

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

ANNEE: 2015

THESE N°: 42

ACTUALITES SUR LES MOYENS BIOLOGIQUES
D'ETUDES PHENOTYPIQUES ET GENOTYPIQUES
DES HEMOGLOBINOPATHIES

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. AMBININTSOA YATTUSSIA MAFILAZA

Née le 27 Mai 1991 à Madagascar

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: Hémoglobinopathies – Moyens biologiques – Phénotypes – Génotypes.

JURY

Mr. A. BELMEKKI

Professeur d'Hématologie Biologique

PRESIDENT

Mr. A. DAMI

Professeur de Biochimie-Chimie

RAPPORTEUR

Mme. S. BOUHSAIN

Professeur de Biochimie-Chimie

Mme. S. BENKIRANE

Professeur d'Hématologie Biologique

JUGES

Mme. S. EL MACHTANI IDRISSE

Professeur de Biochimie-Chimie



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur 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
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Mohamed ADNAOUI
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes
Professeur Mohammed AHALLAT
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Jamal TAOUFIK
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS
ET
PHARMACIENS**

PROFESSEURS :

Mai et Octobre 1981

Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih	Chirurgie Cardio-Vasculaire
Pr. TAOBANE Hamid*	Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

Pr. BENOSMAN Abdellatif	Chirurgie Thoracique
-------------------------	----------------------

Novembre 1983

Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI	Rhumatologie
-------------------------------	--------------

Décembre 1984

Pr. MAAOUNI Abdelaziz	Médecine Interne – <i>Clinique Royale</i>
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi	Anesthésie -Réanimation
Pr. SETTAF Abdellatif	pathologie Chirurgicale

Novembre et Décembre 1985

Pr. BENJELLOUN Halima	Cardiologie
Pr. BENSALD Younes	Pathologie Chirurgicale
Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa	Neurologie

Janvier, Février et Décembre 1987

Pr. AJANA Ali
Pr. CHAHED OUZZANI Houria
Pr. EL YAACOUBI Moradh
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
Pr. LACHKAR Hassan
Pr. YAHYA OUI Mohamed

Radiologie
Gastro-Entérologie
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Neurologie

Décembre 1988

Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib
Pr. DAFIRI Rachida
Pr. HERMAS Mohamed

Chirurgie Pédiatrique
Radiologie
Traumatologie Orthopédie

Décembre 1989

Pr. ADN AOUI Mohamed
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*
Pr. CHAD Bouziane
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne – **Doyen de la FMPR**
Cardiologie
Pathologie Chirurgicale
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid
Pr. HACHIM Mohammed*
Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. MANSOURI Fatima
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale
Médecine-Interne
Gynécologie -Obstétrique
Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia
Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif
Pr. BENSOU DA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZZAD Rachid
Pr. CHABRAOUI Layachi
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique
Anesthésie Réanimation – **Doyen de la FMPO**
Néphrologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Biochimie et Chimie
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie – **Dir. du Centre National PV**
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOU DA Adil
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. DAOUDI Rajae
Pr. DEHAYNI Mohamed*
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. GHAFIR Driss*

Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Médecine Interne

Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. TAGHY Ahmed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Anatomie
Chirurgie Générale
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. EL AOUAD Rajae
Pr. EL BARDOUNI Ahmed
Pr. EL HASSANI My Rachid
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. HADRI Larbi*
Pr. HASSAM Badredine
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. JELTHI Ahmed
Pr. MAHFOUD Mustapha
Pr. MOUDENE Ahmed*
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie **Inspecteur du SS**
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. ABDELHAK M'barek
Pr. BELAIDI Halima
Pr. BRAHMI Rida Slimane
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHAMI Ilham
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. EL ABBADI Najia
Pr. HANINE Ahmed*
Pr. JALIL Abdelouahed
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie
Chirurgie – Pédiatrique
Neurologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Gynécologie – Obstétrique
Traumatologie – Orthopédie
Radiologie
Ophtalmologie
Neurochirurgie
Radiologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. CHAARI Jilali*
Pr. DIMOU M'barek*
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine*
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. HDA Abdelhamid*
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Médecine Interne
Anesthésie Réanimation – **Dir. HMIM**
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Cardiologie - **Directeur ERSM**
Urologie
Ophtalmologie

Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. AMIL Touriya*
Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. MAHFOUDI M'barek*
Pr. MOHAMMADI Mohamed
Pr. OUADGHIRI Mohamed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Radiologie
Médecine Interne
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BEN SLIMANE Lounis
Pr. BIROUK Nazha
Pr. CHAOUIR Souad*
Pr. ERREIMI Naima
Pr. FELLAT Nadia
Pr. HAIMEUR Charki*
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. OUAHABI Hamid*
Pr. TAOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Urologie
Neurologie
Radiologie
Pédiatrie
Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neurologie
Psychiatrie
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA
Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. EZZAITOUNI Fatima
Pr. LAZRAK Khalid *
Pr. BENKIRANE Majid*
Pr. KHATOURI ALI*
Pr. LABRAIMI Ahmed*

Gastro-Entérologie
Neurologie – *Doyen Abulcassis*
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Néphrologie
Traumatologie Orthopédie
Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUMAR Hassan
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
Pr. ECHARRAB El Mahjoub
Pr. EL FTOUH Mustapha
Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
Pr. ISMAILI Hassane*
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*

Pneumophtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
Traumatologie Orthopédie
Anesthésie-Réanimation

Pr. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Anesthésie-Réanimation
Médecine Interne

Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia
Pr. AIT OURHROUI Mohamed
Pr. AJANA Fatima Zohra
Pr. BENAMR Said
Pr. CHERTI Mohammed
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
Pr. EL HASSANI Amine
Pr. EL KHADER Khalid
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. HSSAIDA Rachid*
Pr. LAHLOU Abdou
Pr. MAFTAH Mohamed*
Pr. MAHASSINI Najat
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
Pr. NASSIH Mohamed*
Pr. ROUIMI Abdelhadi*

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

Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH*

ORL

Décembre 2001

Pr. ABABOU Adil
Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJLIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
Pr. DAALI Mustapha*
Pr. DRISSI Sidi Mourad*
Pr. EL HIJRI Ahmed
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
Pr. EL MADHI Tarik
Pr. EL OUNANI Mohamed
Pr. ETTAIR Said
Pr. GAZZAZ Miloudi*
Pr. HRORA Abdelmalek
Pr. KABBAJ Saad
Pr. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MAHASSIN Fattouma*
Pr. MEDARHRI Jalil

Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Chirurgie Générale
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie-Pédiatrique
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Médecine Interne
Chirurgie Générale

Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
Pr. AMEUR Ahmed *
Pr. AMRI Rachida
Pr. AOURARH Aziz*
Pr. BAMOU Youssef *
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
Pr. BENZEKRI Laila
Pr. BENZZOUBEIR Nadia
Pr. BERNOUSSI Zakiya
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya*
Pr. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
Pr. EL HAOURI Mohamed *
Pr. EL MANSARI Omar*
Pr. FILALI ADIB Abdelhai
Pr. HAJJI Zakia
Pr. IKEN Ali
Pr. JAAFAR Abdeloihab*
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. LAGHMARI Mina
Pr. MABROUK Hfid*
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
Pr. NAITLHO Abdelhamid*
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RACHID Khalid *
Pr. RAISS Mohamed
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
Pr. RHOU Hakima
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Anatomie Pathologique
Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Psychiatrie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Dermatologie
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Ophtalmologie
Urologie
Traumatologie Orthopédie
Pédiatrie
Ophtalmologie
Traumatologie Orthopédie
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie
Médecine Interne
Oto-Rhino-Laryngologie
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
Pr. BOUGHALEM Mohamed*
Pr. BOULAADAS Malik
Pr. BOURAZZA Ahmed*
Pr. CHAGAR Belkacem*

Ophtalmologie
Anatomie Pathologique
Oto-Rhino-Laryngologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Neurologie
Traumatologie Orthopédie

Pr. CHERRADI Nadia
Pr. EL FENNI Jamal*
Pr. EL HANCHI ZAKI
Pr. EL KHORASSANI Mohamed
Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
Pr. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHABOUZE Samira
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. LEZREK Mohammed*
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre*
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

Anatomie Pathologique
Radiologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie
Cardiologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Gynécologie Obstétrique
Traumatologie Orthopédie
Urologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Pharmacie Clinique
Chirurgie Générale
Cardiologie

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. AZIZ Nouredine*
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENHALIMA Hanane
Pr. BENYASS Aatif
Pr. BERNOUSSI Abdelghani
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. EL HAMZA OUI Sakina*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. NIAMANE Radouane*
Pr. RAGALA Abdelhak
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
Cardiologie
Ophtalmologie
Ophtalmologie
Biophysique
Microbiologie
Cardiologie *(mise en disponibilité)*
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Rhumatologie
Gynécologie Obstétrique
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. AKJOUJ Said*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BIYI Abdelhamid*

Rhumatologie
Radiologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique

Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 Pr. DOGHMI Nawal
 Pr. ESSAMRI Wafaa
 Pr. FELLAT Ibtissam
 Pr. FAROUDY Mamoun
 Pr. GHADOUANE Mohammed*
 Pr. HARMOUCHE Hicham
 Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 Pr. IDRIS LAHLOU Amine*
 Pr. JROUNDI Laila
 Pr. KARMOUNI Tariq
 Pr. KILI Amina
 Pr. KISRA Hassan
 Pr. KISRA Mounir
 Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 Pr. MANSOURI Hamid*
 Pr. OUANASS Abderrazzak
 Pr. SAFI Soumaya*
 Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 Pr. SOUALHI Mouna
 Pr. TELLAL Saïda*
 Pr. ZAHRAOUI Rachida

Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
 Pr. ACHACHI Leïla
 Pr. ACHOUR Abdessamad*
 Pr. AIT HOUSSA Mahdi*
 Pr. AMHAJJI Larbi*
 Pr. AMMAR Haddou*
 Pr. AOUI Sarra
 Pr. BAITE Abdelouahed*
 Pr. BALOUCH Lhousaine*
 Pr. BENZIANE Hamid*
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 Pr. CHARKAOUI Naoual*
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader*
 Pr. ELABSI Mohamed
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 Pr. EL OMARI Fatima
 Pr. GANA Rachid
 Pr. GHARIB Noureddine
 Pr. HADADI Khalid*
 Pr. ICHOU Mohamed*
 Pr. ISMAILI Nadia

Réanimation médicale
 Pneumo phtisiologie
 Chirurgie générale
 Chirurgie cardio vasculaire
 Traumatologie orthopédie
 ORL
 Parasitologie
 Anesthésie réanimation
 Biochimie-chimie
 Pharmacie clinique
 Ophtalmologie
 Pharmacie galénique
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Anesthésie réanimation
 Psychiatrie
 Neuro chirurgie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Radiothérapie
 Oncologie médicale
 Dermatologie

Pr. KEBDANI Tayeb
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar*
 Pr. LOUZI Lhoussain*
 Pr. MADANI Naoufel
 Pr. MAHI Mohamed*
 Pr. MARC Karima
 Pr. MASRAR Azlarab
 Pr. MOUTAJ Redouane *
 Pr. MRABET Mustapha*
 Pr. MRANI Saad*
 Pr. OUZZIF Ez zohra*
 Pr. RABHI Monsef*
 Pr. RADOUANE Bouchaib*
 Pr. SEFFAR Myriame
 Pr. SEKHSOKH Yessine*
 Pr. SIFAT Hassan*
 Pr. TABERKANET Mustafa*
 Pr. TACHFOUTI Samira
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 Pr. TANANE Mansour*
 Pr. TLIGUI Houssain
 Pr. TOUATI Zakia

Décembre 2007

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

Décembre 2008

Pr ZOUBIR Mohamed*
 Pr TAHIRI My El Hassan*

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. AGDR Aomar*
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim*
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AKHADDAR Ali*
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. AMAHZOUNE Brahim*
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. ARKHA Yassir
 Pr. AZENDOUR Hicham*
 Pr. BELYAMANI Lahcen*
 Pr. BJIJOU Younes
 Pr. BOUHSAIN Sanae*
 Pr. BOUI Mohammed*
 Pr. BOUNAIM Ahmed*
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha*
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. CHTATA Hassan Toufik*

Radiothérapie
 Anesthésie réanimation
 Microbiologie
 Réanimation médicale
 Radiologie
 Pneumo phtisiologie
 Hématologique
 Parasitologie
 Médecine préventive santé publique et hygiène
 Virologie
 Biochimie-chimie
 Médecine interne
 Radiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Radiothérapie
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Ophtalmologie
 Chirurgie générale
 Traumatologie orthopédie
 Parasitologie
 Cardiologie

Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation
 Chirurgie Générale

Médecine interne
 Pédiatre
 Chirurgie Générale
 Neurologie
 Neuro-chirurgie
 Radiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Rhumatologie
 Neuro-chirurgie
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Anatomie
 Biochimie-chimie
 Dermatologie
 Chirurgie Générale
 Traumatologie orthopédique
 Hématologie biologique
 Chirurgie vasculaire périphérique

Pr. DOGHMI Kamal*
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. EL OUENASS Mostapha*
 Pr. ENNIBI Khalid*
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. KARBOUBI Lamyia
 Pr. L'KASSIMI Hachemi*
 Pr. LAMSAOURI Jamal*
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. ZOUHAIR Said*

Hématologie clinique
 Chirurgie Générale
 Microbiologie
 Médecine interne
 Gynécologie obstétrique
 Rhumatologie
 Gastro-entérologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Microbiologie
 Chimie Thérapeutique
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Pédiatrie
 Hématologie biologique
 Chirurgie Générale
 Radiologie
 Cardiologie
 Pneumo-phtisiologie
 Microbiologie

PROFESSEURS AGREGES :

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
 Pr. AMEZIANE Taoufiq*
 Pr. BELAGUID Abdelaziz
 Pr. BOUAITY Brahim*
 Pr. CHADLI Mariama*
 Pr. CHEMSI Mohamed*
 Pr. DAMI Abdellah*
 Pr. DARBI Abdellatif*
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar
 Pr. EL HAFIDI Naima
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
 Pr. EL MAZOUZ Samir
 Pr. EL SAYEGH Hachem
 Pr. ERRABIH Ikram
 Pr. LAMALMI Najat
 Pr. LEZREK Mounir
 Pr. MALIH Mohamed*
 Pr. MOSADIK Ahlam
 Pr. MOUJAHID Mountassir*
 Pr. NAZIH Mouna*
 Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
 Médecine interne
 Physiologie
 ORL
 Microbiologie
 Médecine aéronautique
 Biochimie chimie
 Radiologie
 Chirurgie pédiatrique
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie plastique et réparatrice
 Urologie
 Gastro entérologie
 Anatomie pathologique
 Ophtalmologie
 Pédiatrie
 Anesthésie Réanimation
 Chirurgie générale
 Hématologie
 Anatomie pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
 Pr. ABOUELALAA Khalil*
 Pr. BELAIZI Mohamed*
 Pr. BENCHEBBA Driss*

Chirurgie Pédiatrique
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Traumatologie Orthopédique

Pr. DRISSI Mohamed*
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL KHATTABI Abdessadek*
Pr. EL OUAZZANI Hanane*
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed
Pr. MEHSSANI Jamal*
Pr. RAISSOUNI Maha*

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie pathologique
Psychiatrie
Cardiologie

Février 2013

Pr. AHID Samir
Pr. AIT EL CADI Mina
Pr. AMRANI HANCHI Laila
Pr. AMOUR Mourad
Pr. AWAB Almahdi
Pr. BELAYACHI Jihane
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr. BENCHEKROUN Laila
Pr. BENKIRANE Souad
Pr. BENNANA Ahmed*
Pr. BENSEFFAJ Nadia
Pr. BENSghIR Mustapha*
Pr. BENYAHIA Mohammed*
Pr. BOUATIA Mustapha
Pr. BOUABID Ahmed Salim*
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba
Pr. CHAIB Ali*
Pr. DENDANE Tarek
Pr. DINI Nouzha*
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa
Pr. ELFATEMI Nizare
Pr. EL GUERROUJ Hasnae
Pr. EL HARTI Jaouad
Pr. EL JOUDI Rachid*
Pr. EL KABABRI Maria
Pr. EL KHANNOUSSI Basma
Pr. EL KHLOUFI Samir
Pr. EL KORAIKHI Alae
Pr. EN-NOUALI Hassane*
Pr. ERRGUIG Laila
Pr. FIKRI Meryim
Pr. GHANIMI Zineb
Pr. GHFIR Imade
Pr. IMANE Zineb
Pr. IRAQI Hind
Pr. KABBAJ Hakima
Pr. KADIRI Mohamed*
Pr. LATIB Rachida

Pharmacologie – Chimie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie Réanimation
Anesthésie Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Informatique Pharmaceutique
Immunologie
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique
Traumatologie Orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-Chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologie
Anatomie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Physiologie
Radiologie
Pédiatrie
Médecine Nucléaire
Pédiatrie
Endocrinologie et maladies métaboliques
Microbiologie
Psychiatrie
Radiologie

Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra
 Pr. MEDDAH Bouchra
 Pr. MELHAOUI Adyl
 Pr. MRABTI Hind
 Pr. NEJJARI Rachid
 Pr. OUBEJJA Houda
 Pr. OUKABLI Mohamed*
 Pr. RAHALI Younes
 Pr. RATBI Ilham
 Pr. RAHMANI Mounia
 Pr. REDA Karim*
 Pr. REGRAGUI Wafa
 Pr. RKAIN Hanan
 Pr. ROSTOM Samira
 Pr. ROUAS Lamiaa
 Pr. ROUIBAA Fedoua*
 Pr. SALIHOUN Mouna
 Pr. SAYAH Rochde
 Pr. SEDDIK Hassan*
 Pr. ZERHOUNI Hicham
 Pr. ZINE Ali*

Médecine Interne
 Pharmacologie
 Neuro-chirurgie
 Oncologie Médicale
 Pharmacognosie
 Chirurgie Pédiatrique
 Anatomie Pathologique
 Pharmacie Galénique
 Génétique
 Neurologie
 Ophtalmologie
 Neurologie
 Physiologie
 Rhumatologie
 Anatomie Pathologique
 Gastro-Entérologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Cardio-Vasculaire
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Pédiatrique
 Traumatologie Orthopédie

Avril 2013

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim*
 Pr. GHOUNDALE Omar*
 Pr. ZYANI Mohammad*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Urologie
 Médecine Interne

**Enseignants Militaires*

2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia
 Pr. ALAMI OUHABI Naima
 Pr. ALAOUI KATIM
 Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
 Pr. ANSAR M'hammed
 Pr. BOUHOUCHE Ahmed
 Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
 Pr. BOURJOUANE Mohamed
 Pr. BARKYOU Malika
 Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
 Pr. DAKKA Taoufiq
 Pr. DRAOUI Mustapha
 Pr. EL GUESSABI Lahcen

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

Pr. ETTAIB Abdelkader
Pr. FAOUZI Moulay El Abbas
Pr. HAMZAOUI Laila
Pr. HMAMOUCHE Mohamed
Pr. IBRAHIMI Azeddine
Pr. KHANFRI Jamal Eddine
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
Pr. REDHA Ahlam
Pr. TOUATI Driss
Pr. ZAHIDI Ahmed
Pr. ZELLOU Amina

Zootchnie
Pharmacologie
Biophysique
Chimie Organique
Biologie moléculaire
Biologie
Chimie Organique
Chimie
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

*Mise à jour le 09/01/2015 par le
Service des Ressources Humaines*

- 9 JAN 2015





Dédicaces

A mes parents

Mr MAFILAZA Victor et Mme RAZANASETA Joséphine.

Je dédie ce travail pour vous, sans vous, sans votre amour éternel à mon égard, ce travail n'allait pas apporter son fruit. Vous avez permis que je puisse être la femme que je suis aujourd'hui. Vous n'avez cessé de croire en moi, de m'encourager, de me guider, de prier et me soutenir dans chaque étape de ma vie. Toute une vie ne suffit pas pour vous remercier des sacrifices que vous avez fait pour moi. Je vous aime Papa et Maman. Milles Merci.

Puisse l'Eternel vous bénir continuellement

A ma Famille

RAVOLOLONARISETA, MAFILAZA Cédation,

SOANAVONY Marie Winnie Victoria

Votre soutien, votre encouragement, votre présence continuelle malgré la distance qui nous sépare.

Ce travail vous est dédié

Aux étudiants Malgaches et des pays amis au Maroc

Particulièrement VAHINY Yvie Brenda, MBOYO FATAKI Christelle, RAKOTOMALALA Anacia, SOA Faneva et KAKOU N'Zélébessait Stéphane

En reconnaissance de cette nouvelle famille soudée et incroyable à laquelle je suis liée à vie ; que Dieu vous bénisse et vous accompagne afin que vous puissiez briller aussi bien dans votre domaine de spécialisation que familial.

Merci pour tous les bons moments, vos conseils et votre soutien.

Merci pour tout. Puisse Dieu vous bénir

A tous mes promotionnaires des pays amis

Stéphane, Sandra, Ariane, Cheick, Candy, Makanera, Christelle, Ramatou, Hewan, Monique, Abir, Landrada...

On est venu sans se connaître mais on repart avec de nouveaux frères et sœurs. Puisse Dieu tout puissant nous permettre de consolider nos liens créés ici au Maroc et participer ainsi à la prospérité de l'Afrique.

A tous mes promotionnaires et jeunes Marocains et plus particulièrement à Houness .Merci de votre aide pour ce travail

C'est un honneur pour moi de vous connaître, merci pour tout et que Dieu vous garde.

A tous mes ami(e)s de Madagascar, du Maroc et d'ailleurs.

Je vous remercie et vous dédie ce travail. Que Dieu vous bénisse et vous comble de ses bienfaits.

A toute personne qui de près ou de loin m'a donné des conseils, une aide, ou qui m'a tout simplement donné la force et la volonté de continuer à travers un quelconque acte

A tous ceux et celles que j'ai omis de citer

Je vous dis merci et vous confie à Dieu.



Remerciements

A Notre Maître et Président de thèse

Monsieur Abdelkader BELMEKKI

Professeur d'Hématologie-biologique

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider notre jury de thèse. Vos qualités humaines et professionnelles ont fait de vous un exemple à suivre pour nous tout au long de notre formation. Veuillez accepter, cher maître, l'expression de notre profonde gratitude, de notre grand respect et de nos remerciements.

A Notre Maître et Rapporteur de thèse

Monsieur Abdellah DAMI

Professeur de Biochimie - chimie

Vos compétences, vos qualités humaines et votre simplicité ont toujours suscité une grande admiration. Ce fut un honneur et un privilège de travailler avec vous. Votre aide et votre disponibilité, dans l'élaboration de ce travail, resteront à jamais gravés dans nos mémoires. Veuillez voir à travers ce travail le témoignage de notre profonde gratitude et de notre grand respect. Nous vous remercions pour toute la peine que vous vous êtes donné.

A Notre Maître et juge de thèse

Madame Sanae BOUHSAIN

Professeur Agrégé en Biochimie - chimie

Nous sommes particulièrement touchés par la spontanéité et la gentillesse avec lesquelles vous avez bien voulu accepter de juger notre travail. Vos qualités professionnelles ajoutées n'ont fait qu'agrandir l'admiration que nous avons déjà pour vous. Veuillez trouver ici, cher maître l'expression de notre profond respect. Nous vous remercions également de nous avoir facilité l'accès à certaines données qui ont rapporté un plus à notre travail.

A Notre Maître et juge de thèse
Monsieur Souad BENKIRANE
Professeur d'Hématologie biologique

Nous vous remercions vivement de l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger parmi notre jury de thèse.

Puisse ce travail témoigner de ma reconnaissance et de l'estime que je porte à votre personne.

Veillez croire à nos sincères remerciements.

A Notre Maître et juge de thèse

Madame Samira EL MACHTANI IDRISSE

Professeur de Biochimie - chimie

Nous vous remercions pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger notre travail, pour votre gentillesse et votre compréhension. Votre savoir mis au jugement de thèse ne pourra que lui donner plus de valeur. Veuillez accepter notre haute considération et notre profond respect.



Liste des illustrations

LISTE DES ABREVIATIONS

A/C	: Hétérozygote AC
A/D	: Hétérozygote A/D-Punjab
ADN	: Acide Désoxy ribonucléique
Ala	: Alanine
ALD	: Affection de longue durée
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
A/S	: Hétérozygote AS
A/O	: Hétérozygote A/O-Arab
C	: Cytosine
C°	: Degré Celsius
C/β	: Hétérozygote composite C/β
C/C	: Homozygote C/C
CCMH	: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
C/O-Arab	: Hétérozygote composite C/O-Arab
CO ₂	: Dioxyde de carbone
CRP	: C-Réactive Protéine
CVO	: Crise Vaso-occlusive
2,3-DPG	: 2,3-Diphosphoglycérate
EC	: Electrophorèse Capillaire
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EP	: Electrophorèse
Fe ³⁺	: Ion fer III
Ft	: Femto litre
G	: Guanine
GAP	: Gravity Advanced Package
GBEA	: Guide de bonne exécution des analyses de biologie médicale
G/dl	: Gramme/Décilitre
G/L	: Giga/litre
Gln	: Glutamine

GR	: Globules rouges
Glu	: Acide glutamique
Gly	: Glycine
Hb	: Hémoglobine
HbA	: Hémoglobine Adulte
HbF	: Hémoglobine Fœtale
HBP	: Hémoglobinopathie
HMIMV	: Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V
HPLC	: High performance liquid chromatography
HRM	: High Resolution Melting
HS	: Site hyper sensible
Hte	: Hématocrite
IDC	: Indice de Distribution Cellulaire
IEF	: Isoelectric focusing
IgG	: Immunoglobuline G
IVS	: Intervening Sequence
Kb	: Kilo bases
KDa	: Kilodalton
LCR	: Locus Control Region
LDH	: Lactate Déshydrogénases
Lys	: Lysine
MetHb	: méthémoglobine.
MLPA	: Multiplex Ligation Probe Amplification
mm	: Millimètre
NABM	: Nomenclature des Analyses de Biologie Médicale
NADPH	: Nicotinamide Adénine Di nucléotide Phosphate Hydrogène
NFS	: Numération Formule Sanguine
Nm	: nanomètre
NO	: Monoxyde d'Azote
O ₂	: Oxygène

OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Pg	: Picogramme
PHHF	: Persistance héréditaire d'hémoglobine fœtale
QMPSF	: Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments Chromatographie
Rétic	: Réticulocyte
RFLP	: Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction
SC	: Hétérozygote composite SC
SMG	: Splénomégalie
S/S	: Homozygote SS
STA	: Syndrome Thoracique Aigu
T	: Thymine
TCMH	: Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
Thal	: Thalassémie
Val	: Valine
VGM	: Volume Globulaire Moyenne

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure de l'Hème	4
Figure 2: L'atome de Fer et les liaisons	6
Figure 3 Structure de l'hémoglobine	7
Figure 4: Structure et organisation des deux familles de gènes-globine.	9
Figure 5: Processus de Synthèse des chaînes d'hémoglobine à l'échelle moléculaire	11
Figure 6: Biosynthèse des chaînes de globines de la vie fœtale jusqu'à l'âge de 6 mois.....	14
Figure 7: Composition des diverses hémoglobines identifiées au cours du développement....	15
Figure 8: Distribution géographique de la drépanocytose.....	20
Figure 9: Adhérence des Globules Rouges à l'endothélium dans la drépanocytose	21
Figure 10: Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose	22
Figure 11: Représentation du mécanisme d'obtention de la fusion des gènes de l'hémoglobine Lepore	31
Figure 12: Mécanismes génétiques à l'origine des alpha-thalassémies. En bleu on a le gène alphanormal; en blanc le gène alpha thalassémique.....	35
Figure 13 Base physiopathologique au cours d'une beta-thalassémie sévère.	39
Figure 14: Hyperplasie des os plats de la face chez un enfant thalassémique.....	43
Figure 15: Beta-thalassémies β -thalassémies et de PHHF délétionnelles. Les formes délétionnelles de β -thalassémies sont rares. Seuls des prototypes des délétions décrites sont représentés ici. Certaines ne touchent que le gène β lui-même ; d'autres sont plus étendues et PHHF.	46
Figure 16: régions fonctionnellement et les conséquences physiopathologiques des variants selon la localisation de la mutation	48
Figure 17: Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse (114).....	59
Figure 18: Les étapes d'une PCR Polymerase chain reaction (150).....	69

Figure 19: Principe du séquençage.....	73
Figure 20 : Electrophorèse capillaire sur le patient VAL.....	88
Figure 21: HPLC chez le patient VAL.....	89
Figure 22: IEF chez le patient VAL.....	89
Figure 23 : Electrophorèse capillaire chez le patient AYA.....	92
Figure 24 : HPLC chez le patient AYA.....	92
Figure 25: IEF chez le patient AYA.....	93
Figure 26 : Electrophorèse capillaire chez le patient AIT.....	94
Figure 27: HPLC chez le patient AIT 90.....	95
Figure 28 : IEF chez le patient AIT.....	95
Figure 29 : Electrophorèse capillaire chez le patient NOU.....	96
Figure 30: HPLC chez le patient NOU.....	97
Figure 31: IEF chez le patient NOU.....	98
Figure 32: Electrophorèse capillaire chez le patient BOU.....	98
Figure 33: HPLC chez le patient BOU.....	99
Figure 34: IEF chez le patient BOU.....	99
Figure 35 : Electrophorèse capillaire chez le patient COR.....	100
Figure 36 : HPLC chez le patient COR.....	101
Figure 37 : IEF chez le patient COR.....	102
Figure 38 : Electrophorèse capillaire chez la patiente KOF.....	104
Figure 39 : HPLC chez la patiente KOF.....	104
Figure 40 : IEF chez la patiente KOF.....	105
Figure 41 : Electrophorèse capillaire chez le fils RED F.....	106

Figure 42 : HPLC chez le fils RED F.....	107
Figure 43 : Electrophorèse capillaire.....	108
Figure 44 : HPLC chez la patiente ALI chez la patiente ALI.....	108
Figure 45 : Electrophorèse capillaire.....	109
Figure 46 : HPLC chez le patient RED D chez le patient RED D.....	110
Figure 47 : IEF chez la famille RED	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Nomenclature des Hémoglobines anormales fréquentes par ordre alphabétique	9
Tableau 2: Noms officiels des hémoglobines selon «The Human Genome Project »	10
Tableau 3 : les caractéristiques biologiques des principaux syndromes drépanocytaires.	25
Tableau 4: Principaux syndromes alpha-thalassémiques: relation entre le génotype et le phénotype	38
Tableau 5: Les valeurs normales des quelques paramètres de l'hémogramme	52
Tableau 6: FICHE DE SUIVI / HEMOGLOBINOPATHIES POUR LE PHENOTYPAGE..	53
Tableau 7: Exemple de lettre de consentement pour une exploration génotypique d'une hémoglobinopathie	55
Tableau 8 Les techniques de biologie moléculaire pour l'identification des hémoglobinopathies	77
Tableau 9: Etude de l'hémoglobine: réalisation et interprétation des cas simples	79
Tableau 10 : Arbre décisionnel pour les anomalies quantitatives	84
Tableau 11 : Les autres pathologies ayant une augmentation ou diminution de l'HbA2 et de l'HbFII est essentiel d'écarter ces causes avant de continuer les études phénotypiques.	85
Tableau 12: Arbre décisionnel pour les anomalies qualitatives des cas complexes de l'Hb ...	86
Tableau 13: Bilan sanguin du patient AYA.....	91
Tableau 14: Bilan sanguin du patient AIT.....	93
Tableau 15 : Bilan sanguin de la patiente KOF	103



Sommaire

Introduction.....	1
Partie I : les bases moléculaires et génétiques de l'hémoglobine normale.....	3
I. Les bases moléculaires et génétiques de l'hémoglobine normale.....	4
1. Structure de l'hémoglobine.....	4
1.1. L'hème.....	4
1.2. La globine.....	6
a. Nomenclature des hémoglobines.....	8
b. L'organisation des gènes de l'hémoglobine et ses principales régions régulatrices.....	9
c. Le processus de synthèse des chaînes de globines.....	10
d. Éléments du contrôle de l'expression des gènes globine.....	12
e. Les chaînes de globines normales et les hémoglobines correspondantes.....	13
Partie II : physiopathologie des hémoglobinopathies et leurs circonstances de découverte	16
I. Définitions.....	17
II. Classification des HBP.....	18
III. Les hémoglobines anormales.....	18
A. Hémoglobines anormales fréquentes.....	18
1. HbS ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$) : Hb de la drépanocytose ou HémoglobinoS.....	19
1.1. Répartition géographique.....	19
1.2. Physiopathologie.....	20
1.3. Les différentes formes de la maladie.....	23
a. Le trait drépanocytaire.....	23
b. Syndrome drépanocytaire majeur.....	24
2. HbC ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$) ou HémoglobinoC.....	26
2.1. Répartition géographique.....	26
2.2. Physiopathologie ou tableau clinique.....	26
3. HbE ($\beta 26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$).....	27
3.1. Répartition géographique.....	27
3.2. Physiopathologie.....	27
3.3. Tableaux clinique et biologique.....	28

4.	HbDPunjab (β 121Glu→Gln) ou Hémoglobinosé D.....	29
4.1.	Répartition géographique	29
4.2.	Physiopathologie	29
5.	Hb OArab (β 121Glu→Lys) ou Hémoglobinosé O.....	30
6.	Hb Lepore.....	30
B.	Les thalassémies.....	32
1.	Physiopathologie.....	33
2.	Syndromes α -thalassémiques.	34
2.1.	Epidémiologie.....	34
2.2.	Manifestations cliniques et biologiques.....	35
2.3.	α -thalassémies acquises	38
3.	Syndrome β -thalassémiques.....	39
3.1.	Epidémiologie.....	39
3.2.	Physiopathologie	39
3.3.	Manifestations cliniques et biologiques.....	41
a.	β -thalassémie hétérozygote.....	41
b.	β -thalassémie homozygote.....	42
c.	Thalassémie majeure (maladie de Cooley)	42
d.	β -thalassémie intermédiaire.....	44
4.	Hétérozygoties composites E/ β -thalassémies (Cf Hb E)	44
4.1.	Epidémiologie.....	44
4.2.	β -thalassémies intermédiaires de transmission dominante	45
5.	$\delta\beta$ -thalassémies et Persistances Héritaires d'Hémoglobine Fœtale (PHHF).....	45
IV.	Les variants de l'Hb responsable des anémies hémolytiques, des polyglobulies et rarement des cyanose.	48
Partie III : étude au laboratoire de biologie clinique d'une anomalie de l'hémoglobine		50
I.	Dans quel cas on cherche les anomalies de l'hémoglobine	51
A.	Circonstances de diagnostic d'une hémoglobinopathie.	51
B.	Données anamnestiques.....	51
C.	Données cliniques	51

D.	Données biologiques de base	52
1.	Numération de la formule sanguine.....	52
2.	Bilan martial	53
3.	Bilan d'hémolyse	53
II.	Phase pré-analytique.....	54
III.	Exploration biologique et stratégie d'étude des anomalies de l'hémoglobine	56
A.	Diagnostic phénotypique des anomalies de l'hémoglobine.....	56
1.	HPLC sur une colonne échangeuse de cations	57
1.1.	Principe du HPLC.....	57
1.2.	Avantage et inconvénients	57
2.	L'électrophorèse capillaire(EC)	58
2.1.	Principe d'EC	58
2.2.	Avantage et inconvénients	60
3.	L'isoélectrofocalisation (IEF)	60
3.1.	Principe d'IEF	60
3.2.	Avantage et inconvénients	61
4.	Autres types d'électrophorèse	61
4.1.	L'électrophorèse à pH alcalin.....	61
a.	Principe de l'électrophorèse à pH alcalin	61
b.	Avantage et inconvénients	62
4.2.	L'électrophorèse à pH acide.....	62
a.	Principe	62
5.	Les techniques biochimiques et hématologiques complémentaires.	63
5.1.	Chromatographie	63
a.	Chromatographie liquide en phase inverse	63
b.	Chromatographies des chaînes de globines.....	63
5.2.	Test de solubilité de l'HbS ou test d'Itano.....	63
5.3.	Test de falciformation d'Emmel	64
5.4.	Recherche d'inclusions d'HbH et recherche de corps de Heinz	64
5.5.	Tests de stabilité de l'Hb : Le test à l'isopropanol	64

5.6. La spectrophotométrie de masse	64
B. Diagnostic génotypique des anomalies de l'hémoglobine.....	66
1. Le PCR (polymerase chain reaction)	67
1.1. Principe de la PCR.....	68
1.2. Allele-specific priming – ARMS-PCR ou amorce d'amplification spécifique..	70
.....	70
a. Principe de l'ARMS.....	70
b. Avantage et inconvénients	70
1.3. Allele-specific oligonucleotide (ASO) et la dot-blot inverse.....	71
1.4. Denaturing gradient gel electrophoresis and single-stranded conformation	
polymorphism (DGGE et SSCP)	72
2. Séquençage direct des clusters β et α	73
2.1. Principe du séquençage direct	73
2.2. Avantages et inconvénients.....	74
3. Le Gap-PCR	75
4. La MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification = amplification	
multiplex de sondes dépendant d'une ligation).....	75
IV. Phase post-analytique : Interprétation des résultats	78
A. Arbres décisionnels pour l'interprétation des cas simples des anomalies de l'Hb	79
B. Diagnostic biologique des bêta-thalassémies.....	79
1. Les formes classiques de bêta-thalassémie	79
2. Les bêta-thalassémies sans augmentation d'HbA2.....	80
3. Des tests phénotypiques complémentaires parfois nécessaires.....	81
a. Mesure des chaînes alpha libres en excès dans les réticulocytes.....	82
b. Ratio protoporphyrine/hème (PPZ/H).....	82
c. Diagnostic du trait bêta-thalassémique via le dosage de l'HbA1c.....	83
C. Arbres décisionnels pour l'interprétation des anomalies quantitatives de l'HbA2....	84
D. Arbres décisionnels pour l'interprétation des anomalies complexes de l'Hb.....	86
Partie pratique	87
extraite de la thèse présentée par marie Schmidt épouse hautecoeur	87

I. Patient VAL.....	88
II. Patient AYA et patient AIT	90
1. Patient AYA.....	90
2. Patient AIT.....	93
III. Patient NOU.....	96
IV. Patient BOU	98
V. Patient COR.....	100
VI. Patient KOF	103
VII. Famille RED	106
Conclusion	113
Résumés.....	1
Bibliographie.....	5



Grâce à la technologie et les grands progrès scientifiques, les voyages dans le monde entier sont rendus faciles. Le brassage entre les différentes populations du monde est devenu un phénomène à la mode ; mais en même temps il cause beaucoup de problèmes de santé publique. Ainsi, certaines maladies génétiques endémiques sont aujourd'hui cosmopolites.

