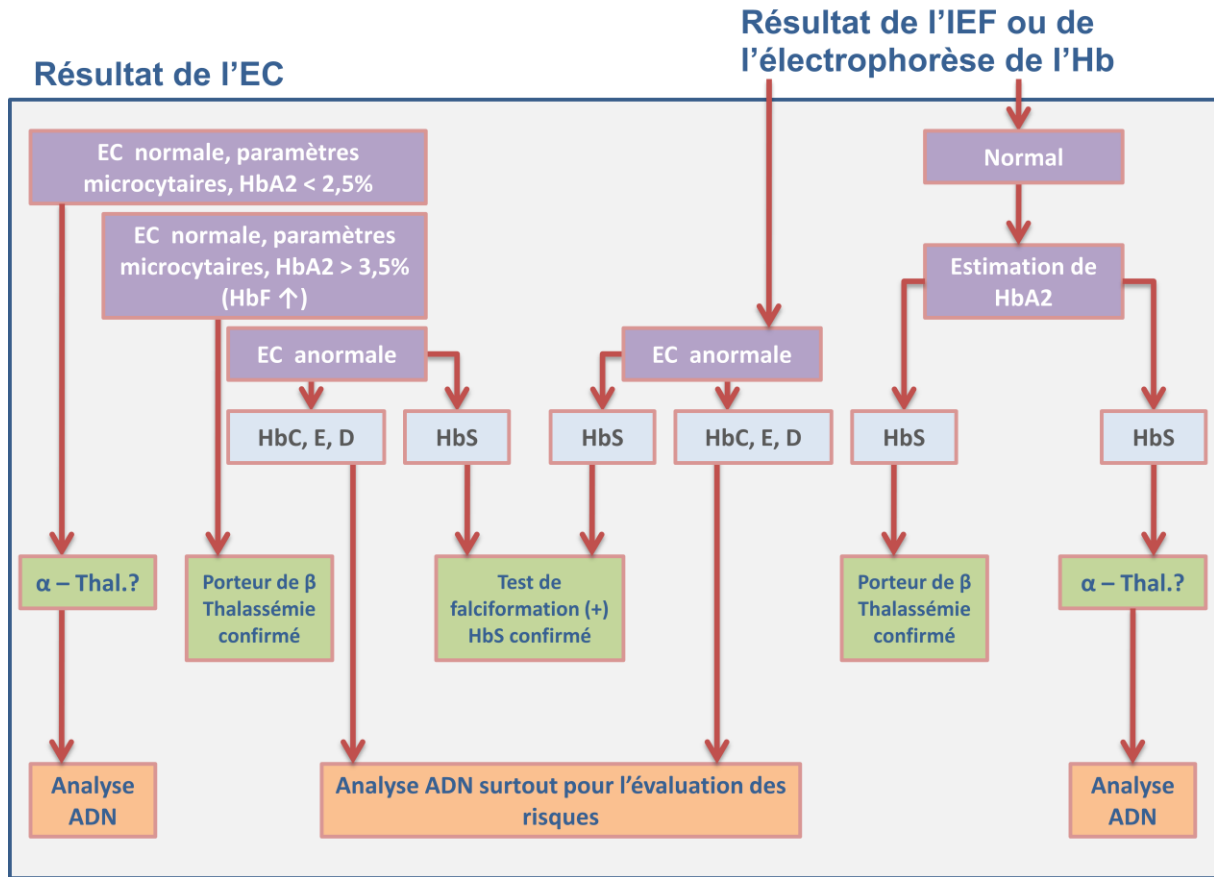


Figure 26 : Démarche diagnostique au laboratoire pour la détection d'une Hb anormale [61].

2.2.3.1.2. Paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques sont mesurés par équipement électronique (compteur des globules rouges) qui peut évaluer le contenu en hémoglobine des globules rouges, leur volume et leur taille, annotés respectivement concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMHb) et volume globulaire moyen (VGM) [13].

2.2.3.1.3. Autres examens complémentaires [12]

➤ Test de falciformation expérimentale

L'incubation d'une goutte de sang entre lame et lamelle en présence d'une solution réductrice de méta-bisulfite de sodium entraîne en quelques minutes l'apparition d'hématies en faux ou en feuilles de houx lors de la présence d'Hb S.

Il faut disposer en parallèle de témoins positifs et négatifs et ne pas oublier que ce test a une sensibilité et une spécificité limitées. En effet, il est négatif en présence d'un taux élevé d'Hb F.

➤ Test d'Itano

L'Hb S d'un hémolysat réduite par une solution d'hydrosulfite de sodium en présence d'un tampon phosphate à pH 6,8 précipite. Ce test, plus sensible que celui de la falciformation, est préféré par certains laboratoires. Certains variants S et C porteurs d'une deuxième mutation au niveau de la chaîne beta (S Antilles, C Harlem...) donnent également un résultat positif.

➤ Test d'instabilité à l'isopropanol

L'incubation d'un hémolysat à 37 °C en présence d'isopropanol à pH 7,4 n'entraîne pas de précipitation de l'Hb A avant 50 minutes. Les hémoglobines instables donnent un trouble ou un précipité avant la 30^{ème} minute.

➤ Test d'instabilité au bleu de crésyl

Après incubation du sang 20 minutes à 37 °C avec le bleu de crésyl brillant, utilisé habituellement pour mettre en évidence les réticulocytes, l'examen microscopique d'un frottis montre des précipités dans les hématies notamment en cas d'hémoglobines instables. La plus fréquente de celles-ci est l'Hb Köln, ou l'Hb H (béta 4) présente chez les sujets alpha-thalassémiques adultes avec trois gènes alpha atteints.

➤ Test de Kleihauer-Betke

Ce test est habituellement utilisé pour dépister un passage trans-placentaire du sang foetal chez la femme enceinte. Le traitement d'un frottis sanguin par un tampon acide élue l'Hb A des hématies et permet de repérer les hématies chargées d'Hb F qui, seules, restent colorées. Chez un adulte normal, moins d'une hématie sur 10 000 est positive ; ce chiffre s'élève en cas de thalassémie ou de PHHF. En principe, dans le cas de PHHF, la répartition de l'Hb F est le plus souvent homogène, alors que dans les thalassémies, elle est hétérogène.

2.2.3.2. *Analyse génotypique [61]*

Lorsque l'évaluation des risques est requise, la fiabilité des méthodes de diagnostic de base peut être insuffisante et une analyse du génotype permettra un diagnostic de certitude. Cette analyse génotypique est pratiquée par des techniques de biologie moléculaire.

Elle est requise lorsqu'un porteur d'Hb S est confirmé par le test de falciformation et que le diagramme de l'analyse par EC de son partenaire est anormal, que l'identification soit présomptive ou non, ou si les données hématologiques sont anormales ou limites. De même, une attention particulière est essentielle si le patient est à limite de la β -Thalassémie avec un taux élevé d'Hb A₂, de l'Hb E, de l'Hb C, de l'Hb D ou d'autres mutations fréquentes ou moins fréquentes.

