

**UNIVERSITÉ MOHAMMED V-RABAT  
FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE –RABAT**

**ANNEE : 2016**

**THÈSE N°: 03**

**ROLE DU LABORATOIRE DANS LE  
DIAGNOSTIC DES HEMOGLOBINOPATHIES**

**THÈSE**

*Présentée et soutenue publiquement le:.....2016*

**PAR**

**Mr Mouad Ghalmane**

Né le 04 juin 1989 à Rabat

**Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie**

**MOTS CLES : Hémoglobine – Hémoglobinopathies – diagnostic –  
techniques d'étude**

**MEMBRES DE JURY**

**Mr. A. BELMEKI**

Professeur d'Hématologie Biologique

**PRESIDENT**

**Mme. S. BENKIRANE**

Professeur d'Hématologie Biologique

**RAPPORTEUR**

**Mr. A. MASRAR**

Professeur d'Hématologie Biologique

**Mme. M. NAZIH**

Professeur d'Hématologie Biologique

**JUGES**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إننا أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ



**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 – *Clinique Royale*  
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie -Réanimation  
Pr. SETTAF Abdellatif pathologie Chirurgicale

**Novembre et Décembre 1985**

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

**Janvier, Février et Décembre 1987**

Pr. AJANA Ali	Radiologie
Pr. CHAHED OUZZANI Houria	Gastro-Entérologie
Pr. EL YAACOUBI Moradh	Traumatologie Orthopédie
Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah	Gastro-Entérologie
Pr. LACHKAR Hassan	Médecine Interne
Pr. YAHYAOUI Mohamed	Neurologie

**Décembre 1988**

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib	Chirurgie Pédiatrique
Pr. DAFIRI Rachida	Radiologie
Pr. HERMAS Mohamed	Traumatologie Orthopédie

**Décembre 1989**

Pr. ADNAOUI Mohamed	Médecine Interne – <i>Doyen de la FMPR</i>
Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali*	Cardiologie
Pr. CHAD Bouziane	Pathologie Chirurgicale
Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda	Neurologie

**Janvier et Novembre 1990**

Pr. CHKOFF Rachid	Pathologie Chirurgicale
Pr. HACHIM Mohammed*	Médecine-Interne
Pr. KHARBACH Aïcha	Gynécologie -Obstétrique
Pr. MANSOURI Fatima	Anatomie-Pathologique
Pr. TAZI Saoud Anas	Anesthésie Réanimation

**Février Avril Juillet et Décembre 1991**

Pr. AL HAMANY Zaïtounia	Anatomie-Pathologique
Pr. AZZOUZI Abderrahim	Anesthésie Réanimation – <i>Doyen de la FMPO</i>
Pr. BAYAHIA Rabéa	Néphrologie
Pr. BELKOUCHI Abdelkader	Chirurgie Générale
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif	Chirurgie Générale
Pr. BENSOUDA Yahia	Pharmacie galénique
Pr. BERRAHO Amina	Ophtalmologie
Pr. BEZZAD Rachid	Gynécologie Obstétrique
Pr. CHABRAOUI Layachi	Biochimie et Chimie
Pr. CHERRAH Yahia	Pharmacologie
Pr. CHOKAIRI Omar	Histologie Embryologie
Pr. KHATTAB Mohamed	Pédiatrie
Pr. SOULAYMANI Rachida	Pharmacologie – <i>Dir. du Centre National PV</i>
Pr. TAOUFIK Jamal	Chimie thérapeutique

**Décembre 1992**

Pr. AHALLAT Mohamed	Chirurgie Générale
Pr. BENSOUDA Adil	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie

Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza  
Pr. CHRAIBI Chafiq  
Pr. DAOUDI Rajae  
Pr. DEHAYNI Mohamed\*  
Pr. EL OUAHABI Abdessamad  
Pr. FELLAT Rokaya  
Pr. GHAFIR Driss\*  
Pr. JIDDANE Mohamed  
Pr. TAGHY Ahmed  
Pr. ZOUHDI Mimoun

### **Mars 1994**

Pr. BENJAAFAR Nouredine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBI Abdelmjid  
Pr. EL AMRANI Sabah  
Pr. EL AOUDAD 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

### **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 Najja  
Pr. HANINE Ahmed\*  
Pr. JALIL Abdelouahed

Gastro-Entérologie  
Gynécologie Obstétrique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Neurochirurgie  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Anatomie  
Chirurgie Générale  
Microbiologie

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  
Gynécologie –Obstétrique  
Dermatologie

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

Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

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 Abbas  
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila  
Pr. HDA Abdelhamid\*  
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Cardiologie - *Dir. HMIMV*  
Urologie  
Ophtalmologie  
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

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

Pr. YOUSFI MALKI Mounia

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\*

Pr. TACHINANTE Rajae

Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie

Pédiatrie

Pédiatrie

Pneumo-ptisiologie

Chirurgie Générale

Chirurgie Générale

Pneumo-ptisiologie

Neurochirurgie

Traumatologie Orthopédie

Anesthésie-Réanimation **inspecteur SS**

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. BENOUACHANE 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  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBAH Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-physiologie  
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  
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\*

Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques

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\*

#### **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\*  
 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

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

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

Pr. KHARMAZ Mohamed  
Pr. LEZREK Mohammed\*  
Pr. MOUGHIL Said  
Pr. OUBAAZ Abdelbarre\*  
Pr. TARIB Abdelilah\*  
Pr. TIJAMI Fouad  
Pr. ZARZUR Jamila

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 HAMZAOUI 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\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal

Rhumatologie  
Radiologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie

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

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 Nouredine  
Pr. HADADI Khalid\*  
Pr. ICHOU Mohamed\*  
Pr. ISMAILI Nadia  
Pr. KEBDANI Tayeb

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

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\*

Anesthésie réanimation  
Microbiologie  
Réanimation médicale  
Radiologie  
Pneumo phtisiologie  
Hématologie biologique  
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

Pr. BOUSSOUGA Mostapha\*  
 Pr. CHAKOUR Mohammed \*  
 Pr. CHTATA Hassan Toufik\*  
 Pr. DOGHMI Kamal\*  
 Pr. EL MALKI Hadj Omar  
 Pr. EL OUENNASS Mostapha\*  
 Pr. ENNIBI Khalid\*  
 Pr. FATHI Khalid  
 Pr. HASSIKOU Hasna \*  
 Pr. KABBAJ Nawal  
 Pr. KABIRI Meryem  
 Pr. KARBOUBI Lamya  
 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\*

Traumatologie orthopédique  
 Hématologie biologique  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 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-ptisiologie  
 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\*

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

Pr. ZOUAIDIA Fouad

**Mai 2012**

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

Anatomie pathologique

Chirurgie Pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Psychiatrie  
Traumatologie Orthopédique  
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. BENSNGHIR Mustapha\*  
Pr. BENYAHIA Mohammed\*  
Pr. BOUATIA Mustapha  
Pr. BOUABID Ahmed Salim\*  
Pr. BOUTARBOUCH Mahjoub  
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 KORAICHI Alae

Pharmacologie – Chimie  
Toxicologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie biologique  
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

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  
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra  
Pr. MEDDAH Bouchra  
Pr. MELHAOUI Adyl  
Pr. MRABTI Hind  
Pr. NEJJARI Rachid  
Pr. OUBEJJA Houida  
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\*

Radiologie  
Physiologie  
Radiologie  
Pédiatrie  
Médecine Nucléaire  
Pédiatrie  
Endocrinologie et maladies métaboliques  
Microbiologie  
Psychiatrie  
Radiologie  
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	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. BARKYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootéchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCI Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

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

- 9 JAN 2015



# *Dédicaces*



*À ma mère, Ma tante, qui m'ont transmis la sagesse de la modestie et l'amour d'autrui, et qui partage mes joies et mes chagrins.*

*À mon père qui a toujours été d'un grand support mental. Il restera toujours mon modèle à suivre.*

*À mes chers frères: Complicité fraternelle et amour inconditionnel nous réunissent.*

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

*À tous ceux qui m'ont transmis leur savoir depuis la maternelle jusqu'à ce jour.*

*À tous ceux connus ou inconnus qui vont feuilleter un jour ce travail.*

*À tous ceux qui ont pour mission cette pénible tâche de soulager l'être humain, d'essayer de lui procurer le bien être physique, psychique et social.*

*À tous les malades...que dieu nous aide à apaiser vos souffrances...*

*À tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.*

# *Remerciements*



**A**

**NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE  
MONSIEUR LE PROFESSEUR ABDELKADER BELMEKKI  
PROFESSEUR D'HEMATOLOGIE CHEF DU CENTRE DE  
TRANSFUSION SANGUINE,**

*Permettez-nous de vous exprimer nos sincères remerciements.  
C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de  
présider le jury de cette thèse avec plaisir et sans conditions.  
Votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir nous ont  
énormément marqués.*

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

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

**A**

**NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE**  
**MADAME LE PROFESSEUR SOUAD BENKIRANE**  
**PROFESSEUR AGREGE EN HEMATOLOGIE**  
**BIOLOGIQUE CHU**

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

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

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

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

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

**A**

***NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE***  
***MONSIEUR LE PROFESSEUR AZLARAB MASRAR***  
***CHEF DE SERVICE HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE CHU***

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

*Nous sommes très sensibles à votre gentillesse, votre accueil très aimable votre volonté d'enseigner et à votre profonde humanité.*

*Nous vous exprimons ici notre admiration quant à l'immense travail que vous abattez au Laboratoire d'Hématologie Avicenne.*

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

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

**A**

**NOTRE MAITRE ET JUGE DE THESE**

**MADAME LE PROFESSEUR MONA NAZIH**

**PROFESSEUR AGREGE EN HEMATOLOGIE CENTRE DE  
TRANSFUSION SANGUINE**

*C'est pour nous un grand honneur de vous compter parmi ce jury de thèse. Nous tenons à vous témoigner notre profonde reconnaissance pour avoir aimablement accepté de juger ce travail.*

*Votre chaleureux accueil n'a pas manqué de nous toucher. Nous nous inclinons avec un grand respect devant vos qualités humaines, votre disponibilité et surtout devant vos compétences professionnelles.*

*Veillez accepter ici, cher maître, l'assurance de notre estime et l'expression de notre profonde reconnaissance.*



**ILLUSTRATIONS**

## *Liste des abréviations*

<b>2,3-DPG</b>	: 2,3-diphosphoglycérate
<b>β-thal</b>	: bêta-thalassémie
<b>α-thal</b>	: alpha-thalassémie
<b>δβ-thal</b>	: delta beta-thalassémie
<b>ADN</b>	: acide Désoxyribonucléique
<b>ARNm</b>	: acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	: acide ribonucléique de transfert
<b>CCMH</b>	: concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
<b>CHLP</b>	: la Chromatographie en phase Liquide à Haute performance
<b>CMF</b>	: Cytométrie en flux
<b>CVO</b>	: crise vaso-occlusive
<b>EDTA</b>	: acide éthylène diamine tétra-acétique
<b>fl</b>	: femtolitres
<b>GR</b>	: globule rouge
<b>Hb</b>	: hémoglobine
<b>Hb A</b>	: hémoglobine A
<b>Hb A2</b>	: hémoglobine A2
<b>Hb C</b>	: hémoglobine C
<b>Hb D</b>	: hémoglobine D
<b>Hb E</b>	: hémoglobine E
<b>Hb F</b>	: hémoglobine fœtale
<b>Hb G</b>	: hémoglobine G
<b>Hb J</b>	: hémoglobine J
<b>Hb M</b>	: hémoglobine M ou Méthémoglobine
<b>Hb O-Arabe</b>	: hémoglobine O-Arabe
<b>Hb S</b>	: hémoglobine S
<b>HFM</b>	: Hémorragie fœto-maternelle
<b>kDa</b>	: kilodalton
<b>LDH</b>	: Lactate déshydrogénase
<b>MetHb</b>	: méthémoglobine
<b>O.M.S</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>PHHF</b>	: persistance héréditaire de l'Hémoglobine F
<b>PCR</b>	: Polymérase Chain Réaction
<b>pCO<sub>2</sub></b>	: la pression partielle en dioxyde de carbone
<b>Pg</b>	: picogrammes

<b>pO<sub>2</sub></b>	: la pression partielle en dioxygène
<b>S.F.B.C</b>	: Recommandations de la Société Française de Biologie Clinique
<b>SM</b>	: Spectrophotométrie en masse
<b>TCMH</b>	: teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
<b>TK</b>	: Test de Kleihauer
<b>tR</b>	: temps de rétention
<b>VGM</b>	: volume globulaire moyen