De plus en plus de naissances comportent des anomalies génétiques dans le monde d'aujourd'hui. Il est compté à une fréquence de 300 000 naissances par an(1). Sur le continent africain 1/50 à 1/200 naissances sont porteurs de l'anomalie drépanocytaire. Tandis que pour la β -thalassémie 1/100 à 1/1600 naissances en Asie et dans les pays méditerranéens ont cette anomalie(2). Des formes de drépanocytoses constituent ce qu'on appelle le Syndrome drépanocytaire majeure qui est maintenant entré dans la base de données des affections de longue durée ALD en 2010(3).

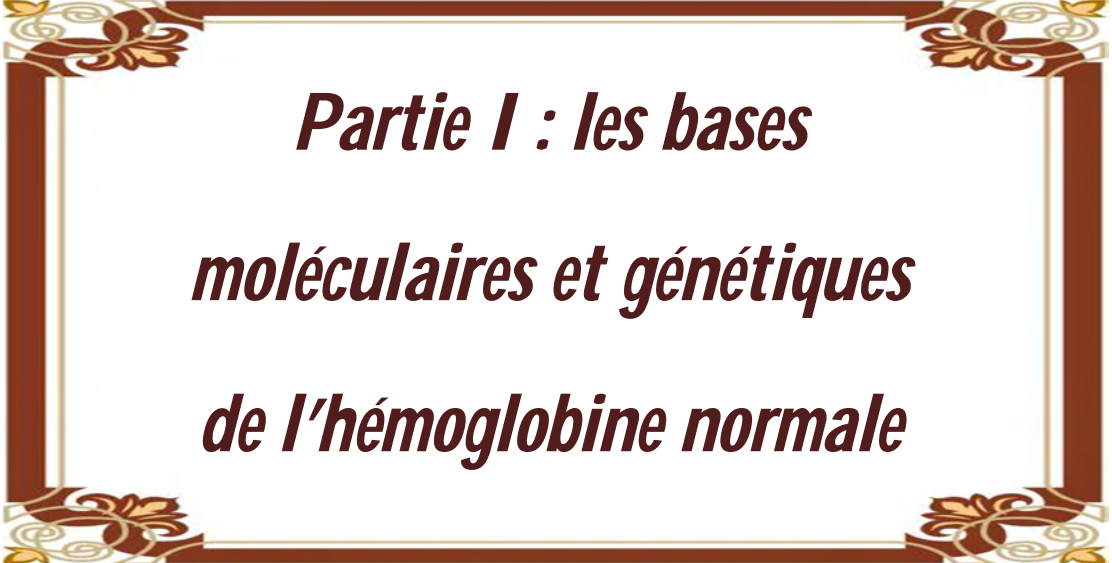
Nombreuses sont les hémoglobinopathies invalidantes à part les deux citées ci-dessus, qui nécessitent des dépistages à la naissance ou pour des couples porteurs de ces gènes. Mais surtout des consultations en conseil génétique doivent être effectuées afin de calculer les risques de certains mariages pour leur descendance.

L'objectif est de maîtriser les moyens d'études de ces hémoglobinopathies, afin de rendre des résultats fiables sur le plan phénotypique et génotypiques pour assurer une meilleure qualité du conseil génétique.

Pour ce faire, notre étude présentera trois parties :

- la connaissance de l'hémoglobine normale sur le plan structural et fonctionnel ;
- la description physiopathologiques des hémoglobinopathies et leurs circonstances de découvertes ; et
- l'exploration au laboratoire proprement dite de ces hémoglobinopathies, en tenant compte de l'aspect réglementaire.

A la fin de ce travail, des cas de patients extraits d'une thèse nous serviront de cas pratique.



***Partie I : les bases
moléculaires et génétiques
de l'hémoglobine normale***

I. Les bases moléculaires et génétiques de l'hémoglobine normale

L'hémoglobine est une chromoprotéine porphyrine de coloration rouge renfermant du Fer. Elle est présente à forte concentration dans les globules rouges ou hématies. Ces globules rouges sont des cellules matures issues d'une lignée immature de cellules. Le phénomène en question s'appelle l'érythropoïèse, qui se fait dans la moelle osseuse des os long, mais se situe également dans d'autres organes lors de la vie fœtale. La biosynthèse de l'hémoglobine Hb vient en parallèle avec la maturation des globules rouges. Elle se fait dans le cytoplasme des érythroblastes (cellules immatures) et des réticulocytes.

Les hématies se lient avec les molécules d'oxygènes via l'Hb dans les poumons et les transportent vers les cellules. Elles transportent aussi le CO₂ et le H⁺ des tissus vers le poumon. La structure chimique et moléculaire des hémoglobines va à merveille avec ses rôles physiologiques.

1. Structure de l'hémoglobine

L'hémoglobine est constituée par l'hème et la globine.

1.1. L'hème

Il résulte de l'association d'une porphyrine et d'un atome de fer divalent, définie comme étant une ferroprotoporphyrine. La porphyrine est une protoporphyrine de type IX, substituée par 4 radicaux méthyl, 2 radicaux vinyl et 2 radicaux propanoïque au niveau du noyau porphyrine.

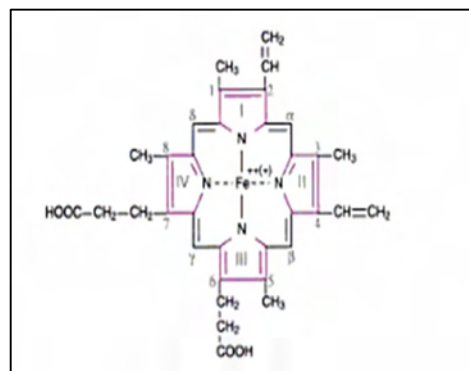


Figure 1: Structure de l'Hème (4)

Ce noyau a une structure fermée ou cyclique, formée par l'association de 4 noyaux pyrrole reliés par des ponts méthinyl.

L'atome de fer bivalent (Fe^{++}), métal hexacoordinable, est lié par 4 liaisons aux atomes d'azotes des noyaux pyrroles. Une cinquième liaison existe entre l'atome de fer et un radical Histidine proximale de la chaîne de la globine. La dernière liaison permet le transport d'une molécule d'oxygène.

Lors de la fixation de l'oxygène, des réarrangements électroniques réduisent le volume de l'atome, ce qui permet son introduction dans la couronne de l'hème. En position désoxygénée, la disposition de ses électrons empêche l'atome de fer de s'introduire dans le plan formé par le noyau porphyrine. Le passage du fer de l'état divalent à l'état trivalent (Fe^{+++}).

L'atome de Fer sous forme réduite se retrouve dans l'hémoglobine oxygénée (HbO_2) et la carboxyhémoglobine (HbCO) et aussi dans l'hémoglobine désoxygénée (désoxyHb).

La forme oxydée Fe^{+++} est impropre au transport de l'oxygène ; elle est caractéristique de la méthémoglobine (metHb).

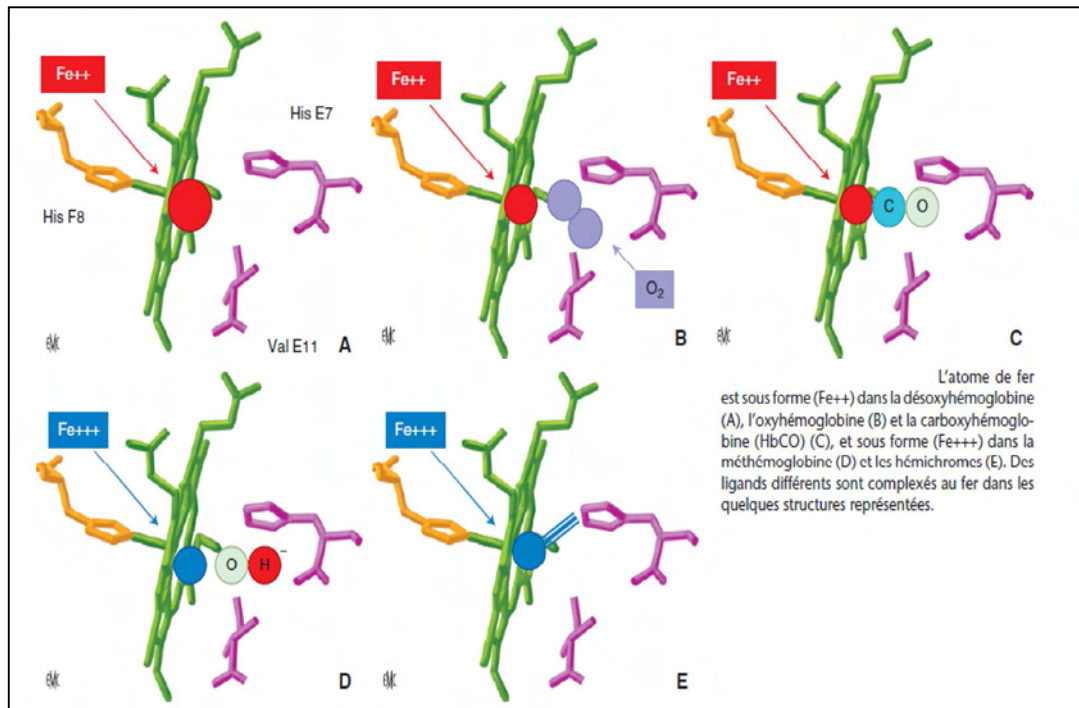


Figure 2: L'atome de Fer et les liaisons (5)

Dans l'HbO₂, l'atome de Fer a six liaisons de coordination, tandis que dans la désoxyHb, l'atome de fer, plus volumineux que dans l'HbO₂, est pentacoordonné.

Le modèle stéréochimique de Perutz (6) place ces modifications de taille de l'atome de Fer à l'origine des différences de la structure protéique qui accompagnent la fixation de l'oxygène sur la molécule de l'hémoglobine.

Cette structure est génératrice de radicaux libres dangereux pour la membrane érythrocytaire car partiellement responsables des complications hémolytiques observées chez les patients porteurs d'hémoglobines instables ou thalassémiques.

1.2. La globine

La globine est un hétérotétramère constitué de deux types de sous-unités associés deux à deux. Chaque sous-unité est formée par une chaîne polypeptidique, c'est la différence de séquence en acides aminés qui donne naissance à différentes sous-unités.

Les chaînes les plus répandues sont :

- les chaînes α ayant 141 acides aminés, la plus courte.
- les chaînes β , γ , et δ comportent 146 acides aminés, les plus longues(7)

Il existe alors des analogies de structure entre ces différentes chaînes. La séquence d'acides aminés représente la structure primaire de la globine. Un enroulement sous forme d'hélice alpha α pour 80% des chaînes polypeptidiques forme ce qu'on appelle la structure secondaire. Il existe des zones non-hélicoïdales qui forment ce qu'on appelle les plicatures.

La structure tertiaire est déterminée par la répartition dans l'espace des segments hélicoïdaux ou non-hélicoïdaux. L'enroulement des chaînes permettent la formation d'une poche pour accueillir l'hème.

La structure quaternaire a été élucidée par diffraction du rayon X par les deux chercheurs, John Kendrew et Max Perutz vers 1960. L'analyse des diagrammes par ce rayon montre une conformation sensiblement globulaire de la globine, avec un diamètre de 55 Å (8).

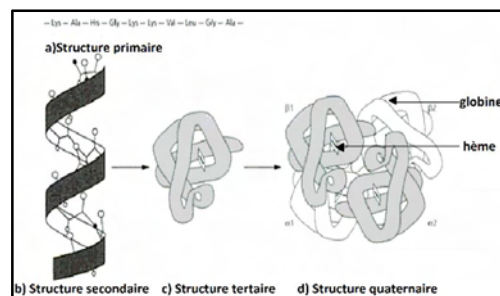


Figure 3 Structure de l'hémoglobine (9)

Donc l'hémoglobine est alors l'association de 4 sous unités identiques 2 à 2. Une sous unité résulte d'un repliement d'une chaîne polypeptidique appelée « globine », autour d'un groupement prosthétique, l'hème, pris en « sandwich » dans ces repliements(10).

a. Nomenclature des hémoglobines

Avant, les hémoglobines trouvées sont appelées communément hémoglobine A pour les Adultes et hémoglobine F pour les fœtus. L'Hb A2 représente l'Hb mineure chez l'adulte trouvée sur l'électrophorèse sur gel d'amidon en 1955(11), elle a été nommée en 1957 lors de la rencontre des experts de ISH ou International Society of Hematology(12).

Il y avait une autre Hb mineure nommée Hb A3 par l'ISH, ayant une bande vers l'anode quand on fait l'électrophorèse à pH alcalin(13).

Lors d'une analyse par chromatographie sur colonne échangeuse de cations, l'Hb A sort sous forme de 2 pics bien distincts. Selon leur élution, il y on a l'Hb AI et AII(14). Peu de temps après, il était démontré que l'HB AI en elle donnait 5 petits pics qui correspondent à l'Hb AI a, b, c, d et e, selon l'ordre de leur élution(15). Ensuite, l'HbAI a, b, c sont des Hb glyquées, elles sont en augmentation lors du diabète.

Les Hb normaux sont nommées ainsi que les variants de l'Hb ont été découvertes dont le nom est donné par une lettre de l'alphabet. L'Hb S responsable de la drépanocytose était autrefois appelée Hb B. Par la suite, les lettres sont attribuées selon l'ordre alphabétique. Sachant qu'il y a beaucoup de variants de l'Hb et que les lettres de l'alphabet ne suffisent pas pour couvrir ces variants découvertes. Il est convenu d'adopter le nom de l'endroit où la variante était découverte.

Tableau 1: Nomenclature des Hémoglobines anormales fréquentes par ordre alphabétique (16)

Nom de l'hémoglobine	Mutation décrite ou caractéristiques
Hb A	Hb adultes (A ₀ , A ₁ , A _{1c} , A ₂ ..)
Hb C	β6 Glu→Lys
Hb D	Mutations β du groupe +1
Hb E	β26 Glu→Lys
Hb F	Hb foetale
Hb G	Mutations α du groupe +1
Hb H	Tétramère β
Hb I	Mutations α du groupe -2
Hb J	Variants α et β du groupe -1
Hb K	Variants α et β rapides entre -1 et -2
Hb M	Variants responsables de méthémoglobinémies
Hb N	Variants rapides β du groupe -2
Hb O	O-Arab β121 Glu→Lys
Hb P	P-Nilotic Gène-fusion
Hb Q	Variants α du groupe +1
Hb S	β6 Glu→Val
Hb T	T-Cambodia

b. L'organisation des gènes de l'hémoglobine et ses principales régions régulatrices

Les gènes des hémoglobines sont subdivisés en 2 familles :

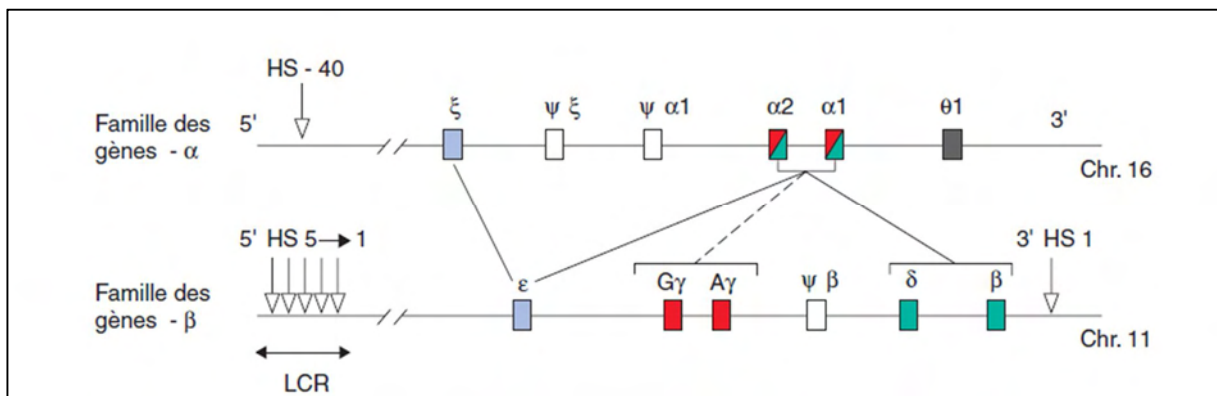


Figure 4: Structure et organisation des deux familles de gènes-globine. (10)

- Les gènes de la famille α

La famille α se situe sur le chromosome 16 surtout près du télomère ou 16pter13.3, incluant le gène ζ et 2 α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$), les pseudo-gènes $\Psi\zeta$ et $\Psi\alpha 1$ qui sont non-fonctionnels et enfin le gène $\theta 1$ dont la fonction n'est pas connue jusqu'à nos jours. En amont du gène existe une zone régulatrice majeure, le LCR « Locus Control Region ». Les gènes sont organisés de 5' à 3' selon leur ordre d'expression au cours du développement humain :

- ζ code pour la chaîne embryonnaire.
- $\alpha 1$ et $\alpha 2$ codent pour la chaîne fœtale et des adultes.
- Les gènes de la famille β

La famille β localisée sur le chromosome 11 au niveau du bras court ou 11p15.5, incluant le gène ξ , 2 gènes γ ($^G\gamma^A\gamma$), un β , un δ et enfin le pseudo-gène $\Psi\beta$. En amont du locus se trouve 5 sites hypersensibles à l'ADNase1 (HS1 à 5, numérotés de 3' à 5') constituent une zone régulatrice majeure "LCR B". Un autre site se trouve aussi en aval (3'HS1). Les gènes sont organisés de 5' à 3' selon leur ordre d'expression au cours du développement humain.

c. Le processus de synthèse des chaînes de globines

Les gènes des globines ont communément une lettre grecque qui désigne la chaîne de globine correspondante. Cependant, ces gènes ont aussi un nom officiel selon «The Human Genome Project ».

Tableau 2: Noms officiels des hémoglobines selon «The Human Genome Project » (17)

Commonly used name	Globin chain	Official name
Zeta	Z	HBZ
Alpha 2	$\alpha 2$	HBA2
Alpha 1	$\alpha 1$	HBA1
Epsilon	ξ	HBE1
G gamma	$^G\gamma$	HBG2
A gamma	$^A\gamma$	HBG1
Beta	B	HBB
Delta	δ	HBD

Le processus de synthèse est complexe, il est représenté dans la figure suivante :

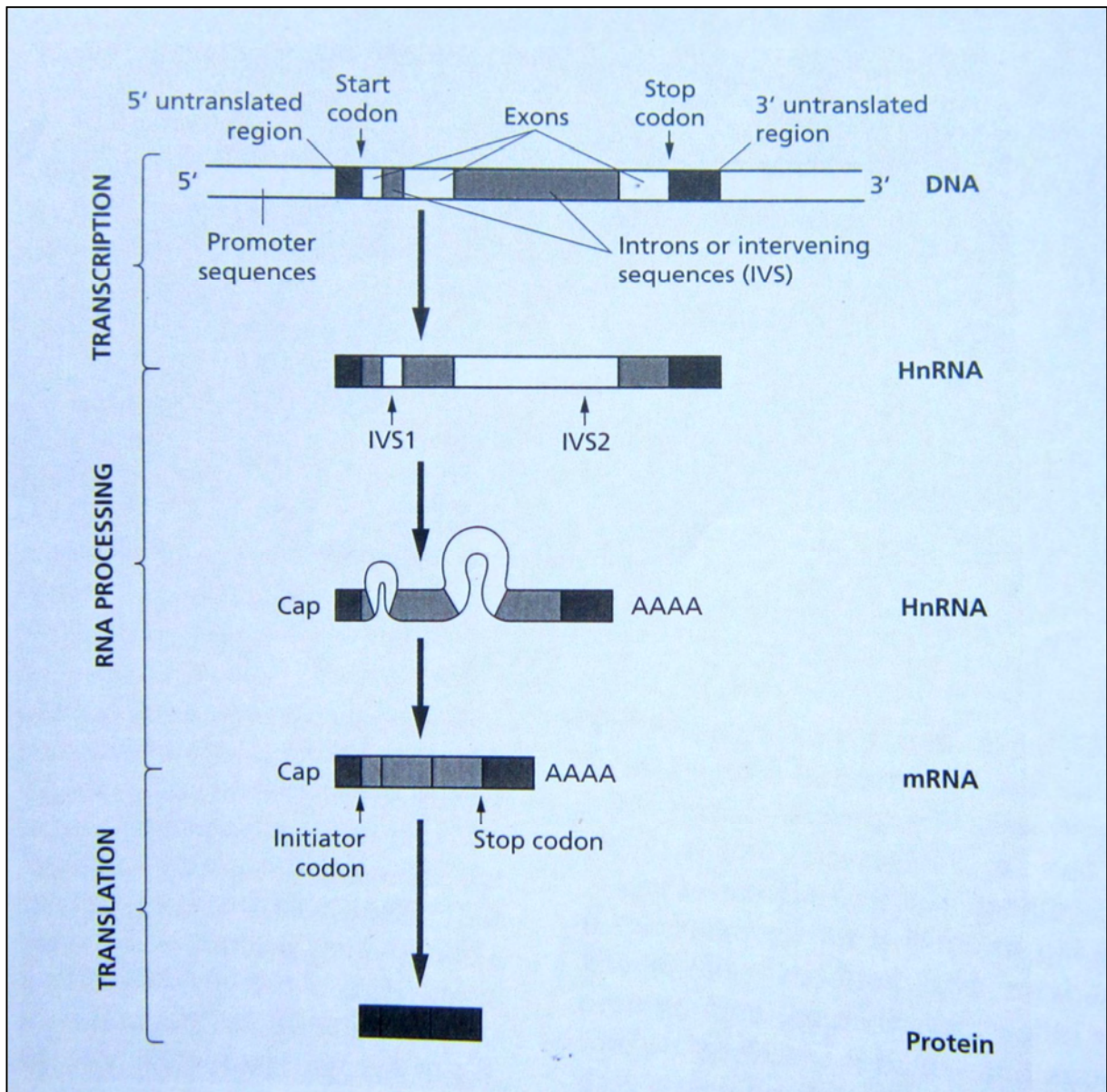


Figure 5: Processus de Synthèse des chaînes d'hémoglobine à l'échelle moléculaire(17)

Il se passe tout d'abord la transcription de l'ADN en ARN précurseur par les ARN polymérases. Les introns et les exons subissent une première transcription, ensuite ils feront l'objet d'autres traitements. Ces traitements sont l'enlèvement des introns ou « splicing », et

l'addition en amont d'un groupement de 7-méthyl guanosine c'est le « capping » et enfin l'ajout de groupement Adényle à la queue du gène. Le 7-méthyl guanosine a un rôle lors de la traduction tandis que l'adénylation (AAAA) est important pour la stabilité de l'ARN. La succession de ces évènements conduisent à la formation de l'ARNm. L'ARN m va ensuite partir du noyau et passer dans le cytoplasme où il va être transcrit à l'aide des Ribosomes et des ARNt mais aussi des Acides aminés.

La synthèse des chaînes polypeptidiques commence normalement par la Méthionine Met (représenté par le codon ATG sur l'ARNm) puis suit les autres acides aminés. La traduction s'arrête quand les ribosomes rencontrent un codon STOP (AAA par exemple). Les chaînes de globines ainsi obtenues vont s'assembler de tels sorte qu' on a 2 globines de la famille α et 2 globines de la famille β pour former le tétramère ou bien l'hémoglobine(17).

d. Éléments du contrôle de l'expression des gènes globine

Dans l'environnement immédiat de chaque gène globine, au niveau des promoteurs, ainsi que dans les zones régulatrices distales de l'ensemble de chaque locus, comme le LCR (*Locus CONTROL Region*), des séquences spécifiques ont été retrouvées sur lesquelles se fixent les facteurs de transcription, spécifiques ou ubiquistes, qui en modulent l'expression. De ces facteurs ou séquences de fixation, quelques-uns sont cités parmi tant d'autres :

- *les facteurs TFIIX* font partie de la machinerie de base de l'initiation de la transcription.

- *les séquences GATA* sont présentes à la fois sur les promoteurs et le LCR. Elles sont aussi retrouvées dans tous les gènes d'expression érythroïde et en sont spécifiques. Le facteur GATA-1 est nécessaire aux étapes tardives de la maturation érythroïde, le facteur GATA-2 est impliqué dans les étapes précoces(18). Ils sont les prototypes d'une grande famille de protéines à doigts de zinc, à expression systémique dans d'autres organes. Leur fonction a été finement analysée dans la lignée érythroïde et dans la lignée mégacaryocytaire.

- *les séquences CACCC* et apparentées sont présentes dans les promoteurs des différents gènes globine. Elles fixent les différents facteurs de la famille EKLF(famille *Krüppel*)(19). Le

facteur EKLF lui-même se fixe en 5' du gène β -globine sur une séquence CCACACCCT et il est impliqué dans la commutation foetale \rightarrow adulte.

Au niveau du gène γ , par exemple, la séquence CTCCACCCA, légèrement différente de la β , fixe le facteur Sp1, facteur ubiquiste dont la spécificité varie au cours du développement. C'est ainsi qu'on obtient des pseudo-gènes, des séquences de l'ADN qui sont obtenus lors du phénomène d'évolution, ils ressemblent au gène sur le plan structural mais ne conduit pas à la synthèse de protéines. Sa perte de fonction est due à des mutations qui ont désactivé ces gènes ou bien la perte des éléments critiques pour l'expression de ces gènes. Ces pseudo-gènes sont transcrits mais pas traduits.

Au niveau du LCR se trouve *une séquence de fixation du facteur NF-E2* (gènes de la famille AP-1), que caractérise un domaine de « fermeture éclair à leucine » (*b-Zip*) qui permet sa dimérisation.

NF-E2 de spécificité érythroïde est composé de deux sous-unités, p45 et p18, qui appartiennent chacune à des familles multiprotéiques(20). Enfin, les travaux récents sont focalisés sur le rôle joué par la structure de la chromatine dans l'expression des gènes en général et des gènes de globine en particulier. Les gènes transcrits sont situés dans des zones dites « ouvertes » de l'euchromatine, accessibles à l'ARN polymérase et aux facteurs de transcription, par opposition à l'hétérochromatine compacte. L'importance majeure de séquences dites « insultrices » et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine émergent peu à peu.

Un équilibre stœchiométrique parfait est nécessaire pour éviter une symptomatologie thalassémique, alors que la chaîne α est physiologiquement synthétisée en léger excès. Un travail récent a montré que les chaînes α en excès sont d'abord captées par une protéine chaperon AHSP (*α -haemoglobin stabilizing protein*) puis libérées progressivement pour fixer la molécule d'hème. Et former, de façon équilibrée, le dimère $\alpha\beta$, puis le tétramère d'Hb(21).

e. Les chaînes de globines normales et les hémoglobines correspondantes

Des mutations changent les pseudo-gènes cités ci-dessus en gène fonctionnel. Le gène qui code pour la chaîne δ est considéré en voie de devenir un pseudo-gène. Des altérations de

son promoteur ont conduit à un faible taux de transcription d'où la faible proportion de l'HBA2 par rapport aux Hb totales.

Par des mécanismes semblables aux mutations citées ci-dessus, la synthèse de l'hémoglobine chez l'homme est caractérisée par deux changements majeurs dans la composition de l'hémoglobine et non pas sa fonction. C'est la commutation ou « switch ».

Au niveau de la famille β , il est observé deux commutations. La première se rencontre à la fin du stade embryonnaire et est caractérisée par l'extinction de l'expression du gène ϵ , remplacée par celle des gènes fœtaux γ ; la seconde au stade périnatal pendant laquelle l'expression des gènes γ est remplacée par celle du gène adulte β .

Une seule commutation est observée pour la famille α , qui, à la fin du stade embryonnaire voit l'extinction de l'expression du gène ζ , remplacée par celle des gènes adultes α (10).

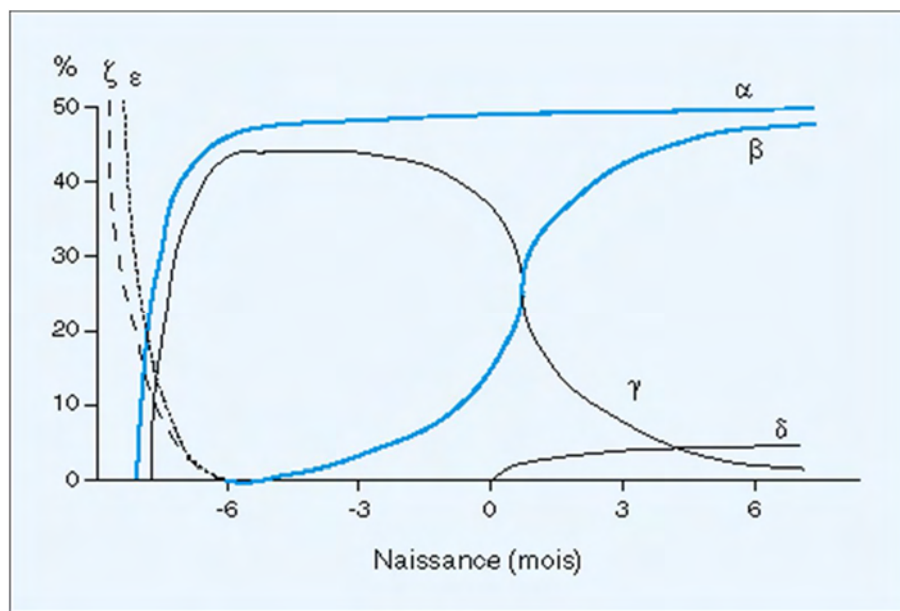


Figure 6: Biosynthèse des chaînes de globines de la vie fœtale jusqu'à l'âge de 6 mois(22)

Une coordination très précise existe et aboutit à une synthèse équivalente des gènes de la famille α et de la famille β afin d'avoir une synthèse équilibrée des chaînes de globines au cours de la vie. Il est distingué alors plusieurs compositions des Hb au cours de notre développement.

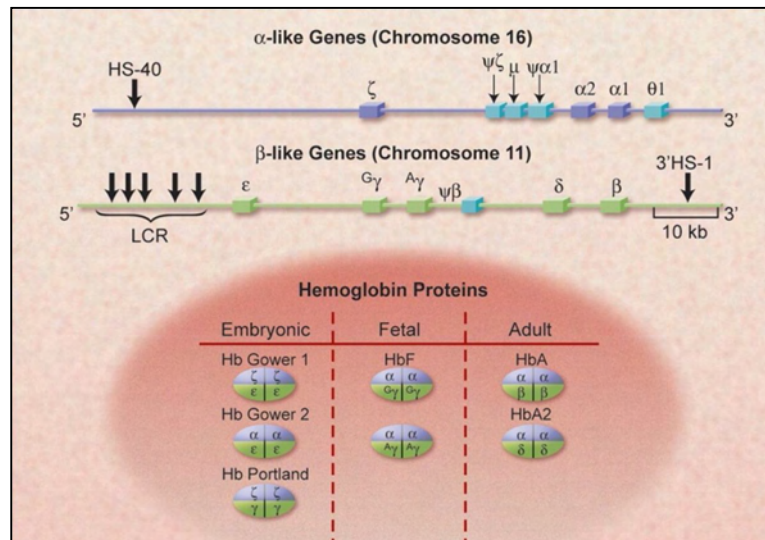


Figure 7: Composition des diverses hémoglobines identifiées au cours du développement(23)

Pendant les trois premiers mois de la gestation, les globules rouges humains contiennent des Hb embryonnaires (Gower1 et 2, Portland). Elles sont ensuite progressivement remplacées par de l'HbF ($\alpha\gamma$).

Dès la 3^{ème} semaine d'aménorrhée, la synthèse d'HbF décline au profit de l'HbA, si bien qu'à la naissance, le pourcentage d'HbA est de 15 à 30%.

Le switch est effectué à 90% à 6 mois et à 95% à un an. Il se termine vers l'âge de 5-6 ans avec une concentration résiduelle d'HbF de 0,1 à 1%(24)

La composition normale définitive de l'hémoglobine est(25):

- HbA ($\alpha_2\beta_2$) : 97%
- HBA2 ($\alpha_2\delta_2$) : 2,2 à 3,2%
- HbF ($\alpha_2\gamma_2$) < 1%.



***Partie II : physiopathologie
des hémoglobinopathies et leurs
circonstances de découverte***

I. Définitions

Les hémoglobinopathies ou HBP constituent les anomalies génétiques les plus répandues dans le monde (21,22). Elles correspondent aux anomalies héréditaires autosomiques récessives qui touchent la partie protéique de l'Hb. Donc, deux porteurs (hétérozygotes) généralement sains peuvent avoir la forme la plus sévère et se manifestent chez leurs enfants des deux sexes. Les HBP sont dues à des mutations des séquences codantes, non-codantes ou régulatrices des gènes de globines. Quand ces mutations bloquent l'expression des gènes de globine α ou β , c'est de la thalassémie.

La thalassémie est définie comme un ensemble très hétérogène d'affections dont le caractère commun est le défaut de synthèse, partiel ou total, d'une ou plusieurs chaînes de l'hémoglobine(26) (HBP quantitative).

Quand ces mutations touchent la structure des gènes de globine, la présence d'une Hb de structure anormale entraîne ou non des signes fonctionnels. Elles sont qualifiées d'Hb anormales ou variants d'Hb (HBP qualitative).

Quelques hémoglobines anormales de faibles fréquences méritent une mention spéciale appelées les Hb instables. Des « *crossing-over* » entre gènes β et δ sont également connus, à l'origine de gènes de fusion codant les Hb Lepore, ou anti-Lepore(27). Enfin, des anomalies moléculaires touchant les régions régulatrices d'expression des gènes seront décrites, à l'origine de β -thalassémies dites « silencieuses » (gènes beta), ou de la persistance héréditaire d'Hb fœtale (PHHF) (gènes gamma)(28,29).

La composition moléculaire normale ou anormale du gène s'appelle le génotype. Le génotype peut être associé à un état pathologique ou non pathologique appelé phénotype(30). Les mutations ne se manifestent pas toujours, même à l'état homozygote et toutes ne sont pas strictement récessives. Ceci est dû au rapport génotype/phénotype, qui rend la prédiction du phénotype extrêmement difficile(31).

II. Classification des HBP

On distingue quatre groupes selon la sévérité de la maladie et les symptômes cliniques(32):

- L'Hb S (sickle cell disease) ou la drépanocytose et les syndromes drépanocytaires majeurs. Les génotypes fréquents sont Hb S/S, Hb S/C, et Hb S/ β -thal, les génotypes les moins communs sont Hb S/D^{Punjab}, Hb S/O^{Arab}, Hb S/Lepore.
- Le β thalassémie incluant le $\delta\beta$ -thalassémie et Hb E/ β -thalassémie.
- Les α -thalassémies.
- Les variants de l'Hb responsables des anémies hémolytiques, des polyglobulies et rarement des cyanose.

III. Les hémoglobines anormales

À ce jour, près de 700 Hb anormales (Hb) ont été décrites(33,34). Les Hb anormales ont été les variants protéiques les mieux décrites depuis la mise en évidence en 1949 du premier d'entre eux, l'HbS, responsable de la drépanocytose(35). Actuellement, il existe plus de 1000 variantes d'une ou de l'autre des chaînes α ou β de l'Hb, et la liste continue à s'en allonger, consultable au site suivant <http://globin.cse.psu.edu/hbvar>(36).

Parmi ces variantes, les mieux connus sont l'Hb S à l'origine de la drépanocytose, l'Hb C et l'Hb E, et ceci en raison des conséquences cliniques et/ou biologiques qu'ils sont susceptibles d'engendrer. Toutefois, une majorité de variantes est asymptomatique et reste de ce fait méconnue ou de découverte fortuite. Enfin, il existe dans certains cas une association d'anomalies quantitatives et/ ou qualitatives de l'hémoglobine.

A. Hémoglobines anormales fréquentes

Trois variants, les premiers décrits, ont diffusé avec une grande fréquence épidémiologique, d'autres variants de fréquences assez élevés seront aussi cités.

Ce sont les hémoglobines S, C et E qui, toutes trois, sont des variants de surface. Leur fréquence, élevée dans des populations définies, est sans doute liée à deux séries de facteurs. Dans des régions anciennement impaludées, un processus de « polymorphisme équilibré » a

entraîné une survie préférentielle sélective des hétérozygotes. Le deuxième facteur est l'endogamie, fréquente dans certaines des populations concernées(37).