En cas d' α -Thalassémie, la différenciation des types α^+ ou α^0 est nécessaire pour prévoir le type de risques génétiques encourus et les mutations ou les délétions de gènes α doivent être étudiées par le biais d'une analyse ADN.

L'évolution des connaissances a été explosive ces dernières années, concernant les gènes de globine, leur régulation normale et les mutations susceptibles de se traduire par une pathologie. Parallèles à ce développement conceptuel, les progrès technologiques permettent de plus en plus souvent de formuler un diagnostic au

niveau moléculaire. Une des applications en est le conseil génétique et l'offre d'un diagnostic prénatal. L'étude génotypique peut aussi aider l'interprétation d'un diagnostic difficile.

Deux séries de techniques sont d'usage fréquent, actuellement normalisé:

- ✚ les techniques de cartographie après clivage enzymatique mettent en évidence des délétions ou remaniements de l'organisation des gènes
- ✚ la technique d'amplification ciblée par PCR permet, dans une deuxième étape, une analyse fine et la mise en évidence d'altérations minimales ou ponctuelles.

Le choix d'une stratégie précise est variable selon les cas. L'évolution très rapide des connaissances fait que cette stratégie, également, est susceptible d'évoluer.

2.2.4. Phase post analytique [12]

2.2.4.1. Interprétation des résultats

Dans le système électrophorétique à pH alcalin, l'absence de bande de migration anormale permet simplement de conclure à une électrophorèse normale de l'hémoglobine. Il ne faut jamais oublier qu'un tracé électrophorétique normal ne permet pas d'exclure certaines hémoglobinopathies, en particulier certaines thalassémies.

En revanche, la présence d'une bande de migration anormale va déterminer différents examens complémentaires. Dans tous les cas, l'hémogramme, les données cliniques, l'origine ethnique et éventuellement une étude familiale des patients participent au diagnostic.

Différents cas de figures vont se présenter :

a. Présence d'une bande anormale migrant au niveau de l'Hb S après électrophorèse en milieu alcalin :

L'Hb S migre à pH alcalin à égale distance des Hb A et A2. Cependant, d'autres hémoglobines anormales co-migrent à ce niveau : c'est le cas de l'Hb D, mais aussi de l'Hb G, P, Lepore et Korle-Bu.

Une électrophorèse en agar à pH acide est indispensable afin de distinguer l'Hb S d'autres hémoglobines anormale.

Il est intéressant de noter que la focalisation isoélectrique, technique plus résolutive, permet parfois de mettre en évidence de légères différences de migration entre ces Hb anormales.

Une bande de faible intensité, environ 10 % de l'hémoglobine totale, migrant au niveau de l'Hb S à pH alcalin, et associée à de l'Hb A permet d'évoquer une hémoglobinose Lepore hétérozygote, et elle s'accompagne alors d'une microcytose sans symptomatologie clinique. Cette Hb Lepore est rarement rencontrée à l'état homozygote : elle s'accompagne alors d'une symptomatologie voisine d'une beta-thalassémie homozygote.

Si la présence d'Hb S est confirmée après électrophorèse en agar à pH acide et par un test d'Itano ou un test de falciformation positif, l'orientation diagnostique est différente selon qu'il existe ou non de l'Hb A.

- ➡ En l'absence d'Hb A, deux cas peuvent se présenter : soit l'Hb S est nettement majoritaire et elle est en général associée à une bande minoritaire d'Hb F, soit l'Hb S est associée à une autre hémoglobine anormale. Dans le premier cas de figure, un taux d'Hb S en moyenne supérieur à 80 % permet d'évoquer une drépanocytose homozygote SS associée ou non à une alpha-thalassémie, ou un syndrome drépanocytaire S/ β_0 ; en cas de trait alpha-thalassémique associé, il peut y avoir atteinte d'un seul gène (sujets SS

alpha-/alpha alpha-) ou de deux gènes (SS alpha-/alpha-). Chez tous ces sujets, une bande F de faible intensité (de 5 à 10 % en moyenne) est visible ; l'hémogramme montre une anémie (< 10 g/dl), régénérative, normocytaire pour les sujets SS, et microcytaire pour les sujets thalassémiques. Dans le cas de PHHF associée à de l'Hb S (sujets S PHHF), le taux d'Hb F est de l'ordre de 30 % et ces sujets ne sont pas anémiques. Enfin, rappelons qu'un traitement des drépanocytaires par hydroxyurée (Hydréa®) fait augmenter le taux d'Hb F, qui peut alors s'élever jusqu'à 25 %. Lorsque l'Hb S est associée à une autre hémoglobine anormale, le syndrome drépanocytaire peut être sévère comme chez les sujets S/D ou S/OArab, ou très modéré comme chez les sujets SE.

- ➡ En présence d'Hb A, il faut évoquer une drépanocytose hétérozygote AS. Il est alors important de quantifier les différentes fractions A, A2 et S. En l'absence de trait thalassémique associé, l'Hb S représente une fraction de 35 à 45 % de l'hémoglobine totale. Les sujets AS ont un hémogramme normal et sont cliniquement asymptomatiques. Ce n'est pas le cas pour les sujets A/S Antilles, qui sont atteints d'un syndrome drépanocytaire, malgré un taux d'Hb A supérieur à 50 %. Le variant S/Antilles, caractérisé par une double mutation sur la chaîne beta (Glu 6 --> Val et Val 23--> Ile), peut être distingué de l'Hb S par focalisation isoélectrique. Un taux d'Hb S inférieur à 30 % est en faveur d'une alpha-thalassémie mineure associée à la drépanocytose hétérozygote AS. En revanche, un taux d'Hb S supérieur à 50 % évoque l'association d'une drépanocytose hétérozygote avec une beta+-thalassémie (S/beta+), l'Hb S étant, rappelons-le, un variant de la chaîne beta. Dans ce cas, l'Hb A représente alors 5 à 20 % de l'hémoglobine totale. Ces sujets S/beta+ présentent une microcytose avec ou sans anémie, et un

taux d'Hb A2 élevé ($\geq 5\%$). Un taux d'Hb S compris entre 50 et 80 % associé à de l'Hb A est également rencontré chez les sujets SS ou S/ β^0 transfusés depuis moins de trois mois.

b. Présence d'une bande anormale migrant au niveau de l'Hb A2 après électrophorèse en milieu alcalin

L'Hb S migre à pH alcalin à égale distance des Hb A et A2. Cependant, d'autres hémoglobines anormales co-migrent à ce niveau : c'est le cas de l'Hb D, mais aussi de l'Hb G, P, Lepore et Korle-Bu.