## *Liste des figures*

- Figure 1 :** structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte
- Figure 2 :** Schéma de la molécule d'hémoglobine adulte A
- Figure 3 :** Structure de l'hème (Diakité, 2005)
- Figure 4 :** Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA) et de ses principales régions fonctionnelles. En rouge, sont indiquées les conséquences physiopathologiques de différents variants
- Figure 5 :** Courbe de saturation de l'hémoglobine
- Figure 6 :** Structure et organisation des deux familles de gènes de globine
- Figure 7 :** Les gènes embryonnaires sont représentés en bleu, les gènes adultes en jaune et les pseudogènes en rouge : on trouve de gauche à droite les gènes  $\zeta$  en bleu,  $\psi\zeta$  et  $\psi\alpha 1$  en rouge et  $\alpha 2$  puis  $\alpha 1$  en jaune
- Figure 8 :** Les gènes embryonnaires sont représentés en bleu, les gènes fœtaux en vert, les gènes adultes en jaune et les pseudogènes en rouge : on trouve de gauche à droite les gènes  $\epsilon$  en bleu,  $G\gamma$  et  $A\gamma$  en vert,  $\psi\beta$  en rouge,  $\delta$  et  $\beta$  en jaune
- Figure 9 :** Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours du développement humain
- Figure 10 :** Répartition géographique des principales hémoglobinopathies (d'après Sébia : Electrophorèse des hémoglobines)
- Figure 11 :** Les différents génotypes associés au locus  $\alpha$
- Figure 12:** Topographie des mutations sur le tétramère de globine
- Figure 13 :** Mutations responsables de  $\beta$ -thalassémies
- Figure 14 :** Hématies falciformes (ou drépanocytes) au microscope électronique à balayage (à gauche) et au microscope optique sur frottis sanguin (à droite)
- Figure 15 :** Mécanisme physiopathologique de base de drépanocytose
- Figure 16 :** Altération membranaires des globules rouges drépanocytaires
- Figure 17 :** Physiopathologie hématologique de l' $\alpha$ -thalassémie (classe 3 et 4)

- Figure 18 :** Répartition géographique des naissances présentant une forme grave d'hémoglobinopathie (pour 1000 naissances) (source : organisation Mondiale de la Santé 2008).
- Figure 19 :** Répartition géographique de la drépanocytose
- Figure 20 :** distribution globale des  $\alpha$ -thalassémies
- Figure 21 :** Distribution globale des mutations de  $\beta$ -thalassémie
- Figure 22 :** courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine
- Figure 23 :** Stratégie proposée par la SFBC pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine
- Figure 24 :** Electrophorèse à pH alcalin : position des différentes hémoglobines
- Figure 25 :** Electrophorèse sur gel d'agar à pH = 6
- Figure 26 :** Isoélectrofocalisation en gel d'agarose
- Figure 27 :** Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire
- Figure 28 :** Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électroosmotique à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon
- Figure 29 :** Profil électrophorétique normal chez un adulte
- Figure 30 :** Profil électrophorétique obtenu chez un jeune enfant
- Figure 31 :** Profil électrophorétique d'un nouveau né de 3 semaines
- Figure 32 :** Tracé électrophorétique d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote
- Figure 33 :** Profil électrophorétique d'une  $\beta^+$  thalassémie
- Figure 34 :** Profil électrophorétique d'Hb Bart's
- Figure 35 :** Profil électrophorétique d'un sang avec variant homozygote HbS
- Figure 36 :** Tracé électrophorétique d'une hémoglobinose S hétérozygote
- Figure 37 :** Electrophorèse d' Hb S hétérozygotes associée avec une  $\alpha$ -thalassémies
- Figure 38 :** Tracé électrophorétique d'une hétérozygotie composite S/C.
- Figure 39 :** Profil électrophorétique d'un sang avec hémoglobinose C hétérozygote
- Figure 40 :** Tracé électrophorétique d'une hémoglobinose C homozygote
- Figure 41:** Tracé électrophorétique d'une hémoglobinose O-Arabe homozygote
- Figure 42 :** Tracé électrophorétique d'une hémoglobinose O-Arabe hétérozygote
- Figure 43 :** Tracé électrophorétique d'hémoglobine E

**Figure 44 :** Schéma simplifié de la chromatographie

**Figure 45 :** Schéma d'un chromatographe de CLHP

**Figure 46 :** Profil chromatographique d'un patient homozygote S/S en CLHP par échange de cations (à gauche) et en CLHP en phase inverse (à droite)

**Figure 47 :** Test de solubilité de l'hémoglobine S (test d'Itano)

**Figure 48 :** test de Kleihauer

**Figure 49 :** Principe de la cytométrie en flux

**Figure 50 :** Aspect en balle de golf de l'hémoglobine H

**Figure 51 :** Corps de Heinz spontanés (Témoin négatif à gauche, Patient malade à droite)

**Figure 52 :** Recherche positive de corps de Heinz provoqués

**Figure 53:** Principes de base de microréseaux CGH

## Liste des tableaux

**Tableau I** : hémoglobines normales exprimées au cours de la vie

**Tableau II** : classification génotypique et phénotypique des  $\alpha$ -thalassémies

**Tableau III** : Nomenclature des principales hémoglobines anormales par ordre alphabétique

**Tableau IV** : Caractéristiques clinico-biologiques des  $\beta$ -thalassémies

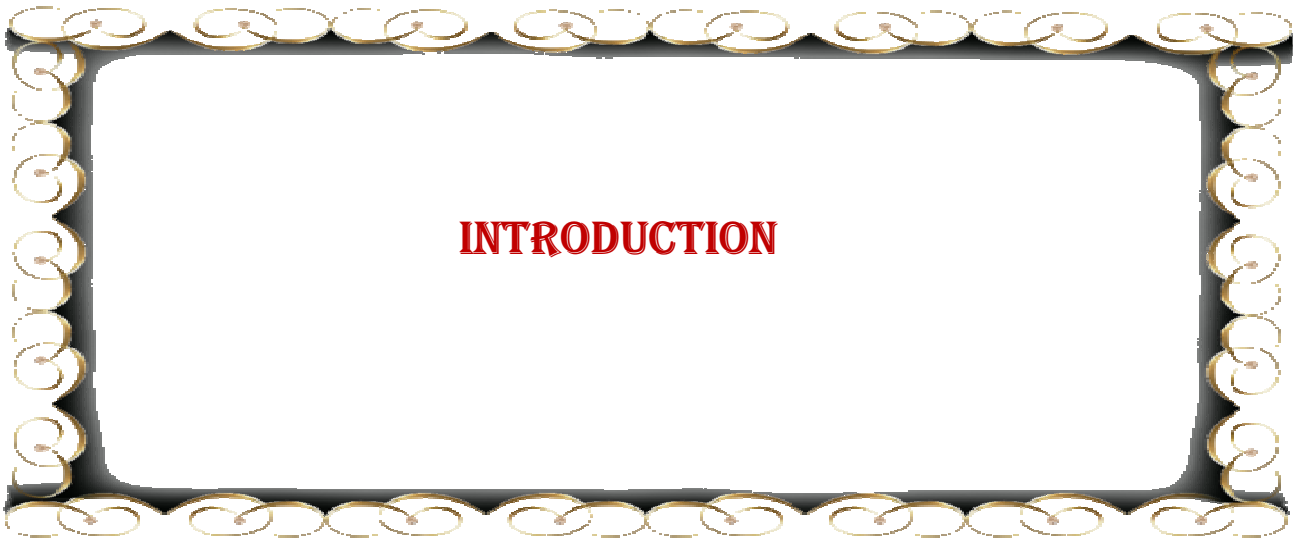
**Tableau V** : Valeurs de référence de la numération globulaire et des paramètres érythrocytaires en fonction de l'âge et sexe



## **SOMMAIRE**

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>LES HEMOGLOBINES NORMALES .....</b>	<b>3</b>
<b>ET HEMOGLOBINOPATHIES.....</b>	<b>3</b>
<b>I. LES HEMOGLOBINES .....</b>	<b>4</b>
1. <i>Structure de l'hémoglobine .....</i>	4
2. <i>l'hème.....</i>	5
3. <i>La globine.....</i>	6
4. <i>Fonction de l'hémoglobine.....</i>	7
5. <i>Génétique, biosynthèse et ontogénie .....</i>	10
<b>II. LES HEMOGLOBINOPATHIES .....</b>	<b>15</b>
A. <i>Définition et classification.....</i>	17
B. <i>Bases moléculaires.....</i>	20
C. <i>Physiopathologie.....</i>	25
D. <i>Epidémiologie .....</i>	34
1. <i>Les hémoglobines anormales .....</i>	35
2. <i>Les thalassémies.....</i>	38
E. <i>Symptomatologie clinique .....</i>	39
F. <i>Autres anomalies .....</i>	48
<b>TECHNIQUES D'ETUDE DE.....</b>	<b>53</b>
<b>L'HEMOGLOBINE .....</b>	<b>53</b>
<b>I. QUAND RECHERCHER UNE ANOMALIE DE L'HEMOGLOBINE ? .....</b>	<b>54</b>
A. <i>Circonstances du diagnostic.....</i>	54
B. <i>Les signes d'appel .....</i>	55
C. <i>Enquête biologique .....</i>	56
<b>II. STRATEGIE D'ETUDE DE L'HEMOGLOBINE .....</b>	<b>61</b>
A. <i>Techniques d'étude séparatives.....</i>	62
B. <i>Techniques d'étude non séparatives .....</i>	88

C. <i>Analyse d'ADN des variants d'hémoglobine et thalassémies</i> .....	96
<b>III. MOYENS THERAPEUTIQUES</b> .....	100
1. <i>Conseil génétique</i> .....	100
2. <i>Traitement de la drépanocytose</i> .....	101
3. <i>Traitement des thalassémies</i> .....	102
4. <i>Traitement des Hémoglobines instables</i> .....	103
<b>IV. RECOMMANDATION POUR UNE MEILLIEUR ANALYSE DE L'HEMOGLOBINE</b> .....	103
<b>CONCLUSION</b> .....	106
<b>RESUMES</b> .....	108
<b>REFERENCES</b> .....	112



Les hémoglobinopathies correspondent aux anomalies qui touchent la partie protéique de l'hémoglobine (Hb) [1]. Affections héréditaires, Avec plus de 300 000 naissances d'individus affectés par an, les anomalies qualitatives et quantitatives de l'hémoglobine figurent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Historiquement limitées à certaines régions du globe (Afrique et Asie principalement), elles se sont rapidement étendues aux pays occidentaux, en particulier dans les grands centres urbains, en raison des différents flux migratoires observés ces dernières décennies[2].

Il faut distinguer deux grands groupes d'anomalies de l'Hb :

- Les anomalies de structure des chaînes protéiques de globine, comme les Hb S,C et E, parmi les plus fréquentes ; plus de 900 variants de l'hémoglobine sont actuellement répertoriés.
- Les anomalies de synthèse des chaînes de globine, responsables des thalassémies et des persistances héréditaires de l'hémoglobine fœtale (PHHF) [3].

Un diagnostic précoce de certaines de ces anomalies permet une prise en charge précoce et une amélioration considérable de la qualité de vie des patients. Différentes techniques d'étude de l'Hb ont été développées dans le passé, telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin et l'électrophorèse en gel d'agarose à pH acide. Cependant, en raison du manque de sensibilité de ces dernières, d'autres techniques ont été mises au point pour le diagnostic des anomalies de l'Hb. Ainsi, la chromatographie liquide de haute performance a contribué à l'identification plus rapide d'un grand nombre de variants de l'Hb et à une quantification plus précise de l'hémoglobine A2 (HbA2) et de l'hémoglobine F (HbF). Une quantification précise de ces deux fractions, présentes en faible concentration, est en effet nécessaire pour établir une orientation diagnostique[4].

Les objectifs recherchés à travers ce travail sont notamment de :

- Réaliser une revue des connaissances du domaine des Hb humaines normales, et les caractéristiques principales des hémoglobinopathies les plus courantes.
- Définir les différentes techniques d'étude de l'Hb pour le diagnostic et la prise en charge des hémoglobinopathies décrites dans la littérature scientifique.