1. HbS ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$) : Hb de la drépanocytose ou Hémoglobinose S

L'HbS est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une Valine ($6\beta \text{Glu}\rightarrow \text{Val}$).

Cette pathologie reste asymptomatique jusqu'au 5^{ème} et 6^{ème} mois. Ceci est dû au taux élevé de l'HbF contenu dans les hématies et qui, comme nous l'avons souligné en haut, empêche la falciformation(38). L'apparition des premières complications cliniques aiguës s'observe vers l'âge de 6 ans, lorsque le taux d'HbF tend à rejoindre celui de l'adulte (38).

1.1. Répartition géographique

La drépanocytose est sûrement l'hémoglobinopathie grave la plus fréquente. Son épidémiologie est bien connue, chez les populations des régions suivantes: Afrique noire (25% de la population dans certaines régions), Madagascar, Réunion, Antilles (10-12%), Amérique centrale, bassin méditerranéen, Proche-Orient(39)

Dans les pays du bassin méditerranéen, la maladie drépanocytaire se rencontre à un moindre degré en Afrique du nord, péninsule ibérique, Sicile, Italie du Sud, Grèce, Turquie et Proche-Orient(1).

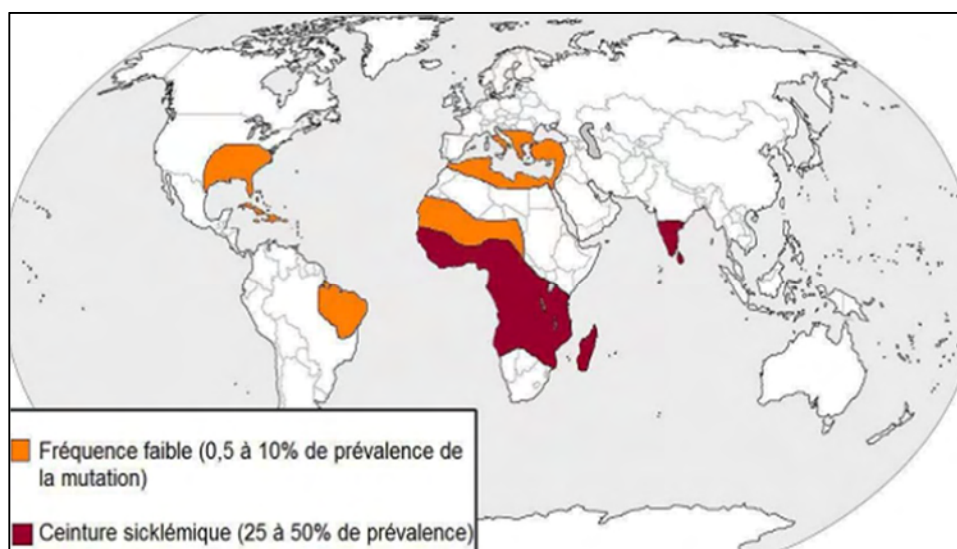


Figure 8: Distribution géographique de la drépanocytose(40)

1.2. Physiopathologie

Son mécanisme physiopathologique de base a été très précisément décrit, centré sur la polymérisation de l'HbS désoxygénée et les déformations cellulaires subséquentes observées chez les homozygotes SS.

Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation, la molécule d'HbS subit un changement de conformation. Celui-ci permet à la valine $\beta 6$ d'établir des liaisons hydrophobes avec la chaîne β d'une autre molécule d'Hb, en particulier avec la phénylalanine $\beta 85$ et la leucine $\beta 88$. Une seule des deux valines opère ce contact, de sorte que l'interaction β - β entraîne la formation d'un polymère qui peut être représentée comme l'enchaînement de deux rangées de molécules(10). Les déformations cellulaires caractéristiques appelées falciformation(41) font suite au regroupement et à la rigidification de ces fibres.

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

Le phénomène de base entraîne une cascade d'autres anomalies qui participent au mécanisme physiopathologique. Il est évoqué la perte de potassium et une déshydratation

cellulaire qui favorisent la polymérisation de la désoxy-HbS. (42) Il y a simultanément dénaturation de l'Hb, dont les hémichromes s'agglomèrent à la face interne de la membrane avec les protéines du cytosquelette. Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération de Fe³⁺, qui favorise l'existence d'un microenvironnement oxydant. Il est aussi observé une altération de l'asymétrie normale des phospholipides membranaires, avec exposition à la surface cellulaire de phosphatidyl sérines anioniques.

Des immunoglobulines de type IgG s'accumulent en surface, favorisant l'érythrophagocytose par les macrophages(43). Enfin, la déformation cellulaire s'accompagne d'une microvésiculation, en fait une augmentation de l'adhérence des hématies à l'endothélium vasculaire provoque un ralentissement circulatoire et favorise la vaso-occlusion(44,45); des anomalies du tonus vasculaire, notamment une vaso-constriction de la microvascularisation, réduisant la perfusion tissulaire(46,47); une augmentation de la viscosité du sang(48); une diminution de l'affinité de l'HbS pour l'oxygène; des phénomènes d'activation de la coagulation(49,50). La croissance squelettique peut aussi être affectée(51).

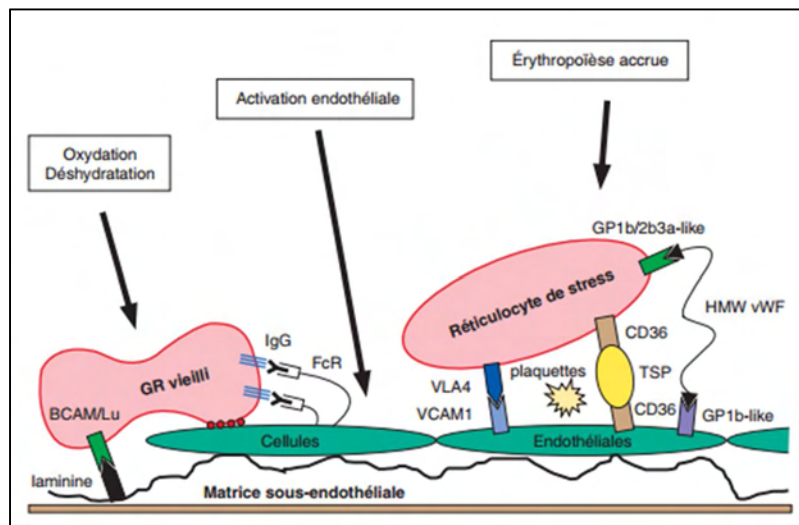


Figure 9: Adhérence des Globules Rouges à l'endothélium dans la drépanocytose(52)

Comme conséquences biologiques, il est noté :

- une anémie causée essentiellement de l'hémolyse, avec augmentation du renouvellement cellulaire des hématies par le système réticulo-endothélial (durée de vie des hématies réduite à 1/10 de leur espérance de vie normale), d'une érythroblastopénie due à une susceptibilité accrue aux infections par le parvovirus B19 en raison de l'asplénie fonctionnelle(53), de nécroses médullaires, d'une allo-immunisation par transfusions répétées(49);

- une augmentation de l'hématopoïèse intra et extramédullaire, réactionnelle à l'anémie chronique ;

- une susceptibilité aux infections bactériennes(100 fois supérieure à la population générale) et en particulier aux germes encapsulés (Streptococcus pneumoniae, Streptococcus de type B, Haemophilus influenzae de type b, Neisseria meningitides, klebsielles et salmonelles) en raison de l'asplénie fonctionnelle due aux infarctus spléniques répétés(54);

- une altération de la voie alterne du complément avec diminution du pouvoir opsonisant du sérum et donc de la phagocytose(55), une diminution du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles(56).

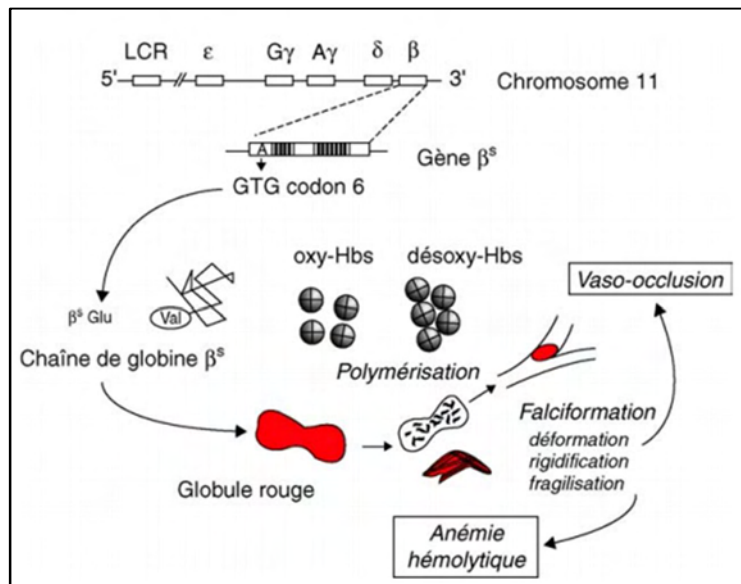


Figure 10: Mécanisme physiopathologique de base de la drépanocytose(57)

1.3. Les différentes formes de la maladie

a. Le trait drépanocytaire

La forme hétérozygote (HbA/HbS) est habituellement cliniquement muette, l'hémogramme est normal et seule l'étude de l'Hb est capable de la mettre en évidence. Les chaînes α s'associant préférentiellement aux chaînes β normales, le taux d'HbS chez un sujet A/S se situe autour de 40%(35).

Une microcytose, en l'absence de carence martiale, doit faire suspecter l'association avec une α -thalassémie. Des symptômes évocateurs de syndrome drépanocytaire (hémolyse, douleurs) doivent faire rechercher un facteur aggravant associé (hétérozygotie A/S Antilles). En effet, l' α -thalassémie est fréquente dans les populations africaines et se retrouve donc souvent chez les porteurs du gène HbS. Dans ce cas, le taux d'HbS est inférieur à celui d'un sujet A/S. En cas d'un seul gène α délété, le taux d'HbS se situe entre 30 et 35%; en cas de deux gènes α délétés, il tombe à 25–30%.

Chez un hétérozygote symptomatique, une étude complémentaire est parfois nécessaire pour mettre en évidence une mutation supplémentaire sur les gènes β ou α , en cis ou en trans. L'HbS-Antilles, pour laquelle une seconde mutation (β 23 Val→Ile) sur le gène de l'HbS favorise la polymérisation. Les complications de l'anémie drépanocytaire décrites chez les sujets porteurs du trait, n'ont été rapportées que chez les sujets atteints d'autres pathologies sous-jacentes pouvant les expliquer(59).

Ainsi, l'incidence d'infections, de manifestations ostéo-articulaires est la même que dans la population générale. Cette population possède, en effet, suffisamment d'HbA pour contrer la polymérisation dans l'état désoxygéné(58).

En revanche, certaines complications rares peuvent être attribuées à l'hétérozygotie A/S : la survenue d'infarctus spléniques, dont l'apparition est favorisée par un séjour en altitude et celle d'épisodes d'hématurie par nécrose papillaire. Ces hématuries sont transitoires, semblent probablement liées à une mauvaise perfusion des papilles rénales(58).

Par ailleurs, certains auteurs (60) ont rapporté que: d'un risque accru de mort subite chez le porteur du trait drépanocytaire, le risque de survenue d'une maladie thromboembolique veineuse est plus élevé chez les porteurs du trait drépanocytaire, comparativement à ceux qui n'ont pas d'HBP. Mais globalement, l'espérance de vie et la morbidité chez les patients drépanocytaires hétérozygotes sont les mêmes que dans le reste de la population(60).

Il faut aussi préciser que dans toute situation pathologique s'accompagnant d'hypoxie, d'acidose ou de risque thrombotique, le trait drépanocytaire pourrait être un facteur d'aggravation. (61)

b. Syndrome drépanocytaire majeur

Le terme de «syndrome drépanocytaire majeur »est utilisé pour désigner les formes cliniques graves et peut correspondre à différentes formes génétiques : forme homozygote (HbS/HbS) ou hétérozygoties composites associant l'HbS à une β -thalassémie ou à une autre Hb anormale (HbC le plus souvent en France, Hb-D-Punjab ou Hb-O-Arab). Chez ces patients, l'HbS polymérise, lors de la désoxygénation, en longues fibres entraînant la rigidification et la déformation de l'hématie à l'origine des deux manifestations principales qui sont l'anémie hémolytique chronique et les accidents vaso-occlusifs. Ces patients doivent bénéficier d'une prise en charge précoce dans des centres spécialisés. Le taux de mortalité reste élevé en Afrique noire.

Le taux d'HbF est variable et doit être déterminé avec précision, car il est admis que, dès qu'il dépasse 10%, il suffit à inhiber partiellement la polymérisation et à retarder la falciformation.

Les patients qui présentent une persistance héréditaire de l'HbF (PHHF) associée sont généralement asymptomatiques.

L'existence d'une α -thalassémie associée doit également être recherchée, car elle semble associée à certaines complications. Elle peut être suspectée sur des arguments

indirects (constantes hématologiques, taux d'HbS, présence d'Hb Bart's ou d'HbH) ou recherchée spécifiquement par des techniques de biologie moléculaire.

L'étude familiale et génotypique est parfois indispensable pour interpréter le phénotype (par exemple pour différencier les patients S/S des patients S/ β^0 -thalassémiques).

Les polymorphismes du locus β -globine définissent 5 types d'haplotypes majeurs associés à l'HbS. Ils sont liés à des variations des taux d'Hb et d'HbF et constitueraient une valeur pronostique pour certains.

Tableau 3 : les caractéristiques biologiques des principaux syndromes drépanocytaires.

(62)

	Hb (g/dl)	VGM (fl)	réticulocytes	Morphologie érythrocytaire	Étude de l'Hb			
					HbA (%)	HbS (%)	HbF (%)	HbA ₂ (%)
AS	N	N*	N	N	60-65	35-40*	< 1	v
SS	6-10	N*	↑	Drépanocytes (+ à +++) Cellules cibles (+) Corps de Jolly (±)	0	80-95	5-20	v
SC	10-12	↓ (70-90)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (50 %) Poikilocytose	0	50 (HbC = 45)	1-7	v
S/ β^+ -thalassémie	9-12	↓ (65-95)	↑	Drépanocytes (rares) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poikilocytose	1-25	55-90	5-15	v
S/ β^0 -thalassémie	7-11	↓ (60-80)	↑	Drépanocytes (+) Cellules cibles (+ à ++) Microcytes (+ à ++) Poikilocytose	0	80-90	5-15	v
S/PHHF	N	N*	N	Cellules cibles (±) Microcytes (±)	0	≥ 70	15-35	v

VGM : volume globulaire moyen ; N: normal.

*: valeur abaissée en cas d' α -thalassémie associée.

v: variable car le dosage de l'HbA₂ est ininterprétable en raison d'une contamination par de l'HbS.

2. HbC (β 6Glu→Lys) ou Hémoglobine C

L'HbC est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 6 est remplacé par une lysine (6β Glu→ Lys).

On peut la trouver à l'état hétérozygote (génotype A/C ou « trait » A/C), à l'état homozygote (C/C ou hémoglobine C) ou combinée à d'autres anomalies, formant ainsi des hétérozygotes composites: génotype C/ β thalassémique (β^+ ou β^0), ou profil S/C, dont la clinique est classiquement moins sévère que celle de la drépanocytose(63).

2.1. Répartition géographique

L'hémoglobine C, dont la substitution a été identifiée dès 1958(64) est considérée comme ayant une origine unique sur le plateau voltaïque, et s'étant de là propagée par diffusion concentrique. L'hémoglobine C, qui vient en seconde position en terme de fréquence, est représentée chez les Africains de l'Afrique de l'Ouest(20%), mais aussi chez les Noirs américains aux Antilles (3%).et les Maghrébins(65).Quelques cas autochtones sont observés en Asie du Sud-Est.

2.2. Physiopathologie ou tableau clinique

La mutation affecte comme celle de l'HbS, la chaîne β -globine mais ne provoque pas la formation de polymères. Les sujets hétérozygotes sont cliniquement asymptomatiques. L'hémoграмme est normal, parfois discrètement microcytaire.

En revanche, il a été mis en évidence la formation de cristaux intra-érythrocytaires qui sont responsables d'une augmentation de la densité, d'une déshydratation cellulaire et d'une moindre déformabilité des hématies. Ce qui est sans doute suffisant pour expliquer une présentation phénotypique extrêmement modérée chez les sujets homozygotes CC. On cite alors une anémie hémolytique chronique modérée, et des frottis sanguins qui montrent nombreuses cellules cibles et parfois quelques microsphérocytes(61).

Cette déshydratation est responsable d'une CCMH élevée (environ 38 g/dl) et d'une microcytose (VGM moyen de 72 fl(66).

Un élément de sévérité tient au fait que sa zone de diffusion coïncide avec celle de l'HbS en Afrique de l'Ouest, d'où la fréquence des hétérozygotes composites S/C qui, eux, présentent un syndrome drépanocytaire classique, bien que très atténué. Le rôle de l'Hb C dans la diffusion du gène β S a été évoqué: dans les pays du golfe du Bénin, la fréquence des hétérozygotes composites SC est du même ordre de grandeur que celui des homozygotes SS(31).

C'est l'association HbS/HbC qui est grave, puisqu'elle conduit à un syndrome drépanocytaire majeur (tableau 3). La présence d'HbC doit donc être prise en compte dans le conseil génétique de la drépanocytose. Les couples risquant d'avoir un enfant avec une HBP S/C doivent être informés du risque de syndrome drépanocytaire majeur.

3. HbE (β 26Glu→Lys)

L'HbE est un mutant de la chaîne α où l'acide glutamique en position 26 est remplacé par une lysine. L'HbE a des propriétés fonctionnelles peu différentes de l'HbA. Elle se trouve à l'état hétérozygote (trait A/E), homozygote (hémoglobinoïse E) ou forme des hétérozygotes composites E/ β thal, ou encore S/E(61).

3.1. Répartition géographique

Même si quelques cas sporadiques ont été observés dans le monde, l'HbE n'est fréquente qu'en Asie du Sud-Est, notamment khmères: Cambodge, Laos, Thaïlande et Birmanie; elle semble plus rare au Viêt-Nam(67). En Asie du Sud-Est, sud de la Chine et nord du sous-continent indien(68).

3.2. Physiopathologie

Il s'agit, là aussi, d'une substitution de surface, mais la mutation faux sens du codon 26, dans le 1^{er} exon du gène β -globine, crée aussi un site alternatif d'épissage, partiellement utilisé, qui dévie une partie de l'ARN messager vers une maturation anormale, aux dépens de la production d'ARNm normal(69). La substitution d'acide aminé, en elle-même, n'affecte pas la fonction de l'Hb, mais la diminution de l'ARNm normal conduit à un défaut de production. L'hémoglobinoïse E se présente donc comme une thalassémie discrète,

responsable, à l'état homozygote, d'une anémie modérée en règle générale bien tolérée. Sa gravité tient surtout au fait que, dans les mêmes populations, le paludisme a sélectionné et amplifié diverses formes d' α et de β thalassémies(68). Un spectre très important de formes composites et associées a été mis en évidence, dont les meilleures descriptions ont, pour des raisons logistiques, été faites en Thaïlande, mais que l'on observe dans tous les pays de la région. D'autres hémoglobines, Hb Knossos, Hb Malay qui sont des variants rares, ont été décrites. Elles sont classées dans l'HbE, car elles comportent de façon similaire un épissage alternatif dans un exon, et un syndrome thalassémique. D'où la raison de sa classification avec les β -thalassémies en terme de sévérité.

3.3. Tableaux clinique et biologique

Cette anomalie est bien supportée dans sa forme hétérozygote. L'hémogramme est normal, il peut montrer une microcytose ou une discrète anémie. Les taux d'HbE sont d'environ 30%.

Chez l'homozygote, les effets sont mineurs, se limitant à une anémie microcytaire hypochrome modérée. L'HbA est absente, le taux d'HbE varie entre 85 et 99%. Le taux d'HbF est variable, généralement inférieur à 15%.

Néanmoins, de grandes variations peuvent être observées, et il est indispensable d'interpréter les résultats en fonction du contexte clinique et familial pour discuter l'éventualité d'une association HbE/ β^0 -thalassémie et un diagnostic moléculaire. L'attention doit se porter sur les formes associées :

- l'association HbE/ α -thalassémie se caractérise par des taux d'HbE anormalement bas et doit faire rechercher une α -thalassémie dans le cadre du conseil génétique ;
- l'association HbE/ β -thalassémie, fréquente en Thaïlande et dans tout le Sud-Est asiatique, se présente généralement sous forme d'une thalassémie intermédiaire.

Elle est suggérée par un taux anormalement élevé d'HbE. En cas d'hétérozygotie composite HbE/ β -thalassémie, le taux d'HbE varie de 40 à 60% et le taux d'HbF est de l'ordre de 30 à 60%.

En cas d'hétérozygotie composite HbE/ β^+ -thalassémie, on observe également environ 10% d'HbA.

4. HbDPunjab ($\beta^{121}\text{Glu}\rightarrow\text{Gln}$) ou Hémoglobine D

L'HbD-Punjab est un mutant de la chaîne α où l'acide glutamique en position 121 est remplacé par une glutamine. Elle se retrouve sur divers haplotypes qui supposent une origine multiple, probablement due à un point critique de mutation.(30)

4.1. Répartition géographique

Il s'agit du quatrième mutant dans l'ordre de fréquence dans le monde, elle ubiquitaire, on le retrouve avec une forte prévalence chez les Sikhs du Punjab et dans les populations du nord-ouest des Indes. Comme l'HbE, elle s'est propagée vers les régions occidentales à cause de l'héritage colonial, et le long de la Route de la Soie(65).

4.2. Physiopathologie

Les patients homozygotes pour cette mutation sont très rares, ils présentent souvent une anémie hémolytique légère et une discrète splénomégalie :

- Trait A/D : Les patients hétérozygotes n'ont pas de symptômes cliniques ni hématologiques.
- Hétérozygotes composites : Les patients hétérozygotes composites pour l'hémoglobine D et l'hémoglobine S présentent une symptomatologie variable selon le variant D en cause. Pour les patients hétérozygotes S/D^{Punjab}, il s'agit d'un syndrome drépanocytaire d'expression clinique identique à la drépanocytose (anémie hémolytique et crises vaso-occlusives), alors que les hétérozygotes S/D-Iran ou S/D-Ibadan présentent plutôt un trait drépanocytaire, c'est-à-dire qu'il est bénin.

Des patients D/ β^0 -thalassémiques ont été trouvés également, chez qui l'anémie hémolytique chronique est modérée. Son origine est multiple, probablement due à un point critique de mutation.

Il est donc important d'en faire le diagnostic, tant dans le cadre du conseil génétique que de la prise en charge précoce des malades.

Les premiers signes cliniques n'apparaissent qu'après l'âge de six mois, période où l'hémoglobine S remplace progressivement l'hémoglobine F.

5. HbOArab (β 121Glu→Lys) ou Hémoglobinoase 0

L'HbO-Arab est un mutant de la chaîne β où l'acide glutamique en position 121 est remplacé par une lysine.

5.1. Répartition géographique

L'HbO-Arab se retrouve en Europe orientale, mais également en Afrique et dans le Moyen-Orient. Elle se trouve principalement chez les Bulgares et des cas ont également été signalés au Soudan, au Kenya, en Jamaïque, aux Etats Unis, en Israël et en Egypte.

5.2. Tableaux clinique et biologique

Ce variant n'entraîne aucune anomalie chez les hétérozygotes et les homozygotes. C'est l'association HbO-Arab/HbS qui est grave, puisqu'elle conduit à un syndrome drépanocytaire majeur avec anémie hémolytique et crises vaso-occlusives. Il est donc important d'en faire le diagnostic, tant dans le cadre du conseil génétique que de la prise en charge précoce des malades.

6. Hb Lepore

Hb Lepore ne touche pas que le gène β mais aussi celui du δ , on parle alors de l'hybride $\delta/\beta[\alpha_2(\delta\beta)_2](70)$. Elle se retrouve spécialement dans les pays de l'Europe de l'Ouest.

La fusion des gènes est provoquée par un crossing-over non- homologue entre les gènes δ et β , l'extrémité 5' du gène recombinant étant de type δ et l'extrémité 3' de type β . Le chromosome qui porte le gène recombinant, ne porte ni le gène δ , ni le gène β (71). En fonction de la région où s'est produit le crossing-over, plusieurs variétés d'Hb Lepore ont été identifiées.

Ce crossing-over peut causer une délétion de 7,4kb environ, ce qui conduit à un gène hybride donc la production de la chaîne hybride $\delta\beta$ -globine(26). Le produit du gène de fusion δ/β est une protéine hybride dont la synthèse est quantitativement réduite, parce qu'elle est placée sous la dépendance du promoteur faible δ , et qui s'exprime dans un syndrome β -thalassémique(72).

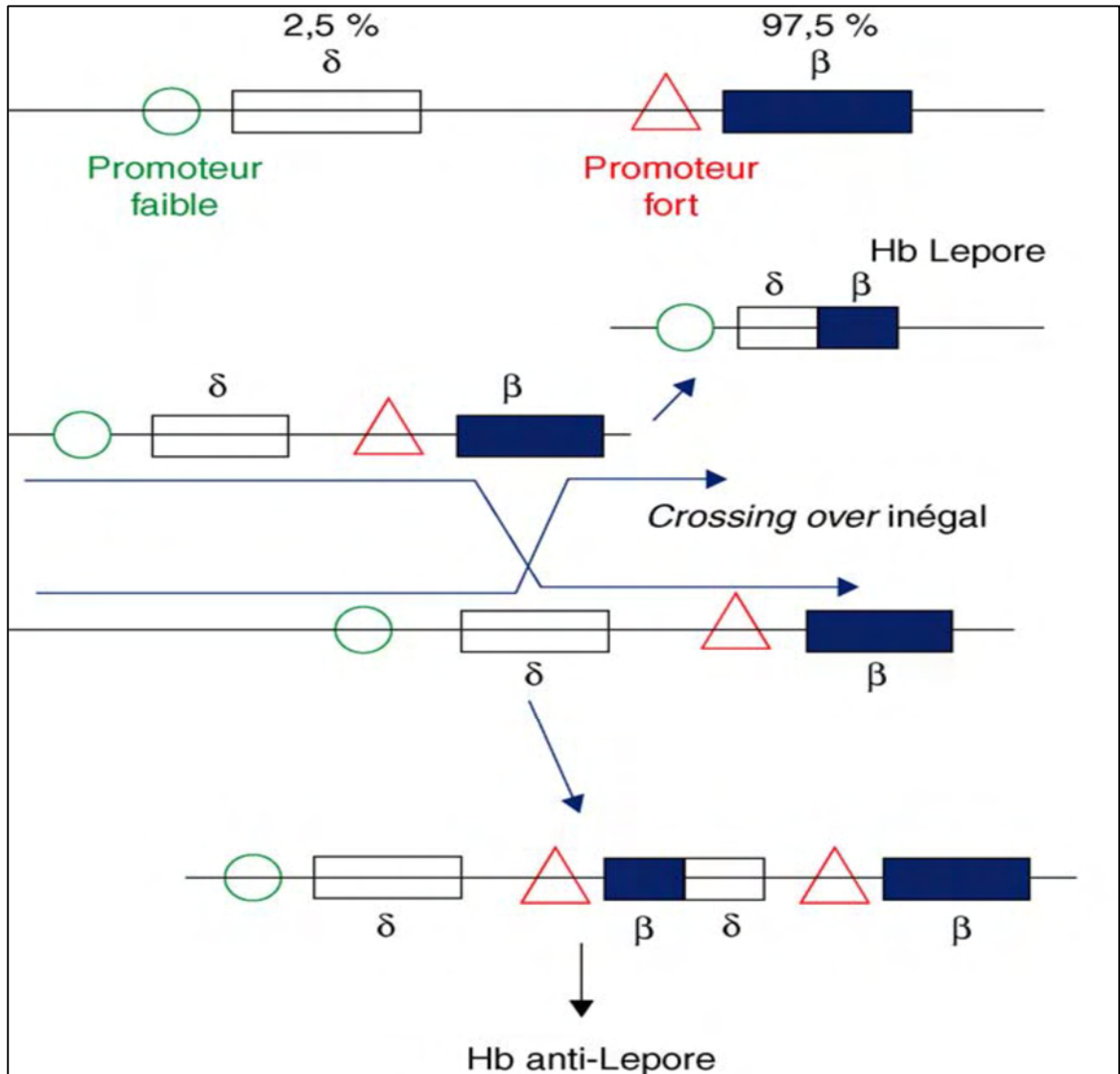


Figure 11: Représentation du mécanisme d'obtention de la fusion des gènes de l'hémoglobine Lepore (10)

Trois différents Hb Lepore ont été définis en fonction de leurs points d'arrêt de suppression, à savoir :

- Hb Lepore-Hollandia ($\delta 22\text{Ala} / \beta 50\text{Thr}$),
- Hb Lepore-Baltimore ($\delta 50\text{Ser} / \beta 86\text{Ala}$ or $\delta 68\text{Leu} / \beta 84\text{Throu} \delta 59\text{Lys} / \beta 86\text{Ala}$)
- Hb Lepore-Washington-Boston ($\delta 87\text{Gln} / \beta \text{IVSII-8or} \delta 87\text{Gln} / \beta 116\text{His}$)(73,74).

Le gène hybride qui produit un phénotype β -thalassémie, ayant comme symptôme une faible anémie hypochrome microcytaire. L'homozygotie de Hb Lepore ou hétérozygotie composite de β -thalassémie et Hb Lepore donne un phénotype de thalassémie majeure ou intermédiaire. Avec cette variété d'allèles thalassémiques, les interactions complexes sont fréquentes et donnent des résultats de syndromes thalassémiques(67,75).

B. Les thalassémies

Le terme thalassémie vient du grec : thalassa (mer) et hémie (sang). Les syndromes thalassémiques constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques, de transmission autosomique récessive, caractérisées par l'insuffisance de production d'une chaîne de globine, c'est-à-dire la partie protéique. En fonction de la nature de la chaîne touchée, on parlera d'alpha (α -thalassémie) ou beta (β -thalassémie), de delta (δ) ou de gamma (γ) thalassémie(76).

Les thal sont parmi les maladies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Il est estimé à 1,67% la prévalence des α - et β -thalassémies hétérozygotes(77). Il y a un rapport de chaînes de globine de type α /chaînes de globine type β . Ce rapport étant physiologiquement régulé très finement pour être égal à 1. Tout déficit qui a pour conséquence spécifique un déséquilibre entre les chaînes, avec excès des chaînes non appariées ou libres qui sont instables et précipitent dans les érythroblastes. Ceci s'observe surtout pour les chaînes alpha libres.(78)

Des conséquences au niveau de l'érythropoïèse et de la destruction cellulaire s'observent dans toutes les thalassémies ; elles sont cependant variables selon qu'il s'agit de β ou d' α -thalassémies. Les déficits suivants ont été cités :

- le déficit de la chaîne γ , par exemple, n'ayant ni conséquence clinique ni hématologique.
- le déficit de la chaîne δ est une anomalie néonatale dont les conséquences disparaissent spontanément en quelques mois, mais dont le diagnostic devrait être évoqué.
- les $\delta\beta$ -thalassémies, en revanche, sont des maladies fréquentes qui posent dans certains pays des problèmes de santé publique sévères.
- les déficits des chaînes α et β qui sont respectivement l' α -thal et la β -thal sont les maladies les plus fréquentes. La différence d'expression clinique et d'évolution doit être référée à la différence de structure des gènes, surtout l'emplacement de ces gènes. Dans le locus α , le gène α est dupliqué, mais il est exprimé dès la phase fœtale puisqu'il n'existe pas de gènes fœtaux et qu'il se produit une seule commutation embryonnaire \rightarrow fœtale/adulte. Ce qui n'est pas le cas pour le gène β qui subit deux commutations.

1. Physiopathologie

Les syndromes thalassémiques sont la conséquence d'une insuffisance de la synthèse d'une ou plusieurs chaînes de globine. Selon la chaîne insuffisamment synthétisée, on distingue les α -, β -, δ -, $\delta\beta$ -, $\gamma\delta\beta$ -thalassémies. De multiples défauts moléculaires sont en cause et aboutissent à déséquilibrer le ratio entre les chaînes α et β , normalement autour de $1,00 \pm 0,1$ chez l'adulte.

En fait, ce sont les chaînes célibataires, non-appariées, qui provoquent la physiopathologie de la maladie, et la sévérité clinique des syndromes thalassémiques est corrélée au degré du déséquilibre du ratio α /non α (79).

Ainsi, chez les patients atteints de forme sévère de β -thalassémie, ont été montrés des agrégats de chaînes α déposés sur la membrane squelettique érythrocytaire. Ces agrégats induisent des anomalies de l'hydratation et de la déformabilité cellulaire, avec rigidification des globules rouges. Leur plasticité n'étant plus suffisante pour circuler dans les microvaisseaux et franchir les sinus du système réticuloendothélial, les globules rouges sont

hémolysés. Les chaînes de globine en excès altèrent aussi la membrane érythrocytaire et génèrent des radicaux libres de l'oxygène. Les membranes érythrocytaires expriment anormalement la phosphatidyl sérine, ce qui favorise leur élimination par les macrophages.

En plus de l'hémolyse périphérique, l'anémie est aussi expliquée dans la β -thalassémie par une érythropoïèse inefficace, conséquence d'une apoptose accélérée (77,79). Le nombre des précurseurs érythroïdes est multiplié par 5 ou 6 chez les patients thalassémiques, et le nombre des cellules apoptiques par 15. L'augmentation de l'apoptose serait moins marquée dans les α -thalassémies.

L'inflation érythroïde dans les espaces médullaires est responsable des déformations osseuses caractéristiques des syndromes thalassémiques(77,80).

L'importance des phénomènes est en fait variable selon le génotype. Les syndromes thalassémiques sont ainsi caractérisés par des anémies hémolytiques de présentation clinique très variable.

Ce sont souvent les mêmes défauts génétiques, qui sont à l'origine des α - et β -thalassémies, avec une transmission autosomique récessive. Mais il faut citer cependant les exceptionnelles formes de β -thalassémies dominantes qui sont à la frontière des deux catégories, puisqu'elles correspondent en fait à des Hb anormales hyperinstables. Les persistances héréditaires d'HbF (PHHF) peuvent être envisagées comme des formes limitent de $\gamma\beta$ -thalassémies au cours desquelles la compensation est presque totale.

2. Syndromes α -thalassémiques.

Les α -thalassémies sont le plus souvent la conséquence de la délétion d'un ou plusieurs gènes α . il à est à noter que retrouve 90% des α -thal sont causées par des délétions.

2.1. Epidémiologie

Elles sont particulièrement fréquentes en Asie du Sud-est et en Chine. Leur prévalence est de 3 à 5% à Hong Kong et peut atteindre 30 à 40% en Thaïlande et au Laos(81,82). Elles sont aussi fréquentes en Afrique, surtout au niveau de l'équateur, moins fréquentes en Afrique du Nord et Australe (0,06 et 0,41)(83).

2.2. Manifestations cliniques et biologiques

Il est résumé dans le tableau suivant l'inactivation d'un, deux, trois ou quatre gènes α (22). Les anomalies géniques impliquant α_2 sont plus sévères que celles impliquant α_1 car le gène α_2 produit deux à trois fois plus d'ARNm α -globine que le gène α_1 (80):

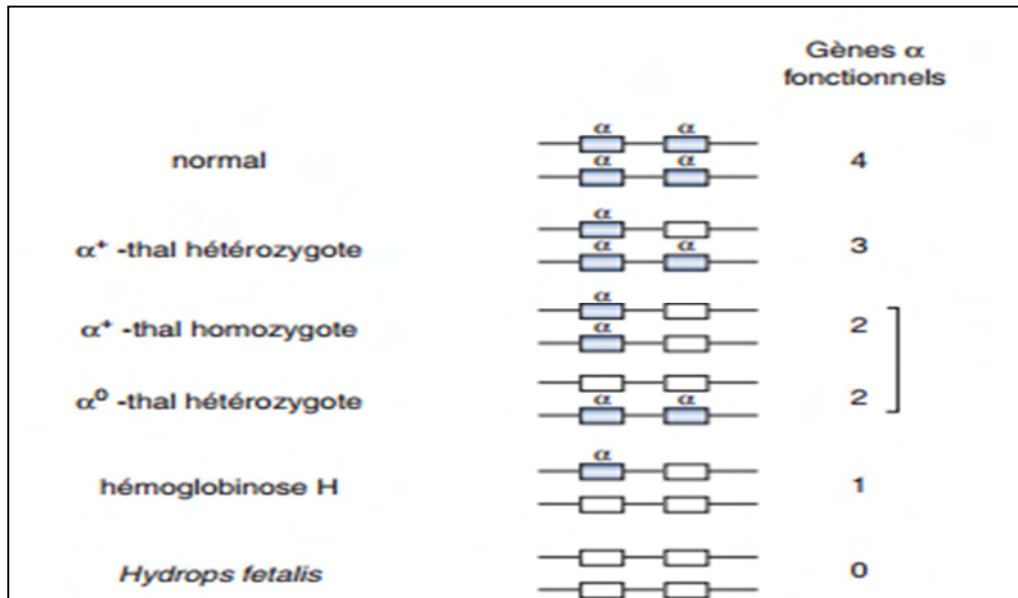


Figure 12: Mécanismes génétiques à l'origine des alpha-thalassémies. En bleu on a le gène alphanormal; en blanc le gène alpha thalassémique(22)

➤ Déléation d'un gène α

Les α -thalassémies les plus fréquentes n'altèrent qu'un gène α et ne sont responsables d'aucune manifestation clinique. Ce sont les α^+ -thalassémies hétérozygotes ($-\alpha/\alpha\alpha$), dites α -thal de type 2 ou silencieuses. Biologiquement, il existe à la période néonatale un taux très modérément augmenté (1 à 2%) d'Hb Bart's constitué par 4 tétramère γ_4 . L'hémogramme est normal dans 50% des cas ; ou peut montrer une hypochromie et une microcytose modérées.