Une électrophorèse en agar à pH acide est indispensable afin de distinguer l'Hb S d'autres hémoglobines anormales.

Il est intéressant de noter que la focalisation isoélectrique, technique plus résolutive, permet parfois de mettre en évidence de légères différences de migration entre ces Hb anormales.

Une bande de faible intensité, environ 10 % de l'hémoglobine totale, migrant au niveau de l'Hb S à pH alcalin, et associée à de l'Hb A permet d'évoquer une hémoglobinose Lepore hétérozygote, et elle s'accompagne alors d'une microcytose sans symptomatologie clinique. Cette Hb Lepore est rarement rencontrée à l'état homozygote : elle s'accompagne alors d'une symptomatologie voisine d'une bêta-thalassémie homozygote.

Si la présence d'Hb S est confirmée après électrophorèse en agar à pH acide et par un test d'Itano ou un test de falciformation positif, l'orientation diagnostique est différente selon qu'il existe ou non de l'Hb A.

- ➔ En l'absence d'Hb A, deux cas peuvent se présenter : soit l'Hb S est nettement majoritaire et elle est en général associée à une bande minoritaire d'Hb F, soit l'Hb S est associée à une autre hémoglobine anormale. Dans le

premier cas de figure, un taux d'Hb S en moyenne supérieur à 80 % permet d'évoquer une drépanocytose homozygote SS associée ou non à une alpha-thalassémie, ou un syndrome drépanocytaire S/ β_0 ; en cas de trait alpha-thalassémique associé, il peut y avoir atteinte d'un seul gène (sujets SS alpha-/alpha alpha-) ou de deux gènes (SS alpha-/alpha-). Chez tous ces sujets, une bande F de faible intensité (de 5 à 10 % en moyenne) est visible ; l'hémogramme montre une anémie (< 10 g/dl), régénérative, normocytaire pour les sujets SS, et microcytaire pour les sujets thalassémiques. Dans le cas de PHHF associée à de l'Hb S (sujets S PHHF), le taux d'Hb F est de l'ordre de 30 % et ces sujets ne sont pas anémiques. Enfin, rappelons qu'un traitement des drépanocytaires par hydroxyurée (Hydréa®) fait augmenter le taux d'Hb F, qui peut alors s'élever jusqu'à 25 %. Lorsque l'Hb S est associée à une autre hémoglobine anormale, le syndrome drépanocytaire peut être sévère comme chez les sujets S/D ou S/OArab, ou très modéré comme chez les sujets SE.

- ➡ En présence d'Hb A, il faut évoquer une drépanocytose hétérozygote AS. Il est alors important de quantifier les différentes fractions A, A2 et S. En l'absence de trait thalassémique associé, l'Hb S représente une fraction de 35 à 45 % de l'hémoglobine totale. Les sujets AS ont un hémogramme normal et sont cliniquement asymptomatiques. Ce n'est pas le cas pour les sujets A/S Antilles, qui sont atteints d'un syndrome drépanocytaire, malgré un taux d'Hb A supérieur à 50 %. Le variant S/Antilles, caractérisé par une double mutation sur la chaîne beta (Glu 6 --> Val et Val 23--> Ile), peut être distingué de l'Hb S par focalisation isoélectrique. Un taux d'Hb S inférieur à 30 % est en faveur d'une alpha-thalassémie mineure associée à la drépanocytose hétérozygote AS. En revanche, un taux d'Hb S supérieur à

50 % évoque l'association d'une drépanocytose hétérozygote avec une β^+ -thalassémie (S/ β^+), l'Hb S étant, rappelons-le, un variant de la chaîne β . Dans ce cas, l'Hb A représente alors 5 à 20 % de l'hémoglobine totale. Ces sujets S/ β^+ présentent une microcytose avec ou sans anémie, et un taux d'Hb A₂ élevé (≥ 5 %). Un taux d'Hb S compris entre 50 et 80 % associé à de l'Hb A est également rencontré chez les sujets SS ou S/ β_0 transfusés depuis moins de trois mois.

c. Présence d'une bande anormale migrant au niveau de l'Hb A₂ après électrophorèse en milieu alcalin

L'électrophorèse en gel d'agar à pH acide permet de distinguer les Hb C, E et O-Arab (variant β , Glu 121 \rightarrow Lys), qui migrent au même niveau que l'Hb A₂ à pH alcalin. Un variant α dont la chaîne comprend 31 acides aminés supplémentaires, l'Hb Constant Spring, donne également une bande au même niveau en milieu alcalin mais beaucoup moins marquée.

Comme les sujets drépanocytaires hétérozygotes AS, les sujets hétérozygotes AC et AE ne présentent pas d'anémie en l'absence de thalassémie associée. Chez les sujets homozygotes CC ou EE, l'anémie est modérée ; chez les sujets EE, le plus souvent originaires du Sud-Est asiatique, il existe une pseudo-polyglobulie microcytaire (VGM < 70 fl) en l'absence de trait thalassémique.

L'association d'une Hb C, fréquente en Afrique, avec l'Hb S, est responsable d'un syndrome drépanocytaire, mais plus modéré que celui des homozygotes SS. Les sujets SC ont un taux d'Hb S d'environ 50 %, associé à une anémie modérée microcytaire ou normocytaire. En revanche, les sujets SE, dont le taux d'Hb S est d'environ 70 %, n'ont pas d'anémie mais sont microcytaires.

d. Présence d'une hémoglobine à migration plus rapide que celle de l'Hb A après électrophorèse en milieu alcalin ou après focalisation isoélectrique

Des bandes discrètes d'hémoglobines migrant plus rapidement que l'Hb A sont parfois observées: elles peuvent correspondre à une Hb Bart's (γ_4), témoin d'une alpha-thalassémie. Cette anomalie n'est repérable qu'à la naissance. À l'âge adulte, ces sujets ont généralement une électrophorèse normale lorsqu'un ou deux gènes alpha sont atteints. Ils ne présentent pas d'anémie. Cependant, lorsque trois gènes alpha sur quatre sont atteints, une bande de 10 à 30 % d'Hb H (β_4) à migration rapide persiste chez l'adulte. Ces sujets présentent alors une anémie microcytaire. Quelques autres hémoglobines peu fréquemment rencontrées migrent plus vite que l'Hb A, telles les Hb Hope, I, J ou N.

e. Hémoglobines donnant un test de falciformation positif

En dehors de l'Hb S, plusieurs hémoglobines sont responsables d'un phénomène de pseudo-falciformation, ce qui doit rendre prudent pour toute interprétation de ce test. L'une des plus connues est l'Hb Sétif, mutant de la chaîne alpha en position 94 (Asp --> Tyr), qui migre à l'électrophorèse à pH alcalin entre Hb S et Hb C. Dans ce cas, la falciformation est surtout déclenchée par la simple déshydratation des hématies.

f. Augmentation du taux d'Hb A₂

Un taux d'Hb A₂ supérieur à 3,5 %, généralement entre 4 et 8 %, est le plus souvent associé à une β -thalassémie. Les sujets homozygotes présentent une anémie très microcytaire. En revanche, à l'état hétérozygote, l'hémogramme des sujets beta-thalassémiques montre classiquement une pseudopolyglobulie microcytaire (hématies $> 5,8.10^{12}/l$, VGM voisin de 65-70 fl), en l'absence de carence martiale. Les difficultés diagnostiques surgissent lorsque existe une carence martiale associée, notamment chez les femmes enceintes : dans ce cas, le taux d'Hb A₂, diminué par la carence en fer, peut

être à la limite supérieure de la normale ou normal (< 3,5 %) et un contrôle après recharge martiale s'avère alors indispensable.