**LES HEMOGLOBINES NORMALES  
ET HEMOGLOBINOPATHIES**

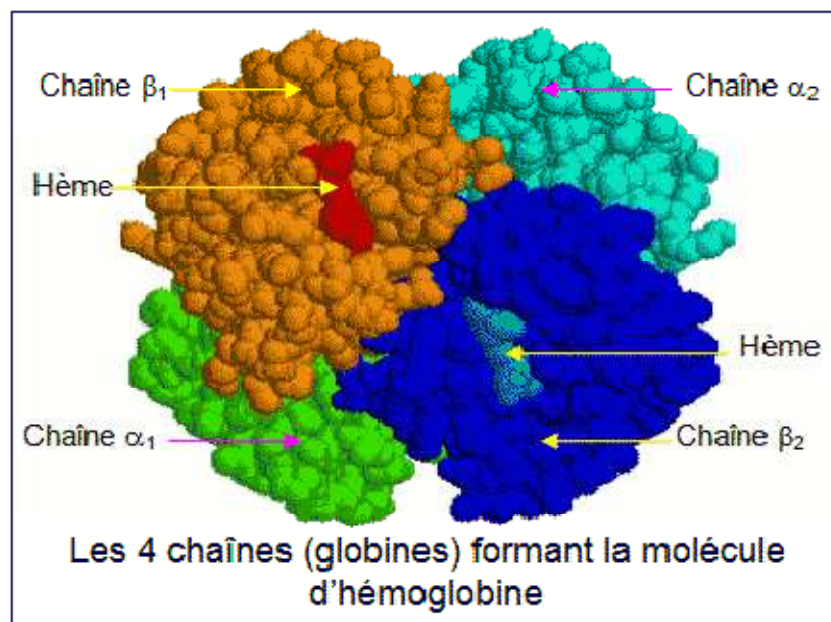
# I. LES HEMOGLOBINES

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

- La structure tétramérique de la molécule d'Hb ( $\alpha_2\beta_2$ ) ;
- Ses relations avec la fonction oxyphorique et le caractère coopératif de celle-ci ;
- L'expression des différentes Hb au cours du développement ontogénique ;
- L'organisation des gènes de l'Hb et de ses principales régions régulatrices.

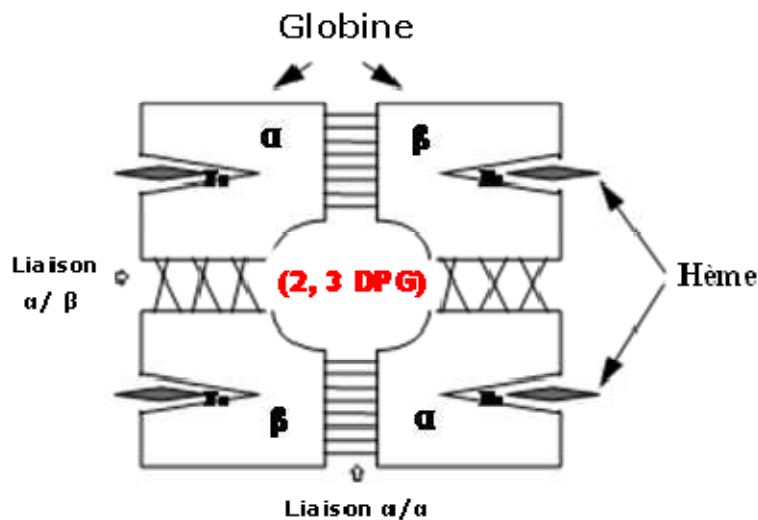
## 1. Structure de l'hémoglobine

Les Hb humaines sont des tétramères d'environ 65 KDa ; constitués de 4 sous unités : les globines, identiques deux à deux (2 chaînes de type  $\alpha$  et 2 chaînes de type non- $\alpha$ ), de nature protéique. Dans chacune de ces chaînes de globine se trouve un groupement prosthétique appelé hème, logé dans une poche hydrophobe. Grâce à ses 4 sous unités, une molécule d'Hb peut fixer 4 molécules d'oxygène (**figure 1**)[5].



**Figure1:** Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte [5].

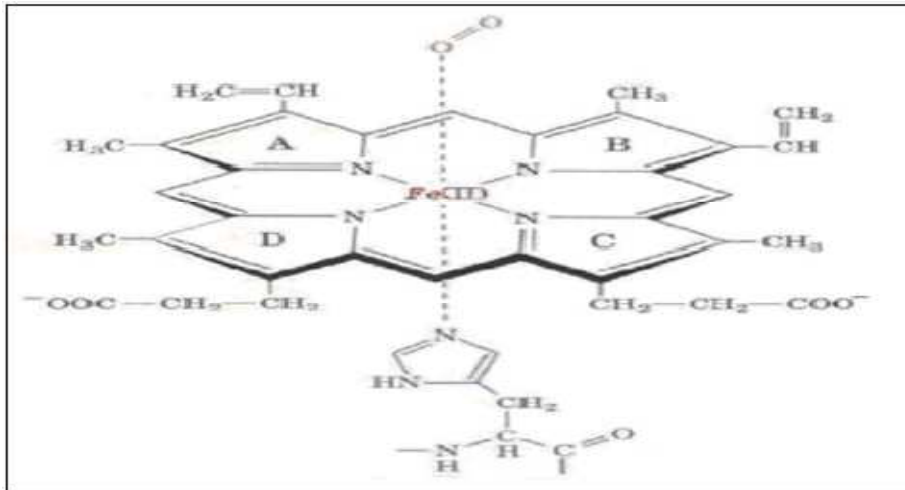
Le contact entre les chaînes de globine, au niveau de la cavité centrale, est établi par l'intermédiaire d'une molécule de 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) qui stabilise la configuration désoxygénée (figure 2).



**Figure 2 :** Schéma de la molécule d'hémoglobine adulte A [5].

## 2. l'hème

C'est une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer, c'est le site de fixation de l'oxygène. En effet, dans la forme oxygénée de l'Hb, le fer a l'état  $Fe^{2+}$  présente six liaisons de coordinance : quatre interviennent dans la structure de l'hème, la cinquième amarre l'hème à la globine au niveau de l'histidine F8 (histidine proximale) et la sixième fixe la molécule d'oxygène entre l'histidine E7 (dite histidine distale) et la valine E11. La forme oxydée  $Fe^{3+}$  est impropre au transport de l'oxygène car la sixième position de coordinance de l'ion ferrique est occupée de façon stable par une molécule d'eau à pH acide, ou par un radical hydroxyle à pH plus alcalin. Cette forme caractérise la méthémoglobine[5].

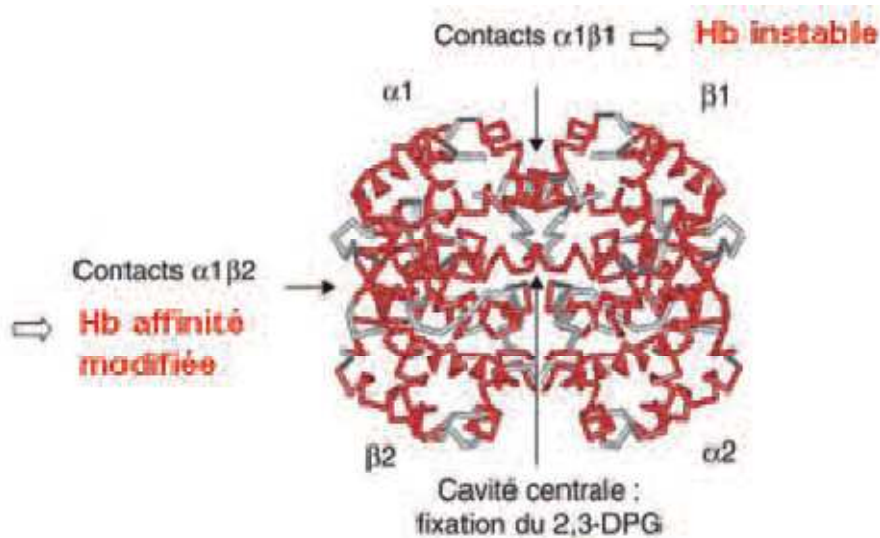


**Figure 3** : Structure de l'hème (Diakité, 2005)

### 3. La globine

La globine constitue la partie protéique de l'Hb. C'est un ensemble de quatre chaînes polypeptidiques, identiques deux à deux.

L'Hb présente une structure primaire définie par la séquence en acides aminés des chaînes de globine, une structure secondaire (alternance d'hélices alpha et non-alpha), une structure tertiaire définie par l'arrangement tridimensionnel du monomère de globine qui permet de délimiter une poche à hème, et une structure quaternaire définie par les interactions entre les monomères au sein du tétramère. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont assemblées entre elles par des liaisons fortes (liaison  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 2$ ) et par des liaisons faibles (liaisons  $\alpha 1\beta 2$  et  $\alpha 2\beta 1$ ), les premières jouant un rôle essentiel dans la stabilité de la molécule et les secondes dans le processus de transition allostérique. En fonction de leur localisation, des mutations concernant des acides aminés impliqués dans les liaisons entre monomères sont responsables d'Hb dites instables et/ ou ayant une affinité modifiée pour l'oxygène (**figure 4**) [6].



**Figure 4 :** Représentation de la structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte (HbA) et de ses principales régions fonctionnelles. En rouge, sont indiquées les conséquences physiopathologiques de différents variants [6].

## 4. Fonction de l'hémoglobine

La fonction principale de l'hémoglobine est de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus et de faciliter l'élimination du CO<sub>2</sub>.

### 4.1. Transport d'O<sub>2</sub>

La structure de l'Hb se modifie au cours de la fixation et de la libération de l'oxygène. L'efficacité du transport de l'oxygène peut être mesurée par la courbe d'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène : cette courbe a une allure sigmoïde en raison du caractère allostérique de l'Hb et de la coopérativité des globines dans la cinétique de fixation de molécules additionnelles (**figure 5**). Selon le modèle allostérique de Monod, Wyman et Changeux, l'Hb existe sous deux formes en équilibre : l'une relâchée ou forme R à forte affinité pour l'oxygène, l'autre contrainte ou forme T, à affinité plus faible. La fixation

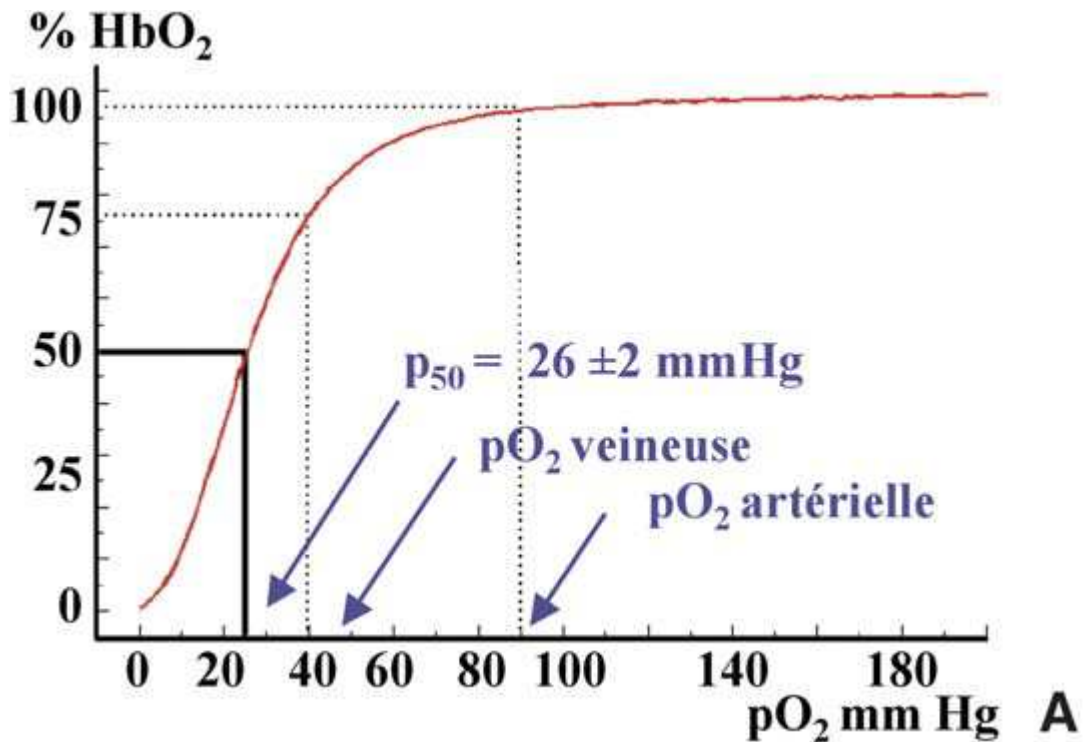
d'oxygène sur une des sous-unités de la molécule entraîne la transition concertée des autres sous-unités du tétramère vers la forme R [7].