➤ Déléation de deux gènes α

L'inactivation de deux gènes α est responsable des différentes formes d' α -thal de types 1. Il peut s'agir de deux gènes α en CIS sur le même chromosome ($--/\alpha\alpha$, α^0 -thalassémie

hétérozygotes), ou en TRANS sur chaque chromosome ($-\alpha/-\alpha$, α^+ thalassémie homozygote). L' α^0 -thalassémie hétérozygote est fréquente chez les Asiatiques et les Méditerranéens et quasi absente chez les sujets noirs Africains ou Antillais, qui ont fréquemment des formes α^+ . Il n'y a pas de conséquences cliniques. Biologiquement, les nouveau-nés ont un taux plus élevé d'Hb Bart's (5 à 10%). A l'âge adulte, l'hémogramme révèle une microcytose (70 ± 5 fL), une hypochromie, un taux normal ou un peu bas d'HbA2 et un taux normal d'HbF.

➤ **Délétion de trois gènes α**

La délétion de trois gènes α sur le chromosome est responsable d'une hémoglobinoase H dite délétionnelle ($---/\alpha$). C'est la forme la plus fréquente d'hémoglobinoase H. Les chaînes non- α en excès s'apparient, sous forme d'Hb Bart's à la naissance et de tétramère β_4 au fur et à mesure que les chaînes β se substituent aux chaînes γ . Cette affection atteint surtout les patients orientaux ou méditerranéens, exceptionnellement les sujets noirs Africains ou Antillais.

Plus rarement, l'hémoglobinoase H est causée par la délétion de deux gènes de l' α -globine d'un chromosome 16, associée à une anomalie α^+ sur l'autre (mutation, insertion ou petite délétion). Les formes non-délétionnelles sont habituellement caractérisées par des symptômes plus importants et par une anémie plus profonde, pouvant nécessiter des transfusions. Par exemple, les sujets qui ont à la fois une α -thal de type 1 et une hétérozygotie de type Constant Spring (mutation du gène α_2) sont atteints d'une forme grave d'hémoglobinoase H, en raison d'une rigidité particulière de la membrane des globules rouges.

Des formes particulières d'hémoglobinoase H ont été décrites chez des patients d'Europe du Nord ayant un retard mental. Baptisés alpha-thalassémie retardation (ATR), ces syndromes sont liés à une délétion télomérique étendue du bras court du chromosome 16 (ATR-16) ou des mutations au locus q13.3 du chromosome X (ATR-X)(84,85).

L'expression clinique de l'hémoglobinoase H est très variable en fonction du génotype responsable(86). Certains patients sont quasiment asymptomatiques. D'autres expriment le tableau d'anémie hémolytique modérée (pâleur, ictère, hépatosplénomégalie, modifications squelettiques modérées). Dans une minorité de cas, enfin, il existe une anémie plus sévère,

responsable de modifications osseuses thalassémiques marquées et nécessite des transfusions répétées.

Biologiquement, il existe une anomalie hémolytique microcytaire hypochrome d'intensité variable (6 à 10 g/dl). Les GR incubées 1 heure à 37°C en présence de bleu de Crésyl brillant à 1% prennent un aspect muriforme. Elles sont ponctuées de petits précipités en motte, les corps de Heinz, qui sont formés de tétramères β . L'électrophorèse montre la présence de 1 à 30% d'HbH et de 10 à 30% d'Hb Bart's à la naissance.

Les patients atteints d'hémoglobinoses H peuvent être considérés comme des « thalassémiques intermédiaires », car ils ont une production résiduelle spontanée d'hémoglobine et des besoins transfusionnels faibles ou occasionnels. Une supplémentation régulière en Acide folique est nécessaire. Les lithiases biliaires sont fréquentes. Une aggravation de l'anémie peut être secondaire à une infection aigüe ou à la prise de médicaments oxydants (les mêmes que ceux qui induisent une hémolyse en cas de déficit en glucose-6-phosphate deshydrogénase). Une aggravation des besoins transfusionnels traduit parfois un hypersplénisme, qu'une splénectomie peut réduire. La splénectomie augmente en revanche, chez ces patients, le risque de complications thromboemboliques.

➤ **Délétion de quatre gènes**

La délétion de quatre gènes α (-- /--) est surtout rencontrée en Asie du Sud-est, où prévaut la mutation sud-est asiatique (--SEA), qui ampute la totalité des gènes α . Elle peut aussi être secondaire à d'autres grandes délétions, présentes en Méditerranée(87). Elle est inconnue en Afrique. Les fœtus α^0 -thal homozygotes survivent au-delà du 5^{ème} mois de grossesse grâce à la présence en petites quantités d'Hb embryonnaires, mais meurent le plus souvent avant le terme de la grossesse ou juste après la naissance dans un tableau d'anasarque fœtoplacentaire (Bart's hydrops foetalis)(27). Ce tableau peut rendre compte de 25% des décès périnataux dans certaines régions comme l'Asie du Sud-est(88). Des observations comportant des survies prolongées ont été rapportées après diagnostic prénatal, lorsque les enfants atteints ont pu bénéficier de transfusions in-utero, avant le développement d'une souffrance neurologique(87).

En pratique quotidienne, cette affection grave pose surtout le problème dans sa prévention, qui repose sur la détection en routine des sujets hétérozygotes pour des mutations impliquant la totalité du génome α , et sur le recours au diagnostic prénatal pour les couples à risques(87).

Tableau 4: Principaux syndromes alpha-thalassémiques: relation entre le génotype et le phénotype (80)

Nombre de gènes délétés	Dénomination génotypique	Dénomination phénotypique	Retentissement clinique	Biologie	Répartition
1	- α/α	α -thalassémie de type 2	« Silencieuse »	Nouveau-né : 1 à 2 % Hb Bart's (γ_4) Adulte : HbA ₁ : 98 % ; HbA ₂ : 2 % Hémogramme normal	
2	-- α/α α^0 -hétérozygote (cis)	α -thalassémie de type 1 hétérozygote	Mineur	Nouveau-né : 5 à 10 % Hb Bart's (γ_4) Adulte : HbA ₁ : 98 % ; HbA ₂ : 1-2 % Microcytose (70 ± 5 fl) ; hypochromie	Asie, Méditerranée
	- $\alpha/-\alpha$ α^+ - homozygote (trans)	α -thalassémie de type 1 homozygote	Absent ou mineur		Afrique, Antilles
3	Hémoglobinose H délétionnelle -- α	α -thalassémie majeure	Très variable en fonction de la nature génétique de la maladie Anémie hémolytique microcytaire hypochrome	Nouveau-né : Hb Bart's (γ_4) 10 à 30 % ; HbH (β_4) 10 à 30 % Adulte : HbH (β_4) ; 1 à 30 % ; HbA ₁ : 70 % ; HbA ₂ : 3 à 6 %	Asie du Sud-Est, Chine, Moyen-Orient, Méditerranée Afrique, Antilles : rare
	Hémoglobine H non délétionnelle Par exemple : -- α ^{Constant Spring}		Atteinte clinique sévère		
4	-- $\alpha/-$	Hydrops foetalis	Mort in utero ou à la période néonatale	Hb Bart (γ_4) 80 à 90 % HbH (β_4) =10 % Hb Portland =10 %	Cause de 25 % environ des décès périnataux dans le Sud-Est asiatique

2.3. α -thalassémies acquises

Un certain nombre de cas d'hémoglobinose H avec déséquilibre de synthèse α/β ont été observés, en général chez des hommes âgés, accompagnant un syndrome myélodysplasique (syndrome ATMDS). Ces formes seraient dues à une anomalie clonale acquise(52).

3. Syndrome β -thalassémiques

3.1. Epidémiologie

Initialement décrite dans les populations du Bassin Méditerranéen où elles sont endémiques, la β -thal est aussi répandue dans tout le Moyen Orient, le sud et l'est de l'Asie, l'Afrique de l'Ouest et les Antilles où a sévi le paludisme, on cite aussi l'Amérique du Sud. La β -thal est rare dans les populations originaires de Nord de l'Europe. La prévalence des porteurs du gènes est de 5% à 70% dans ces régions(89). L' incidence annuelle dans le monde est estimé à environ 1/100 000(90).

3.2. Physiopathologie

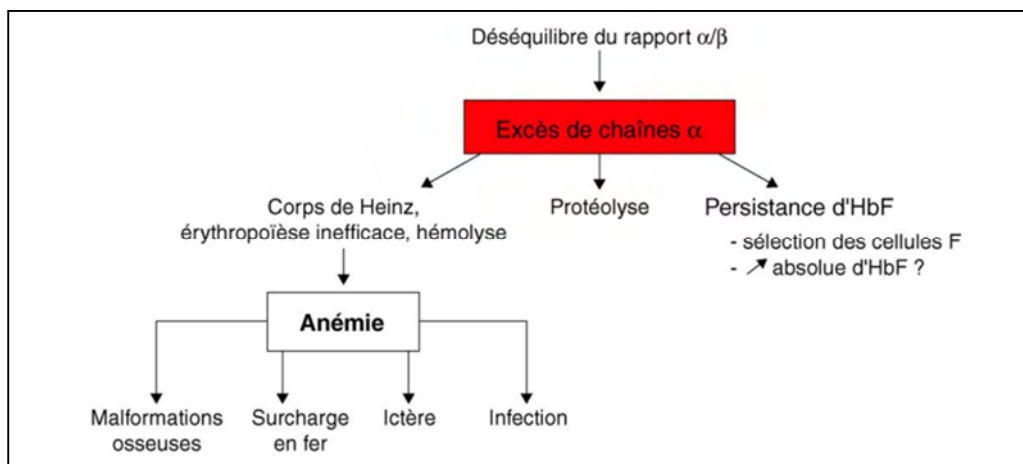


Figure 13 Base physiopathologique au cours d'une beta-thalassémie sévère. (10)

Les chaînes α -globine en excès, non associées en tétramères, précipitent dès le stade des précurseurs érythropoïétiques, entraînant la destruction intra-médullaire des cellules et une érythropoïèse inefficace. Les lésions cellulaires se présentent comme une conséquence directe de cet excès de chaînes α qui co-précipitent sur la membrane avec les protéines du squelette, formant des hémichromes et libérant des espèces réactives de l'oxygène. L'anémie a donc plusieurs composantes : une destruction intra-médullaire précoce, l'hémolyse intra-vasculaire des GR qui sont parvenus à maturité, enfin le pouvoir oxyphorique réduit de GR hypochromes et microcytaires.

La persistance de l'expression d'HbF, couramment observée, est en grande partie liée à la survie sélective des cellules normalement riches en HbF, ou cellules F, dont la proportion est génétiquement déterminée. Dans ces cellules, les chaînes γ s'associent aux chaînes α , ce qui réduit leur excès et allonge la durée de vie des GR. Dans certains cas, s'y ajoute également une augmentation absolue de la production d'HbF et de cellules F. D'autres mécanismes s'enchaînent : une sécrétion d'érythropoïétine répond à l'hypoxie tissulaire, avec expansion de la moelle, déformations osseuses, parfois même érythropoïèse extra-médullaire. Il y a l'observation d'autres conséquence à part l'anémie, les anomalies du métabolisme du fer, avec augmentation de l'absorption intestinale, que limite le traitement transfusionnel, et accumulation de fer dans différents organes (surrénales, pancréas, myocarde, etc.). Une susceptibilité accrue aux infections est classique, mais imparfaitement expliquée.

La première classification a été phénotypique, β^+ ou β^0 selon que l'électrophorèse montrait ou non l'existence d'HbA chez les homozygotes atteints.

L'avènement de la biologie moléculaire a permis de raffiner la classification (24). La grande majorité des β -thalassémies est due à des mutations ponctuelles ou à des micro-délétions ou insertions de nucléotides. Ces mutations ont été observées sur toute l'étendue du gène β : exons, introns, sites d'épissage et leurs séquences consensus, promoteurs, autres régions non transcrites ou non traduites en 5' et en 3'. Elles ont par ailleurs été identifiées à toutes les étapes de la synthèse protéique : transcription, maturation de l'ARNm, traduction, et même une étape post-traductionnelle. Les différentes formes moléculaires ont pu être rattachées à la classification initiale β^+/β^0 . C'est ainsi que sont toujours β^0 :

- les mutations des sites d'épissage GT et AG eux-mêmes ;
- les mutations non-sens qui entraînent un arrêt de la traduction et celles qui, par un décalage de phase de lecture, entraînent l'apparition d'un codon non-sens en aval
- mais aussi les mutations, moins fréquentes, du codon d'initiation.

À l'opposé, dans la catégorie des β^+ -thalassémies, se trouvent les mutations de la région promotrice et en 3' celles du site de polyadénylation, ainsi que les mutations des séquences consensus entourant les sites d'épissage.

Les mutations, exoniques ou introniques, qui créent des sites d'épissage alternatif sont le plus souvent b+. Les patients expriment simultanément l'ARNm mature normal et l'ARNm anormal, seul le premier étant traduit ; les taux relatifs des ARNm conditionnent la gravité de la maladie. Plusieurs centaines de mutations ont maintenant été décrites.

3.3. Manifestations cliniques et biologiques

a. β -thalassémie hétérozygote

Les sujets porteurs d'une β -thalassémie hétérozygote sont bien portants. Ils n'ont pas de signes cliniques d'anémie, exceptionnellement, une splénomégalie discrète est constatée. Biologiquement, le taux d'Hb est normal ou peu diminué (10 à 13 g/dl), le taux de réticulocyte est normal ou peu élevé, le frottis sanguin montre une hypochromie, une anisocytose et une poïkilocytose. Les signes biologiques sont :

- l'augmentation de la masse globulaire (pseudoplyglobulie) ;
- la microcytose et l'hypochromie ; et
- l'élévation de l'HbA2 (> 3,3%) sur l'électrophorèse.

L'HbF est normale ou discrètement augmentée. Les mesures d'HbA2 requièrent une analyse par HPLC. Il est classique de considérer que l'élévation d'HbA2 peut être masqué par une carence en Fer sévère et qu'une électrophorèse de l'hémoglobine n'est interprétable que si les stocks martiaux sont normaux.

Aucune précaution ou traitement particulier n'est à envisager chez les sujets porteurs d'un traitement thalassémique. La seule démarche utile est l'enquête familiale, afin d'identifier les couples dont les deux membres seraient porteurs β -thal hétérozygote et de leur proposer un conseil génétique.

Rarement, une anémie peut être constatée chez certains sujets qui associent une β -thal hétérozygote à une triplication des gènes α , ou à une sphérocytose héréditaire. Exceptionnellement, chez certaines femmes, l'anémie s'aggrave au cours de la grossesse.

b. β -thalassémie homozygote

Les β -thal homozygotes sont classés selon que la synthèse des chaînes β est supprimé (forme β^0) ou seulement diminuée (β^+). C'est la profondeur de l'anémie et l'importance des besoins transfusionnels qui permettent de classer les thalassémies en formes majeurs (maladie de Cooley) ou intermédiaires. Cette distinction ne peut être faite qu'après quelques mois de vie, lorsque la synthèse de l'HbF ne peut plus masquer l'anomalie de synthèse de l'HbA.

c. Thalassémie majeure (maladie de Cooley)

▪ Signes cliniques en l'absence de traitement.

Les signes cliniques apparaissent chez le nourrisson : la pâleur est constante, associée rarement à un ictère conjonctival. L'asthénie dépend du degré de l'anémie.(91)

Une hépatosplénomégalie s'installe progressivement dans les premiers mois de la vie, elle peut s'accroître avec le temps. Une hypertension portale peut être observée chez des patients plus âgés. L'hypersplénisme pourrait être responsable d'une leucopénie et d'une thrombopénie.

Les anomalies morphologiques dépendent du degré de l'anémie, parce ce qu'elles sont la conséquence de l'inflation érythroïde.

L'hyperplasie des os plats de la face confère aux enfants, un aspect asiatique.



Figure 14: Hyperplasie des os plats de la face chez un enfant thalassémique (76)

Des anomalies de l'implantation dentaire sont fréquentes, entraînant des troubles de l'articulé dentaire.

Le retentissement psychologique de ces déformations peut être important. Les fractures pathologiques ne sont pas exceptionnelles, mais toutefois moins fréquentes que ne le laisserait pas prévoir l'importance de l'ostéopénie.

Des arthralgies sont très fréquentes chez les adolescents et les adultes. Les articulations les plus touchées sont les chevilles, puis les genoux et les hanches. Chez l'adulte, l'ostéoporose est responsable de douleurs osseuses atteignant spécifiquement le rachis(92,93).

- **Signes hématologiques**

L'hémogramme révèle une anémie profonde, inférieure à 7 g/dl, microcytaire (VGM entre 60 et 65 fL), hypochrome (TCMH < 26 pg). Le taux de réticulocyte est voisin de 100-109/L, moins élevée que ne le voudrait le degré de l'anémie. L'examen du frottis sanguin montre une anisocytose, une poikilocytose, des ponctuations basophiles fréquentes, une

érythroblastose majeure. Le myélogramme n'étant pas nécessaire au diagnostic, il montrerait la forte érythroblastose avec des érythroblastes d'aspect dysmorphique due au défaut de synthèse d'Hb. Les macrophages médullaires sont surchargés en Fer.

L'étude de l'Hb permet le diagnostic, le pourcentage d'HbF lequel est constamment très augmenté en fonction de l'âge (50 à 98%) ; il persiste (β^+) de l'HbA (5 à 45%), ou non (β^0) ; le pourcentage de l'HbA2 est souvent bas dans les formes β^0 , élevé dans les formes β^+ . La bilirubine non-conjuguée est augmentée du fait de l'hémolyse chronique. Le contenu en fer de l'organisme et le bilan de fer positif sont toujours en augmentation, même en l'absence de transfusion, du fait de l'hyperabsorption intestinale du fer secondaire à la dysérythropoïèse.

- **Evolution en l'absence de traitement**

L'anémie sévère se complique d'insuffisance cardiaque, l'hépatosplénomégalie se majore, un retard de croissance s'installe, le décès survient avant l'adolescence(94).

- d. β -thalassémie intermédiaire**

- **Signes cliniques et biologiques**

Ces patients ont une production résiduelle d'Hb de l'ordre de 6-11 g/dl ne requérant pas de transfusions mensuelles. Contrairement aux patients thalassémiques homozygotes majeurs, la sévérité de l'expression clinique résulte de la conjonction d'au moins trois facteurs, la mutation β -thalassémique en cause, le nombre de gènes α , le taux de production de chaînes γ capables de s'apparier avec les chaînes α , éléments qui seront donc tous pris en compte pour tenter de prédire la gravité clinique de l'affection(95). Cette prédiction doit rester toutefois très prudente, et seule l'observation des besoins transfusionnels permet de distinguer une thal intermédiaire d'une forme majeure.

4. Hétérozygoties composites E/ β -thalassémies (Cf Hb E)

4.1. Epidémiologie

Du fait de la fréquence des mutations β -thal en Asie du Sud-Est. L'hétérozygotie composite E/ β -thal, qui est tout à fait caractéristique de cette région du monde.

4.2. β -thalassémies intermédiaires de transmission dominante

Elles sont rares et responsables chez des sujets hétérozygotes d'un tableau clinique de thalassémie intermédiaire. Elles résultent de mutations de structure qui produisent des molécules de globine de type hypersinstable, dont la demi-vie est de quelques minutes à quelques heures. Il peut s'agir de délétions, de petites insertions ou de mutations ponctuelles. Certaines d'entre elles entraînent un décalage du cadre de lecture.

La physiopathologie de ces affections associe la présence d'une chaîne de globine instable, qui précipite dans les précurseurs érythroblastiques, et un excès de chaînes α libres.

Le diagnostic repose sur le séquençage du gène β . Il doit être évoqué en particulier s'il existe un phénotype de thal intermédiaire chez un patient n'appartenant pas aux populations endémiques.

5. $\delta\beta$ -thalassémies et Persistances Héritaires d'Hémoglobine Fœtale (PHHF)

Ce terme descriptif recouvre un ensemble d'affections caractérisées par un défaut d'expression touchant momentanément l'HbA et l'HbA₂ associé à une expression accrue de l'HbF.

Les $\delta\beta$ -thalassémies résultent de la délétion des deux gènes δ et β . Elles se rencontrent chez différentes ethnies du Bassin méditerranéen.

Il s'agit de la thalassémie et de PHHF selon que l'expression de l'HbF est ou non suffisante pour compenser le défaut de production d'HbA.(96) Un certain nombre de grandes délétions ont été successivement identifiées, englobant les gènes β et δ , parfois le gène γ^A . Il en résulte une classification en :

➤ PHHF $G\gamma^A\gamma(\delta\beta)^0$, subdivisées:

- PHHF délétionnelles (délétion large des deux gènes),
- PHHF non-délétionnelles, un groupe hétérogène de lésions stimulant la synthèse d'HbF.
- thalassémie $G\gamma^A\gamma(\delta\beta)^0$
- thalassémie $G\gamma(\gamma^A\delta\beta)^0$.

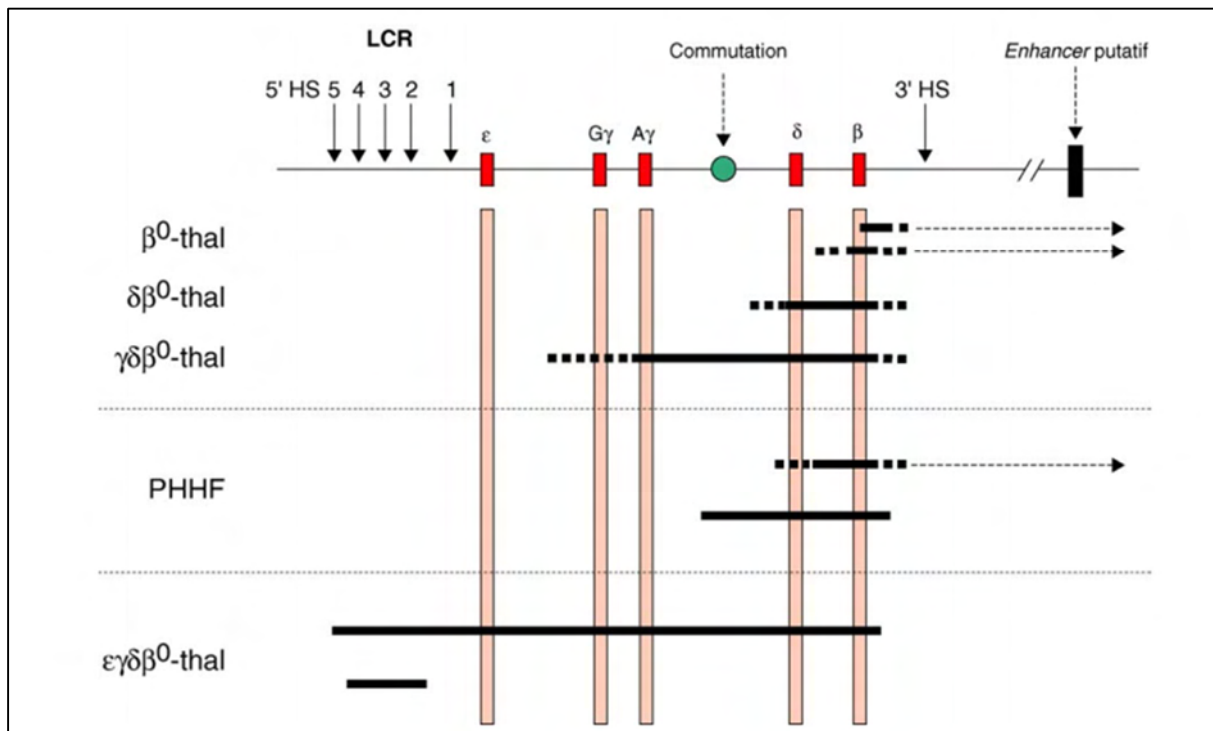


Figure 15: Beta-thalassémies et de PHHF délétionnelles. Les formes délétionnelles de β-thalassémies sont rares. Seuls des prototypes des délétions décrites sont représentés ici. Certaines ne touchent que le gène β lui-même ; d'autres sont plus étendues et PHHF. (52)

Le taux variable d'HbF et ses conséquences sur la sévérité de la maladie ont deux causes principales, non exclusives :

- la délétion peut ou non englober une zone régulatrice située entre les gènes Aγ et δ, impliquée dans la commutation fœtale →adulte(97) ;
- la délétion a placé à proximité des gènes c des séquences activatrices de type « enhancer »(98).

Quoique exceptionnelles, quelques thalassémies ont été observées à l'état hétérozygote au cours desquelles aucun des gènes du locus n'était exprimé ($\epsilon^G\gamma^A\gamma\delta\beta$)⁰ (99,100). Dans certains de ces cas, cependant, le gène β était présent et intact, mais non actif. C'est à la suite de la première de ces descriptions qu'a été faite en 1987 par F. Grosveld la mise en évidence

du LCR en 5' du locus, ce qui a ultérieurement orienté la recherche et permis l'observation de délétions de tailles variables, mais s'étendant toutes sur l'ensemble des sites du LCR.

À côté des formes délétionnelles, des investigations ultérieures ont mis en évidence des PHHF non délétionnelles au cours desquelles le gène β est exprimé normalement. C'est le PHHF non-délétionnelles.

Diverses mutations des régions promotrices de l'un ou l'autre des gènes γ ont été trouvées. Malheureusement le gène porteur de la mutation est toujours sur exprimé. Et qu'il semblerait de règle générale : la mutation modifie souvent le site de fixation d'un facteur transcritivateur.(101)

IV. Les variants de l'Hb responsable des anémies hémolytiques, des polyglobulies et rarement des cyanose.(96)

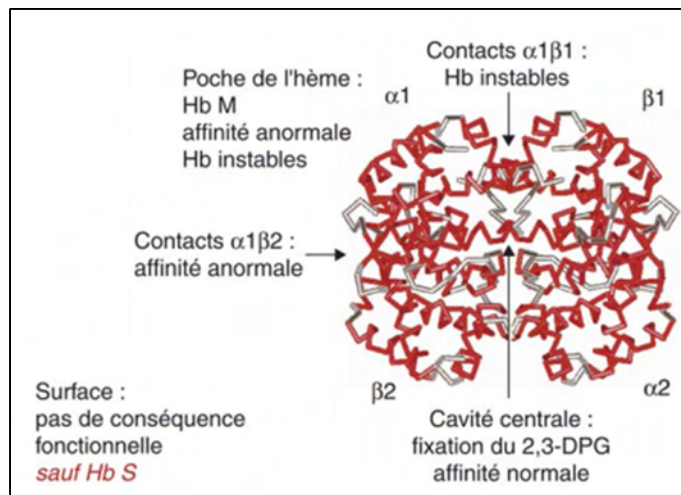


Figure 16: Les régions fonctionnelles et les conséquences physiopathologiques des variants selon la localisation de la mutation (52)

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+} . Il est observé cliniquement une cyanose due à une modification brune des propriétés spectrales de l'Hb. Les hémoglobines perdant leur hème sont instables, entraînant une anémie hémolytique.

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

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.

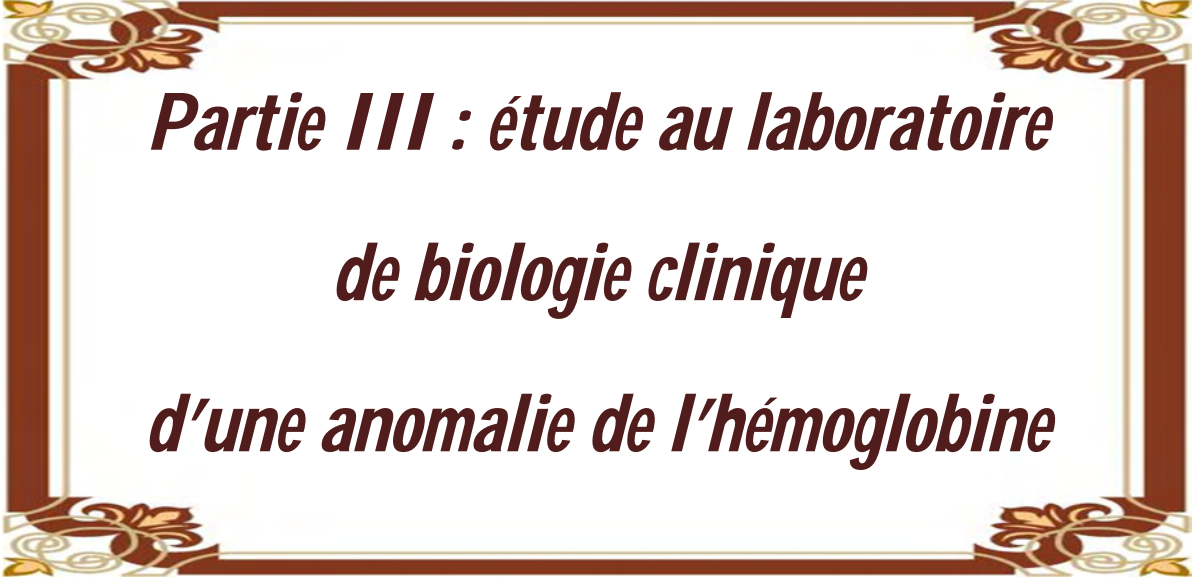
3. Mutation de la cavité centrale

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.

4. Diagnostic différentiel

Ces Hb fonctionnellement anormales se présentent avec une symptomatologie clinique et hématologique qui leur est propre.

L'anémie hémolytique qu'entraîne une hémoglobine instable est typique. En revanche, les tableaux de polyglobulie ou de cyanose induits par une Hb hyper-ou hypoaffine pour l'oxygène sont exceptionnels et poseront des problèmes de diagnostic différentiel. Dans le cas d'une polyglobulie, particulièrement chez le sujet jeune, et bien sûr après avoir éliminé une maladie de Vaquez, il faudra aussi penser à une anomalie enzymatique, au 2,3-DPG, à l'érythropoïétine et à son récepteur, etc. Le cas d'une cyanose peut faire penser à de nombreux toxiques et bien sûr à une anomalie cardiaque ou pulmonaire, à toutes les causes qui s'opposent à une oxygénation correcte de la molécule d'Hb.



***Partie III : étude au laboratoire
de biologie clinique
d'une anomalie de l'hémoglobine***

I. Dans quel cas on cherche les anomalies de l'hémoglobine

A. Circonstances de diagnostic d'une hémoglobinopathie.

Toujours penser à une anomalie de l'hémoglobine devant les situations suivantes :

- Chez les femmes enceintes d'ethnie à risque.
- Motivation de la demande,
- Origine géographique du patient et de ses parents présumés,
- Antécédents familiaux connus d'hémoglobinopathies,
- Renseignements cliniques, comme des signes d'anémie, de polyglobulie
- Présence d'une hémoglobine anormale au cours du dosage de l'HbA1C
- Pour compléter le diagnostic étiologique d'anomalies biologiques évocatrices d'une anomalie de l'hémoglobine
- Recherche systématique chez les nouveau-nés de certaines maternités.
- Enquête familiale, suite à la découverte d'une hémoglobinopathie.

B. Données anamnestiques

L'identification d'anomalies de l'hémoglobine par analyse du phénotype suppose des renseignements précis et complémentaires accompagnant la demande d'examen(102):

- Motivation de la demande,
- Origine géographique 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.

C. Données cliniques

- Signes d'anémie : pâleur cutanéomuqueuse, asthénie, souffle cardiaque...
- Signes d'hémolyse.

D. Données biologiques de base

1. Numération de la formule sanguine

L'interprétation d'une analyse de l'Hb est pratiquement impossible sans les informations hématologiques obtenues à partir de l'hémogramme ou la numération de la formule sanguine (NFS) Ceci concerne surtout le diagnostic des thal. . La mutation structurale des Hb conduisent à des variations du bilan hématologique qui est fonction de la mutation spécifique à chaque hémoglobinopathie. La clé hématologique d'une suspicion des thal est une anémie microcytaire et hypochrome. C'est-à-dire que le VGM est inférieur à 80 fL à condition d'avoir une bonne sensibilité. (103,104).

Tableau 5: Les valeurs normales des quelques paramètres de l'hémogramme (105)

Age	Hb (g/dl)	Hématies (T/l)	VGM (fl)	TCMH (pg)
6 mois-2 ans	12 ± 0.9	4.66 ± 0.3	76.1 ± 3.2	25.7 ± 1.4
2-6 ans	12.2 ± 0.7	4.67 ± 0.3	77.6 ± 3.3	26.3 ± 1.3
2-12 ans	12.7 ± 0.8	4.68 ± 0.3	80.4 ± 3.4	27.3 ± 1.3
12- 16 ans	13.5 ± 1.1	4.74 ± 0.4	83.8 ± 4	29.2 ± 1.5
Adulte femme	11.5 à 15	4 à 5	82 à 98	27 à 32
Adulte homme	13 à 17	4.5 à 5.5		

En dépit, il faut disposer des résultats d'un hémogramme récent, accompagnés de manière idéale d'un décompte des réticulocytes. Le taux d'hémoglobine, le VGM et le nombre d'hématies doivent être interprétés en fonction de l'âge du patient (27,106). Le nombre de GR est à prendre en compte, RBC ou red cell blood count.

Ces paramètres sont intégrés dans le Mentzer index (VGM / RBC). Le diagnostic de l'anémie ferriprive peut être accompagné par un indice de Mentzer (généralement supérieure à ~ 13) alors les porteurs de β -thal présentent généralement un indice inférieur (107).

L'examen du frottis sanguin doit permettre de reconnaître d'éventuelles anomalies des globules rouges : anisocytose, microcytose, polychromatophilie, présence de cellules cibles, de drépanocytes, des ponctuations basophiles intra-érythrocytaires.

2. Bilan martial

Est primordial pour l'interprétation de certains examens comme celle du dosage de l'Hb A2c comprenant au moins :

- Fer sérique
- Coefficient de saturation de la transferrine
- Ferritine.

3. Bilan d'hémolyse

- Bilirubine libre et conjuguée,
- haptoglobine

Tableau 6: FICHE DE SUIVI / HEMOGLOBINOPATHIES POUR LE PHENOTYPAGE utilisée au laboratoire de Biochimie et de Toxicologie de l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de RABAT

Nom, prénom :	Date de naissance	
Origine géographique	Tél	
Motif de consultation ou admission dans le service		
Antécédents pathologiques/Familiaux		
Taux d' <u>Hb</u>	<u>Hte</u>	VGM
TCMH		
Nombre de GR	IDR	Taux de <u>Rétic</u>
Frottis sanguin		
Ferritine	CRP	Haptoglobine
<u>Bili T.</u>	<u>Bili.D</u>	LDH
Enquête familiale		

II. Phase pré-analytique

Les conditions pré-analytiques doivent être bien connues et maîtrisées. Le prélèvement de choix pour l'étude phénotypique de l'hémoglobine est un échantillon sanguin recueilli sur EDTA. Le prélèvement doit être frais ou peut, à défaut, être conservé à +4°C pendant 1 semaine au maximum.

Le prélèvement doit être transporté rapidement au laboratoire, soit à température ambiante si l'acheminement dure moins de 24 h, soit conservé à + 4 °C(108). Sinon, l'apparition de bandes parasites sur les gels d'électrophorèse, correspondant à des formes dégradées de l'hémoglobine, qui peut rendre l'interprétation difficile délicate (109).

L'interprétation des résultats nécessite un certain nombre de renseignements complémentaires : données hématologiques (résultat de la numération de la formule sanguine NFS avec indices érythrocytaires voire analyse du frottis), bilan martial (au minimum la ferritine), notion éventuelle de transfusion.

Tandis que pour la recherche d'hémoglobines instables (hyper affines, hypo affines), le prélèvement doit être impérativement effectué sur du sang fraîchement prélevé.

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 (109).

Le matériel de base utilisé pour l'extraction d'ADN est le plus souvent du sang total prélevé sur tube EDTA. Le consentement écrit du patient (ou des parents pour un mineur) ou l'attestation de consultation de génétique rédigée par le médecin prescripteur (décret n° 2008-321 du 4 avril 2008) est indispensable pour la réalisation de ces analyses par les laboratoires de référence.(110)

Tableau 7: Exemple de lettre de consentement pour une exploration génotypique d'une hémoglobinopathie (110)

v.2 du 15/12/2019

HOSPICES CIVILS DE LYON FÉDÉRATION DE BIOCHIMIE ET DE BIOLOGIE SPÉCIALISÉE Unité Fonctionnelle de Pathologie Moléculaire (Bâtiment 5) Laboratoire agréé Arrêté Préfectoral n°03-478 du 01/12/2003 Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France (33) 04.72.11.06.28 Fax : (33) 04.72.11.05.98	HOPITAL EDOUARD HERRIOT
--	--------------------------------

EXAMEN DES CARACTÉRISTIQUES GÉNÉTIQUES
 Ce document doit accompagner la prescription pour les analyses demandées

SUR TUBE EDTA DE 5 mL
 Engagement du laboratoire : résultat (définitif ou partiel) en un mois maximum

Identification du patient NOM : Prénom : Date de naissance : Adresse :	Identification du titulaire de l'autorité parentale si mineur NOM : Prénom :
---	---

RENSEIGNEMENTS COMPLÉMENTAIRES :
 Hémogramme :
 Écrituraire ou fer sérique :
 Autres : Patient(e) transfusé(e) :

CONSENTEMENT DU PATIENT OU DE L'AUTORITÉ PARENTALE
 Je soussigné(e), sus nommé, reconnais avoir été informé par le Dr..... sur la nature des examens génétiques qui pourront le cas échéant être réalisés pour la prescription suivante :

Diagnostic génétique d'hémoglobinopathie

Je donne mon consentement pour ce prélèvement et je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations conformément aux articles R.162-16-7 du décret n°95-559 du 6 mai 1995 et R.145-15-4 du décret n°2000-570 du 23 juin 2000 du code de la santé publique, permettant la compréhension de cet acte biologique et sa finalité. J'accepte également que l'ADN utilisé pour ce diagnostic génétique soit conservé par le laboratoire réalisant l'analyse pour un usage interne (mixe ou point) exclusivement dans le cadre du diagnostic génétique des hémoglobinopathies.