D'autre part, il faut savoir que quelques beta-thalassémies hétérozygotes, dites « silencieuses », ne présentent pratiquement aucune des anomalies habituelles, y compris l'élévation de l'Hb A₂. Par ailleurs, l'Hb A₂ peut s'élever modérément au cours d'anémies mégalo-blastiques, d'hyperthyroïdies ou d'érythro-leucémies.

g. Diminution du taux d'Hb A₂

Une diminution d'Hb A₂ est observée notamment au cours des alpha-thalassémies, avec 2 ou 3 gènes atteints, au cours des -delta-beta-thalassémies hétérozygotes, ou au cours de l'hémoglobino-se Lepore. Il existe également une diminution acquise de l'Hb A₂ dans les carences martiales sévères, au cours d'anémies sidéroblastiques congénitales ou acquises.

h. Augmentation du taux d'Hb F

Chez l'adulte normal, le taux d'Hb F est inférieur à 1 % mais il existe des variations génétiques et liées à l'âge. La coexistence d'un taux d'Hb F supérieur à 20 % et surtout dépassant 50 % et d'une anémie microcytaire hypochrome évoque une beta-thalassémie majeure. Le test de Kleihauer-Betke permet de mettre en évidence une répartition hétérogène de l'Hb F dans les hématies : une population d'hématies contient de l'Hb F, l'autre non.

Au cours de syndromes -delta-beta-thalassémiques hétérozygotes, des taux d'Hb F de l'ordre de 5 à 15 % sont retrouvés chez l'adulte.

Un taux élevé d'Hb F sans anémie, ni microcytose, ni signes cliniques correspond en général à une PHHF. Différents types ont été décrits : dans les types noir et grec, le taux d'Hb F varie généralement de 10 à 25 %, alors que dans le type suisse, il n'est que de l'ordre de 1 à 5 %, à l'état hétérozygote.

Rappelons qu'au cours de différents syndromes drépanocytaires, il existe une augmentation de l'Hb F, de quelques pourcents à 30 % selon les cas.

2.2.4.2. *Conseil génétique*

D'après les résultats obtenus, *six cas* de la descendance sont porteurs d'un trait thalassémique et *trois cas* porteurs de l'hémoglobine D-Punjab à l'état hétérozygote. Ceci indique l'intérêt du conseil génétique qui a pour but d'évaluer le risque de survenue ou de récurrence d'une maladie ou d'une malformation dans la descendance d'un couple et de proposer à celui-ci les différentes solutions de prévention.

Dans les pays occidentaux, le diagnostic d'hémoglobinopathie est largement répandu et permet d'identifier tôt dans la vie les anomalies les plus graves. La détection des hétérozygotes, asymptomatiques dans la plupart des cas, permet notamment de reconnaître les couples à risque et de leur proposer éventuellement un conseil génétique.

La transmission des principales hémoglobinopathies se fait selon un mode autosomique récessif. Le but ultime du dépistage de porteurs sains est d'identifier, non pas des porteurs sains isolés, mais des couples dont les deux membres sont porteurs et qui présentent donc un risque sur quatre à chaque grossesse de donner naissance à un enfant malade. Après identification des sujets porteurs, il faut pouvoir proposer à un couple un conseil génétique qui précisera les risques génétiques en fonction de l'anomalie dépistée et, le cas échéant, un diagnostic prénatal [14].

Le conseil génétique passe par une multitude d'étapes que nous allons détaillées ci-dessous [62].

Evaluation du risque

La consultation de conseil génétique a lieu idéalement en binôme médecin et psychologue. Trois situations dominant :

- + Demande d'information génétique de la part de personnes porteuses d'un trait d'hémoglobinopathie. Tout dépistage d'un trait devrait déboucher sur une information génétique.
- + Demande spontanée d'un couple : savoir s'il constitue un « couple à risque » avant la conception.

Le couple est adressé en conseil génétique au moment d'une grossesse en vue d'un diagnostic prénatal par un autre praticien. La grossesse est débutée, le risque d'hémoglobinopathie grave pour le fœtus est présomptif et fondé sur des analyses antérieures et les antécédents.

● Diagnostic

Il est basé sur la réalisation d'un arbre généalogique, ainsi qu'une panoplie d'exams de première intention à demander à un couple potentiellement à risque, notamment :

- + une numération formule sanguine.
- + une étude de l'hémoglobine du couple qui comprend la caractérisation d'une hémoglobine anormale et le dosage des Hb A₂ et F.
- + un dosage de la ferritine sérique : la carence en fer pouvant interférer avec les deux analyses précédentes.

Vu la gravité des enjeux, si l'étude de l'hémoglobine n'a pas été effectuée selon les recommandations de la SFBC (société française de la biologie clinique), il faut imposer un nouveau prélèvement et associer une étude de l'Hb selon les méthodes de références et un prélèvement pour l'étude en biologie moléculaire.

● Aspect éthique

Il convient de respecter les bonnes pratiques et de la législation en matière de conseil génétique, du prélèvement foetal, de la réalisation des analyses moléculaires et de l'éventuelle IMG.

● Annonce du résultat

L'annonce du résultat fait l'objet d'une nouvelle consultation avec le même binôme médecin psychologue.

**CONCLUSION
&
RECOMMANDATIONS**

La présente étude souligne la rareté de ce type d'hémoglobinopathie et surtout la difficulté de son diagnostic. Celui-ci fait appel à plusieurs techniques qui relèvent de l'exploration phénotypique auxquelles devra être associée une analyse génotypique pour une meilleure prise en charge des patients.