La poche centrale située entre les quatre sous-unités joue un rôle important, car c'est à ce niveau que vient se fixer à l'état désoxygéné le 2,3-DPG. L'affinité pour l'O<sub>2</sub> est ainsi réglée, avec une libération du 2,3-DPG et contraction de la poche centrale au cours de la fixation de l'O<sub>2</sub> sur les quatre molécules de l'hème.

Tout se passe comme s'il existait une compétition au niveau de l'Hb entre l'O<sub>2</sub> et le 2,3-DPG.

Un déficit en DPG ou une mutation (entraînant une anomalie de l'Hb au niveau du site de fixation du DPG dans la poche centrale) conduit aussi à une affinité anormale de l'Hb pour l'O<sub>2</sub> qui est mal libéré dans les tissus.

Le pH est aussi un facteur influant sur l'affinité de l'O<sub>2</sub> car, sa baisse modifie les liaisons ioniques à l'intérieur de la molécule d'Hb et diminue l'affinité de l'Hb pour l'O<sub>2</sub>. Théoriquement ceci conduit à une meilleure oxygénation tissulaire et l'inverse est vrai de l'élévation du pH[8].

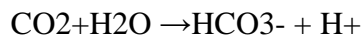


**Figure 5 :** Courbe de saturation de l'hémoglobine [5].

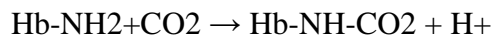
#### 4.2. Transport du CO<sub>2</sub>

L'Hb fixe le CO<sub>2</sub>, non sur le fer comme l'O<sub>2</sub>, mais plutôt sur des groupes aminés latéraux de la globine pour constituer la carbaminohémoglobine (carbHb). Une partie du CO<sub>2</sub> (environ 40%) est transportée sous cette forme.

Le CO<sub>2</sub> libéré par les tissus est peu soluble. Cette solubilité augmente lorsqu'il se combine à l'eau pour former l'ion bicarbonate en libérant un proton.



En outre, l'Hb désoxygénée fixe environ 10% du CO<sub>2</sub> grâce à la carbamation De l'extrémité N des chaînes de l'Hb [9].



#### 4.3. Effet Bohr

L'oxygénation des chaînes libère des ions H<sup>+</sup> lors de la rupture de leurs ponts salins, et en fixe lors de la reconstitution de ces ponts salins quand l'O<sub>2</sub> est libéré. L'Hb réduite est

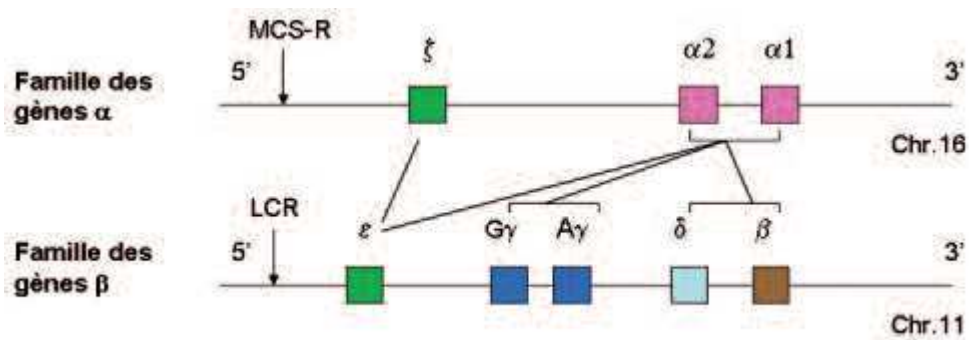
donc un meilleur tampon des ions  $H^+$  que  $HbO_2$ , et réciproquement un environnement acide à tendance à consolider l' $Hb$  aux dépens de la forme  $HbO_2$  de la molécule. Pour chaque mmol d' $O_2$  libérée, 2,4mEq de  $H^+$  peuvent ainsi être fixés ; l'effet étant maximal à des pH situés entre 6,9 et 7,4. En soustrayant des protons au milieu local, la réaction favorise la formation de  $HCO_3^-$  aux dépens de  $H_2CO_3$ . Cette coopérativité entre libération d' $O_2$  et tamponnement d'une partie de la charge acide provenant du métabolisme des cellules est appelée effet Bohr[9].

## 5. Génétique, biosynthèse et ontogénie

### 5.1. Gènes de l'hémoglobine

Les chaînes de type  $\alpha$  correspondent à des chaînes polypeptidiques de 141 résidus dont la synthèse est sous le contrôle de gènes situés sur le chromosome 16. Les chaînes de type  $\beta$  (auxquelles se rattachent les chaînes  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ) comportent 146 résidus et dépendent de gènes situés sur le chromosome 11 [1].

L'organisation des familles des gènes  $\alpha$  et  $\beta$ -globine est présentée schématiquement dans la figure 6.



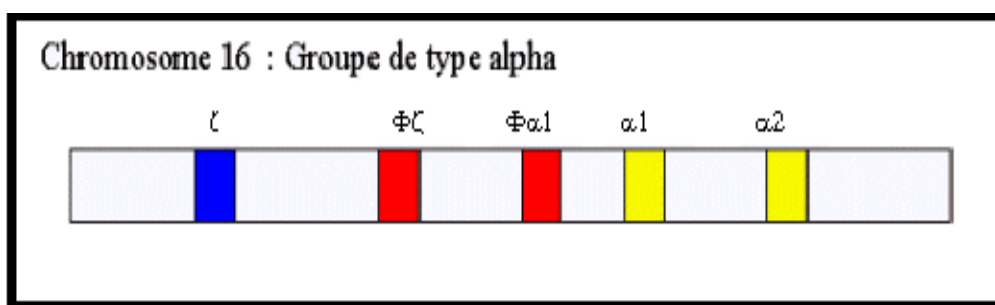
**Figure 6 :** Structure et organisation des deux familles de gènes de globine [8].

### 5.1.1. Groupe des gènes de type $\alpha$

Les gènes de type  $\alpha$  sont regroupés sur le chromosome 16, au niveau de la partie terminale du bras court.

La famille  $\alpha$  comporte 3 gènes fonctionnels : le gène  $\zeta$  code pour la chaîne embryonnaire  $\zeta$ , et précède les deux gènes des chaînes  $\alpha$  :  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ .

Les gènes  $\psi\zeta$ ,  $\psi\alpha 1$  et  $\psi\alpha 2$  sont, quant à eux, des pseudogènes non fonctionnels (**figure7**). Les gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  codent tous deux pour la même chaîne de globine  $\alpha$ , et ce de manière équivalente : en effet, l'ARNm du gène  $\alpha 2$ , transcrit en plus grande quantité du fait de la meilleure efficacité de son promoteur, contre balance la traduction plus active de l'ARNm du gène  $\alpha 1$  [10].

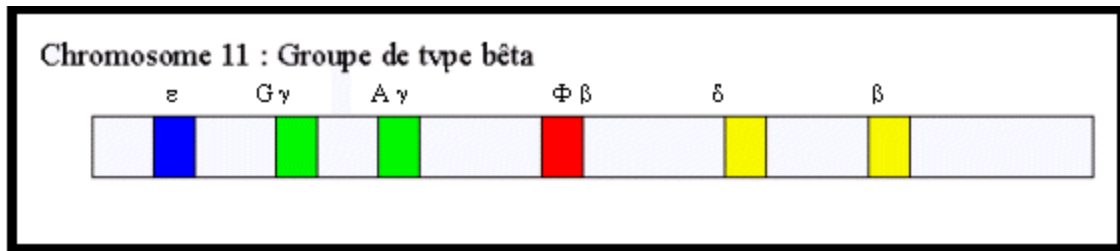


**Figure7** : Les gènes embryonnaires sont représentés en bleu, les gènes adultes en jaune et les pseudogènes en rouge : on trouve de gauche à droite les gènes  $\zeta$  en bleu,  $\psi\zeta$  et  $\psi\alpha 1$  en rouge et  $\alpha 2$  puis  $\alpha 1$  en jaune [10].

### 5.1.2. Groupes de gènes de type $\beta$

Les gènes de type  $\beta$  se trouvent à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11 (**Figure8**).

La famille  $\beta$  compte 5 gènes fonctionnels : le gène de la chaîne embryonnaire  $\epsilon$ , qui est suivi par les deux gènes des chaînes fœtales  $\gamma$  ( $G\gamma$  et  $A\gamma$ ), puis par les deux gènes des chaînes adultes  $\delta$  et  $\beta$  [10].



**Figure 8 :** Les gènes embryonnaires sont représentés en bleu, les gènes fœtaux en vert, les gènes adultes en jaune et les pseudogènes en rouge : on trouve de gauche à droite les gènes  $\epsilon$  en bleu,  $G\gamma$  et  $A\gamma$  en vert,  $\psi\beta$  en rouge,  $\delta$  et  $\beta$  en jaune [10].

## 5.2. Activation ontogénique et biosynthèse

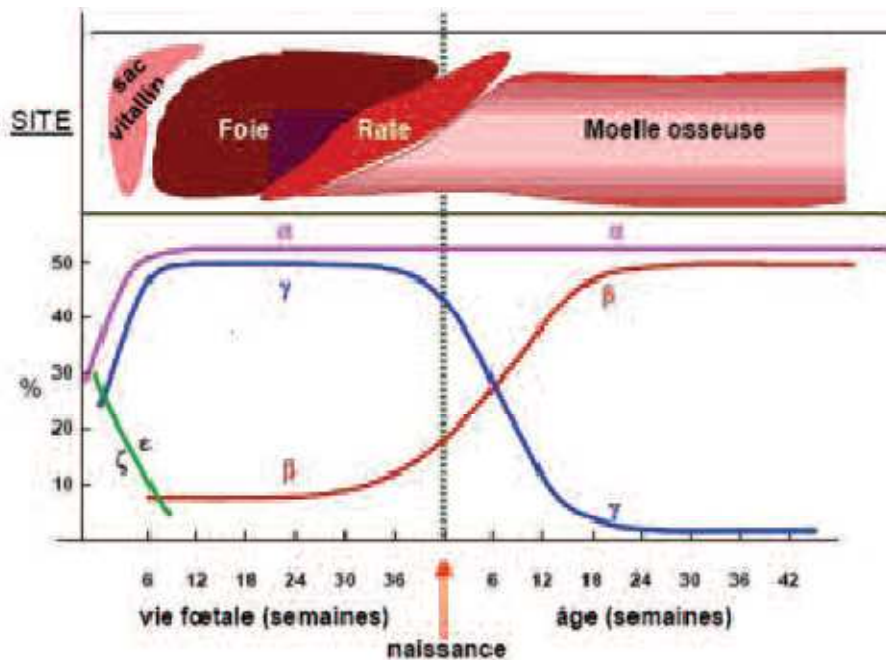
Pendant l'ontogénie, deux commutations (Switch) interviennent (**figure 9**). Elles correspondent à des changements de stade de développement du fœtus et de lieux d'érythropoïèse. La première commutation survient lors du passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale et la seconde pour la transition de la vie fœtale à la vie adulte, c'est-à-dire au moment de la naissance [11].

Chez l'embryon, il existe simultanément trois Hb à chaînes zêta, alpha, epsilon et gamma : l'Hb Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), l'Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) et l'Hb Portland 1 ( $\zeta_2\alpha_2$ ). Les chaînes  $\epsilon$  et  $\zeta$  sont spécifiques de la vie embryonnaire et la chaîne  $\zeta$  présente une structure très proche de celle de la chaîne  $\alpha$ . A la fin du stade embryonnaire, l'expression du gène  $\epsilon$  est remplacée par celle des gènes fœtaux  $\gamma$  et l'expression du gène  $\zeta$  est remplacée par celle des gènes  $\alpha$ .

L'HbF est alors détectable à partir de la cinquième semaine de vie intra-utérine et elle constituera la protéine hémoglobinique principale de la vie fœtale. Entre la huitième et la dixième semaine, son taux atteint 90 % pour ensuite légèrement diminuer jusqu'à la naissance où elle représente environ 80 % de l'Hb totale. La seconde commutation, qui a lieu à la fin de la vie fœtale, conduit alors au remplacement des chaînes  $\gamma$  par les chaînes  $\beta$ . La synthèse des chaînes  $\beta$  commence en effet très lentement dès le dernier trimestre de gestation.

Ainsi, durant la vie fœtale, l'HbA représente 5 à 10 % de l'Hb totale. Après la naissance, la synthèse des chaînes  $\beta$  augmente rapidement et l'HbA prend une place prépondérante. A l'âge de 2 ans, le profil hémoglobinique de l'adulte est atteint et l'HbA représente alors plus de 95 % de la totalité des Hb. Il existe également un constituant mineur :

l'HbA<sub>2</sub>, dont le taux est environ de 2,5 % et qui est détectable dès le troisième mois de naissance. Chez l'adulte sain, il est également possible de détecter des traces d'HbF (< 1 %). Cette faible fraction d'HbF présente à l'âge adulte est liée à une synthèse limitée dans un nombre restreint d'hématies appelées cellules F[1, 2,12].