Fait à le Signature :

ATTESTATION DU MÉDECIN PRESCRIPTEUR

Je certifie avoir informé le (ou la) patient(e) sus nommé(e) sur les caractéristiques de la maladie recherchée, les moyens de la détecter, les possibilités de prévention et de traitement, et avoir recueilli le consentement du (ou de la) patient(e) dans les conditions de l'article n°R.145-15-4.	Signature et cachet du Médecin prescripteur.
--	--

RAPPEL CONCERNANT LA LEGISLATION

(Décret n°2000-570 du 23 juin 2000 fixant les conditions de prescription et de réalisation des examens des caractéristiques génétiques d'une personne). Le médecin prescripteur doit conserver le consentement écrit, les doubles de la prescription et de l'attestation, et les comptes rendus d'analyses de biologie médicale commentés et signés (Art. R.145-15-15). Le laboratoire agréé réalisant les examens doit disposer de la prescription et de l'attestation du prescripteur (Art. R.145-15-15) et adresser le compte-rendu d'analyse de biologie médicale commenté et signé par un praticien responsable agréé (conformément à l'art. R.145-15-6) exclusivement au médecin prescripteur des examens génétiques (Art. R.14515-14).

Conformément aux dispositions de la loi du 5 janvier 1978, vous disposez d'un droit d'accès et de rectification aux données vous concernant.
 Le dossier a été adressé à M. le Directeur de l'Hôpital Edouard Herriot, 3, Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03.
 Document de la Fédération de Biochimie et de Biologie Spécialisée. Rédacteur : A. FRAMONDIA (septembre 2009) ; Approuvé par A. FRAMONDIA (mise en application : 1 décembre 2009). 16 rue d'Jaur (A. FRAMONDIA) (0900 2009) 1666/édition de la Fiche de consentement le 20 novembre 2007 (A. FRAMONDIA).

III. Exploration biologique et stratégie d'étude des anomalies de l'hémoglobine

A. Diagnostic phénotypique des anomalies de l'hémoglobine

Le diagnostic des principales hémoglobinopathies (HbS, HbC, HbE, bêta-thalassémie hétérozygote) est aisé pour les laboratoires de biologie clinique qui maîtrisent les techniques d'électrophorèse de l'Hb et ou de HPLC par échange de cations (30). En revanche, le diagnostic des α -thalassémies ou de certains variants rares de l'Hb est beaucoup plus complexe. Le retour à un laboratoire spécialisé dans les hémoglobinopathies est nécessaire pour leur diagnostic(111).

Selon la NABM (nomenclature des actes de biologie médicale), « un bilan standard pour la recherche d'une hémoglobine anormale » doit comporter une technique d'électrophorèse, et deux autres tests adaptés selon les besoins pour un résultat diagnostique d'orientation. Un commentaire et une conclusion accompagnent le compte rendu. (Code 1120).

Les techniques utilisées sont :

- soit séparatives permettant de différencier les hémoglobines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (électrophorèse et chromatographie),
- soit non séparatives, mettant en évidence des propriétés spécifiques à l'anomalie : test Itano (ou test de précipitation de l'HbS), recherche de corps de Heinz, test de précipitation à l'isopropanol, spectrophotométrie pour la méthémoglobine, courbe de dissociation de l'oxygène.

L'objectif principal de ces 3 techniques étant de mettre en évidence les hémoglobinopathies les plus fréquentes telles : les HbS, HbC et HbE et de permettre le screening d'un variant rare de l'Hb non détecté par le test de première intention.

En pratique quotidienne, le variant de l'Hb à caractériser avec certitude, voire en urgence, est l'HbS puisque c'est l'Hb anormale qui, à l'état homozygote ou en association avec une autre Hb anormale (HbE, HbC, HbD Punjab, HbO Arab) ou avec une β -thalassémie, est responsable d'un syndrome drépanocytaire majeur (SDM). Afin de répondre à cet

impératif, quand un laboratoire n'est pas en mesure d'effectuer un panel de techniques spécifiques comme décrit précédemment, il devrait idéalement envoyer le prélèvement, avec toutes les données cliniques et biologiques disponibles, à un laboratoire équipé et ne pas rendre de conclusion à partir d'un test unique.

Pour une suspicion d'un nouveau variant ou d'une thal, il est préférable d'envoyer le prélèvement ou adresser le patient à un laboratoire de référence pour une investigation plus poussée qui est le diagnostic du génotype de l'anomalie.

1. HPLC sur une colonne échangeuse de cations

1.1. Principe du HPLC

La chromatographie liquide haute performance(HPLC) sépare les différentes fractions d'hémoglobines en fonction de la force de leurs interactions ioniques sur une colonne échangeuse de cations. Les molécules d'Hb chargées positivement dans le tampon utilisé interagissent avec la colonne chargée négativement (résidu carboxyl greffé sur une résine). Suite à l'injection d'un gradient de tampon de haute force ionique, les différentes fractions d'Hb sont éluées au fur et à mesure que la force ionique du tampon devient supérieure à leur interaction avec la colonne. Les différentes fractions d'Hb sont éluées à un temps donné qui est caractéristique : c'est le temps de rétention ou « Tr ».

La détection est spectrophotométrique et s'effectue à 415 nm comme pour l'EC. Les différents pics obtenus sont donc reconnus en fonction du temps de rétention : les Hb normalement présentes (HbA, HbA₂, HbF), ainsi que les variants d'Hb les plus fréquents, sont reconnus de façon présomptive, avec séparation des HbS, HbC, HbE, HbO-Arab, HbD-Punjab et G-Philadelphia ; les variants dont le Tr n'est pas répertorié par le fournisseur sont dits « unknown »(112,113).

1.2. Avantage et inconvénients

Cette technique a l'avantage d'être automatisée, reproductible, et permet une quantification et précise de l'hbA₂ et de l'HbF qui sont le point de départ de la caractérisation des hémoglobinopathies.

À noter que dans la plupart des systèmes, l'HbE et l'Hb Lepore ne sont pas séparées de l'HbA₂.

Elle permet également l'identification présomptive de certains variants, comme l'hémoglobine S ou l'hémoglobine C.

Par contre la HPLC nécessite toujours des techniques complémentaires pour la caractérisation précise des variants suspectés.

2. L'électrophorèse capillaire(EC)

2.1. Principe d'EC

L'électrophorèse consiste en une séparation d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique, généralement sur base de leur rapport charge/masse. L'invention de l'électrophorèse capillaire remonte à la fin des années 1960, quand Hjertén puis Everaerts et Keulemans montrèrent que les problèmes de convection liés à l'effet Joule observés en électrophorèse sur le support solide pouvaient être contrôlés en réalisant l'électrophorèse dans des tubes en Téflon (114).

Classiquement, l'électrophorèse capillaire est pratiquée dans un tube de silice fondue recouvert d'une couche de polyimide de 20 à 200 cm de longueur pour un diamètre interne de 20 à 200µm.

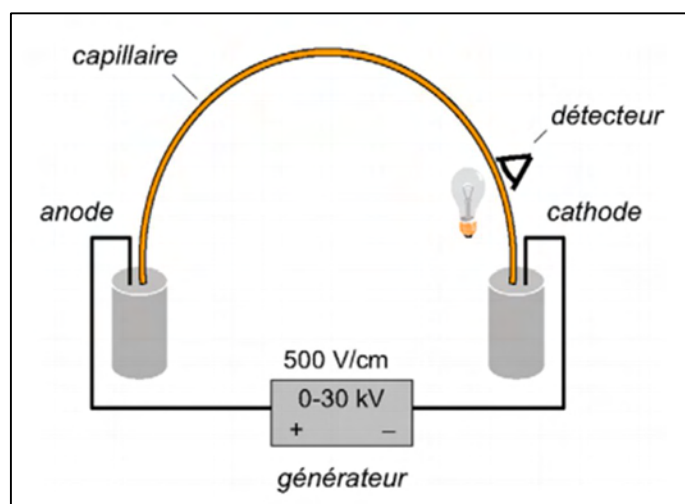


Figure 17: Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse (115)

Le capillaire, enfermé dans un système de thermostatisation, est rempli de tampon et plonge dans deux réservoirs contenant cette même solution. Chaque réservoir est connecté à une électrode reliée à un générateur de courant.

La caractéristique essentielle de l'EC vient de l'interface solide-liquide entre la paroi du capillaire en silice et le tampon qui le remplit. En fonction du pH, les groupements silanols de la silice s'ionisent, conférant à la paroi des charges négatives à l'origine du flux électro-osmotique (EOF) orienté vers la cathode. L'EOF prend naissance au niveau des parois du capillaire et génère un profil de migration élution plat (plug flow), contrairement à l'écoulement laminaire observé en HPLC. D'où un pouvoir de séparation supérieur à celui de l'HPLC.

C'est une technique d'électrophorèse liquide plus récemment développée pour l'étude de l'hémoglobine(116). La migration se fait dans un capillaire de silice avec un tampon alcalin soumis à un haut voltage. Suite à l'injection de l'hémolysat dans le système et à l'application du courant électrique, les différentes fractions d'hémoglobines se séparent en fonction de leur mobilité électrophorétique (donc de leur charge) mais aussi en fonction du courant d'électro-endosmose (donc de leur rapport charge/masse). Les hauts voltages

appliqués permettent une séparation rapide et sensible des différentes fractions. L'ordre de séparation est équivalent à celui observé pour l'électrophorèse sur gel à pH alcalin.

La détection par spectrophotométrie UV-visible se fait à 415 nm (maximum d'absorption de l'oxyhémoglobine). Un électrophorégramme est alors généré avec les différentes fractions d'hémoglobines « normales » (HbA, HbF, HbA₂) et les fractions « anormales » de mutants caractérisés de façon présomptive en fonction de leur position relative dans des zones spécifiques : HbS, HbC, HbE, HbO-Arab, HbD-Punjab... (117,118). Une quantification relative des différentes fractions est réalisée.

2.2. Avantage et inconvénients

Cette technique présente l'avantage d'être automatisée, rapide, reproductible et quantitative, avec des tracés simples à interpréter.

Cette technique permet de confirmer l'identification des variants de l'hémoglobine (notamment ceux suspectés en HPLC), elle permet entre autres de différencier l'hémoglobine S de l'hémoglobine D, et l'hémoglobine E de l'hémoglobine C.

3. L'isoélectrofocalisation (IEF)

3.1. Principe d'IEF

La migration est effectuée dans un gradient de pH ; chaque molécule migre jusqu'à l'endroit où le pH est égal à son pHi. Un gel de forte porosité est utilisé (polyacrylamide ou agarose), pour que la taille n'influence pas la migration. Le gradient de pH est généré par des ampholines, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication : un mélange de telles molécules, possédant des pHi dans une certaine gamme (gamme large, ex. 3-9, ou ± étroite, ex. 4-5 ou 5-6,5) est utilisée. Ces molécules migrent rapidement dans le gel jusqu'à atteindre une zone où leur charge devient nulle. Elles ont alors une distribution statistique telle qu'elles génèrent un gradient de pH sensiblement linéaire le long du gel. Il existe de telles molécules de petit poids moléculaire et solubles (**ampholines**) et il existe également des gels à base d'acrylamide modifiée contenant des groupements acides et basiques fixés (gels d'**immobilines**).

Les différentes fractions d'hémoglobines soumises à un champ électrique migrent jusqu'au niveau du pH correspondant à leur point isoélectrique (pHI), où elles s'arrêteront car leur charge nette sera égale à 0.

Cette technique sensible et hautement résolutive permet de séparer un grand nombre de fractions d'hémoglobines différentes en fonction de leur pHI dans un gradient de pH (119).

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 ne requiert, de plus, qu'une faible quantité de prélèvement, méthode de choix dans le dépistage des hémoglobinopathies chez le nouveau-né. Si bien qu'elle est très utilisée pour le dépistage néonatal de la drépanocytose.

Cependant, cette technique coûte relativement chère, n'est pas quantitative, et nécessite une certaine expertise.

3.2. Avantage et inconvénients

Cette technique bénéficie d'un pouvoir de résolution exceptionnel.

La qualité de l'interprétation nécessite une certaine maîtrise, ainsi que le fait que cette méthode n'est pas adaptée à la quantification des variants mais seulement une méthode qualitative.

4. Autres types d'électrophorèse

4.1. L'électrophorèse à pH alcalin

a. Principe de l'électrophorèse à pH alcalin

L'électrophorèse de zone à pH alcalin (pH = 8,6) sur support solide (acétate de cellulose ou agarose) est encore une technique largement utilisée. À pH alcalin, les hémoglobines sont chargées négativement et migrent vers l'anode (+). Si le variant de l'hémoglobine présente un

acide aminé de surface ayant un résidu qui modifie sa charge, sous le champ électrique, il va avoir un déplacement différent de celui de l'HbA.

On parle de mutant « rapide » s'il est plus chargé négativement que l'HbA et donc migre plus près de l'anode que l'HbA, ou de mutant « lent » s'il est moins chargé négativement et donc migre moins près de l'anode que l'HbA.

Cette technique permet donc la séparation des principales hémoglobines : HbA, HbF, HbS/D/G et HbC/E/O-Arab.

Elle est alors une méthode de choix pour le dépistage de ces Hb anormales.

b. Avantage et inconvénients

Des variants ayant la même différence de charge migrent ensemble, comme :

- la position C est compatible avec HbC, HbE et HbO-Arab
- la position S est compatible avec HbD, HbG, Hb Lepore.

Chez le nouveau-né elle sépare mal le HbA des HbS.

Elle est facile à mettre en œuvre, mais présente l'inconvénient d'être peu résolutive et de ne pas permettre une quantification fiable des fractions mineures Hb A₂ et HbF.

Qui constitue une quantification primordiale pour le diagnostic des formes mineures de thalassémie.

4.2. L'électrophorèse à pH acide

a. Principe

L'électrophorèse à pH acide (pH = 6) sur support solide (citrate agar ou agarose) est une technique de seconde intention. Son principal avantage est qu'en complément de l'électrophorèse à pH alcalin, elle peut séparer l'HbS des mutants « S-like », et HbC de l'HbE.(120).

N.B : l'électrophorèse capillaire et la HPLC ont remplacé ces deux techniques, qui ne sont plus utilisées qu'occasionnellement.

5. Les techniques biochimiques et hématologiques complémentaires.

5.1. Chromatographie

a. Chromatographie liquide en phase inverse

Elle sépare les différentes chaînes de globine en fonction de leur hydrophobicité, permettant la séparation de variant ayant la même charge (121). Elle indique aussi la chaîne de globine qui est anormale. Cette technique est réservée à des laboratoires spécialisés.

Ainsi, elle contribue à la séparation et l'identification des variants rares comme HbS Antilles, la caractérisation des HbF comme le PHHF.

b. Chromatographies des chaînes de globines

Cette électrophorèse est réalisée en gel de polyacrylamide en milieu acide dissociant. Cette méthode met en évidence toute substitution d'acide aminé impliquant une différence d'hydrophobicité de la chaîne latérale de l'acide aminé concerné.

5.2. Test de solubilité de l'HbS ou test d'Itano

Le test Itano est essentiel pour confirmer la présence d'HbS et repose sur le principe que seule l'HbS désoxygénée précipite en milieu réduit (122). L'utilisation de l'hydrosulfite de sodium en milieu salin concentré est courante pour ce test. C'est une technique manuelle facile à mettre en œuvre et rapide (< 10 minutes) mais qui utilise des réactifs « maisons ». Son interprétation est facile à condition de prendre les précautions suivantes :

De travailler toujours par comparaison avec un échantillon témoin négatif (AA) et un échantillon témoin positif (AS) dans chaque série ; laver soigneusement le culot globulaire en sérum physiologique, afin d'éliminer tous les stromas cellulaires (risque de faux positifs) ; savoir qu'un taux d'HbS trop faible (< 20 %) peut donner un résultat faussement négatif (24). Sans oublier que la qualité du test dépend des réactifs utilisés.

5.3. Test de falciformation d' Emmel (108)

Ce test est une alternative au test Itano, en ajoutant le métabisulfite de sodium, le processus de falciformation est accéléré. C'est également une technique manuelle qui met en évidence les drépanocytes sur lame lorsque le frottis est mis en condition hypoxique. Elle nécessite plus de temps (45 minutes) et présente les mêmes risques de faux négatifs que le test Itano quand le taux d'HbS est trop faible. Il n'est pas spécifique pour la drépanocytose et peu sensible.

5.4. Recherche d'inclusions d'HbH et recherche de corps de Heinz

L'hémoglobine H (HbH) (association de 4 chaînes β), retrouvée chez les patients atteints d' α -thalassémie avec plusieurs gènes non fonctionnels (2 et surtout 3), peut être mise en évidence après coloration supra-vitale par des colorants basophiles (bleu de crésyl brillant). De multiples granules ronds apparaissent colorés en gris-bleu et correspondent à la précipitation d'HbH, donnant un aspect de « balle de golf ». Les corps de Heinz (précipités d'hémoglobine dénaturée), qui apparaissent souvent « accrochés » au niveau de la membrane du globule rouge, sont mis en évidence avec cette même coloration et sont notamment présents en cas d'hémoglobine instable et dans les déficits en G6PD.

5.5. Tests de stabilité de l'Hb : Le test à l'isopropanol

Le test à l'isopropanol est le test de référence (123). Il doit être pratiqué sur un prélèvement frais (<6 heures) et toujours en présence d'un témoin prélevé dans les mêmes conditions. Ce test peut s'avérer faussement négatif dans le cas d'hémoglobine hyper-instable.

Il mesure l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène : étude fonctionnelle réservée à des laboratoires spécialisés dans un contexte d'hémoglobine ayant une affinité modifiée pour l'oxygène.

Analyse spectrophotométrique : mise en évidence des méthémoglobines et des HbM.

5.6. La spectrophotométrie de masse

L'application de la spectrométrie de masse ou MS pour l'analyse de l'hémoglobine a été rapporté pour la première fois en 1981(124).

Cette technique permet la séparation de différents fragments protéiques de masses différentes. La révélation d'une chaîne de globine avec une masse « anormale » et le calcul de la différence de masse permet d'en déduire l'acide aminé impliqué. Depuis la masse spectrométrie techniques d'instrumentation et d'ionisation ont créé une occasion pour les applications cliniques dans la détection des hémoglobinopathies et des thalassémies (125). Cependant, étant donné que beaucoup variantes de la chaîne de globine β commune diffèrent de type sauvage bêta-globine que de 1 Da. Les MS, même en haute définition ne peuvent pas différencier ces variants du type sauvage intacte de Hb C, D ou E. La MS qui détecte les chaînes de globines intactes aura du mal à différencier les chaînes de globine dans le même échantillon qui diffèrent de la masse de moins de 6 Da, et ne peut pas conférer emplacement d'une mutation d'acide aminé donné(126).

Par exemple, le remplacement de 6 valine pour 6 l'acide glutamique (Hb S) se traduira par une différence de masse de 30 Da. Mais la même différence de masse peut se produire pour une substitution de l'arginine en tryptophane, thréonine à la méthionine, la sérine à la glycine, l'alanine ou de la thréonine, en ne importe quelle position de la chaîne de globine(127).

En outre, une élucidation de la structure est possible en fragmentant la chaîne de globine intact par spectrométrie de masse tandem, ou par clivage de la chaîne de globine avec une enzyme protéolytique telle que la trypsine(128,129). Cette technique peut être couplée à des digestions enzymatiques préalables, qui permettent une précision plus importante (130).

La MS peut avoir le potentiel d'améliorer la sensibilité de l'analyse Hb comme une méthode complémentaire de HPLC et IEF. Il est également possible que les méthodes de MS en tandem pour le dépistage néonatal offriront plusieurs avantages par rapport aux méthodes actuellement utilisées, y compris l'utilisation rentable de l'expertise et de l'instrumentation déjà utilisé dans les laboratoires de dépistage néonatal et l'analyse plus automatisé. Un échantillon de sang qui n'est pas frais peut être également analysé par MS, qui peut offrir des avantages logistiques pour les tests.

Toutefois, ces applications sont relativement nouvelles, l'augmentation des comparaisons inter-laboratoires doit être effectuée et des améliorations à l'imprécision dosage devraient être étudiées.

B. Diagnostic génotypique des anomalies de l'hémoglobine

La transmission des hémoglobinopathies se fait principalement selon un mode autosomique récessif. La caractérisation moléculaire est utile voire nécessaire pour :

- Le conseil génétique de couples à risque
- Pour affirmer ou simplement préciser le phénotype des cas index, de façon sporadique, pour caractériser des mutants (131).

Les techniques utilisées pour la caractérisation moléculaire des anomalies de l'Hb sont les mêmes que pour l'étude d'un gène à faire (132). Les mutations ponctuelles (les insertions et les délétions courtes) sont responsables de la majorité des variants de l'Hb et des β -thalassémies. Les β -thalassémies ayant un pourcentage de 90 % de mutations ponctuelles. Tandis que 90% des α -thal sont constituées par des délétions.

En premier, il est indispensable de distinguer sur quel cluster on va travailler : cluster α ou le cluster β . Ces mutations sont classiquement mises en évidence par séquençage des gènes α ou β -globine.

• Pour les gènes α , qui sont dupliqués et donc très homologues, le séquençage différentiel des gènes $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou d'un gène α -hybride ($\alpha 2/\alpha 1$) est délicat et nécessite l'utilisation d'amorces très spécifiques (133). La recherche d'une mutation connue peut être réalisée, en alternative au séquençage, par une PCR-RFLP, par PCR en temps réel avec révélation par sondes fluorescentes spécifiques (134,135) ou encore par la technique de reverse dot-blot (136). L'étude du profil de dénaturation d'un amplicon par HRM (high resolution melting) permet aussi le génotypage de mutations ponctuelles (137).

- Les délétions larges représentent la majorité des α -thalassémies (138) et quelques cas de β -thalassémies (139).

- Les délétions α -thalassémiques les plus fréquentes (-3,7kb ; -4,2kb ; – SEA ; – Med ; – FIL) ont des points de cassure bien caractérisés et peuvent donc être facilement identifiées par gap-PCR (140,141) ou reverse dot-blot au moyen de kits commerciaux.
- D'autres techniques comme la QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fragments) (142,143), la PCR semi-quantitative (144,145) et la MLPA (multiplex ligation probe amplification) sont actuellement de plus en plus utilisées pour le criblage des délétions rares ou non encore décrites. Des kits commerciaux de MLPA (comme ceux de MRC Holland), ciblant sélectivement les familles de gènes α et β -globine, sont ainsi disponibles sur le marché (146).

1. Le PCR (polymerase chain reaction)

Presque toutes les méthodes d'analyse de l'ADN des hémoglobinopathies utilisés aujourd'hui sont basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR)(147). Par conséquent, pour détecter une mutation et ou une délétion, un réarrangement ou une mutation ponctuelle. Les tests effectués sont similaires en utilisant des amorces de variabilité et la spécificité différentes.

Les techniques basées sur la PCR utilisées dans le diagnostic d'Hb comprennent :

- l'ASO (Allele specific Oligonucléotide) hybridation ou par dot-blot,
- le dot-blot reverse,
- l'ARMS ou allele-specific priming or amplification refractory mutation system, l'amorçage ou l'amplification de mutation réfractaire système spécifique à un allèle.
- l'analyse par enzyme de restriction,
- l'amplification créée par analyse de restriction
- le PCR et de le gap-PCR.

1.1. Principe de la PCR

Est basé sur une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN.

Chaque réaction met en œuvre deux amorces sous forme d'oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre, une ADN polymérase et des désoxyribonucléotides.

Les amorces ou «primers» en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Les amorces sont orientées dans le sens 5' vers 3' à l'aide des désoxynucléotides, qui constitue l'étape de l'élongation.

Chaque produit de chaque étape de synthèse sert de matrices pour les étapes suivantes. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Le PCR permet alors de faire apparaître sur l'électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide, des produits d'amplification de tailles différentes selon la présence ou l'absence d'une mutation ou d'une délétion.

Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel de Chimie dès 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation vers 1988, d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet une automatisation de la technique en supportant les sauts de température.

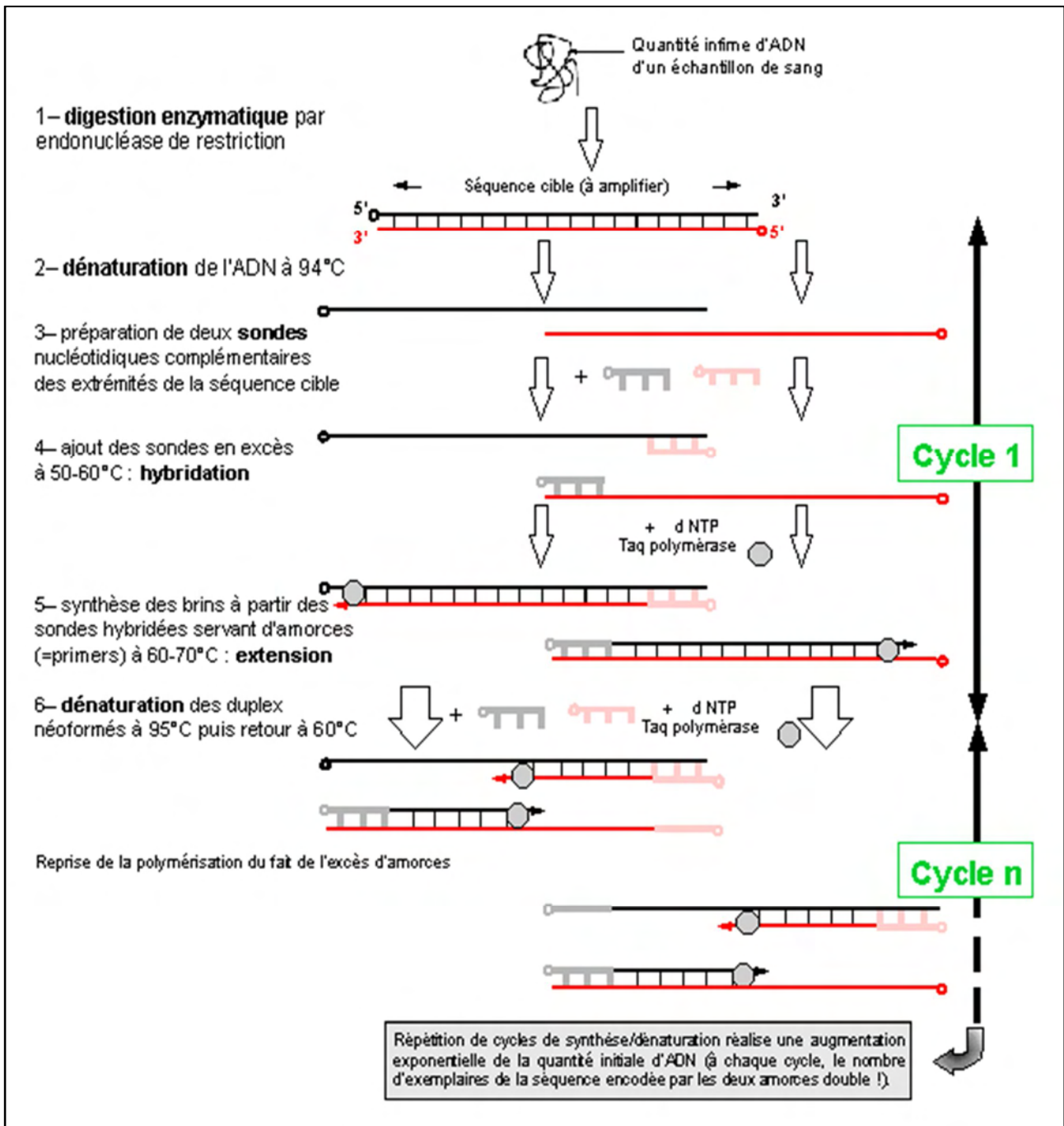


Figure 18: Les étapes d'une PCR Polymerase chain reaction (148)

1.2. Allele-specific priming – ARMS-PCR ou amorce d'amplification spécifique

a. Principe de l'ARMS

L'ARMS est basée sur le principe selon lequel une amorce parfaitement adaptée est beaucoup plus efficace à l'hybridation et de diriger l'élongation de l'amorce à une autre amorce de mésappariement. La méthode la plus largement utilisée est les bras dans lequel l'amplification spécifique d'allèle s'appuie sur la spécificité de la 3' terminal des nucléotides(149). Pour améliorer la spécificité de l'allèle, il est de pratique courante d'incorporer délibérément une seconde mésappariement à la position 2 ou 3 à partir de la fin de 3'. L'ADN cible est amplifié dans deux réactions séparées en utilisant une amorce de sens commun et l'une des deux amorces spécifiques d'allèles inverse, une complémentaire de la séquence mutante, l'autre à la séquence d'ADN normal. La présence de l'allèle mutant va générer un produit de PCR dans le tube contenant l'amorce spécifique de la mutation, et vice versa. Pour surveiller les résultats faussement négatifs en raison de l'échec de la réaction d'amplification lui-même, un contrôle interne PCR qui amplifie une autre région du génome doit être inclus dans la réaction

b. Avantage et inconvénients

il est théoriquement possible de détecter une mutation connue (149). Récemment, la méthodologie a été améliorée par le développement d'un tube à essai unique (150), où les deux : le mutant et les allèles de type sauvage sont détectés simultanément dans la même réaction avec un contrôle positif interne, dénommé tétra ARMS amorces -PCR.

Plus d'une mutation peut également être détectée pour en même temps dans une seule réaction en utilisant des amorces ARMS couplés avec une amorce commune (151). ARMS Multiplex nécessite une optimisation rigoureuse des conditions amorce de recuit et les concentrations d'amorces.

1.3. Allele-specific oligonucleotide (ASO) et la dot-blot inverse

La méthode est basée sur le principe de l'hybridation spécifique de deux sondes oligonucléotidiques, une complémentaire de la séquence mutante et l'autre à la séquence normale(152,153).

Dans cette méthode, l'ADN amplifié du patient qui comprend la région d'intérêt est placé sur des membranes de nylon. Chaque échantillon de patient est repéré comme un point séparé sur deux membranes, une membrane pour chaque ultérieure sonde. Deux sondes ASO sont utilisées pour chaque mutation, une complémentaire à la séquence d'ADN mutant et l'autre à la séquence de type sauvage. Ces ASO marquées sont hybridées à l'ADN lié et amplifié. Un signal détecté pour un point spécifique sur la membrane indique l'hybridation de la sonde et l'amplicon, signalant que l'allèle spécifié (de type sauvage ou mutant) est présent ; les patients hétérozygotes présenteraient un signal pour des points correspondant à la fois le type sauvage et le mutant sondes.

Dans le dot-blot inverse, ce sont les sondes spécifiques d'allèles (non marquées dans ce cas) qui sont fixées sur une bande de membrane de nylon sous la forme de points. L'ADN génomique du patient est amplifié, marqué et hybride au filtre. Ces techniques sont peu coûteuses et utiles pour un nombre limité de mutations connues ; par conséquent, elles ont été utilisées dans de nombreux laboratoires dans le monde pour le diagnostic ainsi que prénatale dépistage(154,155).

Les techniques sont fiables et ont été utilisées avec grand succès en particulier dans les populations où il y a une ou deux mutations prédominants(156). Cependant, le procédé est limité lorsque le dépistage des mutations multiples du fait des étapes d'hybridation et de lavage répétés. Pour surmonter ce problème, un procédé de dot-blot inverse a été développée dans laquelle des paires de sondes mutant et de type sauvage ASO sont fixés sous forme de points ou de fentes aux bandelettes de membrane de nylon (157).

Des kits commerciaux basés sur le dot-blot inverse pour certains des mutations courantes sont disponibles. Ces kits utilisent une bande de nylon avec des ASO pour les mutations β -thalassémie méditerranéens communs (Vienne Lab, Vienne, Autriche), tandis que d'autre utilise ASO immobilisé sur les murs d'une microplaque développé par BioRad (Hercules, CA, USA). Les deux ont des applications limitées que le panneau détecte un nombre limité de mutations, les kits sont chers et démontrent une variation d'un lot à un autre. Ainsi, l'ASO et dot-blot inverse ont été largement remplacée par d'autres techniques basées sur la PCR tels que l'ARMS, PCR et séquençage direct.

1.4. Denaturing gradient gel electrophoresis and single-stranded conformation polymorphism (DGGE et SSCP)

L'Électrophorèse dénaturante sur gel en gradient et la conformation simple brin polymorphisme (SSCP) (158) sont deux techniques qui ont été utilisées pour explorer les mutations inconnues issues d'une PCR. Ces deux techniques reposent sur la séquence mutante, modifiant la mobilité du produit issu du PCR sur un gel par rapport au type sauvage, et nécessitent une analyse plus approfondie pour résoudre la mutation causale, habituellement séquencée. Des substitutions de bases individuelles peuvent être détectées par les deux méthodes, mais l'efficacité de détection est comprise entre 70 et 90%, avec le SSCP qui exige des différentes conditions de gel pour atteindre cette gamme plus élevée. Ces approches de détection de mutation ont une application pour les gènes ayant de nombreux exons répartis sur de grandes régions génomiques avec une répartition uniforme des mutations parce que la méthode permet l'amplification et de 3 à 5 du PCR peut être exécuté en une seule fois.

DGGE est utile dans certains laboratoires pour le dépistage à grande échelle des mutations β -thalassémie (159). La technique se base sur l'électrophorèse de fragments d'ADN double brin par un gradient de dénaturant augmentation linéaire jusqu'à ce que le meilleur domaine de température de fusion du fragment dénature la formation d'un heteroduplex qui s'immobilise dans la matrice de gel. Le gène de la β -globine est amplifié en utilisant des segments de cinq à sept paires d'amorces, une séquence riche en GC est ajoutée à une de chaque paire afin de créer un domaine de fusion élevé ce qui augmente la mobilité

différentielle du fragment. Des indices sur la nature et la localisation des mutations sont fournis par des motifs caractéristiques des hétéroduplexes. Ces techniques de dépistage sont tout simplement une mise en évidence de la présence d'une mutation qui doit être définitivement identifiée par une autre technique basée sur la PCR, ou l'analyse de séquence directe.

La réalisation de ces techniques nécessite une optimisation, et l'interprétation des modèles hétéroduplex peut être difficile sans expérience.

2. Séquençage direct des clusters β et α

2.1. Principe du séquençage direct

Il s'agit de copier le brin à séquencer de telle sorte que les copies soient radioactives (ou repérables par un autre marquage : fluorescence).

Il faut choisir une amorce complémentaire d'un bout de séquence connue. La DNA polymérase réplique 5' \rightarrow 3' à partir 3'OH libre de l'amorce en présence d'un 2, 3 didéoxynucléotide. La réplication est stoppée. Statistiquement on observera des fragments d'ADN de tailles différentes en fonction de l'incorporation du 2, 3 didéoxynucléotide pendant la réplication du brin à séquencer.

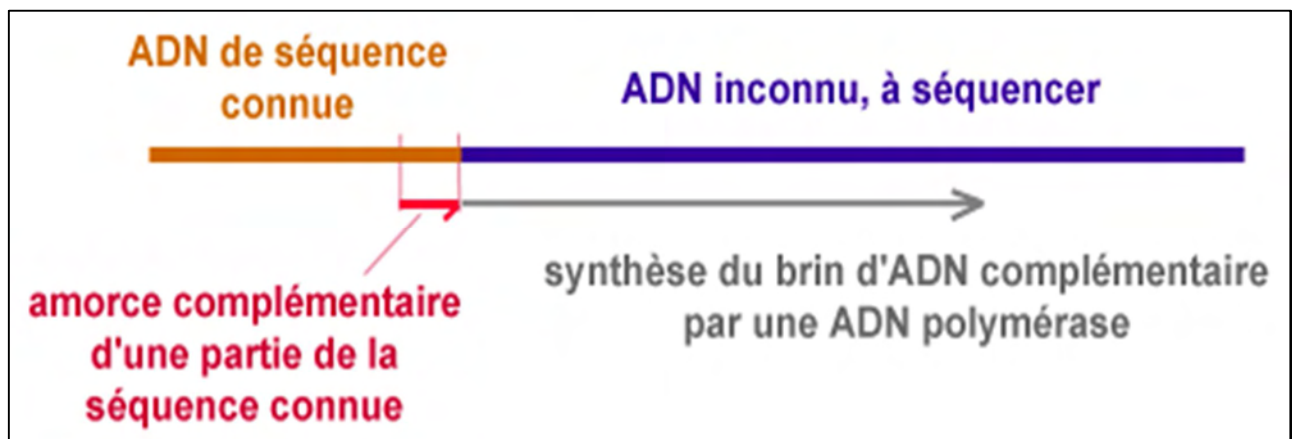


Figure 19: Principe du séquençage (134)

Le séquençage est un procédé à plusieurs étapes nécessitant une amplification par PCR, séquençage en cycle et la précipitation avant que la séquence peut être déterminée. Après cela, la séquence doit être analysé et vérifié et tout changement noté. Bien que le logiciel d'analyse de séquence est disponible, il n'est pas efficace à 100% pour détecter les hétérozygotes. Ceci a une conséquence importante pour les hémoglobinopathies : la plupart des cas nécessite le séquençage d'un porteur, donc un séquençage nécessite souvent la vérification à l'œil nu. Il existe deux méthodes de séquençage différentes disponibles basés sur méthode de Sanger (160,161), « dye primer and dye terminator » ou coloration des amorces et coloration des terminateurs, elles diffèrent l'une de l'autre dans la manière dont le marqueur fluorescent est incorporé pendant les cycles.