Dans l'optique d'une prévention optimale de cette affection, il est nécessaire de la faire connaître à l'échelle communautaire. En l'absence d'une stratégie nationale de dépistage, nous nous permettons de proposer des recommandations :

- ✚ aux autorités sanitaires et politiques pour instituer le conseil génétique avant le mariage, informer la population des anomalies de l'Hb et renforcer les laboratoires publics pour qu'ils puissent régulièrement pratiquer l'électrophorèse de l'Hb.
- ✚ au personnel soignant pour informer et sensibiliser les porteurs du trait sur les risques génétiques en cas de mariage et encourager les consultations prénuptiales afin de mieux prévenir les hémoglobinopathies,
- ✚ enfin, au CNTS en vue d'entreprendre une étude sur les anomalies de l'hémoglobine chez les donneurs volontaires de sang afin de pouvoir disposer de données épidémiologiques marocaines pour une meilleure prise en charge de ce type de pathologie.

RESUMES

Résumé

Titre : Hémoglobinoses D-Punjab : Résultats d'une enquête réalisée chez une famille marocaine (HMIMV-Rabat)

Mots clés : Hémoglobine D-Punjab - β_0 -thalassémie - Double hétérozygotie- Conseil génétique

Auteur : Leila ESSAID

Rapporteur : Pr. Zohra OUZZIF

Introduction

Les hémoglobinopathies sont définies par la présence d'anomalies qualitatives générant des hémoglobines anormales ou variants de l'hémoglobine et/ou quantitatives à l'origine d'alpha ou bêta-thalassémie.

Parmi les mutants ponctuels rares figure le groupe des hémoglobines D, dont appartient le variant Hb D-Punjab.

L'objectif de ce travail est de faire la lumière sur ce mutant jamais rapporté dans la littérature marocaine, de présenter la démarche diagnostique requise pour son exploration à travers l'étude menée chez les membres d'une même famille et son suivi, et surtout de souligner l'intérêt dans ce contexte du conseil génétique.

Patients et méthodes

Il s'agit d'une étude de cas d'hémoglobinopathie D-Punjab, issus de la même famille, répertoriés de façon transversale au laboratoire de biochimie, à l'HMIMV de Rabat.

Pour réaliser cette étude, nous nous sommes basées sur des outils analytiques associant des techniques d'électrophorèse, de chromatographie et de biologie moléculaire.

Résultats

D'après les résultats obtenus, trois cas de cette famille sont atteints de la double hétérozygotie D-Punjab/ β_0 -thalassémie. Chez ces patients, nous avons noté une pseudopolyglobulie, une hypochromie microcytaire, une anisocytose et des hématies en cibles avec un taux très élevé de l'Hb D, un faible pourcentage de l'Hb A et un chiffre augmenté de l'Hb A₂.

Pour les autres cas étudiés, trois expriment le variant D-Punjab à l'état hétérozygote et six sont porteurs de trait thalassémique.

Discussion/Conclusion

Les résultats de la présente étude concordent, dans la majorité des cas, avec les données de la littérature.

Le présent travail confirme, par ailleurs, la rareté de ce type d'hémoglobinopathie et souligne encore une fois de plus l'intérêt indéniable du conseil génétique.

Abstract

Title: Hemoglobin D-Punjab: Results of an inquiry accomplished in a Moroccan family (MHMV-Rabat).

Keywords: Hemoglobin D-Punjab - β^0 -thalassemia - Double heterozygosity – Genetic counseling.

Reporteur: Pr Zohra OUZZIF

Author: Leila ESSAID

Introduction

Hemoglobinopathies are defined by the presence of qualitative abnormalities generating abnormal hemoglobins or hemoglobin variants and / or quantitative origin of alpha or beta-thalassemia

Among mutant punctual rare represent the group of hemoglobins D, which is the variant Hb D-Punjab.

The objective of this study, is to bring the truth about it mutating never brought back in Moroccan literature, to introduce step diagnoses requested for its exploration across the study led to the members of the same family and its monitoring, and especially to underline interest in this context of genetic counseling.

Patients and methods

This is a study of cases of hemoglobinopathie D-Punjab, existent of the same family, listed in a transverse manner in the laboratory of biochemistry, in MHMV of Rabat.

To accomplish this study, we were based on analytical tools linking techniques of electrophoresis, chromatography and molecular biology.

Results

According to acquired results, three cases of this family are attained of the double heterozygosity hemoglobin D-Punjab / β^0 -thalassemia. At these patients, we noted a pseudopolycythemia, hypochromia, microcytosis, anisocytosis and red blood cells in targets with a very well brought up rate of Hb D, a weak percentage of Hb A and a number augmented by Hb A₂.

For the other cases studied, three express the variant D-Punjab in the heterozygous state and six are carriers of thalassemia trait.

Discussion and conclusion

The results of the present study are consistent, in most cases with the literature data.

The present work also confirms the rarity of this type of hemoglobinopathie and underlines yet again the undeniable interest of genetic counseling.

ملخص

العنوان : اليمحور د-بنجاب: نتائج دراسة استقصائية لعائلة مغربية (المستشفى العسكري محمد الخامس - الرباط).
الكلمات الأساسية: اليمحور د-بنجاب- بيطاه طلاسيما- ثنائي التخالف - الاستشارة الوراثية.
المقرر: الأستاذة زهرة أوزيف
من طرف: ليلي السعيد

مقدمة

يتم تعريف الإضطرابات اليمحورية بوجود تشوهات نوعية تنتج عنها متغيرات اليمحور و/او تشوهات كمية مسببة لالفا و بيطا طلاسيما.
من بين المتغيرات اليمحورية النادرة،توجد مجموعة اليمحورات د التي ينتمي اليها المتغير د-بنجاب.
الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على هذا المتغير, تقديم عملية التشخيص اللازمة لاكتشافه ومتابعته من خلال الدراسة التي أجريت لأفراد عائلة واحدة وبالخصوص إبرازأهمية الإستشارة الوراثية.

المرضى و الأساليب

تعتبر هذه الدراسة دراسة عرضية لحالات اليمحور د-بنجاب المنتمية لنفس العائلة أنجزت بمختبرالبيوكيمياء بالمستشفى العسكري محمد الخامس بالرباط .
لانجاز هذه الدراسة،اعتمدنا على أدوات تحليلية تجمع بين تقنيات الإلكتروفوريز،الكروماتوغرافي والبيولوجيا الجزيئية.

النتائج

استنادا للنتائج المحصل عليها، ثلاث حالات من هذه العائلة مصابة بثنائي التخالف اليمحور د-بنجاب / بيطاه طلاسيما. عند هؤلاء المرضى وجدنا شبه كثرة الكريات الحمراء، نقص صبغي للكريات الحمراء مع صغرها وتفاوتها ووجود كريات حمراء هدف. كما وجدنا معدلا عاليا جدا من اليمحور د، نسبة ضعيفة من اليمحور أ₂، ومرتفعة بالنسبة لليمحور أ.
بالنسبة للحالات الأخرى المدروسة، ثلاث حالات مصابة بالمتغير د بنجاب في حالته المتخالفة وست حالات حاملة لخلطة طلاسيمية.