**Figure 9** : Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours du développement humain [8].

Une mutation de l'un des gènes codant pour les chaînes de globine peut aboutir à une hémoglobinopathie, correspondant soit à une anomalie qualitative soit à une anomalie quantitative de l'Hb [13].

### 5.3. Hémoglobines normales exprimés au cours de la vie :(tableau I)

La proportion des différentes Hb évolue en fonction du changement de lieu de l'érythropoïèse dans les étapes successives de la vie :

#### a) *Chez l'embryon*

L'érythropoïèse a lieu dans le sac vitellin. Il y a coexistence de 2 chaînes de type : dans l'ordre d'apparition la chaîne  $\zeta$  puis la chaîne  $\alpha$  retrouvée à l'âge adulte, et de 2 chaînes de type  $\beta$  : les chaînes  $\epsilon$  et  $\gamma$ .

De ce fait, il existe 3 types d'hémoglobines embryonnaires :

- ✓ L'Hb Gower 1 :  $\zeta_2\epsilon_2$
- ✓ L'Hb Gower 2 :  $\alpha_2\epsilon_2$
- ✓ L'Hb Portland :  $\zeta_2\gamma_2$

#### b) *Chez le fœtus*

Chez le fœtus, c'est au niveau du foie et de la rate que se déroule l'érythropoïèse.

A partir du 37ème jour apparaît l'HbF ou fœtale:  $\alpha_2\gamma_2$ , dont les proportions vont atteindre 90% entre la 8ème et la 10ème semaine de grossesse puis rester constantes jusqu'à la naissance.

La synthèse de l'hémoglobine adulte HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) débute mais à taux faible.

#### c) *Chez l'adulte*

Ici la synthèse des Hb se déroule dans la moelle osseuse.

L'enfant atteint son profil hémoglobinique adulte vers l'âge de 6 mois, et on retrouve:

- ✓ L'HbA, qui représente plus de 97 % de l'Hb. L'Hb A est en réalité constituée de l'Hb A0 (constituant majeur) et de l'Hb A1, forme obtenue par glycation.
- ✓ L'HbA2 :  $\alpha_2\delta_2$ , qui représente 2,2 à 3,2 % de l'Hb, sa synthèse débute dans la période néonatale.
- ✓ L'HbF qui demeure à l'état de traces (<1%) [12].

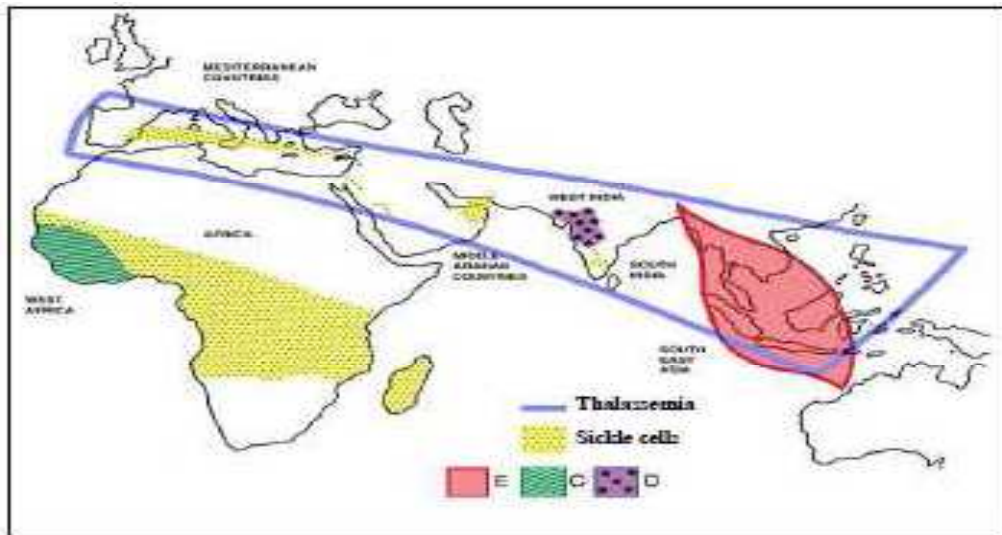
**Tableau I : hémoglobines normales exprimées au cours de la vie [12].**

Age	Types d'hémoglobines rencontrées	Proportion des différentes hémoglobines	Chaînes de globine
Adulte	Hb A	97 %	$\alpha_2\beta_2$
	Hb A <sub>2</sub>	2,2 – 3,2 %	$\alpha_2\delta_2$
	Hb F	< 1 %	$\alpha_2\gamma_2$
Fœtus	Hb F	80 – 95 %	$\alpha_2\gamma_2$
	Hb A	5 – 20 %	$\alpha_2\beta_2$
Embryon	Hb Gower 1		$\zeta_2\varepsilon_2$
	Hb Gower 2		$\alpha_2\varepsilon_2$
	Hb Portland		$\zeta_2\gamma_2$

## II. LES HEMOGLOBINOPATHIES

Les hémoglobinopathies peuvent être classées en trois grandes catégories :

- Anomalies quantitatives de synthèse de l'Hb : production structurellement normale mais diminué de chaînes de globine (syndrome de thalassémie).
- Trouble (qualitative) dans la structure de l'Hb : production de chaînes de globine structurellement anormales telles que l'Hb S, C, O, ou E. le syndrome drépanocytaire est l'exemple le plus courant d'une telle maladie.
- Défaut de transformer la chaîne de globine synthétisée après la naissance, par exemple, persistance héréditaire de l'Hb F, qui est une affection relativement bénigne. Il peut coexister avec la thalassémie ou la drépanocytose et entrainera une diminution de gravité de ces maladies (effet protecteur) [14].



**Figure 10** : Répartition géographique des principales hémoglobinopathies (d'après Sébia : Electrophorèse des hémoglobines) [14].

Les hémoglobinopathies sont transmises dans un mode autosomique récessif. Par conséquent, les transporteurs qui ont un chromosome affecté et un chromosome normale sont généralement en bonne santé ou légèrement anémique. Lorsque les deux parents sont porteurs, leurs enfants ont 25% de chance d'être normale, une chance d'être affecté de 25 % par la maladie, et un risque d'être porteur de 50 %. Les hémoglobinopathies sont causées par une mutation des gènes codant pour la synthèse de globine. Les mutations peuvent perturber l'expression du gène, causant moins de production de chaîne de globine  $\alpha$ - ou  $\beta$ - (thalassémie) ou mutation ponctuelle du gène dans la région codante (exons), ce qui peut entraîner la production de globine défectueux qui conduit a la formation de l'Hb anormale (les variants de l'Hb) [14].

## **A. Définition et classification**

### **1. Anomalies structurales de la protéine**

Les Hb anormales sont la conséquence d'une mutation généralement ponctuelle dans l'un des gènes codant une chaîne spécifique. Plus de 900 variants ont été répertoriés à l'heure actuelle. Seuls un tiers d'entre eux ont des répercussions cliniques, la mutation intervenant dans une zone critique pour le fonctionnement de la molécule [15].

Trois Hb anormales occupent une place prépondérante de par leur fréquence et leur caractère pathogène : HbS, HbE, et HbC.

Les Hb anormales peuvent être classés en 4 groupes :

- Les mutants qui sont à l'origine de problèmes de santé publique majeurs. Il s'agit surtout des HbS dans la population africaine et des HbE dans les populations du Sud-Est asiatique ;
- Les variants plus rares, mais présents dans les populations où l'HbS a une forte prévalence. C'est le cas des HbC, O-Arab et D-Punjab, qui par elles-mêmes n'ont qu'un effet pathogène minime, mais qui, associées à l'HbS, conduisent à des syndromes drépanocytaires majeurs ;
- Les variants rares, à l'origine des désordres hématologiques variés : Hb instables (qui sont la cause d'anémie hémolytiques chroniques), Hb hyperaffines (responsables de polyglobulies), Hb hypoaffines (responsables d'anémies avec cyanose), HbM (cause de méthémoglobinémies) ;
- Les polymorphismes ou les mutations privées, habituellement totalement silencieux sur le plan clinique. Ils ont été découverts lors d'études systématiques de population ou parce qu'ils interfèrent avec le dosage de l'Hb glyquée. Ces mutants doivent être caractérisés et rapportés dans les banques de données pour éviter qu'ils ne soient confondus avec des mutants aux conséquences cliniques sévères [16].

## 2. Anomalies de synthèse des chaînes de globine : les thalassémies

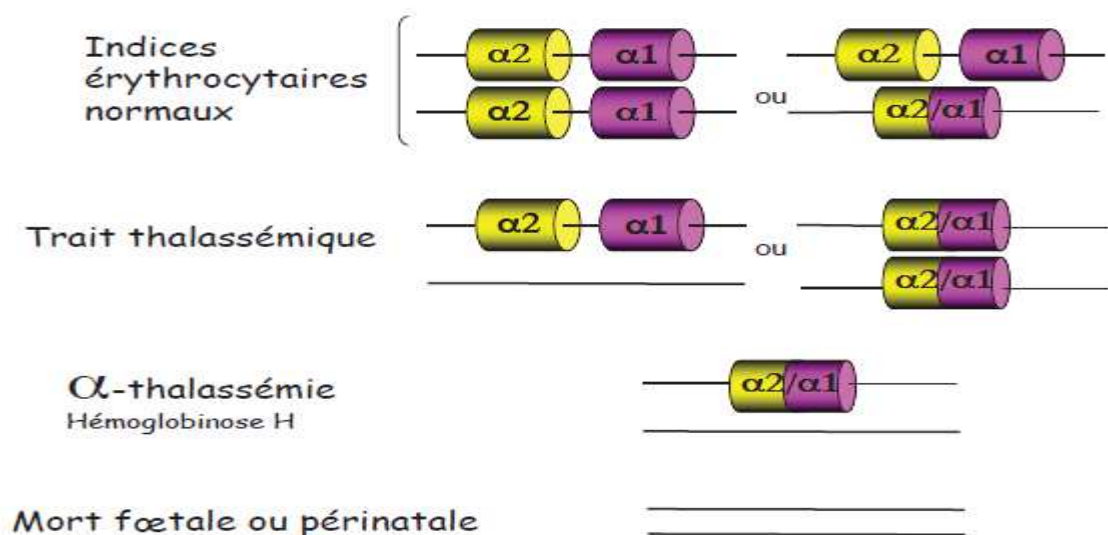
Les thalassémies (anémie méditerranéenne) sont des maladies génétiques de transmission autosomique récessive dues à des anomalies quantitatives de production d'Hb par défaut de gènes codant pour la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'Hb [17].

Les thalassémies sont nommées en fonction de la chaîne de globine affectée : l' $\alpha$ -thalassémie met en jeu la chaîne  $\alpha$ , tandis que la  $\beta$ -thalassémie met en jeu la chaîne  $\beta$  [18]. Les  $\alpha$ - et  $\beta$ -thalassémies étant les plus fréquemment décrites. Celles-ci sont particulièrement fréquentes dans les pays infestés par le paludisme. En effet, les personnes présentant un trait thalassémique sembleraient protégées contre les formes graves de paludisme.

### 2.1. Les $\alpha$ -thalassémies

Elles sont le plus souvent la conséquence d'une délétion ou d'une mutation d'un ou de plusieurs gènes  $\alpha$  (**Figure 11**).

Le sujet normal a deux gènes  $\alpha$  sur chaque chromosome 16, donc quatre gènes  $\alpha$  fonctionnels. La plupart des  $\alpha$ -thalassémies sont expliquées par des délétions d'un ou de deux gènes  $\alpha$ . L'inactivation d'un, deux, trois ou quatre gènes  $\alpha$  va se traduire par des tableaux cliniques différents[19].