Pour le gène β -globine, qui est relativement faible (couvrant 1,6 kb d'ADN génomique, y compris 5' et 3' région non traduite), la majorité des mutations peut être détecté dans deux séquences.

Pour le cluster α , chaque gène (α_1 ou α_2) peut être séquencé après une amplification spécifique en une seule lecture.

2.2. Avantages et inconvénients

Le séquençage de Sanger peut être utilisé pour détecter des mutations ponctuelles pour la caractérisation des hémoglobinopathies et des β -thalassémies(160,162). Les gènes de globine β et α sont relativement petits, 1,2 kb et 1,8 kb, respectivement, et facilement prête à un séquençage. L'amplification par PCR suivie d'un séquençage bidirectionnel est effectuée. Le séquençage peut être avantageux car il ne nécessite pas de ciblage séparé de chaque mutation (à la différence des méthodes ciblées) et il identifie également la mutation exacte (à la différence des méthodes de balayage. Le séquençage direct est alors une technique utilisée pour détecter les points de mutations, les petites délétions et les insertions qui causent les thal, aussi bien pour confirmer que pour caractériser un variant rare ou un nouveau variant.

En tout, le processus d'acquisition d'une séquence de sang total et de l'analyse peut prendre 4-5 jours, avec confirmation en utilisant un autre test basé sur le PCR.). Le séquençage n'est pas bien adapté à la détection de grandes délétions / duplications.

3. Le Gap-PCR

Les délétions plus courantes peuvent être détectées par gap-PCR. Une fois que les points de rupture de délétion ont été définis et des amorces spécifiques des délétions sont conçues. Les délétions mises en évidence par cette méthode de PCR nécessitent des amorces choisies pour être très éloignées l'une de l'autre. Lorsqu'il n'existe pas de délétion, ces amorces ne permettront pas une amplification. En cas de délétion, les amorces sont rapprochées et l'ADN amplifié signe alors une délétion. (163)

Cette méthode est très utilisée et plusieurs laboratoires en sont déjà équipés. Comme elle est rapide et à moindre coût. La recherche des 7 délétions les plus courantes de l' α -thal est de routine. Contrairement aux β -thalassémies, les délétions sont une cause fréquente d'une α -thalassémie. Les délétions et les réarrangements des thalassémies courantes peuvent être détectés en utilisant régulièrement gap-PCR(140,164,165).

Ce principe a été utilisé dans la technique de le gap-PCR pour la HPFF commun et $\delta\beta$ -thalassémies (166). Le Gap-PCR est également couramment utilisé pour détecter l'Hb Lepore, un variant créé par délétion de 7 kb et donne un produit fonctionnel delta/bêta globine hybride (26).

4. La MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification = amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation)

C'est une variante de la PCR multiplexe qui utilise une sonde séparée en deux, nécessitant la ligation des deux parties pour que l'amplification ait lieu. Deux oligonucléotides sont utilisés :

- Le premier contient à la suite une région correspondant à une première amorce de PCR et la première moitié de la sonde complémentaire de la région à détecter,
- Le second contient la deuxième moitié de la sonde suivie d'une région correspondant à la deuxième amorce de PCR.

Le résultat d'une analyse par MLPA donne des carrées. Chaque carré correspond à une sonde. Les carrés se trouvent entre les deux lignes horizontales correspondent à une région présente en un nombre normal d'exemplaire.

Au cours de l'analyse, ces deux oligonucléotides se fixent sur l'ADN à analyser, au niveau de la région correspondant à la sonde. Comme les deux moitiés de la sonde se trouvent l'une à côté de l'autre, il est possible de les assembler par ligation. Il est alors obtenu une sonde complète liée à l'ADN étudié, avec de chaque côté une région non-liée sur laquelle il est possible de fixer une amorce. Cette sonde est détachée de l'ADN et l'on procède à une amplification par PCR avec les amorces choisies au début. Seuls les oligonucléotides ayant subi une ligation, c'est-à-dire ceux qui se sont liés au brin d'ADN, sont susceptibles d'être amplifiés. Ainsi, il est à éviter d'amplifier les oligonucléotides qui ne se sont pas liés à l'ADN cible. L'amplicon est détecté grâce à un marqueur fluorescent attaché aux amorces avant amplification.

Le principe de la sonde de ligation dépendant multiplex amplification est basé sur la détection des délétions ou duplications par amplification quantitative de la sonde multiple des paires hybridées dans le gène de l' α et β -globine clusters et régions voisines. La diminution ou augmenter dans le signal par rapport à la normale est un contrôle indicatif, respectivement, les délétions ou les duplications à travers le locus sont analysés

Cette méthode est une alternative intéressante ou une méthode complémentaire à Gap-PCR. Lors de l'étude des réarrangements connus et inconnus.

Tableau 8 Les techniques de biologie moléculaire pour l'identification des hémoglobinopathies (32)

Type d'anomalies	Type de Mutation	Techniques disponibles
β-thalassémie	Mutation ponctuelle	ARMS-PCR ASO Séquençage direct
	Délétion	Gap-PCR
α- thalassémie	Délétion	Gap-PCR Southern blot
	Non-délétionelle	Amplification α1 ou α2 ARMS-PCR ASO Séquençage direct
variant Hb S	Mutation ponctuelle	ARMS-PCR Séquençage direct
variant Hb C	Mutation ponctuelle	ARMS-PCR Séquençage direct
variant Hb E	Mutation ponctuelle	ARMS-PCR Séquençage direct
variant Hb D ^{Punjab}	Mutation ponctuelle	ARMS-PCR Séquençage direct
variant Hb Lepore	Délétion	Gap-PCR
PHHF et δβ-thalassémie	Délétion	Gap-PCR
δβ-thalassémie	Délétion	Southern blot
εγδβ-thalassémie	Délétion	Southern blot

IV. Phase post-analytique : Interprétation des résultats

Un bilan standard pour la recherche d'une hémoglobine anormale » doit comporter 3 tests phénotypiques différents, dont au moins une technique électrophorétique avec interprétation.

Pour un diagnostic phénotypique précis, il est indispensable d'avoir en main :

- Les données épidémiologiques
- Les renseignements cliniques
- Les données hématologiques
- Les données biochimiques.

Tout ceci est regroupé sur la fiche de suivi pour les hémoglobinopathies. Si des données manquent, le résultat sera rendu sous réserve de la fiche de suivi.

Pour l'interprétation, il faut se référer aux valeurs de référence établies par le laboratoire. À titre indicatif, quelques valeurs de référence sont les suivantes :

➤ **Le profil d'étude de l'hémoglobine d'un nouveau-né à terme contient:**

- HbF = 70 à 85%
- HbA= 15 à 30%
- HbA2 non quantifiable.

➤ **Le profil d'étude de l'hémoglobine d'un adulte contient :**

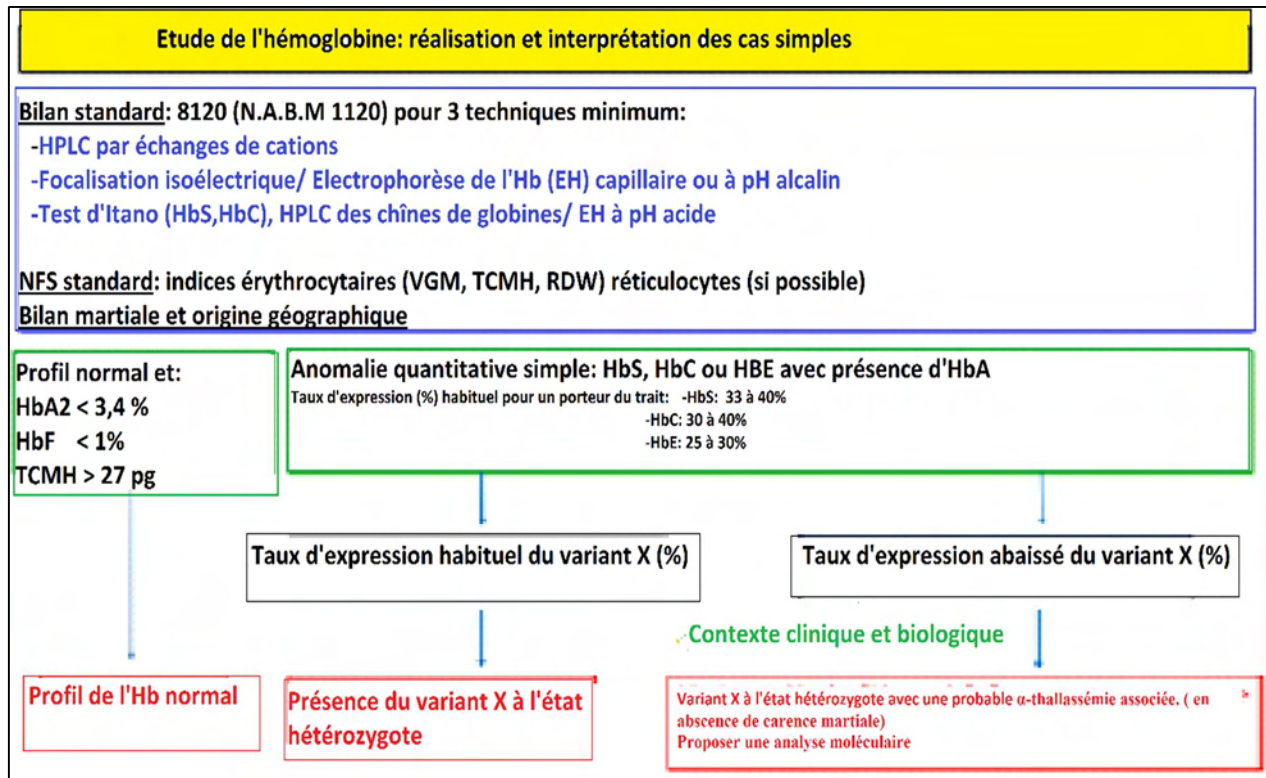
- HbA majoritaire (80 à 97%)
- HbA2 = 2,0 à 3,4% (valeur indicative, à déterminer en fonction de chaque technique)
- HbF < 1 %.

NB : Il est à noter que l'on considère qu'à l'âge de 1 an, le profil d'étude de l'hémoglobine de l'enfant est équivalent à celui de l'adulte (en dehors de l'HbF, qui peut persister à des taux < 5 % jusqu'à 2-3 ans).

A. Arbres décisionnels pour l'interprétation des cas simples des anomalies de l'Hb

Le biologiste peut donc se référer aux tableaux suivants pour ses démarches.

Tableau 9: Etude de l'hémoglobine: réalisation et interprétation des cas simples(167)



B. Diagnostic biologique des bêta-thalassémies

1. Les formes classiques de bêta-thalassémie

Comme nous l'avons vu plus haut, chacune des trois grandes entités cliniques de β -thalassémie est associée à un tableau hématologique et hémoglobinique assez caractéristique qui rend le diagnostic clinique facile à poser (ou tout du moins à suspecter) phénotypiquement. Une β -thalassémie majeure se caractérise par une anémie très profonde avec absence d'HbA et des HbA2 et F élevées (>80 % pour l'HbF) ; une β -thalassémie intermédiaire se caractérise par une anémie modérée avec HbA diminuée ou absente et des HbA2 et HbF élevées ; enfin, un trait bêta thalassémique se caractérise par un taux d'HbA2

>4,5–5% avec des indices érythrocytaires (VGM, TCMH) diminués. La condition sine qua none est cependant de disposer d'une technique de quantification fiable de l'HbA₂ et de l'HbF. De nombreuses enquêtes de contrôle de qualité externes ont clairement démontré à cet égard la supériorité des techniques de HPLC et de l'EC sur les techniques d'électrophorèse sur gel avec intégration des différentes fractions qui ne donnent des résultats fiables que pour des fractions supérieures à 15-20 % de l'hémoglobine totale (111).

L'interprétation d'un taux élevé d'HbA₂ comporte quelques pièges qu'il est capital de garder à l'esprit pour éviter de poser un diagnostic erroné (168)

Les exemples les plus courants sont l'HbE et les différentes Hb Lepore qui ont un temps de rétention similaire à l'HbA₂ en HPLC (sur résine échangeuse de cations) ;

En électrophorèse capillaire (EC), c'est l'HbC qui pourrait éventuellement prêter à confusion car les pics d'HbC et d'HbA₂ sont très proches ce qui conduit à une surestimation de la quantification de la fraction A₂. Si une bêta-thalassémie est réellement associée à un variant de la chaîne bêta-globine, c'est un taux inhabituellement élevé (si la mutation bêta thal. est en trans) ou inhabituellement bas (si la mutation bêta-thal. est en cis) de ce variant qui indiquera la présence d'une bêta-thalassémie et non le taux d'HbA₂.

2. Les bêta-thalassémies sans augmentation d'HbA₂

Certaines β -thalassémies hétérozygotes peuvent être très difficiles à diagnostiquer car elles ne s'accompagnent pas d'une augmentation du taux d'HbA₂. Le seul moyen de les suspecter est donc de constater une microcytose et une hypochromie chronique plus ou moins marquées, sans étiologie apparente, et de caractère héréditaire dans certains cas. On distingue trois mécanismes moléculaires dont la confirmation nécessite impérativement un examen génétique :

- une mutation β -thalassémique silencieuse (β^{++} -thal.) à l'état hétérozygote
- l'association avec un variant delta ou une δ -thalassémie (169).
- En revanche, en cas de β -thalassémie vraie associée à une δ -thalassémie, le taux d'HbA₂ sera normal sans fraction surnuméraire pour attirer l'attention;

- les délétions $(\delta\beta)^0$ -thalassémiques et les délétions emportant le LCR du cluster β -globine n'entraînent, de façon fort logique, pas d'augmentation réactionnelle d'HbA₂ puisque le gène HBD est lui aussi délété ou inactivé.

En revanche, dans le cas de la délétion $(\delta\beta)^0$ -thal., le taux d'HbF est souvent compris entre 10 et 20 %, ce qui, associé à l'hypochromie et à la microcytose, suffit à faire suspecter le diagnostic de $(\delta\beta)^0$ -thalassémie. En revanche, les délétions emportant la région HS3 du LCR et qui inactivent donc tout le cluster β -globine du chromosome 11 touché n'ont aucune traduction sur le bilan phénotypique de l'hémoglobine (170)

3. Des tests phénotypiques complémentaires parfois nécessaires

Un bilan phénotypique de l'Hb normal permet d'éliminer de façon certaine les β -thalassémies (hormis les trois situations évoquées ci-dessus) mais ne permet pas d'éliminer les alpha-thalassémies délétionnelles simples (1 ou 2 gènes alpha délétés) qui s'accompagnent de taux d'HbA₂ et d'HbF normaux. Il est donc de la responsabilité du biologiste d'évoquer ces hypothèses devant un bilan de l'Hb normal chez un patient sans carence martiale et présentant une hypochromie et une microcytose chroniques plus ou moins importantes. Pour ce faire, il faut disposer des résultats d'un hémogramme et d'un bilan martial récents au moment de l'interprétation de l'examen. C'est le cas la plupart du temps pour l'hémogramme mais beaucoup moins souvent pour le bilan martial. En outre, un dosage de ferritine normal ou augmenté peut être observé même dans un contexte de carence martiale si un syndrome inflammatoire est associé.

Au final, le biologiste est donc souvent confronté au problème de l'interprétation d'une microcytose-hypochromie associée à un bilan de l'Hb normal : l'origine est-elle une carence en fer (cas le plus fréquent) ou un syndrome thalassémique ?

Deux tests phénotypiques complémentaires permettent, chacun à leur manière, d'aider à répondre à cette question.

a. Mesure des chaînes alpha libres en excès dans les réticulocytes

Un test in vitro de mesure de l'excès en chaînes α -globine libres dans les érythrocytes et utilisant la propriété de l'AHSP (une protéine chaperonne de la chaîne alphaglobine) à fixer les chaînes α -globine non appariées a été mis au point il y a quelques années par l'équipe de Véronique Baudin-Creuzat au Kremlin-Bicêtre (171).

Pour un patient normal, les valeurs obtenues sont environ de 93 +/- 21 ppm vs 119 à 1800 ppm environ pour les Patients β -thalassémiques avec une très bonne corrélation avec le génotype et la gravité clinique. Cette mesure permettrait donc de distinguer les β -thalassémies avec taux d'HbA2 normales des autres causes de microcytose et d'hypochromie. Mais d'autres applications sont également possibles dans le domaine des β -thalassémies :

- (i) évaluation de la gravité relative d'une β -thalassémie intermédiaire,
- (ii) suivi de l'efficacité d'un traitement à l'EPO ou à l'hydroxyurée dans la β -thalassémie intermédiaire,
- (iii) programme de dépistage de masse du trait β -thalassémique dans des populations où les β -thalassémies sans augmentation d'HbA2 sont fréquentes,
- (iv) diagnostic phénotypique d'une β -thalassémie intermédiaire ou majeure dès la naissance avant l'apparition des premiers signes cliniques. Ce test est en cours de développement, les études préliminaires ayant donné de très bons résultats.

b. Ratio protoporphyrine/hème (PPZ/H)

Le ratio PPZ/H a déjà été utilisé avec succès par plusieurs auteurs dans le cadre du diagnostic différentiel microcytose thalassémique/microcytose par carence martiale (172). Schématiquement, la dernière étape de la biosynthèse de l'hème dans les érythrocytes consiste en l'addition d'un ion Fe^{2+} par la ferrochélatase. En cas de carence martiale, la ferrochélatase incorporera à la place un ion Zn^{2+} pour former de la PPZ. Par conséquent, toute augmentation dans les érythrocytes du ratio PPZ / H sera le reflet d'une carence en fer durant l'érythropoïèse, qu'elle qu'en soit l'étiologie (anémie inflammatoire, carence vraie en fer, etc.).

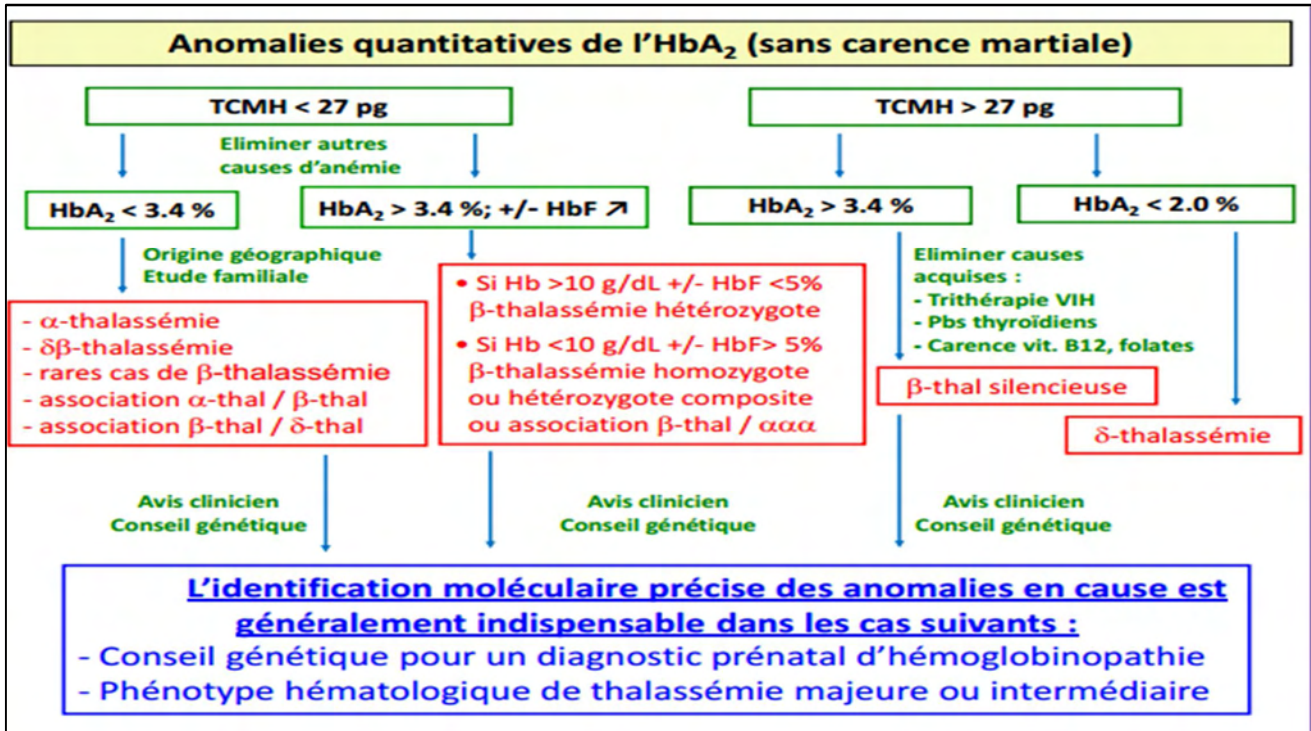
La mesure se fait sur des globules rouges lavés à partir d'un prélèvement de sang EDTA, soit exactement le prélèvement sur lequel se font les bilans de l'hémoglobine.

c. Diagnostic du trait bêta-thalassémique via le dosage de l'HbA1c

Dans les pays où le dépistage systématique n'est pas organisé au niveau national, le trait bêta-thalassémique est souvent évoqué devant une microcytose persistante mais il reste hélas souvent non diagnostiqué. Un dépistage fortuit au décours d'un dosage d'HbA1c, examen prescrit beaucoup plus fréquemment que le bilan complet de l'Hb, pourrait donc s'avérer très intéressant. Ceci est possible avec le kit Dual programme long sur Variant II (Biorad) et avec le kit HbA1c du Capillarys 2 ®Flex Piercing (Sebia) qui permettent la mesure simultanée des taux d'HbA1c et d'HbA2. Dans le cas du kit HbA1c Capillarys, on observe un biais négatif d'environ 0,6 % par rapport au kit Hémoglobine de référence pour la mesure du taux d'HbA2 et le seuil à retenir pour le diagnostic présomptif de trait β -thalassémique est d'environ 2,8 % (poster lors du congrès du Club du globule rouge et du fer – Novembre 2013)

C. Arbres décisionnels pour l'interprétation des anomalies quantitatives de l'HbA₂

Tableau 10 : Arbre décisionnel pour les anomalies quantitatives (167)



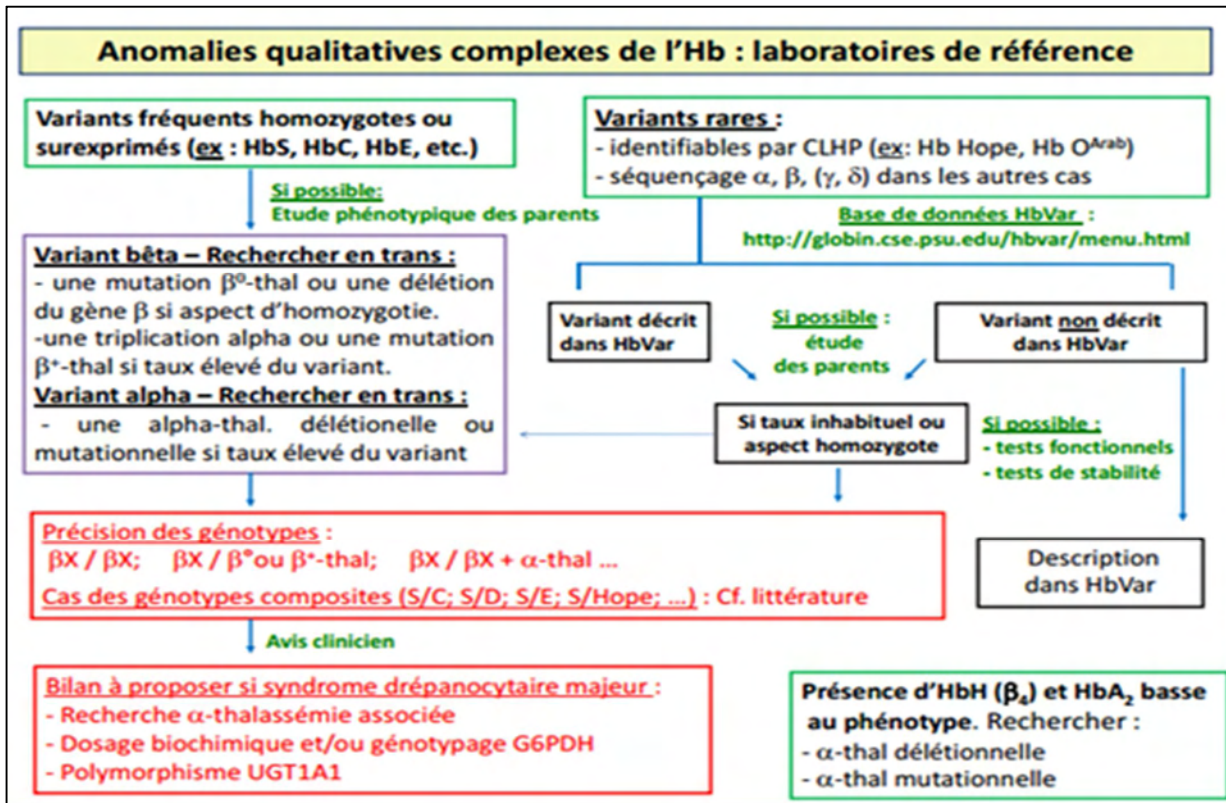
Avant tout examen, il est à noter qu'en dehors des HBP, les fractions de l'hémoglobine peuvent varier dans certaines situations rendant l'interprétation de l'Electrophorèse de l'Hb délicate.

Tableau 11 : Les autres pathologies ayant une augmentation ou diminution de l'HbA2 et de l'HbFII est essentiel d'écartier ces causes avant de continuer les études phénotypiques.(173)

PATHOLOGIE	HbA2	HbF
Carence en Fer	Diminution	
Carences en Vitamine B12 et B9	Augmentation	
Hyperthyroïdie	Augmentation	
Syndrome hémolytique, dysmyélopoïèse		Augmentation
TRAITEMENTS		
Hydroxy urée		
Acide valproïque		
antiviraux	Augmentation	
PRELEVEMENT « VIEILLI »	Diminution	Augmentation

D. Arbres décisionnels pour l'interprétation des anomalies complexes de l'Hb

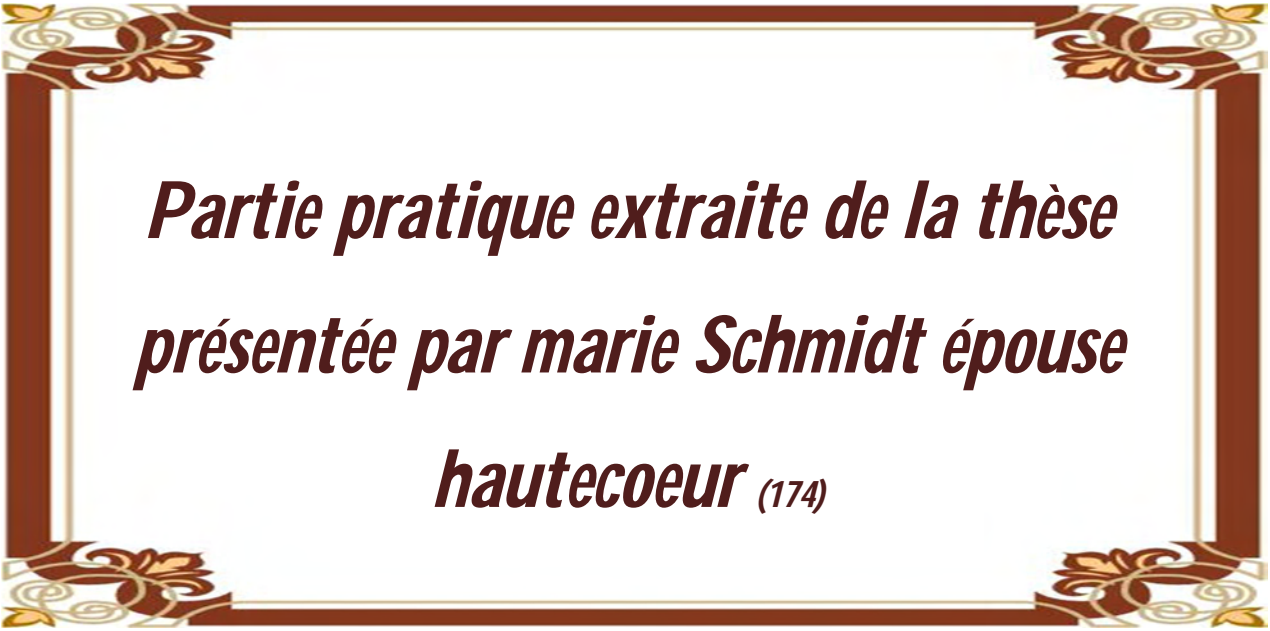
Tableau 12: Arbre décisionnel pour les anomalies qualitatives des cas complexes de l'Hb
(167)



Le compte rendu doit alors contenir :

- Les techniques utilisées
- Les valeurs usuelles
- Une conclusion

A partir de la conclusion, on aura 3 cas : un profil normal, une anomalie qualitative et/ou quantitative de l'hémoglobine. Certaines de ces anomalies requièrent une investigation plus poussée ou une confirmation à l'aide des techniques génotypiques.



***Partie pratique extraite de la thèse
présentée par marie Schmidt épouse
hautecoeur (174)***

Dans cette partie on rapporte les cas extraits de la thèse dirigée par Marie SCHMIDT épouse HAUTECOEUR illustrant à l'aide d'exemples la complémentarité des techniques d'étude de l'hémoglobine, rendant leur association indispensable. Il a été remarqué que pour chacun des patients un minimum de 3 techniques : l'électrophorèse capillaire, en premier lieu, c'est d'ailleurs ce tracé qui sera rendu au prescripteur car la lecture et l'interprétation en sont généralement plus aisées, puis l'HPLC et enfin l'IEF, réalisée en dernier pour des raisons d'organisation (groupement de séries de 24 échantillons).

I. Patient VAL(174)

Ce premier patient est un homme de 58 ans, dont nous ne connaissons ni l'origine géographique, ni les raisons ayant motivé une étude de l'hémoglobine.

En électrophorèse capillaire, on ne retrouve aucune anomalie particulière (Figure 20). Le pic d'Hb A est noté « A+X » car nous verrons par la suite que cette technique passe en fait à côté d'un variant d'hémoglobine anormale, coélué avec l'Hb A.(174)

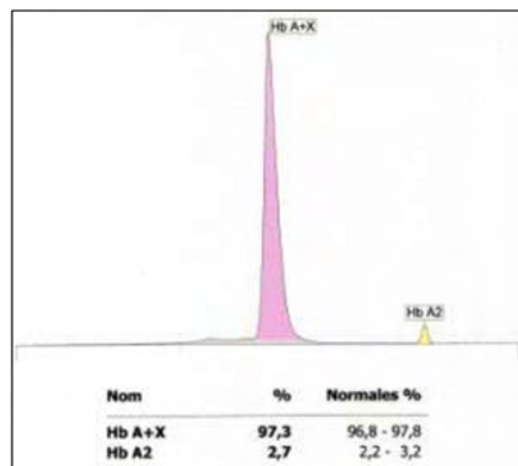


Figure 20 : Electrophorèse capillaire sur le patient VAL(174)

On réalise ensuite l'HPLC (Figure 21), qui montre en effet la présence d'un variant d'hémoglobine plus rapide que l'hémoglobine A (pic « P3 », figuré en bleu), dépisté également en IEF (Figure 22), où l'on retrouve en vert le contrôle AFSC et en rouge le patient (chacun étant passé 2 fois).

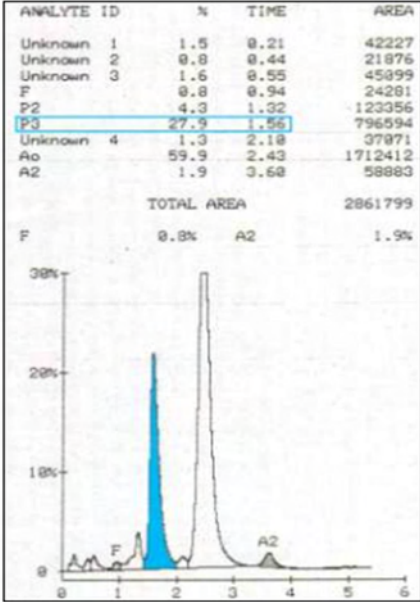


Figure 21: HPLC chez le patient VAL(174)

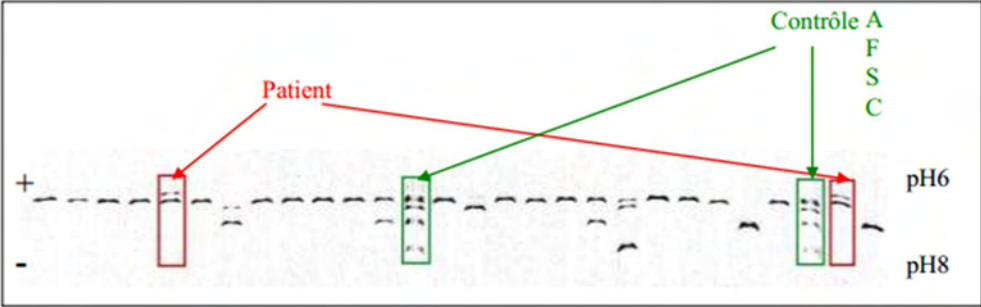


Figure 22: IEF chez le patient VAL(174)

En conclusion, on dépiste chez ce patient un variant d'Hb en IEF et en HPLC, que l'on quantifie à 27,9% par l'HPLC. L'EC, d'une grande utilité dans d'autres cas, ne permet pas de dépister ce variant et nous fait ainsi défaut. Cependant, aucune de ces 3 techniques ne permet l'identification précise du variant pathologique, qui nécessite donc une étude par biologie moléculaire. Le séquençage du gène $\alpha 2$ montrera que Monsieur VAL est porteur hétérozygote d'un variant $\alpha 2$ nommé « Hémoglobine Le Lamentin » (codon 20 His \rightarrow Gln). La mutation n'entraîne pas de modification de comportement du variant anormal en électrophorèse capillaire par rapport à l'Hb A, il y a donc coélution de l'Hb Le Lamentin ($\alpha'2 \beta 2$) et de l'Hb A ($\alpha 2 \beta 2$) en zone Z9. C'est ce qu'on appelle un variant neutre. De la même manière, il y a coélution du variant ' ($\alpha'2 \delta 2$) et de l'Hb A2 ($\alpha'2 \delta 2$) en zone Z3.

Le fait que ce soit bien un variant qui ait été identifié est en accord avec son taux d'expression en HPLC qui est de 27,9%. En effet, un variant α à l'état hétérozygote a souvent un taux d'expression voisin de 25%, tandis qu'un variant sera exprimé davantage (taux d'expression plus proche de 50%). Une étude familiale sera bien sûr conseillée.

II. Patient AYA et patient AIT(174)

1. Patient AYA(174)

Ce patient est en réalité une petite fille âgée de 6 ans, dont le père est d'origine marocaine. On réalise chez cette enfant le bilan sanguin suivant (Tableau 13).

Cette patiente nous est envoyée car elle présentait en période néonatale un profil FC (Hb foetale et Hb anormale C), ce qui nécessite toujours un contrôle à distance.

On retrouve chez cette enfant une microcytose prononcée sans anémie. Le bilan martial est sensiblement normal, tout comme le bilan d'hémolyse.

Pour ce qui est de l'étude des enzymes du métabolisme glucidique, on retrouve une activité glucose-6-phosphate déshydrogénase normale pour l'âge de l'enfant, et une activité pyruvate kinase à la limite supérieure de la normale. Ces résultats permettent d'éliminer un déficit enzymatique en l'un de ces 2 enzymes, connus pour être responsables d'anémies hémolytiques.