المناقشة و الخاتمة

نتائج هذه الدراسة تتوافق مع المعطيات الأدبية. كما يؤكد هذا العمل ندرة هذا النوع من الاضطرابات اليمحورية ويبرز الأهمية البالغة للاستشارة الوراثية.

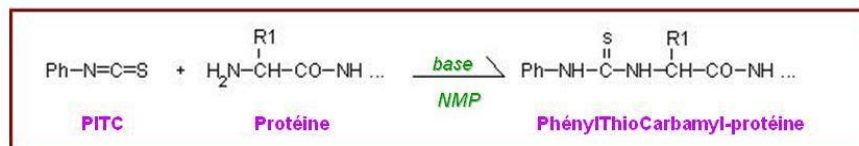
Annexe 1

Principe de dégradation d'Edman [63]

Elle se réalise en trois étapes :

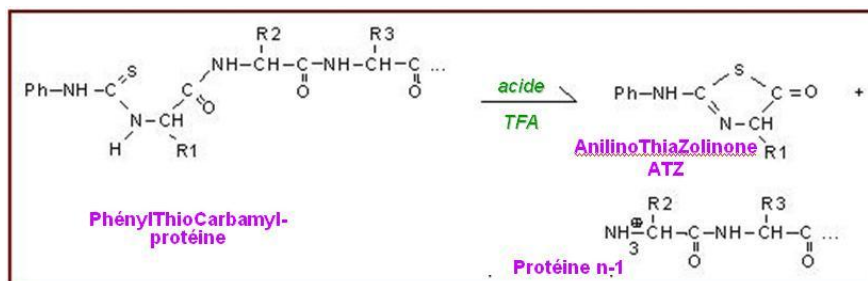
● *le couplage :*

En présence de tampon N-méthyl pipéridine, le Phényl-Iso-Thio-Cyanate (PITC) se couple aux fonctions amines primaires et secondaires des protéines (PTC-Protéine). Le temps de réaction à 45° C est de 18 minutes.



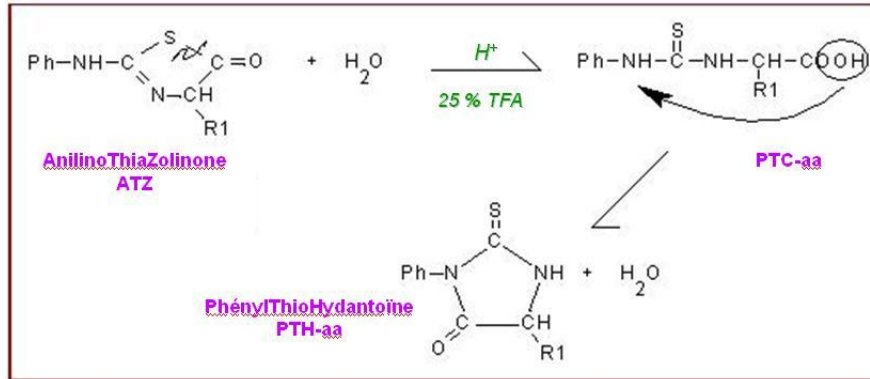
● *la coupure :*

La liaison peptidique suivante est fragilisée ce qui permet sa coupure en 3 minutes par l'acide trifluoroacétique (TFA) pur générant ainsi l'anilino-thiazolinone (ATZ) du premier acide aminé (AA) et la protéine ayant perdu le 1er acide aminé.



● *la conversion :*

L'ATZ-AA est extrait du milieu réactionnel et converti en milieu acide en phényl thio-hydantoïne (PTH-AA) plus stable.

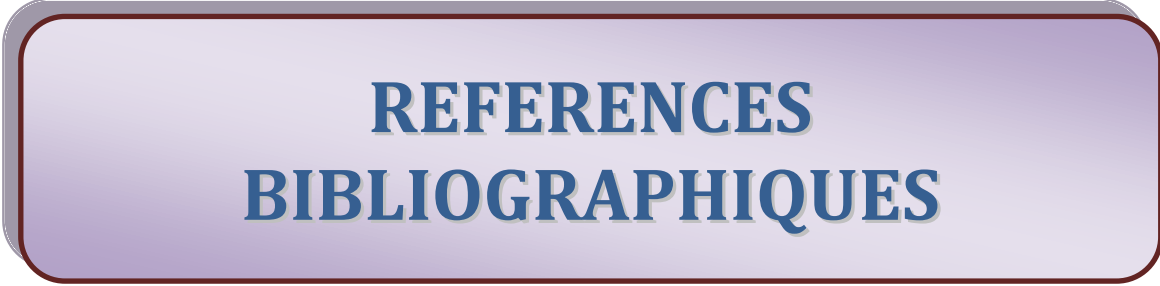


Le PTH-AA peut donc être analysé par HPLC et sa nature déterminée grâce à un étalon de PTH-AAs. Le cycle de réaction peut être répété et conduit ainsi à la séquence de la protéine.

Annexe 2

Technique de Finger-print [64]

La détermination de la séquence d'une protéine peut être une tâche longue et difficile. Cependant, une fois que la structure primaire d'une protéine a été élucidée celle d'une protéine presque identique comme celle trouvée chez une espèce très voisine ou après une mutation ou une modification chimique sera déterminée plus facilement. Classiquement, ceci a été fait en combinant la chromatographie sur papier et l'électrophorèse sur papier d'hydrolysats protéiques partiels, technique appelée *fingerprint* ou carte peptidique. Les fragments peptidiques qui comportent des modifications d'acide(s) aminé(s) vont migrer à des endroits différents sur leur *fingerprint* (carte peptidique) comparés aux peptides correspondants de la protéine originale. On peut alors éluer les peptides différents et les séquencer afin d'établir les différences entre la protéine originale et la protéine apparentée sans devoir séquencer celle-ci entièrement.



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] Pr **Leblouch P, Cavasana Calvo M, Gluckman E.** Succès d'un essai clinique en thérapie génique pour la β -thalassémie .Revue nature **2010**.
- [2] **Hamane I.T.** Electrophorèse de l'hémoglobine chez 616 patients vus au CNTS de Bamako. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie **2006**;83 p
- [3] **Badens C.** La prévention des hémoglobinopathies dans les pays non endémiques. Journée "Drépanocytose et β -thalassémie". Société de pathologie exotique **2000**.
- [4] **Ghani R, Manji M.A, Nikhat A.** Hemoglobinopathies among five major ethnic groups in Karachi, Pakistan. Department of Biochemistry, University of Karachi, Karachi; Pathology Laboratories **2002**; 33(4): 855-861.
- [5] Drépanocytose et autres hémoglobinopathies.OMS **2011**; Aide mémoire N° 308.
- [6] **Bernadette M, Matthew D.** Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bulletin of the World Health Organization **2008**; 86 (6): 480-487.
- [7] **Labie D, Elion J.** Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. EMC-Hématologie **2005**; 2: 220-239.