**Figure 11** : Les différents génotypes associés au locus  $\alpha$  [20].

Il existe principalement deux types d'anomalies génétiques :

- L' $\alpha$ -thalassémie-1, causée par l'absence de deux gènes  $\alpha$  sur le chromosome 16 ;
- L' $\alpha$ -thalassémie-2, causée par la délétion d'un seul gène  $\alpha$  sur le chromosome 16 ;

Suivant les cas de gravité, l'on pourrait avoir quatre classes :

**Tableau II : classification génotypique et phénotypique des  $\alpha$ -thalassémies [21]:**

Classe	Phénotypes	Génotypes	Gènes inactivés	Signes	Répartition
1	$\alpha$ -T-2 hétérozygote	(- $\alpha/\alpha$ $\alpha$ )	1	Microcytose	Afrique
2	$\alpha$ -T-2 homozygote $\alpha$ -T-1 hétérozygote	(- $\alpha/-$ $\alpha$ ) (- $-/\alpha$ $\alpha$ )	2	Microcytose	Afrique Asie
3	Hémoglobinoses H	(- $\alpha/-$ -)	3	sévère	Asie
4	A-T-1 homozygote Hydrops foetalis	(- $-/-$ -)	4	Létale	Asie

$\alpha$ -T-1 :  $\alpha$ -thalassémie-1

$\alpha$ -T-2 :  $\alpha$ -thalassémie-2

## 2.2. Les $\beta$ -thalassémies

La  $\beta$ -thalassémie est provoquée par des mutations affectant les gènes  $\beta$ -globines sur le chromosome 11. Ces mutations peuvent se traduire en une chute ( $\beta^+$ ) ou en une absence ( $\beta^0$ ) de production de  $\beta$ -globine. En présence d'une  $\beta$ -thalassémie, les chaînes  $\beta$  de la globine sont structurellement normales, ce n'est que leur quantité qui est réduite (tout comme les chaînes  $\alpha$  de la globine dans le cas de l' $\alpha$ -thalassémie)[18].

## **B. Bases moléculaires**

### **1. Les anomalies structurales de la protéine**

Les mécanismes génétiques des hémoglobinopathies sont multiples. La simple mutation d'une base de l'ADN codant pour la chaîne de la globine par une autre est le phénomène le plus fréquent. Dans la plupart des cas, cette mutation aboutit à la substitution d'un acide aminé par un autre dans la chaîne protéique synthétisée. Cela conduit soit à des **variants de surface** ou à des **Hb anormales** en rapport avec une mutation affectant des résidus à l'intérieur de la molécule (**figure 12**).

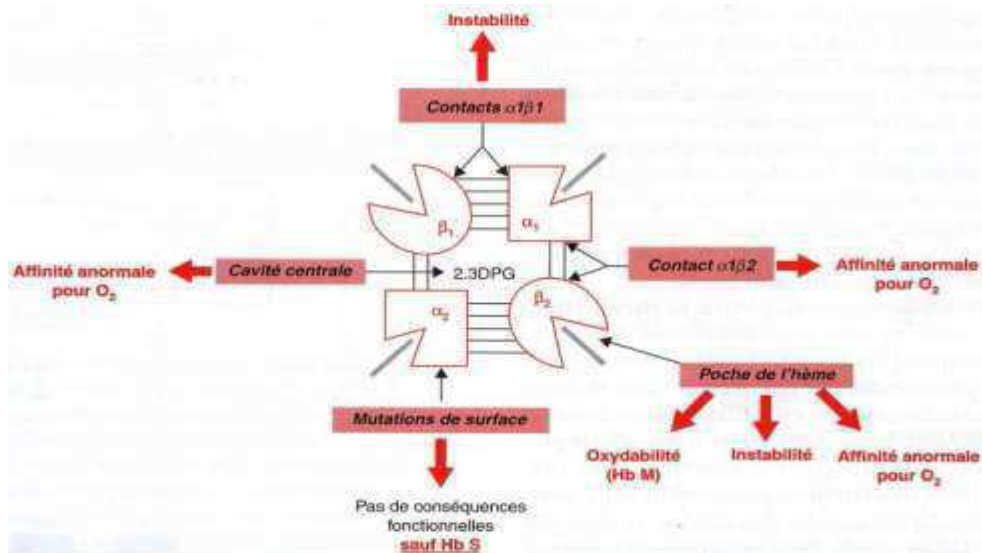
Certaines Hb anormales sont la conséquence de deux mutations affectant le même gène (cas de l'Hb C Harlem, pour laquelle les deux substitutions concernent les acides aminés en position 6 et 73).

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

En ce qui concerne les mutations affectant les résidus internes de la molécule, elles peuvent avoir des localisations différentes et sont responsables de désordres en rapport avec la fonction oxyphorique et la transition conformationnelle qui l'accompagne. Il s'agit notamment :

- **Des Mutations de la poche de l'hème** : C'est le cas par exemple des hémoglobines M, où le fer de l'hème est oxydé en Fe<sup>3+</sup>. Il en résulte une cyanose due à une modification des propriétés spectrales de l'Hb.
- **Des Mutations des zones de contact** :  $\alpha 1\beta 1$ , responsables d'une Hb instable ou  $\alpha 1\beta 2$  produisant une Hb à affinité modifiée pour l'oxygène.
- **Des Mutations de la cavité centrale** : Elles peuvent toucher les résidus de la cavité centrale, l'extrémité des chaînes polypeptidiques impliquées dans les ponts salins qui stabilisent la forme désoxygénée de la molécule, ou encore les sites de fixation du 2,3-DPG. Chez ces variants, l'affinité pour l'oxygène est le plus souvent augmentée.

D'autres variants sont caractérisés par un allongement de la chaîne polypeptidique du fait d'une mutation du codon de terminaison ou entraînant un décalage de la phase de lecture peu avant celui-ci [22, 23].



**Figure 12:** Topographie des mutations sur le tétramère de globine [10].

Avant de débiter la description des principales Hb anormales, il est important d'en avoir une vision globale et d'en connaître la nomenclature par ordre alphabétique, dont l'origine vient de leur profil de migration en électrophorèse à pH alcalin (**Tableau III**).

**Tableau III : Nomenclature des principales hémoglobines anormales par ordre alphabétique [24].**

Nom de l'hémoglobine	Mutation décrite ou caractéristiques
Hb A	Hb adultes (A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> , A <sub>1c</sub> , A <sub>2</sub> ..)
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

Les Hb sont nommées par une lettre ou par un nom, le plus souvent correspondant au lieu où la première Hb de ce nom a été décrite. Cette lettre peut correspondre à un variant bien précis, comme l'Hb S ou l'Hb C, mais elle peut aussi englober une famille de variants, caractérisée par le fait que la mutation porte sur la famille de gènes α ou β, et par une migration particulière en électrophorèse à pH alcalin.

A présent, nous allons décrire les Hb anormaux qui nous ont semblés les plus pertinents.

## **2. Anomalies de synthèse des chaînes de globine : les thalassémies**

### **2.1. Les α-thalassémies**

Le mécanisme moléculaire le plus souvent incriminé est la délétion des gènes α. Des mutations ponctuelles affectant la transcription ou la traduction de la chaîne α ont été aussi décrites.

- Délétion des gènes :

Il existe entre les gènes  $\psi\alpha 1$  et  $\alpha 1$  des zones d'homologie appelées X, Y et Z. Celles-ci comportent à leur proximité plusieurs courtes séquences répétitives dites Alu, connues comme « points chauds » de recombinaisons géniques.

Les séquences Alu favorisent des mécanismes d'échange de matériel génétique entre chromosome lors de la méiose. Elles facilitent des crossing over non homologues, qui se traduisent par la perte d'un ou deux gènes sur un chromosome et par leur intégration sur l'autre.

On distingue cinq variétés de délétion, qui peuvent entraîner une  $\alpha$ -T-2, dont les deux principales sont les suivantes:

- ✓ La délétion 3,7 Kb, majoritaire en Afrique et dans le Bassin méditerranéen. Elle emporte la majorité du gène  $\alpha 1$ .
- ✓ La délétion 4,2 Kb, retrouvée dans le Sud-est asiatique surtout. Elle emporte la totalité du gène  $\alpha 2$ .
- ✓ L'ampleur du déficit en chaînes alpha est fonction du gène absent. En effet, l'ARNm du gène  $\alpha 2$  est 2,5 fois plus abondant que celui du gène  $\alpha 1$  [25].

- Mutation des gènes :

L' $\alpha$ -T peut aussi être due à une mutation ponctuelle. Ces mutations altèrent la maturation de l'ARNm, l'efficacité de la traduction, la stabilité de la chaîne  $\alpha$  ou la formation de l'Hb.

Parmi ces mutations on peut citer :

- ✓ Les mutations qui entraînent la production de chaînes  $\alpha$ -instables comme l'Hb Constant Spring très fréquentes en Asie. La chaîne  $\alpha$  qui en résulte est allongée de 28 ou de 31 acides aminés supplémentaires.
- ✓ Certaines mutations, qui diminuent la synthèse de chaînes de globine des gènes  $\alpha$ .

- ✓ les mutations de zones régulatrices des chaînes alpha seraient la cause d'une forme d' hémoglobinoase H[25].

## 2.2. Les $\beta$ -thalassémies

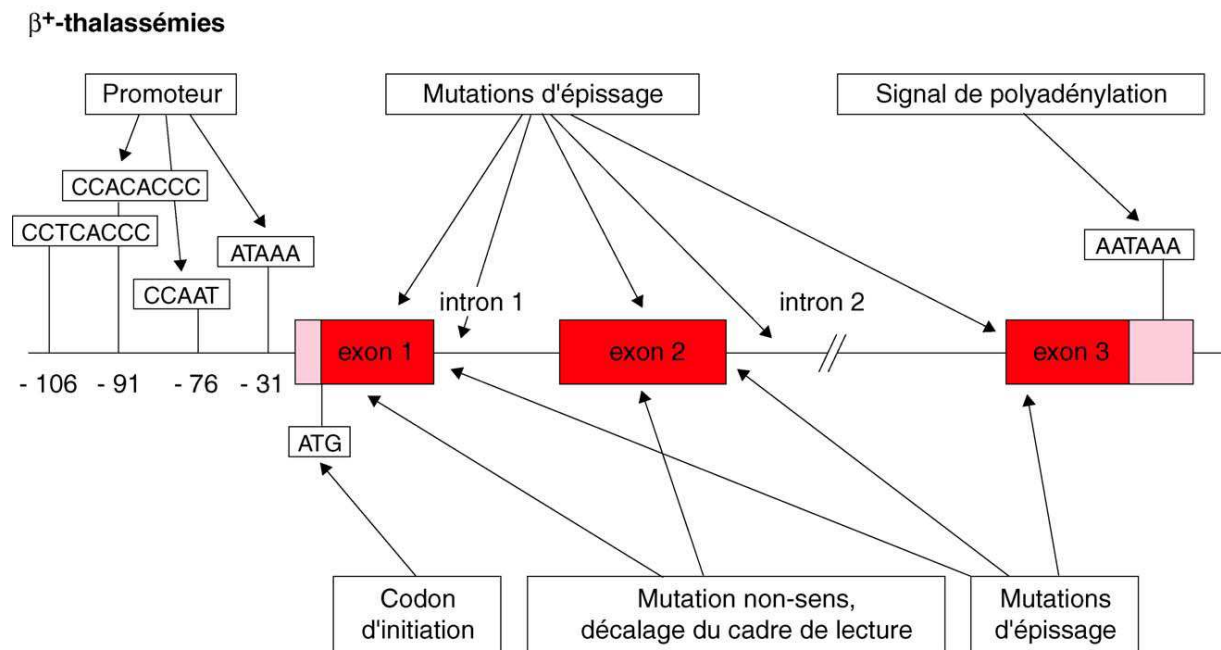
La grande majorité des  $\beta$ -thalassémies est due à des mutations ponctuelles ou à des microdélétions ou insertions de nucléotides. Ces mutations ont été observées sur toute l'étendue du gène  $\beta$  : exons, introns, sites d'épissage et leurs séquences consensus, promoteurs, autres régions non transcrites ou non traduites en 5' et en 3' (**Fig. 13**). Elles ont par ailleurs été identifiées à toutes les étapes de la synthèse protéique : transcription, maturation de l'ARNm, traduction, et même étape post-traductionnelle.

Les différentes formes moléculaires ont pu être rattachées à la classification initiale  $\beta^+/\beta^0$ . C'est ainsi que sont toujours  $\beta^0$  :

- ✓ 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, on trouve dans la catégorie des  $\beta^+$ -T 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  $\beta^+$ [26].