Tableau 13: Bilan sanguin du patient AYA(174)

Paramètres	Résultats du patient	Valeurs de référence
Leucocytes (+ érythroblastes)	7,67 x 10 ⁹ /l	4,5 – 14,5
Erythrocytes	5,15 x 10 ¹² /l	4,0 – 5,3
Hémoglobine	12,4 g/dl	11,5 – 16,0
VGM	63,5 x 10 ⁻¹⁵ l	77 - 98
Réticulocytes	2,34 % soit 121 x 10 ⁹ /l	20 - 120
Bilirubine totale	9 mg/l	1 - 12
LDH	635 UI/l	300 – 700
Ferritine	16 ng/ml	20 - 300
Fer sérique	100 µg/dl	50 - 170
Transferrine	2,42 g/l	2,00 – 3,60
Capacité totale de fixation	338 µg/dl	250 - 350
Coefficient de saturation de la sidérophiline	30 %	30 - 40
Glucose 6 phosphate déshydrogénase	1007 mUI/ml soit 196 mUI/10 ⁹ érythrocytes	120 – 220 mUI/10 ⁹ érythrocytes
Pyruvate kinase	820 mUI/ml soit 159 mUI/10 ⁹ érythrocytes	50 – 150 mUI/10 ⁹ érythrocytes

L'étude de l'hémoglobine réalisée chez cette patiente nous montre, en électrophorèse capillaire (Figure 23), la présence d'hémoglobine C, mais le pic d'Hb C et celui d'Hb A2 sont intégrés ensemble, ce qui empêche de les quantifier correctement. Il y a également présence d'hémoglobine fœtale et d'Hb C dégradée ; à noter l'absence d'Hb A.(174)

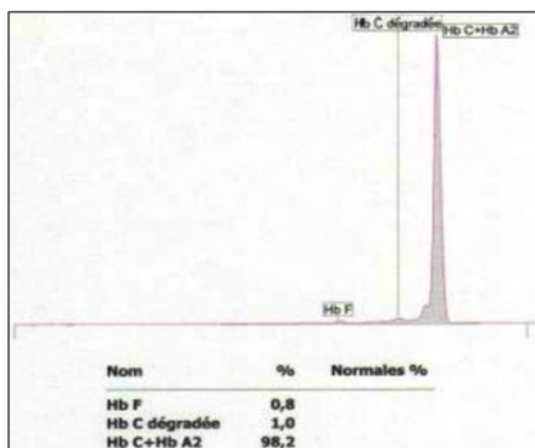


Figure 23 : Electrophorèse capillaire chez le patient AYA(174)

En HPLC, on note de même la présence d'un variant migrant dans la zone de l'hémoglobine C (Figure 24) et l'absence d'hémoglobine A.



Figure 24 : HPLC chez le patient AYA(174)

En IEF, on observe également une bande franche au niveau de la zone de migration de l'hémoglobine C (Figure 25).



Figure 25: IEF chez le patient AYA(174)

En conclusion, nous confirmons chez cette patiente une hémoglobinose C homozygote, avec expression d'Hb C à 94,2% (HPLC), et présence d'Hb F à un taux <1% et d'Hb A2, quantifiée elle aussi par l'HPLC à 3,7%.

Cet exemple pointe du doigt l'inconvénient que présente ici l'électrophorèse capillaire qui intègre ici ensemble les pics d'Hb A2 et d'Hb C chez le patient homozygote, cette technique est donc dans ce cas précis inférieure aux deux autres, ce qui illustre la nécessité d'en utiliser plusieurs. (174)

2. Patient AIT (174)

Ce patient est encore une patiente, cette fois âgée de 30 ans. On réalise chez elle le bilan sanguin suivant (Tableau 14).

Tableau 14: Bilan sanguin du patient AIT(174)

Paramètres	Résultats du patient	Valeurs de référence
Leucocytes	10,48 x 10 ⁹ /l	5,2 – 12,4
Erythrocytes	5,51 x 10 ¹² /l	4,2 – 6,1
Hémoglobine	9,4 g/dl	12,0 – 18,0
VGM	56,2 x 10 ⁻¹⁵ l	80 – 99

Cette dame présente donc une anémie microcytaire modérée, motivant la réalisation d'une étude de l'hémoglobine.

L'électrophorèse capillaire réalisée sur le Capillarys 2 (Figure 26), met en évidence la présence d'hémoglobine C, cette fois parfaitement différenciée de l'Hb A2, à la différence du patient précédent. (174)

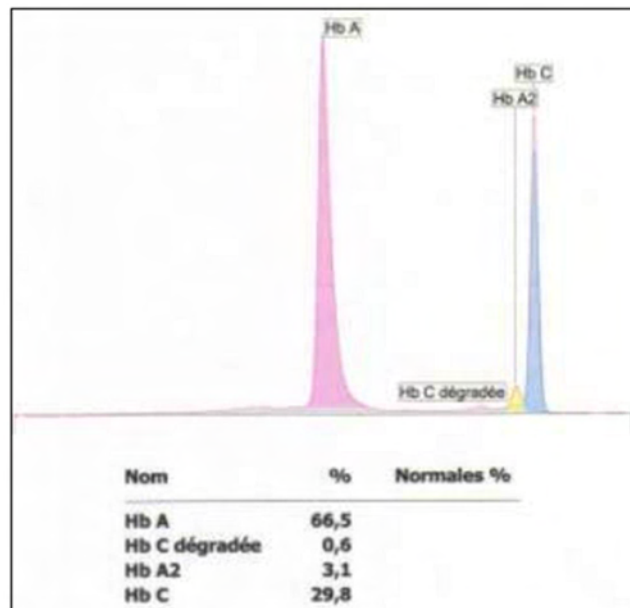


Figure 26 : Electrophorèse capillaire chez le patient AIT(174)

La figure 27 nous montre bien la présence d'une hémoglobine anormale migrant au niveau de l'Hb C en HPLC. En IEF (Figure 28), l'Hb C est également mise en évidence (patient en rouge, contrôle AFSC en vert). (174)

On note cette fois chez la patiente la présence d'Hb A, et ce dans les 3 techniques.

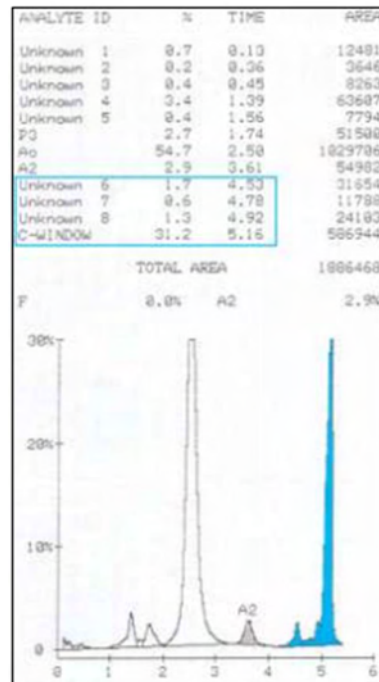


Figure 27: HPLC chez le patient AIT 90(174)

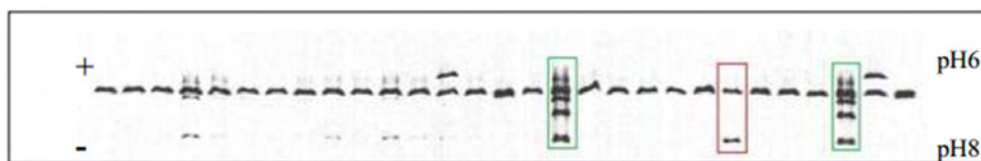


Figure 28 : IEF chez le patient AIT(174)

En conclusion, cette patiente présente une hémoglobine C hétérozygote, mise en évidence par nos 3 techniques. Elle est quantifiée à 29,8%. Ces résultats sont bien sûr à interpréter en fonction du bilan martial, sachant que la microcytose peut être expliquée par une carence martiale évidemment, mais également par la seule présence d'Hb C, qui peut aussi être à l'origine d'une microcytose chez certains patients. On suppose, par comparaison avec l'exemple précédent, qu'un taux trop important d'Hb C entraîne des difficultés de séparation avec l'Hb A2 en électrophorèse capillaire. Car ce problème est résolu lorsque l'Hb C est retrouvée à un taux inférieur comme c'est le cas ici. (174)

III. Patient NOU(174)

Ce patient est un petit garçon de 10 ans, dont nous ne connaissons ni les signes cliniques ni le bilan biologique initial ayant motivé la demande d'une étude de l'hémoglobine.

Nous réalisons l'électrophorèse capillaire, qui met en évidence un variant anormal, probablement d'Hb A2 ($\alpha_2 \delta_2$) (Figure 29). (174)

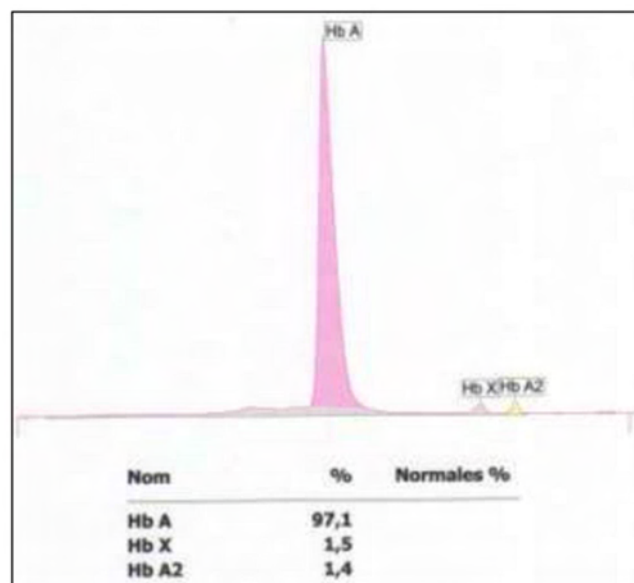


Figure 29 : Electrophorèse capillaire chez le patient NOU(174)

En revanche, de façon surprenante, la HPLC ne révèle rien d'anormal (Figures 30).
(174)

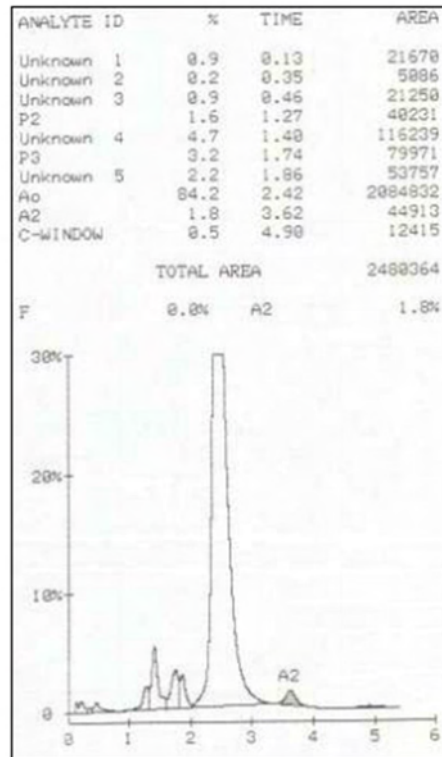


Figure 30: HPLC chez le patient NOU (174)

L'IEF, quant à elle, est corrélée à l'EC, et laisse supposer la présence d'un variant pathologique (Figure 31). Sur cette figure, j'ai pris la liberté de reproduire ce qui était visible sur le gel d'IEF mais qui n'est pas passé sur la copie, à savoir les 2 bandes en pointillés bleus, l'une correspondant à l'Hb A2 et l'autre au variant anormal. (174)

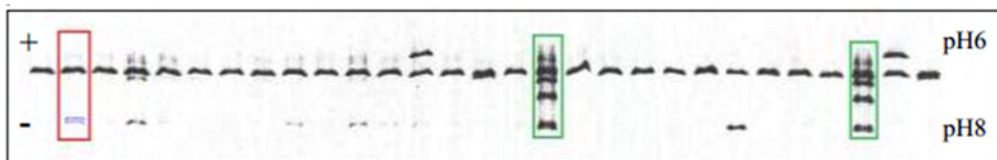


Figure 31: IEF chez le patient NOU (174)

En conclusion, le patient présente probablement un variant d'Hb A2 ($\alpha 2 \delta' 2$).

Ce résultat est à interpréter en fonction de la clinique et de la biologie. Nous observons ici l'utilité du Capillarys 2® qui a permis de détecter la présence de ce variant, présence confirmée par l'IEF. (174)

IV. Patient BOU(174)

On présente ici le cas d'un homme de 29 ans. L'étude de l'hémoglobine est demandée par le médecin suite à la découverte fortuite d'un variant d'Hb anormal lors du suivi de son diabète.

Cette étude nous montre tout d'abord, en électrophorèse capillaire, la présence d'un variant d'Hb « X », migrant dans la zone Z6, zone où migre (entre autres) l'hémoglobine D. L'Hb A est absente (Figure 32). (174)

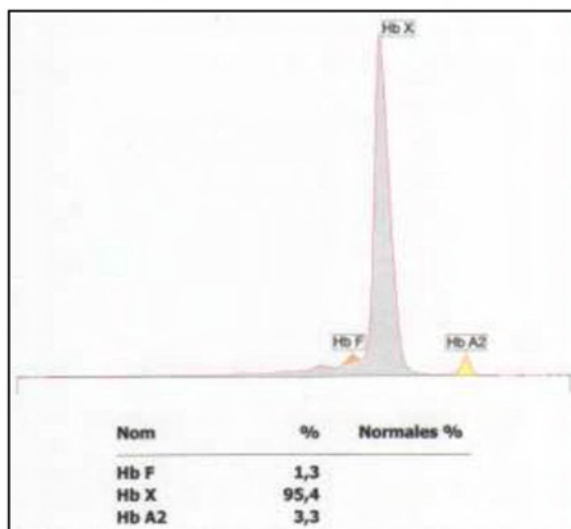


Figure 32: Electrophorèse capillaire chez le patient BOU (174)

En poursuivant l'analyse avec l'HPLC, on retrouve également une fraction majeure (Hb homozygote) migrant dans la zone de migration de l'Hb S (Figure 33). La présence d'une hémoglobine migrant au niveau de l'Hb S est de même démontrée par IEF, ainsi que l'absence d'Hb A (Figure 34). (174)

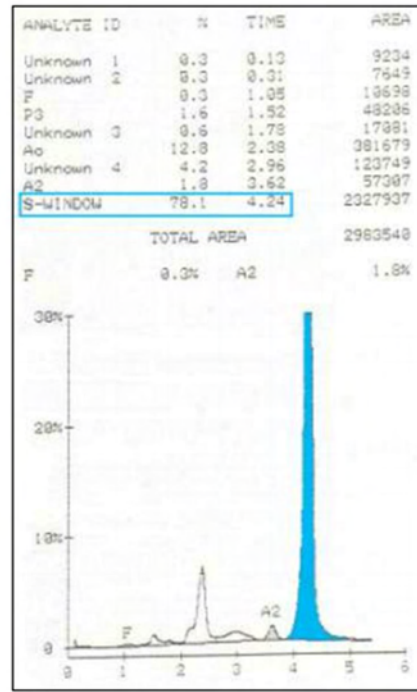


Figure 33: HPLC chez le patient BOU(174)

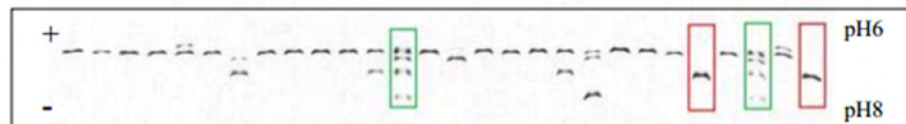


Figure 34: IEF chez le patient BOU(174)

L'hypothèse d'une Hb D, connue pour migrer au même niveau que l'Hb S dans les 2 techniques précédentes, est confortée par la réalisation d'un test de solubilité ou test d'Itano qui se révèle négatif et écarte ainsi la possibilité d'une Hb S.

On conclut donc à un variant d'Hb D homozygote probable (n'oublions pas qu'il en existe plusieurs), en conseillant bien sûr une étude familiale.

La confirmation de ce résultat par biologie moléculaire reste souhaitable.

On réalise, par cet exemple, que parfois 4 techniques peuvent être nécessaires, ici avec une supériorité de l'électrophorèse capillaire, appuyée par le test d'Itano. Malgré tout, le recours à la biologie moléculaire est souvent utile. (174)

V. Patient COR(174)

Ce sixième patient est un homme de 72 ans. Une étude de l'hémoglobine a été réalisée chez ce monsieur en raison de la découverte fortuite d'un variant anormal lors de la mesure de son taux d'HbA1c pour le suivi de son diabète.

Les 3 techniques usuelles sont alors entreprises.

Tout d'abord, l'électrophorèse capillaire met en évidence un pic anormal en zone Z12, zone correspondant à l'Hb J (Figure 35). (174)

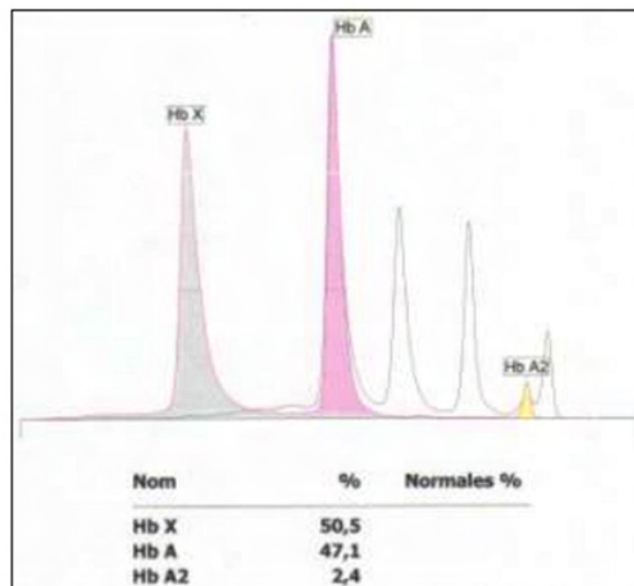


Figure 35 : Electrophorèse capillaire chez le patient COR(174)

En HPLC, on observe un pic migrant devant l'Hb A₀ : les pics sont en réalité décalés, sur le schéma « A₀ » correspond au variant anormal et « Unknown 4 » correspond à l'Hb A₀. En effet, nous avons la démonstration ici qu'il faut un œil exercé pour apprendre à lire les tracés de HPLC, et toujours vérifier les temps de rétention des pics pré-identifiés par l'automate (pour l'Hb A₀, tR aux alentours de 2,44 – 2,48 min.) (Figure 36). (174)

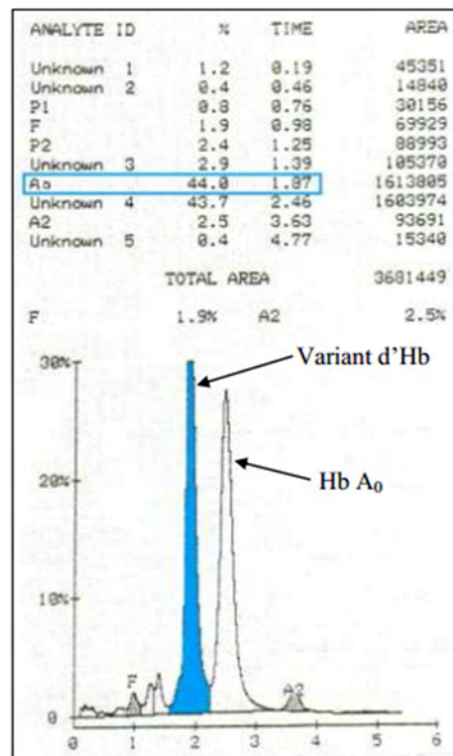


Figure 36 : HPLC chez le patient COR(174)

Enfin, on peut observer en IEF la présence d'une bande migrant plus rapidement que l'Hb A (Figure37). (174)

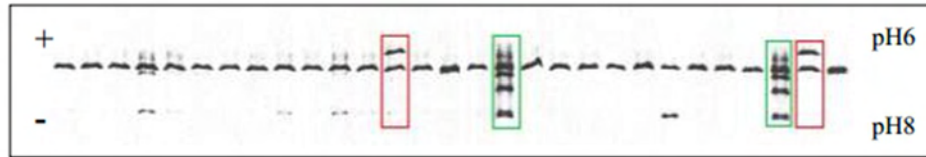


Figure 37 : IEF chez le patient COR(174)

Ce patient présente donc un variant d'Hb migrant comme une hémoglobine J, détecté par les 3 techniques, même si l'EC est plus précise car elle permet une identification présomptive du variant en question.

Une fois de plus, la biologie moléculaire reste indiquée pour identifier ce variant. Les hémoglobines J sont un groupe d'hémoglobines anormales caractérisées par des caractéristiques électrophorétiques similaires. Leur migration est plus rapide que l'Hb A et la mutation qui en est à l'origine peut porter soit sur la chaîne de l' α -globine, soit sur celle de la β -globine. Elles peuvent entraîner ou non des anomalies de l'hémogramme chez les patients qui en sont porteurs.

Chez ce patient, nous nous orientons plutôt vers un variant J bêta en raison du taux d'expression proche de 50%, et de l'absence de pic mineur $\alpha^2 \delta^2$. (174)

VI. Patient KOF(174)

Cette patiente est une jeune femme de 27 ans dont le dossier est un peu complexe.

Elle est hospitalisée en pneumologie pour suspicion de tuberculose, traitée par rifampicine, isoniazide, pyrazinamide et éthambutol.

On réalise chez elle le bilan suivant (Tableau 15). (174)

Tableau 15 : Bilan sanguin de la patiente KOF (174)

Paramètres	Résultats du patient	Valeurs de référence
Leucocytes (+ érythroblastes)	3,88 x 10 ⁹ /l	4,0 – 10,0
Erythrocytes	4,59 x 10 ¹² /l	3,8 – 5,8
Hémoglobine	10,7 g/dl	12,0 – 16,0
VGM	75,8 x 10 ⁻¹⁵ l	82 - 98
T.C.M.H.	23,3 x 10 ⁻¹² g	27 - 32
C.C.M.H.	30,7 g/dl	32 - 36
Réticulocytes	0,62 % soit 28 x 10 ⁹ /l	20 - 120
Bilirubine totale	1 mg/l	1 - 12
Ferritine	81 ng/ml	20 - 300
Fer sérique	30 µg/dl	50 - 170
C Réactive Protéine	49 mg/l	< 6

Devant l'anémie microcytaire, et malgré la discrète carence martiale et l'inflammation, le médecin demande une étude de l'hémoglobine chez cette patiente, étude justifiée également par le pays d'origine des parents de la patiente, le Libéria.

L'électrophorèse capillaire révèle 2 pics anormaux, un pic que l'on nommera « Hb X » qui sort avant l'Hb A et un pic « Hb X' » qui sort juste avant l'Hb A2 (Figure 38). (174)

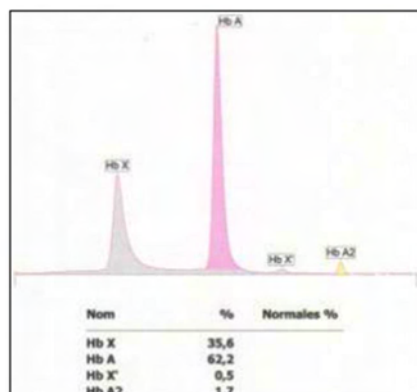


Figure 38 : Electrophorèse capillaire chez la patiente KOF(174)

En HPLC, seul un pic « P3 » anormal est détecté, son temps de rétention est plus court que celui de l'Hb A₀ (Figure 39). (174)

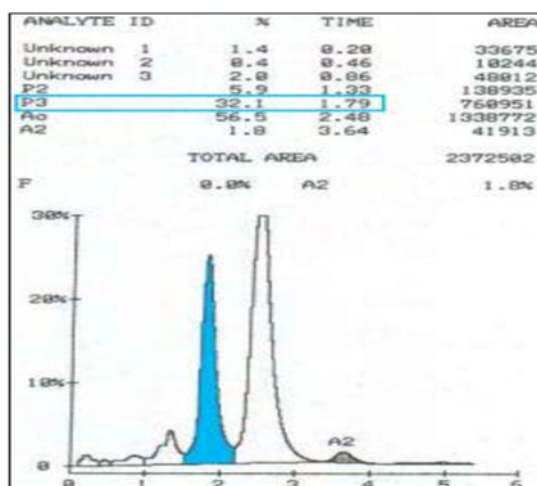


Figure 39 : HPLC chez la patiente KOF(174)

Enfin, l'IEF nous montre également chez cette patiente la présence d'un seul variant anormal, plus rapide que l'Hb A (Figure 40). (174)

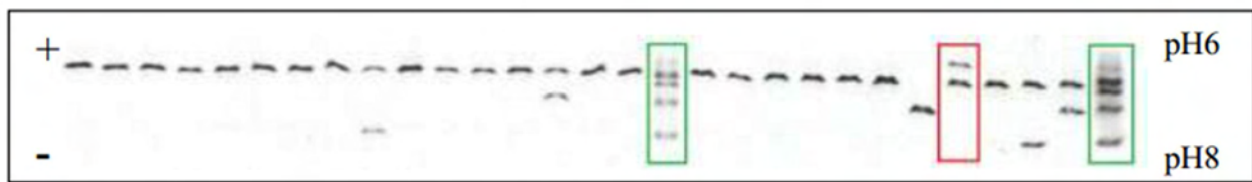


Figure 40 : IEF chez la patiente KOF(174)

Ces 3 techniques nous font suspecter la présence probable d'un variant d'Hb J alpha (Hb X : $\alpha^2 \beta^2$ et Hb X' : $\alpha^2 \delta^2$ en EC), à confirmer par biologie moléculaire. Au regard du bilan sanguin, une α -thalassémie associée ne peut être exclue. (174)

L'étude moléculaire du locus α -globine, réalisée à l'Hôpital Henri Mondor de Créteil, nous indique que la patiente est porteuse hétérozygote composite :

- d'une délétion au locus α -globine de type $\alpha^{-3,7}$
- et d'un variant d'un gène $\alpha 2$ globine de type Hémoglobine J-Paris.

A ce jour, aucune anomalie de fonction n'a été mise en évidence avec ce variant, les discrètes anomalies érythrocytaires présentes sur la numération formule sanguine seraient donc liées au trait

$\alpha^{-3,7}$. En effet, cette délétion de 3,7 kb est très fréquemment retrouvée dans les α^+ -thalassémies, et notamment au Libéria, pays d'origine de la patiente.

Les 3 techniques que nous utilisons en routine nous ont donc orientés sur la bonne piste, mais c'est la biologie moléculaire qui nous a permis d'identifier le variant incriminé avec précision et de découvrir un trait -thalassémique associé, de toute évidence responsable des anomalies de l'hémogramme. (174)

VII. Famille RED(174)

Ce dossier constitue une étude familiale composée de 3 dossiers, un petit garçon de 7 ans (RED F), ainsi que son père (RED D) et sa mère (ALI), tous deux âgés de 32 ans. Cette famille est d'origine roumaine.

Nous ne connaissons malheureusement pas les raisons ayant motivé cette étude familiale de l'hémoglobine, ni les bilans sanguins initiaux de ces 3 patients. Nous savons seulement que la demande avait été faite au départ pour l'enfant. C'est en observant les profils de migration des fractions d'Hb obtenus chez l'enfant qu'il a été demandé par la suite une étude familiale.

Nous exposons donc dans un premier temps l'électrophorèse capillaire et l'HPLC chez le fils RED F (Figures 41 et 42). (174)

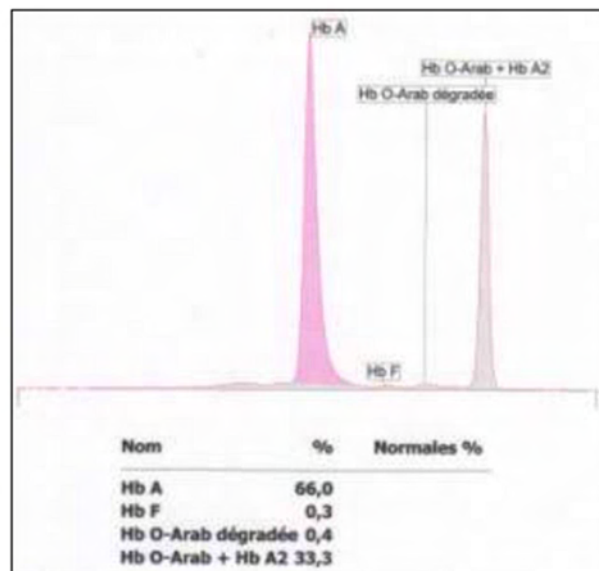


Figure 41 : Electrophorèse capillaire chez le fils RED F(174)

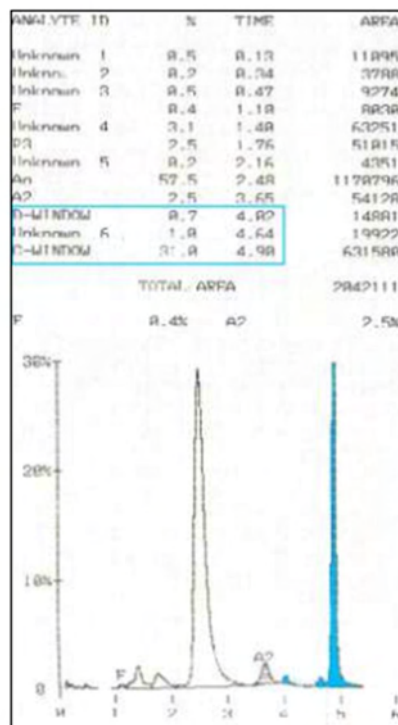


Figure 42 : HPLC chez le fils RED F(174)

L'électrophorèse capillaire met en évidence un pic d'Hb A2 à 33,3%. En HPLC, le résultat diffère et fait plutôt suspecter la présence d'un variant migrant dans la zone de l'Hb C. Le bon sens ainsi que le graphe obtenu par HPLC nous laissent supposer que le variant anormal migre au même niveau que l'Hb A2 sur le Capillarys 2®, soit en zone Z3. Le seul variant connu dans la banque de données migrant dans cette zone est l'Hb O-Arab. Nous restons donc sur cette hypothèse de la présence d'une hémoglobine O-Arab, quantifiée par HPLC à 32,7%.

Nous procédons à présent à la même étude chez la mère (patiente ALI) tout d'abord puis chez le père (RED D) pour déterminer l'origine de cette mutation chez cet enfant.

Examinons le cas de la mère ALI, l'électrophorèse capillaire et l'HPLC sont représentées figures 43 et 44. (174)

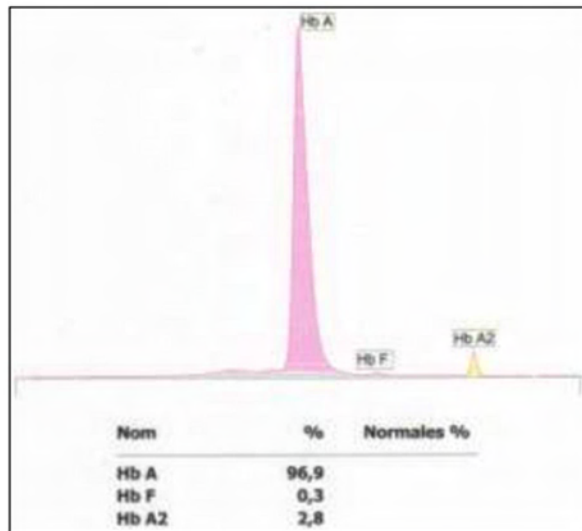


Figure 43 : Electrophorèse capillaire (174)

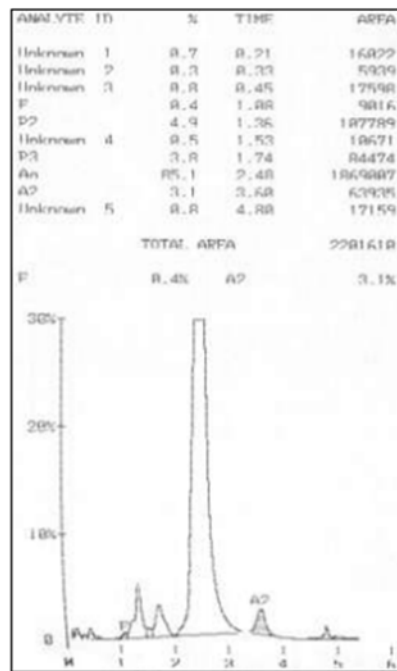


Figure 44 : HPLC chez la patiente ALI chez la patiente ALI. (174)

Chez cette patiente, nous ne retrouvons aucune anomalie dans ces deux techniques. Le variant retrouvé chez l'enfant ne proviendrait donc pas de sa mère.

Nous suspectons évidemment que l'anomalie provient du père (RED D). L'électrophorèse capillaire ainsi que l'HPLC abondent également dans ce sens puisque les deux tracés (Figures 45 et 46) sont similaires à ceux du fils. L'hémoglobine O-Arab est ici quantifiée à 41,8% par HPLC. (174)

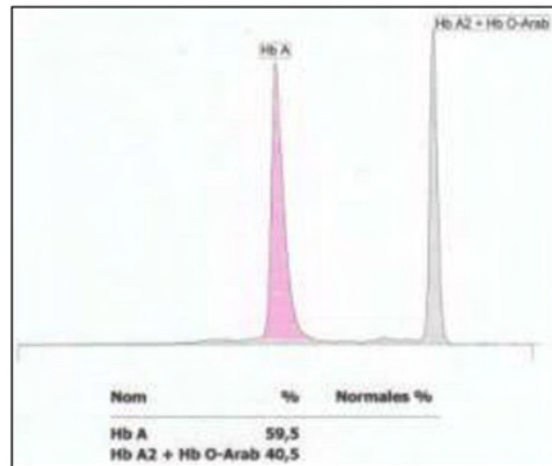


Figure 45 : Electrophorèse capillaire (174)

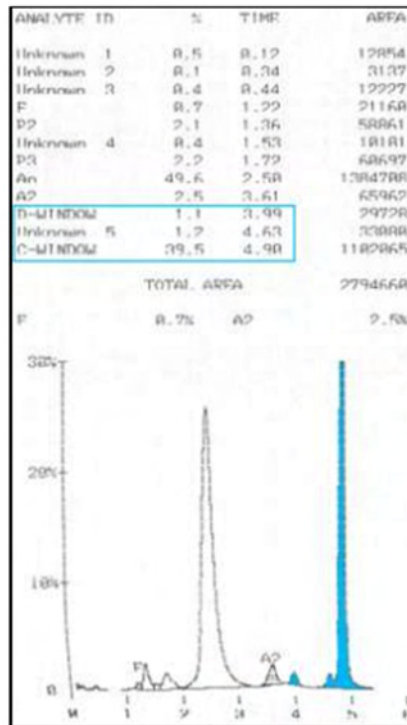


Figure 46 : HPLC chez le patient RED D chez le patient RED D(174)

On réalise enfin l'IEF qui donne les résultats suivants (Figure 47) (174):

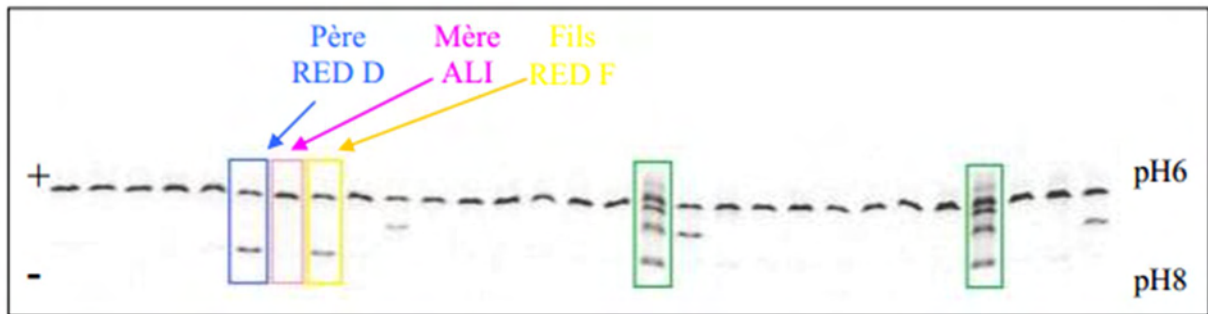


Figure 47 : IEF chez la famille RED(174)

On retrouve ainsi chez le père et le fils 2 bandes : l'une correspondant à l'Hb A et l'autre migrant dans une zone où co-migrent plusieurs variants d'hémoglobine comme l'Hb A2, l'Hb E, l'Hb C-Harlem ou l'Hb O-Arab, cette zone se trouvant très proche de celle où migre l'Hb C.

Chez la mère, cette deuxième bande n'est pas retrouvée. (174)

Une étude du gène β -globine, utile mais non indispensable dans ce cas, a été réalisée chez ces trois patients et confirme notre hypothèse : le séquençage du gène β -globine révèle l'existence d'un variant d'hémoglobine O-Arab à l'état hétérozygote (codon 121 Glu \rightarrow Lys : GAA \rightarrow AAA).

Chez le fils et le père. La recherche de mutation sur le gène β -globine s'est révélée négative chez la mère. (174)

Dans cet exemple, le variant anormal a été détecté dans les 3 techniques mais n'a pu être identifié que par électrophorèse capillaire. En effet, celui-ci migre dans la zone de l'Hb C en HPLC et co-migre avec plusieurs variants en IEF. Le recours à la biologie moléculaire a donc permis de confirmer ce résultat mais n'était pas indispensable. Il faut néanmoins relativiser, la technique d'électrophorèse capillaire est encore récente et l'on peut se poser une question légitime : est-il possible que d'autres variants que l'Hb O-Arab (et l'Hb A2) migrent également en zone Z3 et ne soient pas encore répertoriés ? Pour obtenir la réponse à cette question, il faudra attendre que la bibliothèque de variants du Capillarys 2® s'étoffe encore, bien qu'elle soit déjà bien fournie. De plus, la HPLC est ici indispensable si l'on souhaite quantifier l'Hb A2, coéluée avec l'Hb O-Arab en électrophorèse capillaire. Il y a donc une vraie nécessité de combiner ces techniques pour obtenir un diagnostic fiable chez cette famille. (174)

A noter : L'hémoglobine O-Arab est un variant d'hémoglobine rare, dû à une mutation sur le gène de la β -globine ($\beta 121 \text{ Glu} \rightarrow \text{Lys}$). Il est retrouvé principalement chez les personnes originaires des Balkans (Bosnie, Bulgarie, Croatie, Grèce, Serbie.) et occasionnellement chez les patients d'origine arabe, égyptienne ou africaine. Il ne donne aucune symptomatologie clinique à l'état hétérozygote mais est responsable d'une anémie modérée chez l'homozygote.