- [8] **M'Rad A.** Contribution à l'étude des hémoglobines anormales : Epidémiologie, structure, fonction des hémoglobines anormales en Tunisie. Thèse de Doctorat en Science **1993**.
- [9] <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/menu.html>
- [10] **Gulbis B, Cotton F, Vertongen F.** Hémoglobines anormales rares. EMC-Hématologie **2004**: 106-114.
- [11] **Guemira F, Hajji F, Sellami M.** Un cas d'hémoglobine D Punjab en Tunisie. Caractérisation et étude structurale. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis **1987** ; 64(3) :341-349.
- [12] **Siguret V, Andreux J-P.** Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype .Annales de Biologie Clinique **1997** ; 55(2) :103-12.
- [13] **Lusina D, Sifi A, Mathieu P, Adam M.N, Le Pennec M.P, Guerou T, Baledent F.** Evaluation d'un système modulaire de chromatographie liquide haute performance pour le diagnostic des hémoglobinopathies .Annales de **biologie** clinique **1998**; 56 (6) :743-9.
- [14] **HYDRAGEL7HEMOGLOBINE Ref.4106 & HYDRAGE 15 HEMOGLOBINE Ref .4126.** Notice d'utilisation Sebia **2006** ;10 p.

- [15] **CAPILLARYS HEMOGLOBINE** Ref .2007. Notice d'utilisation Sebia **2008**;18 p.
- [16] **Frédéric G, Micheline M.R, Neonato M.G.** Diagnostic biologique des pathologies génétiques de l'hémoglobine. Docstoc **2010**.
- [17] **Ritesh S, Arpita R.D, Gaurav T.** Detection of Hb variants and hemoglobinopathies in Indian population using HPLC: Report of 2600 cases. Indian journal of pathology and microbiology **2010**; 53(1): 57-62.
- [18] **Bogard M, Lamoril J, Ameziane N.** Principe de Biologie Moléculaire en Biologie clinique **2005**. Elsevier.
- [19] **Etienne J, Clauser E, Housset C, Roingeard P.** Biochimie Génétique, Biologie Moléculaire **2006**. Elsevier.
- [20] **Charif khodja M, Ghermi M, Tahri M, Bettayeb M.A, Zidour M.N.** Dosage de l'hémoglobine. République Algérienne Démocratique. Université Djellali Liabes. Faculté de Médecine. Département de pharmacie. Hématologie **2009**.
- [21] **Wajcman H.** Hémoglobines : structure et fonction. EMC-Hématologie **2005**; 2(3) :145-157.

- [22] **Zidani-Zertal S.** Déterminants génétiques de l'expression d'hémoglobine fœtale. Thèse de Doctorat. Biologie cellulaire et moléculaire **2002**.
- [23] **Giroit R.** La bêta-thalassémie. Encyclopédie Orphanet **2003**;1-11.
- [24] **Pouiré Y.** Contribution à l'étude des paramètres hématologiques chez les femmes enceintes atteintes d'une alpha thalassémie au centre médical SAINT CAMILLE de OUAGADOUGOU. Mémoire d'Etudes Approfondies en Biotechnologies **2009** ; 66p.
- [25] **DREPANOCYTOSE.** Biologie Médicale **2011**.
- [26] **Pr Zandecki. M.** Les syndromes thalassémiques. Hématologie biologique **2006** ; 12p
- [27] **Yavarian M, Karimi M, Paran F, Neven C, Harteveld C.L, Giordano P.C.** Multi centric origin of Hb D-Punjab [β 121(GH4) Glu-->Gln, GAA>CAA]. Hemoglobin **2009**; 33(6): 399-405.
- [28] **Itano H.** A third abnormal hemoglobin associated with hereditary hemolytic anemia. Proc Nat Acad Sci USA **1951**; 37:775-7.
- [29] **Baglioni C.** Abnormal human hemoglobin. VII. Chemical studies on hemoglobin D. Biochem Biophys Acta **1962**; 59:437-49.

- **[30] Bruegger E, Favre H, Waldvogel F.** Hémoglobine D (Punjab). A propos de deux familles. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* **1979**; 109(32):1187-1193.
- **[31] Zeng Y.T, HUANG S.Z, ZHAO-RUI REN.** Identification of Hb D-Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. *American journal of human genetics* **1989**; 44(6):886-889.
- **[32] Wajcman H, Boigne J.M, Labie D, Seringe P.** Hémoglobine D Los Angeles. Mise en évidence de l'anomalie de structure par une amélioration des méthodes. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**; 188: 55-58.
- **[33] Vella F, Lehmann H.** L'hémoglobine D Punjab (D Los Angeles). *J Med Genet* **1974**; 11(4): 341-348.
- **[34] Srinivas U, Pati H.P, Saxena R.** Hemoglobin D-Punjab syndromes in India: a single center experience on cation-exchange high performance liquid chromatography. *Hematology* **2010**; 15(3): 178-81.
- **[35] Desai D.V, Dhanani H, Shah M, Dayal N, Kapoor A, Yeluri S.V.** Homozygous Hemoglobin D Disease: A Case Report . *The Internet Journal of Pathology* **2004**; 3(1).

- [36] Mukherjee M.B, Surve R.R, Gangakhedkar R.R, Mohanty D, Colah R.B. Hemoglobin sickle D Punjab—a case report . Indian Journal of Human Genetics **2005**; 11 (3):154-15.
- [37] Sultan T, Alotaibi, Mirghani A, Ahmed M. Hemoglobin D trait with alpha thalassemia in a Saudi family. Annals of Saudi Medicine **2000**; 20(3-4):251-252.
- [38] Rahimi Z, Akramipour R, Korani S, Nagel RL. Hb D-Punjab [beta 121 (GH4) Glu-->Gln]/beta0-thalassemia [IVSII.1(G-->A)] in two cases from an Iranian family: first report. Am J Hematol **2006**; 81(4): 302-3.
- [39] Adekile A.D, Kazanetz E, Leonova J.YE. Co-inheritance of Hb D-PUNJAB (CODON 121; GAA→CAA) and β₀-thalassemia (IVS-II-1; G→A). Journal of pediatric hematology/oncology **1996**; 18(2):151-153.
- [40] Stéphanie H, David M. In Hématologie **2010**.
- [41] Pr Christian B. Maladie de VAQUEZ. Service d'Hématologie - Hôpital Bretonneau - CHU TOURS **2008**.
- [42] Keikhaei B, Galehdari H, Salehi B. Co-inheritance ααα anti 3.7 triplication with hemoglobin D/β₀- thalassemia: A case report from South west of Iran Journal of Medical Genetics and Genomics **2010**; 2(2):18-23.