**Figure 13** : Mutations responsables de  $\beta$ -thalassémies [26].

## C. Physiopathologie

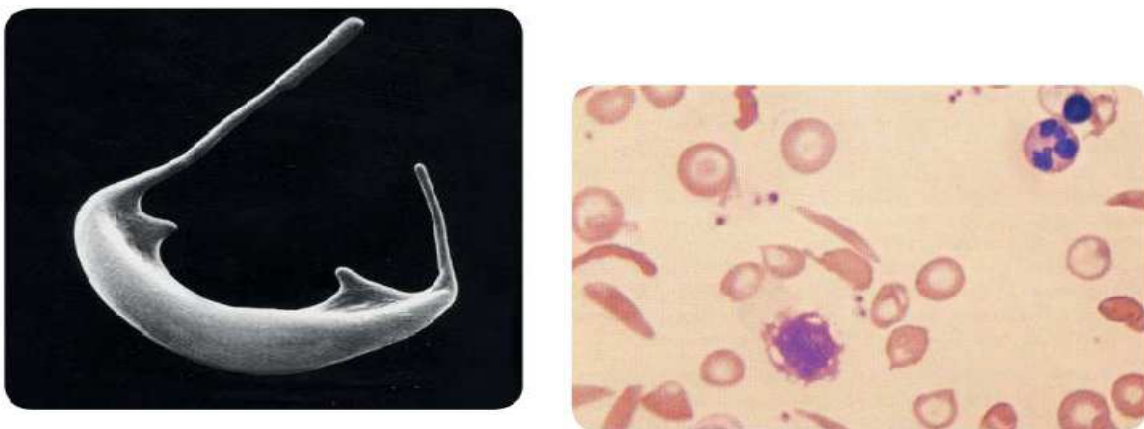
### 1. Les hémoglobines anormales

#### 1.1.L'hémoglobine S

La drépanocytose est liée à l'inversion d'une paire de base ( $A=T \rightarrow T=A$ ). Le sixième codon de la chaîne  $\beta$  de la globine [GAA] devient [GTA]. En conséquence, le sixième acide aminé(acide glutamique, chargé négativement) est remplacé par une valine, hydrophobe. Un site hydrophobe est donc présent sur l'extérieur de la chaîne  $\beta$  de l'HbS. Celui-ci contracte une liaison hydrophobe avec la phénylalanine en position 85 et la leucine en position 88, qui s'externalisent dans la désoxyhémoglobine [27]. Il se crée donc un polymère d'HbS, qui polymérise en longues fibres entraînant une rigidification et une déformation de l'hématie en forme de faucille (**Figure 14**). Les hématies, ayant perdu leur élasticité, obstruent les

capillaires des organes, provoquant une ischémie par manque d'apport d'oxygène et donc des crises vaso-occlusives (CVO) douloureuses [28].

À cette conception classique, se sont ajoutés les rôles du monoxyde d'azote et du tonus vasculaire, de l'augmentation de l'adhérence des globules rouges à l'endothélium, des lésions du globule rouge induites par l'HbS : déshydratation, sénescence, formation de microvésicules. Si ces progrès dans la connaissance de la physiopathologie n'ont pas encore eu d'application clinique, celles-ci vont arriver un jour. Il est donc particulièrement important de poursuivre la structuration du réseau de drépanocytose dans l'optique de mettre en place des essais multicentriques le jour venu [27].



**Figure 14** : Hématies falciformes (ou drépanocytes) au microscope électronique à balayage (à gauche) et au microscope optique sur frottis sanguin (à droite)[23][28].

En 1956, Vernon Ingram identifie l'anomalie dans la séquence en acides aminés de la chaîne  $\beta$ -globine ( $\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ). Un premier schéma physiopathologique centré autour de la polymérisation de l'HbS émerge dès les années 60-70. Il explique la mécanistique des évènements de vaso-occlusion caractéristiques de la maladie, au premier rang desquels, la classique CVO douloureuse. Il rend compte aussi de la fragilisation des globules rouges et donc de l'anémie hémolytique [29].

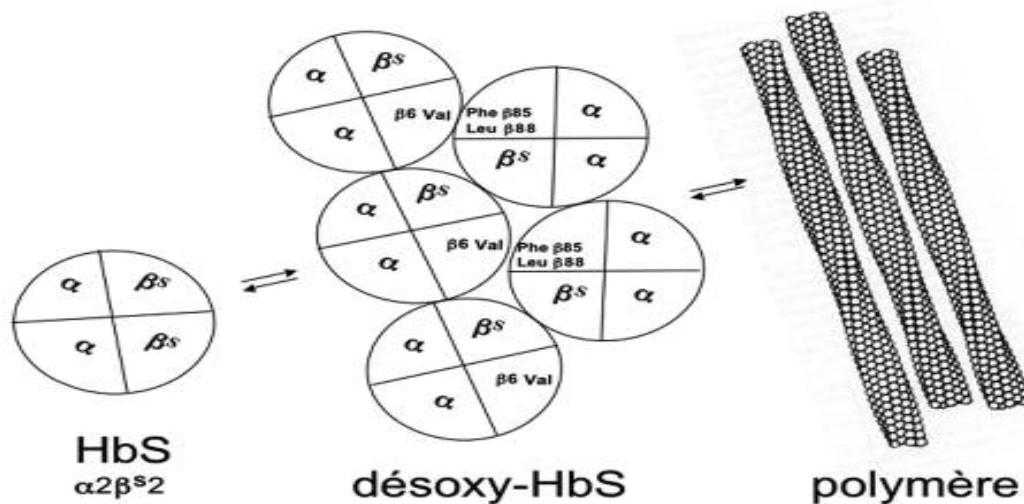
Les données plus récentes indiquent une participation directe de l'endothélium vasculaire, d'interactions cellulaires multiples et de processus d'activation cellulaire,

impliquant des mécanismes inflammatoires, dans l'initiation et la propagation de la vaso-occlusion.

Ont été notamment mis en évidence l'existence : 1) d'une adhérence accrue des globules rouges drépanocytaires aux cellules endothéliales vasculaires, 2) d'un environnement vasculaire pro-inflammatoire dont témoignent des cellules endothéliales circulantes activées et une activation exacerbée des polynucléaires neutrophiles [27], 3) de voies de signalisation dans le globule rouge susceptibles d'être modulées par le stress, l'hypoxie et la réponse inflammatoire et d'influencer l'état d'activation des récepteurs d'adhérence [30] et des transporteurs ioniques impliqués dans la déshydratation du globule rouge drépanocytaire et enfin, 4) d'un syndrome de dysfonctionnement endothélial complexe impliquant des anomalies du métabolisme du monoxyde d'azote (NO) [31].

- Mécanisme de base : polymérisation de l'hémoglobine S et altérations érythrocytaires :

Au cours de la désoxygénation qui suit le passage dans la microcirculation la molécule d'HbS subit un changement de conformation. Le remplacement de l'acide glutamique  $\beta 6$  hydrophile par une valine hydrophobe fait que cette dernière établit des liaisons hydrophobes avec d'autres résidus hydrophobes sur la chaîne  $\beta$  d'une autre molécule de désoxy-HbS (**figure 15**). Un polymère se forme et s'allonge en fibres hélicoïdales qui se regroupent, se rigidifient, et provoquent la falciformation, déformation cellulaire caractéristique des globules rouges classiquement en forme de faucille [29]. Le processus prend un certain temps à s'amorcer (Delaytime), qui est inversement proportionnel à la concentration intracellulaire de l'Hb.



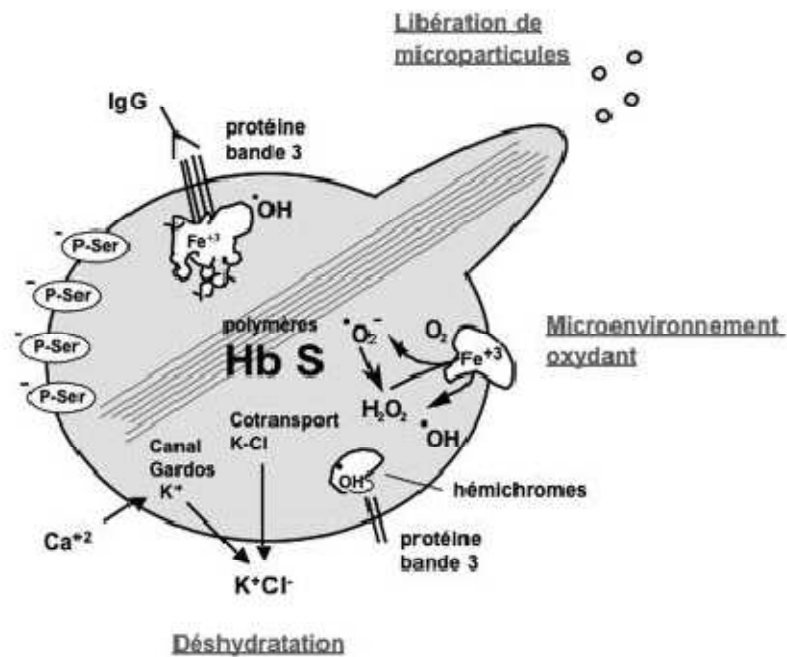
**Figure 15** : Mécanisme physiopathologique de base de drépanocytose [29].

La formation de ces grandes fibres de polymères entraîne une cascade d'autres anomalies cellulaires qui participent au mécanisme physiopathologique (**figure 16**). Une dérégulation de l'homéostasie des cations, avec activation des canaux ioniques, cotransport K-Cl et canal potassique dépendant du calcium (canal Gardos), entraîne notamment la perte de potassium et une déshydratation cellulaire qui, en augmentant la concentration intra cellulaire en Hb, favorise la polymérisation de la désoxy-HbS [32]. L'Hb se dénature et des hémichromes s'agglomèrent à la face interne de la membrane avec les protéines du cytosquelette, en particulier la protéine bande 3.

Ce processus s'accompagne de la perte d'hème et de la libération de  $Fe^{3+}$  qui favorise l'existence d'un microenvironnement oxydant. L'asymétrie normale des phospholipides membranaires est perturbée avec exposition à la surface cellulaire de phosphatidylsérines anioniques. Des IgG anti-bande 3 s'accumulent en surface au niveau des agglomérats de protéine bande 3, exacerbant l'érythrophagocytose par les macrophages. Enfin, toutes ces altérations membranaires s'accompagnent de la libération de microparticules.

Rigidification et fragilisation des globules rouges sont à la base de la vaso-occlusion d'une part et de l'anémie hémolytique d'autre part. Cependant, le mécanisme décrit plus haut,

s'il constitue bien la base physiopathologique de la drépanocytose, ne rend pas compte du déclenchement des CVO. En effet, en conditions basales, le Delay time, nécessaire pour la polymérisation de la désoxy-HbS est supérieur au temps de passage du globule rouge dans la microcirculation. Les données récentes ont fourni des éléments sur divers mécanismes adjuvants, susceptibles, en ralentissant le flux circulatoire, de précipiter les CVO [29].



**Figure 16:** Altération membranaires des globules rouges drépanocytaires [29].

### 1.2.L'hémoglobine C

Découverte en 1951 par Itano et Neel [33], l'hémoglobine C est un variant de l'Hb, formé suite à une mutation ponctuelle au niveau du codon 6 (GAG AAG) dans le gène bêta globine. Cette mutation concerne le premier nucléotide de ce codon : il s'agit de la *substitution de la guanine par l'adénine*.

Cela a pour conséquence le remplacement de l'acide glutamique (sixième acide aminé de la chaîne  $\beta$ ) par une lysine :  $\alpha 2\beta 2 \rightarrow 6GluLys$ , en même position que la mutation drépanocyttaire (Hb S).

La lysine est un monoacide diaminé. Sa présence dans la chaîne polypeptidique entraîne le remplacement de deux charges négatives par deux charges positives. Ainsi, l'hémoglobine C migre moins vite que l'Hb S.

On peut la trouver à l'état hétérozygote (génotype A/C ou trait C), à l'état homozygote (C/C) ou combinée à d'autres anomalies, formant ainsi des hétérozygotes composites : génotype C/thalassémique (+ ou 0), ou profil S/C, dont la clinique est classiquement moins sévère que celle de la drépanocytose [34, 35].

Les érythrocytes contenant de l'hémoglobine C sont partiellement déshydratés (avec perte d'eau et efflux de K<sup>+</sup>), de petite taille mais avec une charge en hémoglobine normale. Lorsque la concentration en hémoglobine augmente, il s'en suit une formation de cristaux intra-érythrocytaires rhomboédriques et une perturbation des échanges ioniques transmembranaires.

La forte concentration hémoglobinique dans l'hémoglobinoase C rend compte de la sévérité de la forme hétérozygote composite S/C.

En outre, les GR contenant l'hémoglobine C sont plus fragiles et semblent porter beaucoup plus d'IgG à leur surface favorisant ainsi leur élimination de la circulation sanguine par le système réticulo-phagocytaire de la rate. L'ensemble de ces phénomènes explique en grande partie la physiopathologie de la splénomégalie au cours de l'hémoglobinoase C [36, 37].