En revanche, elle entraîne un syndrome drépanocytaire majeur chez le patient hétérozygote composite S/O-Arab. (174)



Conclusion

Les hémoglobinopathies endémiques de certaines régions sont devenues ubiquitaires de nos jours. Malgré les fortes fréquences de certaines hémoglobinopathies dans certaines régions comme l'Hb S, C et E. Les praticiens sont confrontés de plus en plus souvent à de nouveaux variants mais aussi des combinaisons entre les variants de l'hémoglobine avec les anomalies quantitatives.

L'utilisation de trois techniques dont au moins un est électrophorétique doit être la règle d'or pour le diagnostic phénotypique des hémoglobinopathies. L'électrophorèse capillaire et l'HPLC sont largement utilisées. L'HPLC est actuellement considérée par de nombreux laboratoires comme la méthode de choix pour le dépistage et la quantification des hémoglobines anormales que normales. Bien qu'elle est très performante, elle est très insuffisante utilisée seule et devrait être abandonnée si elle ne s'accompagne pas d'une ou plusieurs techniques complémentaires. Avec ces 3 techniques phénotypiques, le diagnostic des cas simples est aisé.

Cependant, d'autres cas nécessitent des techniques spécialisées telles, l'analyse génotypique dans le cas d'un phénotype complexe ou dans le cadre d'un conseil génétique en vue du diagnostic prénatal de drépanocytose et de thalassémie β ou α . Sans aussi oublier la recherche d'un nouveau variant, dont le nombre ne cesse d'augmenter de jours en jours.

On cite alors, la Gap-PCR pour la recherche simultanée des délétions courantes, le MLPA pour les délétions et les duplications des gènes de globines. L'ARMS-PC, l'ASO, le DGGE et le SSCP qui servent pour la détection des points de mutation, des insertions et des délétions responsable des anomalies de l'hémoglobine. Le séquençage direct des clusters pour l'identification des variants rares et nouveaux variants.

Des arbres décisionnels sont mis en place à tout patient ayant atteint une érythropoïèse adulte (âge supérieur à 2 ans). Leur utilisation et leur interprétation correcte doit venir en aide aux cliniciens et biologistes et les sensibiliser aux faits que : les paramètres cliniques, biologiques, ethniques et hématologiques sont indispensables pour une interprétation correcte des résultats.

Le laboratoire effectuant le diagnostic des hémoglobinopathies doit savoir reconnaître les principaux mutants d'intérêt clinique (Hb S, HbC, HbE). Et faire le diagnostic de bêta-thalassémie et d'alpha-thalassémie.

Les difficultés tiennent, d'une part, au nombre de mutants et à la nécessaire confrontation de diverses techniques (3 minimum) et, d'autre part, à l'enchevêtrement possible des anomalies. Au final, le diagnostic des hémoglobinopathies nécessite impérativement la confrontation de plusieurs techniques, des données cytologiques et des données cliniques pour une interprétation correcte des résultats. À la moindre incertitude de diagnostic, l'avis d'un laboratoire de référence doit être sollicité.

Ce qui était illustré par des cas pratiques extraits d'une thèse sous le titre de « Complémentarité des techniques d'électrophorèse capillaire et de CHLP dans le diagnostic des hémoglobinopathies ».



Résumés

RESUME

Titre : Actualités sur les moyens biologiques d'études phénotypiques et génotypiques des hémoglobinopathies.

Auteur : Ambinintsoa Yattussia MAFILAZA

Mots clés : hémoglobinopathies - moyens biologiques – phénotypes – génotypes.

Les hémoglobinopathies sont les maladies héréditaires les plus répandues dans le monde. Elles posent des problèmes de santé publique dans certaines régions où une variante est à haute fréquence. Selon le niveau de synthèse de l'hémoglobine atteint, il y a les variants de l'hémoglobine qui sont des anomalies qualitatives. Et les thalassémies qui constituent un grand groupe d'anomalies quantitatives. Les hémoglobinoses les plus fréquentes sont HbS, HbC, HbE et Hb D. Tandis que l' α et la β -thalassémie sous des génotypes différents sont les thalassémies les rencontrées.

La détection et la caractérisation de ces hémoglobinopathies repose principalement sur la clinique, l'enquête familiale et les méthodes d'exploration au laboratoire.

Des multiples batteries de tests biochimiques, hématologiques et génétiques sont disponibles pour fournir le phénotype et/ou le génotype d'une anomalie. Pendant de nombreuses années, l'électrophorèse sur gel classique et l'HPLC sont de techniques séparatives couramment utilisées en laboratoire d'analyses. Ces techniques sont complémentaires aux tests non-séparatifs comme le test d'EMMEL et le test de solubilité de l'HbS... Pour rendre une analyse phénotypique, il est impératif d'utiliser 3 techniques dont au moins un est électrophorétique.

Cependant, d'autres méthodes se sont ajoutées à cet arsenal pour améliorer la qualité du diagnostic et l'interprétation des résultats. L'électrophorèse capillaire en zone et les techniques moléculaires comme le séquençage, dot-blot, gap-PCR, le MLPA sont régulièrement recommandées. Et plus récemment, la spectrométrie de masse est utilisée.

L'interprétation des résultats obtenus est, en général compliqué en raison de la participation de plusieurs gènes dans l'expression des hémoglobines. Des arbres décisionnels sont à la disposition des biologistes pour les aider dans leurs démarches.

ABSTRACT

Title: NEWS analytical tools for the phenotypic and genotypic diagnosis for the Hemoglobinopathies.

Author: Ambinintsoa Yattussia MAFILAZA

Keywords: hemoglobinopathies - biological mean -phenotypic and genotypic.

Haemoglobin disorders are the most common hereditary diseases in the world. They cause public health problems in some areas where a variation is high frequency. Depending on the level of hemoglobin synthesis reached, there are the variants of hemoglobin which are qualitative abnormalities. And thalassemia which constitute a large group of quantitative abnormalities. The most common hemoglobinopathies are HbS, HbC, Hb E and Hb D. While the α -thalassemia and β -thalassemia from different genotypes are thalassemia encountered.

Detection and characterization of these hemoglobinopathies mainly based on clinical, family survey and exploration methods in the laboratory.

Multiple battery of biochemical, haematological and genetic tests are available to provide the phenotype and / or genotype of an anomaly. For many years the conventional gel electrophoresis and HPLC separation techniques are commonly used in laboratory analyzes. These techniques are complementary to non-separative tests such as EMMEL test and the solubility test of HBS... To make phenotypic analysis, it is imperative to use three techniques that at least one is electrophoretic.

However, other methods have been added to the arsenal to improve the quality of diagnosis and interpretation of results. Capillary electrophoresis zone and molecular techniques such as sequencing, dot blot, gap-PCR, MLPA are regularly recommended. And most recently, mass spectrometry has is used.

The interpretation of the results obtained by these techniques is usually complicated by the involvement of several genes in the expression of hemoglobin. Decision trees are available to biologists to help them in their approaches.

ملخص

عنوان: مستجدات حول الوسائل البيولوجية لدراسة الحليلات والانماط الجينية

الكاتب: أومبنيئتسويا ياتوسيا مافيلازا

الكلمات الأساسية: اضطرابات الهيموغلوبين، الوسائل البيولوجية، الحليلات، الانماط الجينية.

تعد اضطرابات الهيموغلوبين من الامراض الوراثية الاكثر شيوعا في العالم. حيث تطرح العديد من مشاكل الصحة العامة في بعض المناطق المصابة بنوع ذو تردد عال. واعتمادا على مستوى انتاج الهيموجلوبين المصاب، يمكن التمييز بين اختلالات نوعية واخرى ذات طابع كمي كالتلاسيما.

اختلالات الهيموجلوبين الاكثر شيوعا هي الهيموجلوبين اس، والهيموجلوبين س، والهيموجلوبين E. بينما تعد α و β تلامييا تحت تراكيب وراثية مختلفة الاكثر مصادفة.

يقوم الكشف ووصف هذه الاختلالات اساسا، على الفحص السريري، البحث العائلي وكذلك على طرق الاستكشاف داخل المختبر.

يوجد العديد من الاختبارات ذات الطابع البيو كيميائي ودموي ووراثي، تمكن من الحصول على الصيغة الوراثية للحالة الشاذة.

لسنوات عدة، يتم استعمال الهجرة الكهربائية الكلاسيكية على الهلام و HPLC كطرق مفرقة في مختبرات التحليل.

تعتبر هاته الطرق مكملة للاختبارات الغير مفرقة مثل ايميل واختبار الذوبان الهيموجلوبين اس لإجراء تحليل مظهري، من الضروري استخدام ثلاث تقنيات حيث تكون فيها واحدة على الاقل ذات طابع كهروكرومي.

ومع ذلك، فقد تم إضافة طرق أخرى لهذه الترسانة لتحسين جودة التشخيص وتفسير النتائج. ينصح باستعمال الهجرة الكهربائية الشعرية والوسائل الجزيئية مثل التجزئة، دوت بلوت، چاب بسر، ملبء. مؤخرا يتم استعمال المطياف الكتلي.

تفسير النتائج غالبا ما يكون معقدا، وذلك بسبب تداخل العديد من الجينات في التعبير عن الهيموجلوبين. ولمساعدة علماء الاحياء في ذلك تم تزويدهم بأشجار القرار.



Bibliographie

- [1]. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. 2001. 704-12 p.
- [2]. Jean Pierre M. Génétique médicale, formelle, chromosomique, moléculaire et clinique. 2004^e éd. p. 16.
- [3]. Protocole National de diagnostics de soins. Haute Autorité de Santé - ALD n° 10 - Syndromes drépanocytaires majeurs de l'adulte. janv 2010;9.
- [4]. C.Moussard. Biochimie structurale et métabolique. 3^eème. 2006. 300-314 p.
- [5]. Wajeman H. Hémoglobine et structure. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. Paris; 2013. p. 4.
- [6]. Wajeman H. Méthémoglobinémies et sulfhémoglobinémies. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. Paris; 2008.
- [7]. Nicolas Guex. Swiss PDB Viewer - Home [Internet]. 2012 [cité 6 juin 2014]. Disponible sur: <http://spdbv.vital-it.ch/>
- [8]. Perutz MF., Rossman MG. Structure of haemoglobin. A three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis. 1960. 416-22 p.
- [9]. Isabelle Clavurie, Mireille Panet. Cahiers du préparateur en pharmacie. BIOCHIMIE. 2^eème. 2008. 47 p.
- [10]. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobines. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. Paris; 2005. p. 225.
- [11]. Kunkel HG, Wallenius G. New Hemoglobin in Normal Adult Blood. 1955;122:288.
- [12]. lehmann H. News and Views: International Society of Hematology, the haemoglobinopathies. Blood. 1957;12:90-2.
- [13]. Kunkel HG, Bearn AG. Blood- Minor hemoglobin components of normal human blood. 16(760-762).

- [14]. Allen DW, Schoeder WA, Balog J. Observations on the chromatographic Heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: a study of effect of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. 1958;1628-34.
- [15]. Clegg MD, Schoeder WA. The chromatographic study of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals. :6065-9.
- [16]. Godart C., Riou J. Place de l'HPLC dans le diagnostic des hémoglobinopathies. BIO-RAD; 2007.
- [17]. Barbara J.Bain, Barbara J.Wild, Adrian D.Stephens, Lorraine A.Phelan. The variants haemoglobins: a Guide to Identification. Première Edition. 2010. 4 p.
- [18]. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. Blood. 1992;80:575-81.
- [19]. Bieker JJ., Southwood CM. The erythroid Krüppel-like factor transactivation domain is a critical component for cell-specific inducibility of a beta-globin promoter. Mol Cell Biol. 1995;(15):852-60.
- [20]. Talbot D., Grosveld F. The 5'HS2 of the globin locus control region enhances transcription through the interaction of a multimeric complex binding at two functionally distinct NF-E2 binding sites. EMBO J. 1991;(10):1391-8.
- [21]. Kihm AJ., , Russell JE., Kong Y., Hong W., Rouda S., Adachi K. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-hemoglobin. Nature. 2002;(417):758-63.
- [22]. V. Siguret, J.P. Andreux. Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. avr 1997;55(2):103-12.
- [23]. Blood journal. hemoglobin molecular, genetic and clinical aspects - Recherche Google [Internet]. [cité 17 juin 2014].

- [24]. Bardakdjian-Michau J, Dhondt J-L, Ducrocq R, Galactéros F, Guyard A, Huchet F-X, et al. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 juill 2003;61(4):401-9.
- [25]. H.F.Bunn, B.G.Forget. *Hemoglobin molecular, Genetic and clinical aspects*. 1986.
- [26]. Weatherall DJ, Clegg JB. *The thalassaemia syndromes*. Oxford [Internet]. 2001 [cité 11 juin 2014].
- [27]. Kaplan JC., Delpech M. *Génétique moléculaire de quelques maladies constitutionnelles*. Biologie moléculaire et médecine Flammarion. Flammarion. Paris; 1989. p. 273-338.
- [28]. Cao A., Galanello R., Rosatelli MC. *Pathologie moléculaire et diagnostic de la beta-thalassémie intermédiaire*. *Hématologie*. 1995;(4):289-94.
- [29]. Pissard S., M'Rad A., Beuzard Y., Roméo PH. A new type of hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH): HPFH Tunisia beta+ (+ C - 200) Ggamma. *Br J Haematol*. 1996;(95):67-72.
- [30]. P.C. Giordano. *Dépistage des porteurs et prévention des hémoglobinopathies par électrophorèse capillaire*. France; 2007. 10 p.
- [31]. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of Hemoglobin*. Cambridge University Press; 2001;
- [32]. B.E Clark, S.L. Thein. *Molecular diagnosis of haemoglobin disorders*. *ClinLab Haem*. 2004;(26):161.
- [33]. *International Hemoglobin Information Center variant list*. 1996;(20):213-212.
- [34]. *The beta and delta thalassemia repository*. 8^e éd. 1995. 213-36 p.
- [35]. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells JC. *Sickle cell anemia: a molecular disease*. 1949. 543-8 p.

- [36]. Hardison R.C, Chui D.H, Giardine B., Riemer C., Patrinos G.P, Anagnou N., et al. HB Var: a relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. *Hum Mutat.* (19):225-33.
- [37]. Labie.D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *encyclopédie médicale chirurgicale EMC.* 2005; p. 5.
- [38]. Serjeant GR, Higgs DR, Hambleton IR. Elderly survivors with homozygous Sickle cell disease. *N Engl J Med.* 2007;(356):642-5.
- [39]. Galactéros F. Drépanocytose. *Physiopathologie et diagnostic.* 1995;(45):351-61.
- [40]. Saint-Martin C., Kéclard L, Romana M. Epidémiologie des gènes globines dans le bassin caribéen in la drépanocytose, regards croisés sur une maladie orpheline. (Dir. Lainé A)Khartala. 2004. 75-94 p.
- [41]. Morris CR., Kato GJ., Poljakovic M; Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* 2005;(294):81-90.
- [42]. Nadia OU-KHEDA, Z. OUZZIF. LES HEMOGLOBINOPATHIES : CONTRIBUTION DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET DE TOXICOLOGIE DE L'HMIMV A L'ETUDE EPIDEMIOLOGIQUE ,CLINIQUE ET BIOLOGIQUE DES CAS REPERTORIES SUR UNE PERIODE DE 12 ANNEES. [RABAT]: MOHAMMED V-SOUISSI FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE; 2013.
- [43]. Eaton WA., Hofrichter J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood.* 1987;(70):1245-66.
- [44]. Telen MJ. Sickle Cell Anemia. Role of adhesion Molecules and Vascular Endothelium in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ;* 2007 Program p. 84-90.

- [45]. Cartron JP., Elion J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. 2008;(15):39-50.
- [46]. Conca TJ, et al., Hammerman SI., Kourembanas S. Endothelin-1 production during the acute chest syndrome in sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;(156):280-5.
- [47]. Gladwin MT., Schechter AN., , Shelhamer JH, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease. Possible role of nitric oxide in its pathophysiology and treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;(159):1368-76.
- [48]. Labrune M., Khalifa G. *Imagerie du rachis de l'enfant.* Paris; 1999.
- [49]. Rees DC, William TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2010. 2018-31 p.
- [50]. Atage KI., Key NS. Hypercoagulopathy in Sickle Cell Disease: New approaches to an Old Problem. 2007 p. 91-6.
- [51]. Ejindu VC., Hine AL., Mashayekhi M, et al. Musculoskeletal manifestations of sickle cell disease. *Radiographics.* 2007;(27):1005-21.
- [52]. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie.* déc 2005;2(4):220-39.
- [53]. Steinberg MH. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of molecular etiology, pathophysiology and therapeutic approaches. *Sci World J.* 2008;(8):1295-324.
- [54]. Booth C., Inusa B., Obaro SK. Infection in sickle cell disease: a review. *Int J Infect Dis.* 2010;(14):2-12.
- [55]. Almeida A., Roberts I. Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2005;129(4):482-90.
- [56]. Bégué P., Castello-Herbreteau B. Infections graves chez l'enfant drépanocytaire: aspects cliniques et prévention. *Arch Pediatr.* 2001;8(S4):732-41.

- [57]. Harkness J., Hebbel RP. Solovey AA; Solovey AN; Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. 2001: 1937-41 p.
- [58]. Kiryluc K., Jadoon A., Gupta M., Radhakrish J. Sickle cell trait and gross hematuria. *Kidney Int.* 2007. 706-710. p.
- [59]. La drépanocytose. 2011;26p. Encyclopédie Orphanet Grand Public. 2011. p. 26.
- [60]. Lionnet F., Stankovic K., Girot R. Drépanocytose de l'adulte. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. 2006. p. 20.
- [61]. Nicole Couprie FC. Hémoglobinopathie. Laboratoire Marcel Mérieux – Hématologie Spécialisée, Formation Continue; 2000.
- [62]. Girot R. La drépanocytose. John Libbey Eurotext. 2003;16.
- [63]. M. Nagaraa., C. Alba-Sauviat a., Fontvielle b., D. Simeona., MF.Gaudeau-Toussainta F., G. Faucherb. L'hémoglobinose C homozygote : à propos d'un cas découvert fortuite, Immuno-analyse et biologie spécialisée. 2009. p. 210-6.
- [64]. Hunt AJ., Ingram VM. Allelomorphism and the chemical differences of the human hemoglobins A, S and C. 1958. 162-3 p.
- [65]. Rosa J., Wajcman H., Blouquit Y. Hémoglobine. 13 000-S-10. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. 1993. p. 14.
- [66]. Brugnara C., Kopin AS., Bunn HF., Tosteson DC. Brugnara C, Kopin AS, Bunn HF, Tosteson DC. Regulation of cation content and cell volume in hemoglobin erythrocytes from patients with homozygous hemoglobin C disease. *J Clin.* 1985;(75):1608-17.
- [67]. Fuchaoren S., Winichagoon P. Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin.* 1987;11:65-88.
- [68]. The haemoglobin E syndromes. *AnnNYAcadSci.* 1998;850:334-43.

- [69]. Orkin SH., Kazazian HH., Ostrer H, Antonarakis SE., Sexton JP. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of the Beta E -globin gene. *Nature*. 1982;(300):768-9.
- [70]. P.C. Giordano. Dépistage des porteurs et prévention des hémoglobinopathies par électrophorèse capillaire. France; 2007. 24 p.
- [71]. Attawut Chaibunruang ., Hataichanok Srivorakun, Supan Fucharoen, Goonapa Fucharoen, Nattaya Sae-ung. Interactions of hemoglobin Lepore ($\delta\beta$ hybrid hemoglobin) with various hemoglobinopathies: A molecular and hematological characteristics and differential diagnosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2010. p. 140-5.
- [72]. Baglioni C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1962;(48):1880-6.
- [73]. A.B. Metzberg., G. Wurzer., T.H.J Huisman., O. Smithies. Homology requirements for unequal crossing over in human. *Genetics*. 1991;(128):143-61.
- [74]. K.D. Lanclos., J. Patterson., G.D. Efremov, et al. Characterization of chromosomes with hybrid genes for Hb Lepore–Washington, Hb Lepore–Baltimore, Hb P-Nilotic, Hb Kenya. *Hum Genet*. 1987;(77):40-5.
- [75]. S. Fucharoen., P. Winichagoon., N. Sirithanaratkul., J.Chowthaworn., P. Pootrakul. α - and β - thalassemia in Thailand. *Ann N Acad Sci*. 1998;850:412-4.
- [76]. Montalembert M. Syndromes thalassémiques. Elsevier Masson-SAS. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. Paris; 2008. p. 6.
- [77]. Rund D., Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005;(353):1135-46.
- [78]. 78. Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005;(353):1135-46.

- [79]. Schrier SL., Beaumont C., Beris P., Beuzard Y., Brugnara C. Pathophysiology of the thalassemia. Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis, ESH and Club du Globule rouge et du FER. Genoa. 2006. p. 228-35.
- [80]. Montalembert M. Syndromes thalassémiques. Elsevier Masson-SAS. encyclopédie médicale chirurgicale EMC. Paris; 2008. p. 2.
- [81]. Chen FE., Ooi C., Ha SY, Cheung BM., Todd D., Liang R. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. 2000;(343):544-50.
- [82]. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The metabolic bases of inherited diseases. Thalassemia Scriver CR. Toronto: MacGraw-Hill: Beaudet AL, Sly WS, Valle D; 1989. p. 2315-32.
- [83]. Mouélé R., Pambou O., Feingold J., Galactéros F. Alpha-thalassemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anemia. Hum Hered. 2000;(50):118-25.
- [84]. Bernini LF., Hartevelde CL. Alpha-thalassaemia. Baillieres Clin Haematol. 1998;(11):53-90.
- [85]. Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L., Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassaemia (ATR-X syndrome). Cell. 1995;(80):837-45.
- [86]. Kanavakis E., Papassotiriou I., Karagiorga M., Vrettou C., Metaxotou-Mavrommati A., Stamoulakatou A. Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. Br J Haematol. 2000;(111):915-23.
- [87]. Chui D.H, Waye JS. Hydrops foetalis caudus by alpha-thalassemia: an emerging health care problem. Blood. 1998;(91):2213-22.
- [88]. Tang W., Luo HY., Eng B., Waye JS., Chui D.H. Immunological test to detect adult carriers of (-/SEA) deletional alpha-thalassemia. Lancet. 1993;(342):1145-7.

- [89]. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;(108):532-40.
- [90]. Galanello R., Origa R. Beta-thalassemia. 2010. 11 p.
- [91]. Girot R., de Montalembert M. Syndromes thalassémiques. *Hématologie de l'enfant.* Flammarion Médecine-sciences. Paris: Schaison G, Baruchel A, Leblanc T; 1995. p. 109-17.
- [92]. Wonke B. Bone disease in beta-thalassemia major. *Br J Haematol.* 1998;(103):897-901.
- [93]. Wonke B., Hoffbrand AV., Bouloux P., Jensen C., Telfer P. New approaches to the management of hepatitis and endocrine disorders in Cooley's anemia. *Ann N Acad Sci.* 1998;(850):232-41.
- [94]. Borgna-Pignatti C., Rugolotto S., De Stephano P., Zhao H., Cappellini MD., Del Vecchio GC. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica.* 2004;(89):1187-93.
- [95]. Ho PJ, Hall GW., Luo LY., Weatherall DJ., Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: it is possible constantly to predict phenotype from genotype? *Br J Haematol.* 1998;(100):295-300.
- [96]. Labie D, Elion J. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *EMC - Hématologie.* déc 2005;2(4):220-39.
- [97]. Huisman THJ., Schroeder WA., Efremov GD. The present status of the heterogeneity of fetal hemoglobin in β -thalassemia: an attempt to unify some observations on thalassemia and related conditions. *AnnNYAcadSci.* 1974;(232):07-24.
- [98]. Tuan D., Feingold E., Newman M., Weissmann SM., Forget BG. Different 3' end points of deletions causing $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin: implications for the control of γ -globin gene expression in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;(80):6937-41.

- [99]. Van der Ploeg LH., Flavell RA., Konings A., Oort M., Roos D., Bernini L. $\gamma\beta$ -Thalassaemia studies showing that deletion of the δ and γ -genes influences β -globin gene expression in man. *Nature*. 1980;(283):637-42.
- [100]. Driscoll MC, Dobkin CS, Alter B. $\gamma\delta\beta$ -thalassemia due to a de novo mutation deleting the 5' β -globin gene activation region hypersensitive sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;(86):7470-4.
- [101]. Gumucio DL, Rood KL, Gray TA, Riordan MF, Sartor CI, Collins FS. Nuclear proteins that bind the human γ -globin gene promoter: alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol*. 1988;(8):5310-22.
- [102]. Elion J., Ducrocq R. Le diagnostic des hémoglobinopathies en 1990. *Sem Hôp Paris*. 1991;67:1118-26.
- [103]. Sin SY, Ghosh A, Tang LC, Chan V. Ten years' experience of antenatal mean corpuscular volume screening and prenatal diagnosis for thalassaemias in Hong Kong. *J Obstet Gynaecol Res*. 2000;(8):26:203.
- [104]. Leung TN, Lau TK, Chung T. Thalassaemia screening in pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;(17):129-34.
- [105]. Isabelle VINATIER. Recommandations pour la mise en œuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine. Cahier du LABORATOIRE CERBA présenté à;
- [106]. Maitland K, Ganczakowski M, Peto TEA, Clegg JB, Weatherall DJ, Bowden DK., Williams TN,. Red blood cell phenotypes in the alpha+ thalassaemias from early childhood to maturity. *Br J Haematol*. 1996;(95):266-72.
- [107]. Mentzer Jr WC. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet*. 1973;(1):882.
- [108]. N. COUQUE, M. DE MONTALEMBERT. Diagnostic d'une hémoglobinopathie. *Feuill Biol*. mars 2013;311:7.

- [109]. Galactéros F. Diagnostic néonatal des hémoglobinopathies. *Rev Prat.* 1992;(42):1893-5.
- [110]. Décret n° 2008-321 du 4 avril 2008 relatif à l'examen des caractéristiques génétiques d'une personne ou à son identification par empreintes génétiques à des fins médicales. 2008-321 avr 4, 2008.
- [111]. Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, et al. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Ann Biol Clin (Paris).* 1 juill 2010;68(4):455-64.
- [112]. Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi MA. HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies: a study of 60000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clin Chem.* 2004;(50 (10)):1736-47.
- [113]. Riou J, Godart C, Mathis M, Hurtrel D, Wajcman H., Préhu C, Bardakdjian J. Evaluation of the Bio-Rad VARIANT II HbA2/HbA1C Dual Program for measurement of hemoglobin concentrations and detection of variants. *Clin Chem Lab Med.* 2005;(43 (2)):237-43.
- [114]. Hjertén S. Free zone electrophoresis. *Chromatogr Rev.* 1967;(9):122-219.
- [115]. Cotton F, Vertongen F, Gulbis B. Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. *Immuno-Anal Biol Spéc.* févr 2006;21(1):45-50.
- [116]. Cotton F, Lin C, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A2 and F. *Clin Chem.* 1999;(45 (2)):237-43.
- [117]. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak, R. Comparison of Sebia Capillarys capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol.* 2008;(130(5)):824-31.

- [118]. Cotton F, Malaviolle X, Vertongen F, Gulbis B. Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. *Clin Lab.* 2009;(55 (5-6)):217-21.
- [119]. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, Rosa. J. Isoelectric focusing of human hemoglobin : its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. *Blood.* 1978;(51):971-82.
- [120]. Frédéric Girard. Diagnostic biologique des pathologies génétiques de l'hémoglobine. Lycée Docteur Lacroix -.
- [121]. Wajcman H, Riou J. Globin chain analysis: an important tool in phenotype study of hemoglobin disorders. *Clin Biochem.* 2009;(42(18)):1802-6.
- [122]. Itano HA. Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 1953;(47(1)):148-59.
- [123]. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol.* 1972;(23(5)):615-9.
- [124]. Wada Y, Hayashi A, Fujita T, Matsuo T, Katakuse I, Matsuda H. Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta.* 1981;(667):233-41.
- [125]. Kar R, Sharma CB. Bilirubin peak can be mistaken as Hb Bart's or Hb H on Highperformance liquid chromatography. *Hemoglobin.* 2011;(35):171-4.
- [126]. Wild BJ, Green BN, Stephens AD. The potential of electrospray ionization mass spectrometry for the diagnosis of hemoglobin variants found in newborn screening. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;(33):308-17.
- [127]. Daniel YA, Turner C, Haynes RM, Hunt BJ, Dalton RN. Rapid and specific detection of clinically significant haemoglobinopathies using electrospray mass spectrometry. *Br J Haematol.* 2005;(130):635-43.

- [128]. Rai DK, Alvelius G, Landin B, Griffiths WJ. Electrospray tandem mass spectrometry in the rapid identification of alpha-chain haemoglobin variants. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000;(14):1184-94.
- [129]. Kiernan UA, Black JA, Williams P, Nelson RW. High-throughput analysis of hemoglobin from neonates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Chem.* 2002;(48):947-9.
- [130]. Zanella-Cleon I, Préhu C, Joly P, Riou J, Becchi M., Wajcman H, Francina A. Strategy for identification by mass spectrometry of a new human hemoglobin variant with two mutations in Cis in the beta-globin chain: Hb S-Clichy [$\beta 6(A3)Glu \rightarrow Val$; $\beta 8(A5) Lys \rightarrow Thr$]. *Hemoglobin.* 2009;(33(3)):177-87.
- [131]. Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, Elion J, Francina A., Joly P, Pissard S, Rochette J. Réseau DHOS Pathologie héréditaire de l'érythrocyte. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinoopathies. *Ann Biol Clin Paris.* 2010;455-64.
- [132]. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev.* 2003;(17):43-53.
- [133]. Dode C, Rochette J, Krishnamoorthy R. Locus assignment of human alpha globin mutations by selective amplification and direct sequencing. *Br J Haematol.* 1990;(76):275-81.
- [134]. Poitras E, Houde A, La. PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotech.* 2002;(2):2-11.
- [135]. Vrettou C, Traeger-Synodinos J, Tzetis M, Malamis G., Kanavakis E. Rapid screening of multiple beta-globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassemia syndromes. *Clin Chem.* 2003;(49):769-76.

- [136]. Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood Rev.* 1993;(81):239-42.
- [137]. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of singlenucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem.* 2004;(50):1748-54.
- [138]. Higgs DR, Bowden DK. Clinical and laboratory features of α -thalassemia syndromes. *Disorders of hemoglobin.* Cambridge University; 2001;431-69.
- [139]. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. *Disorders of Hemoglobin.* Cambridge University Press; 2001;252-76.
- [140]. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of alphas-thalassemia. *Blood.* 2000;(95):360-2.
- [141]. Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of -alpha 3.7 thalassaemia and alpha alpha alpha anti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol.* 1993;(83):105-11.
- [142]. Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, et al. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat.* 2002;(20):218-26.
- [143]. Houdayer C, Gauthier-Villars M, Lauge A, Pages-Berhouet S, Dehainault C, Caux-Moncoutier V, et al. Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat.* 2004;(23):193-202.
- [144]. De Andrade TG, Saad ST, Sonati Mde F, Costa FF. Simple fluorescent PCR method for detection of large deletions in the beta-globin gene cluster. *Am J Hematol.* 2003;(72):225-7.

- [145]. Joly P, Lacan P, Garcia C, Couprie N, Francina A. Identification and molecular characterization of four new large deletions in the beta-globin gene cluster. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;(43):53-7.
- [146]. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den, Dunnen JT, White SJ, et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2005;922-31.
- [147]. Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H. & Erlich H.A. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequencespecific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;(86):6230-4.
- [148]. Présentation de la PCR [Internet]. [cité 10 févr 2015]. Disponible sur: <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/anim/presentation.htm>
- [149]. 149. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers, C., Kalsheker N., Smith J.C. & Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989;(2503– 2516):17.
- [150]. Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A.R. & Day I.N. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2001;(29):E88.
- [151]. Tan J.A., Tay J.S., Lin L.I., Kham S.K., Chia J.N., Chin T.M., Aziz, N.B. & Wong H.B. The amplification refractory mutation system (ARMS): a rapid and direct prenatal diagnostic technique for beta-thalassaemia in Singapore. *Prenat Diagn.* 1994;1077-82.
- [152]. Wallace R.B., Johnson M.J., Hirose T., Miyake T., Kawashima, E.H. & Itakura K. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II: Hybridisation of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit beta-globin DNA. *Nucleic Acids Res.* 1981;(9):879-94.

- [153]. Conner B.J., Reyes A.A., Morin C., Itakura K., Teplitz R.L. & Wallace R.B. Detection of sickle cell beta -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;(80):278-82.
- [154]. Li D, Liao C, Li J, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia by reverse dot-blot hybridization in southern China. *Hemoglobin*. 2006;(30):365-70.
- [155]. Lin M, Zhu JJ, Wang Q, et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of common alpha and beta thalassemia in Chinese. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;(48):86-90.
- [156]. 156. Ristaldi M.S., Pirastu M., Rosatelli C., Monni G., Erlich H., Saiki R. & Cao A. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia in Mediterranean populations by dot blot analysis with DNA amplification and allele specific oligonucleotide probes. *Prenat Diagn*. 1989;(9):629-38.
- [157]. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich, H.A. & Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*. 1985;(230):1350-4.
- [158]. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;(86):2766-70.
- [159]. Losekoot M., Fodde R., Harteveld C.L., van Heeren H., Giordano, P.C. & Bernini L.F. Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassaemia. *Br J Haematol*. 1990;(76):269-74.
- [160]. Sanger F., Donelson J.E., Coulson A.R., Kossel H. & Fischer D. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;(70):1209-13.

- [161]. Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;(74):5463-7.
- [162]. Van Zwieten R, Veldthuis M, Delzenne B, et al. an Zwieten R, Veldthuis M, Delzenne B, et al. Hemoglobin analyses in The Netherlands reveal more than 80 different variants including six novel ones. *Hemoglobin*. 2014;(38):1-7.
- [163]. Dode´ C., Krishnamoorthy R., Lamb J. & Rochette J. Rapid analysis of -alpha3.7 thalassaemia and alpha-alphaalphaanti 3.7 triplication by enzymatic amplification analysis. *British Journal of Haematology*. 1992;105-11.
- [164]. Liu Y.T., Old J.M., Miles K., Fisher C.A., Weatherall D.J. & Clegg, J.B. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *British Journal of Haematology*. 2000;295-9.
- [165]. Tan A.S., Quah T.C., Low P.S. & Chong S.S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha-thalassemia. *Blood*. 2001;(98):250-1.
- [166]. Craig J.E., Barnetson R.A., Prior J., Raven J.L. & Thein S.L. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood*. 1994;(83):1673-82.
- [167]. Serge PISSARD, Alain FRANCINA, Patricia AGUILAR MARTINEZ, Catherine BADENS, Jacques ELION, Jacques ROCHETTE. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. Paris;
- [168]. Mosca A, Paleari R, Galanello R, Sollaino C, Perseu L, Demartis FR., et al. New analytical tools and epidemiological data for the identification of HbA2 borderline subjects in the screening for beta-thalassemia. *Bioelectrochemistry*. 2008;(73):137-40.
- [169]. Moi P, Paglietti E, Sanna A, Brancati C, Tagarelli A, Galanello R., et al. Delineation of the molecular basis of delta- and normal HbA2 betathalassemia. *Blood*. 1988;(72):530-3.

- [170]. Joly P, Lacan P, Garcia C, Meley R, Pondarre C, Francina A. A novel deletion/insertion caused by a replication error in the beta-globin gene locus control region. *Hemoglobin*. 2011;(35):316-22.
- [171]. Vasseur C, Pissard S, Domingues-Hamdi E, Marden MC, Galacteros, F, Baudin-Creuzat V. Evaluation of the free alpha-hemoglobin pool in red blood cells: a new test providing a scale of beta-thalassemia severity. *Am J Hematol*. 2011;(86):199-202.
- [172]. Magge H, Sprinz P, Adams WG, Drainoni ML, Meyers A. Zinc protoporphyrin and iron deficiency screening: trends and therapeutic response in an urban pediatric center. *JAMA Pediatr*. 2013;(167):361-7.
- [173]. Meyer Michel SAMANA, Daniel Germain, Jacques INGRAND, Pierre KAMOUN. Précis de biopathologies. Analyses médicales spécialisés. 2007^e éd. Lyon - FRANCE;
- [174]. Marie SCHMIDT épouse HAUTECOEUR. COMPLEMENTARITE DES TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE CAPILLAIRE ET DE HPLC DANS LE DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINOPATHIES. Université de Lille 2; 2011.



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 public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne 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



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيما 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 وبأدب 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.
- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

مستجدات حول الوسائل البيولوجية لدراسة الحليلات والأنماط الجينية

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرف

الآنسة : أومبنينتسويا ياتوسيا مافيلازا

المزداة في 27 ماي 1991 بمدغشقر

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: اضطراب الهيموغلوبين - الوسائل البيولوجية - الحليلات - الأنماط الجينية.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: عبد القادر بلمكي

أستاذ في علم الدم البيولوجي

مشرف

السيد: عبد الله دامي

أستاذ في الكيمياء الحيوية والكيمياء

السيدة: سناء بوحسايين

أستاذة في الكيمياء الحيوية والكيمياء

أعضاء

السيدة: سعاد بنكيران

أستاذة في علم الدم البيولوجي

السيدة: سميرة المشطاني إدريسي

أستاذة في الكيمياء الحيوية والكيمياء