- **[43] Hynes M, Lehmann H.** Hemoglobin D in a Persian Girl: Presumably the first case of hemoglobin-D-thalassemia. *Br Med J.*1956; 2: 923-924.
- **[44] Sukumaran PK, Sanghvi LD, Nazreth FA.** Hemoglobin D-thalassemia.A report of two families. *Acta Haematol* **1960**; 23: 309-319.
- **[45] Schneider RG, Ueda, Alperin JB, Levin WC, Jones RI, Brimhall B.** Hemoglobin D Los Angeles in two Caucasian families:hemoglobin SD disease and hemoglobin D thalassemia. *Blood* **1968**; 32(30):250-259.
- **[46] Ramot B, Rotem J, Rahbar S , Jacobs AS, Udem L, Ranney HM.** Hemoglobin D Punjab In a Bulgarian Jewish family. *Isri Med. Sci* **1969**; 5(5):1066-1070.
- **[47] Jam RC, Andleigh HS, Mehta JB .**Hemoglobin D-thalassemia. *Acta Haematol* **1970**; 44:124-127.
- **[48] Oldrini R, Salmi G, Maioio AT.** Studio di un case di associazione Hb D- β microcitemia. *Haematologica* **1973**; 58:515-521.
- **[49] Ronald F.** Rieder Globin Chain Synthesis in Hb D [Punjab] - β - Thalassemia, *blood* **1976**;47: 113-120.

- **[50] Wong SC, Mam A.** Hemoglobin D Los Angeles- β +-thalassemia and D/ β_0 -thalassemia. A report of two Canadian families. *Acta Haematol* **1980**; 63:151-155.
- **[51] Sousa UL, Fernandez A, Pilar M.** Double heterozygote hemoglobin D/ β_0 . thalassemia. Report of 3 cases in a Portuguese family. *Nouv. Rev. Fr. Hematol* **1983**; 25:387-390.
- **[52] Worthington S, Lehmann H** .The first observation of Hb D Punjab- β_0 . thalassemia in an English family with 22 cases of unsuspected β_0 -thalassemia minor among its members. *J. Med. Genet* **1985**; 22:377-
- **[53] Casals T, Baiget M, Hernandez JL.** Association of Hb D Punjab and beta zero thalassemia. First case in Spain. *Sangre* **1986**; 31:483-488.
- **[54] Ropero P, Gonzalez F, Sanchez J.** The association of beta zero thalassemia and Hb D Punjab in a family of Indian origin. The second case reported in Spain. *Med Clin [Barc]* **1996**; 108:385-388.
- **[55] Troitskaia OV, Antonova LA, Lozhechnik I.** Beta thalassemia and Hb D in patients with anemia. *Klin Lab Diagn* **1998**; 3:16-23.

- **[56] Ahmed M, Stuhmann M, Bashawri L, Kühnau W, El-Harith A.** The β globin genotype E121Q/ W15X[cd121GAA_CAA/ cd15TGG_TGA] underlines Hb D/ β -[0]thalassemia marked by domination of hemoglobin D. *Ann Hematol* **2001**;80:629-633.
- **[57]Owaidah T.M, Al-Saleh M.M, Al-Hellani A.M.** Hemoglobin D/ β -thalassemia and β -thalassemia major in a Saudi family. *Saudi medical journal* **2005**; 26 (4): 674-677.
- **[58] Theodoridou S, Alemayechou M, Perperidou P, Sinopoulou C, Karafoulidou T, Kiriakopoulou G.** Compound heterozygosity for Hb D-Punjab / [β]-thalassemia and blood donation: case report. *Turkish J. Hematol* **2009**; 26:100-101.
- **[59] Isabelle Vinaria.** Recommandations pour la mise en œuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine. *Les Cahiers Cerba* **2006**; 313 p.
- **[60] Francina A.** Bilan standard de l'hémoglobine. *Blood* **2000**; 95: 360-2
- **[61] Giordano P.C.** Dépistage des porteurs et prévention des hémoglobinopathies par Electrophorèse capillaire **2007**. Sebia.

- [62] Conseil génétique dans le syndrome drépanocytaire majeur. Centre de Référence labellisé Maladies rares « Syndromes Drépanocytaires Majeurs .Recommandations CRLMR **2009**.

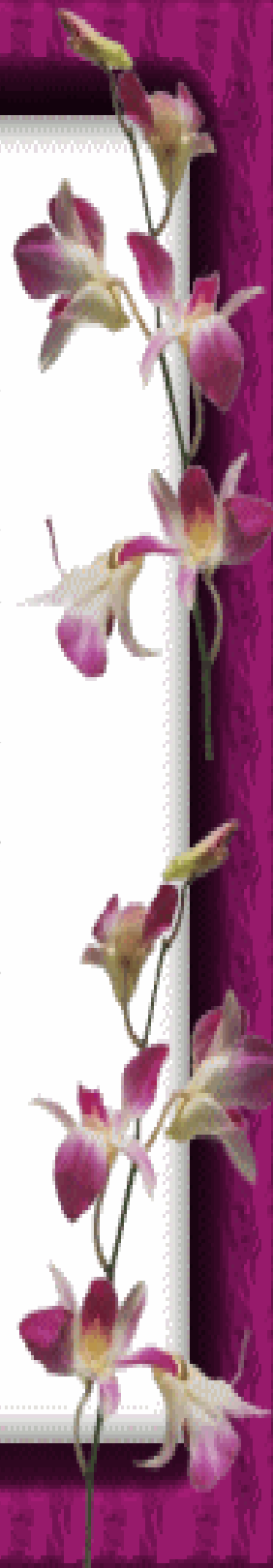
- [63] **Sabrina**. La dégradation d'Edman. Plate-forme Protéomique **2007**.

- [64] **Donald V, Judith G.V**. In Bichimie **2005**: 1600 p.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne pas dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

والحمد لله رب العالمين

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأداب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة

سنة: 2011

رقم: 64

اليحمور د-بنجاب: نتائج دراسة استقصائية لعائلة مغربية بالمستشفى العسكري محمد الخامس بالرباط.

قدمت ونوقشت علانية يوم :

السيدة :ليلى السعيد

المزداة في: 01 شتبر 1985 بالقنيطرة

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

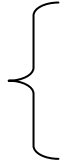
الكلمات الأساسية: اليحمور د-بنجاب- بيطا0 طلاسيميا- ثنائي التخالف - الاستشارة
الوراثية

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرفة

أعضاء



السيد : عبد القادر بلمي

أستاذ في علم الدم

السيدة: زهرة أوزيف

أستاذة مبرزة في الكيمياء الاحيائية

السيدة: نزهة المسعودي

أستاذة مبرزة في علم الدم

السيد : كمال دغمي

أستاذ مبرز في علم الدم السريري