### **1.3. L'hémoglobine E**

L'HbE est un variant d'Hb avec une mutation dans le gène de la chaîne  $\beta$  provoquant la substitution de l'acide glutamique par la lysine à la position 26 de la chaîne  $\beta$  de globine. L'HbE peut être présente à l'état hétérozygote, l'état homozygote et des variétés d'états hétérozygotes composites telles que l'HbE/ $\beta$  thalassémie, HbS/HbE.

La chaîne  $\beta$  de l'HbE est synthétisée à une vitesse réduite par rapport à celle de l'HbA. Cela est dû par une mutation qui crée un site d'épissage alternatif dans un exon aboutissant à la synthèse en quantité insuffisante de la chaîne  $\beta$ , et par conséquent les hétérozygotes,

hétérozygotes composites et homozygotes présentent certaines caractéristiques des  $\beta$  thalassémies [38].

La séquence nucléotidique proche du site normal d'épissage est modifiée suite à la mutation responsable de la formation de l'Hb E. Ceci dévoile un site d'épissage cryptique qui décale alors le cadre de lecture, d'où un signal de terminaison précoce. La chaîne  $\beta$  mutée est ainsi synthétisée à taux faible par rapport au taux de l'Hb A.

Ce déficit de synthèse de la chaîne  $\beta$  de la globine explique pourquoi l'Hb E s'apparente plutôt aux syndromes thalassémiques au niveau clinique [35].

#### **1.4. Les hémoglobines instables**

Les hémoglobines instables constituent un groupe particulier d'Hb anormales rares présentant une anomalie génétique de l'Hb, responsables d'anémies hémolytiques et caractérisées par la formation de précipités insolubles dans les globules rouges, appelés corps de Heinz [39].

Les Hb instables constituent un groupe particulier d'Hb anormales responsables d'anémies hémolytiques caractérisées par la présence de corps de Heinz. La physiopathologie des Hb instables est déduite de la connaissance de la structure globulaire de cette molécule [40].

En général, il s'agit d'une mutation ponctuelle entraînant une modification de la structure primaire de la globine et donc une instabilité de la globine concernée ou du tétramère. Plusieurs mécanismes à l'origine d'une fragilisation des interactions hème-globine, ou interférant avec la structure secondaire, tertiaire ou quaternaire de l'Hb sont incriminés.

L'Hb instable s'auto-oxyde en méthémoglobine anormale, formant alors des hémichromes (ou dérivés de méthémoglobine instable), d'abord réversibles puis irréversibles qui finissent par précipiter en corps de Heinz intra-érythrocytaires. Les globules rouges perdent alors de leur élasticité, ce qui entraîne leur destruction par la rate et une hémolyse. Il faut noter qu'il est possible, si la mutation en cause touche une région située proche de la poche de l'hème, que l'Hb instable présente une altération de sa fonction oxyphorique, soit une augmentation ou une diminution de l'affinité de la chaîne mutée pour l'oxygène. C'est

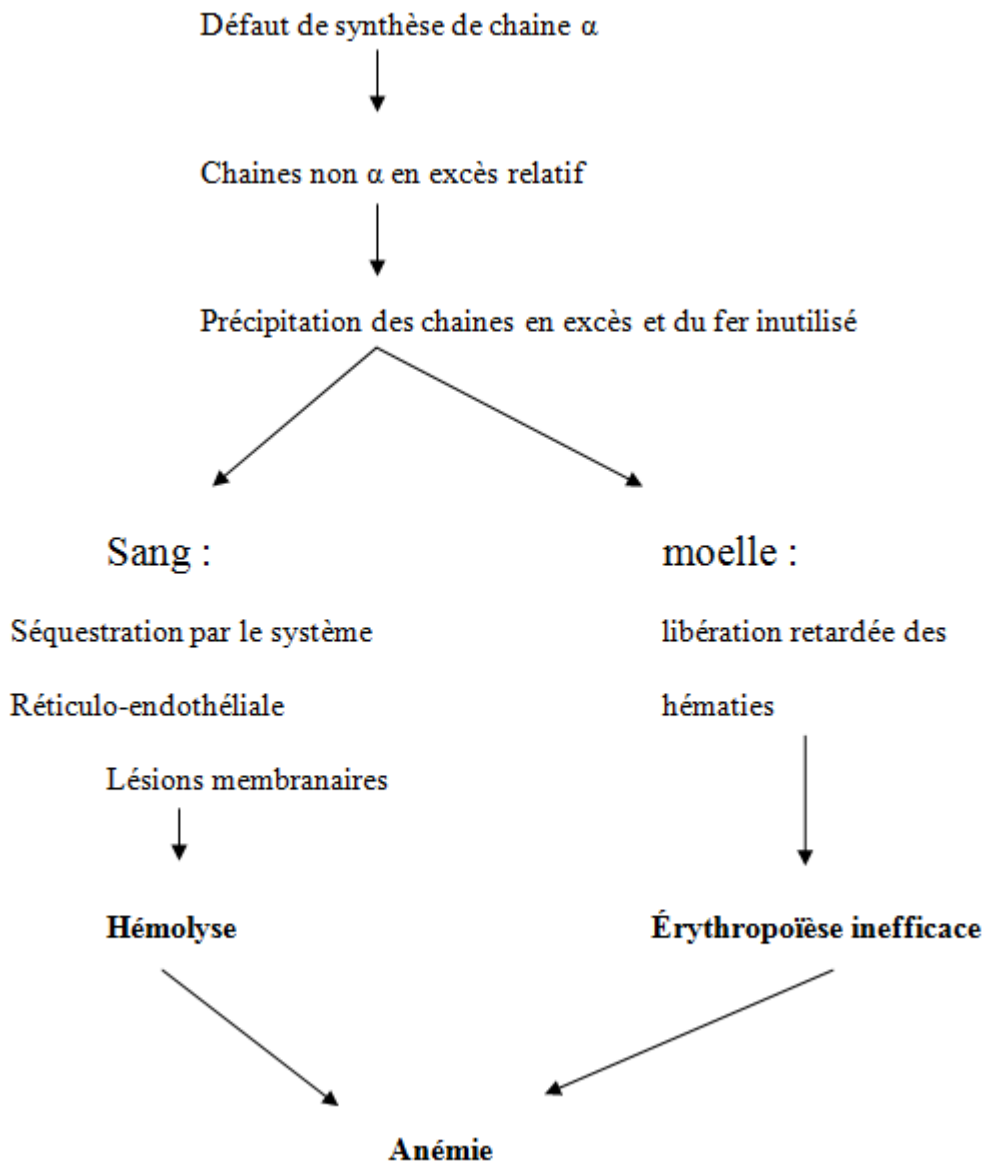
pour cette raison qu'il est souvent réalisé, en parallèle du test d'instabilité, une détermination de la P50 et un dosage du 2,3-BPG [41].

## **2. Les thalassémies**

### **2.1. Les $\alpha$ -thalassémies**

Le mécanisme physiopathologique de l' $\alpha$ -T associe plusieurs facteurs. Suivant les classes ci-dessus citées on a :

- ✓ dans toutes les classes : la diminution quantitative de la synthèse des chaînes alpha a pour conséquence une diminution de l'élaboration de l'hémoglobine, d'où la microcytose [21].
- ✓ Dans les classes 3 et 4 : Les chaînes libres dues au déséquilibre entre les chaînes alpha et les chaînes non alpha, précipitent dans les hématies. On a alors une hémolyse qui raccourcit la durée de vie des érythrocytes. Par ailleurs, le fer non utilisé du fait de la diminution de la synthèse globinique tend à s'accumuler dans la zone mitochondriale. Ceci entraîne une altération des mitochondries contribuant à écourter la vie des hématies.
- ✓ Cette précipitation des chaînes libres et du fer inutilisé ne se fait pas seulement dans les globules rouges circulants mais aussi dans les érythroblastes médullaires. Il en résulte un processus d'hémolyse intramedullaire par avortement d'un certain nombre d'érythroblastes [42].



**Figure 17** : Physiopathologie hématologique de l' $\alpha$ -thalassémie (classe 3 et 4) [42].

## 2.2. Les $\beta$ -thalassémies

Les  $\beta$ -thalassémies sont définies par un déficit total ou partiel en synthèse de chaînes  $\beta$  de l'Hb. On distingue les  $\beta^0$ -thalassémies (absence de synthèse) et les  $\beta^{+}$ -thalassémies (Présence d'une synthèse diminuée).

En raison de l'absence ou de la diminution de synthèse des chaînes  $\beta$ , le tétramère hémoglobinique normal est peu ou pas formé et les chaînes  $\alpha$  non appariées, moins solubles, précipitent et altèrent l'érythroblaste provoquant sa destruction. Les troubles sont davantage liés à la dysérythropoïèse qu'à l'hémolyse. La précipitation des chaînes libres s'effectue dès les étapes précoces de l'érythrogenèse. Il s'en suit une érythropoïèse inefficace ainsi qu'une prolifération du tissu érythroïde [43].

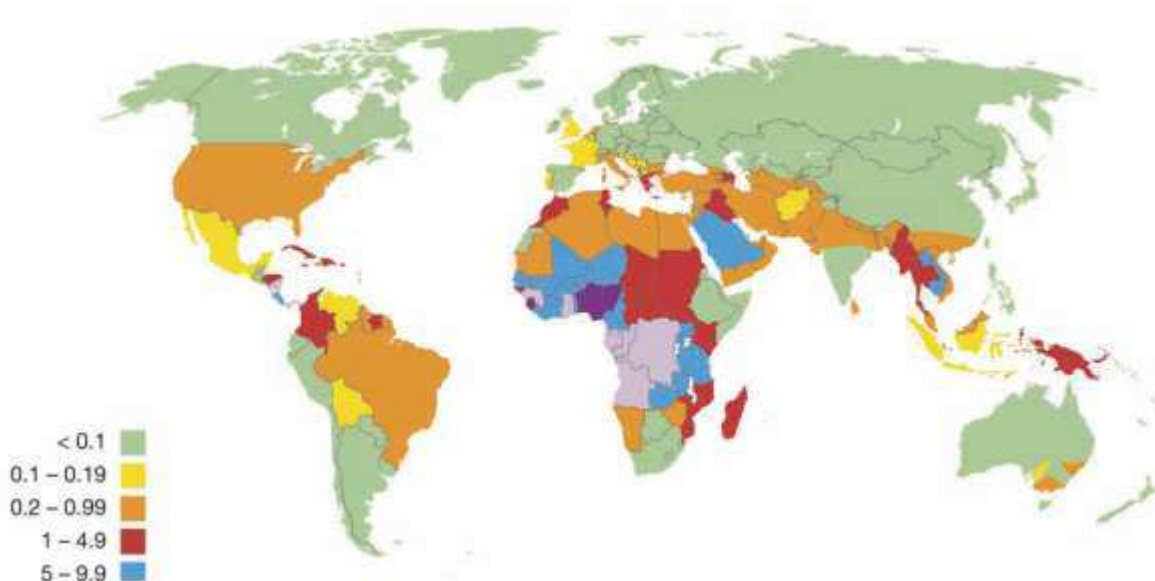
Cependant dans les hématies du sang périphérique, la précipitation des chaînes  $\alpha$  libres conduit à des altérations membranaires et à une hémolyse.

La chaîne  $\delta$  n'étant synthétisée qu'en faible quantité, la seule compensation possible est une production accrue des sous-unités  $\gamma$ , qui constituent, associées aux sous-unités  $\alpha$ , l'Hb F.

L'Hb F circulante, quantitativement insuffisante et ayant une affinité élevée pour l'oxygène, ne peut corriger le défaut d'oxygénation des tissus. L'anoxie tissulaire, à l'origine d'une stimulation de la synthèse de l'érythropoïétine, accroît encore le processus érythropoïétique [43].

## **D. Epidémiologie**

Il a été estimé qu'environ 5% de la population mondiale sont porteurs des anomalies de l'Hb. En outre, les hémoglobinopathies affectent environ 370 000 nouveau-nés chaque année. Les variants de l'Hb de signification clinique majeure sont Hb S, C et E. En Afrique de l'ouest, environ 25% des individus sont hétérozygotes pour le gène de l'Hb S, qui est liée à la drépanocytose. En outre, les fréquences élevées des allèles de gènes de l'Hb S sont également présents chez les gens qui vivent dans les Caraïbes, au sud de l'Afrique centrale, la région méditerranéenne, la péninsule arabique, et l'est de l'Inde. Hb C se trouve surtout chez les gens qui vivent ou proviennent d'Afrique de l'Ouest. Hb E est largement distribué entre l'Est de l'Inde et l'Asie du Sud, avec la plus forte prévalence en Thaïlande, au Laos, et au Cambodge; cependant, il peut être observé de façon sporadique dans les régions de la Chine et de l'Indonésie [44].



**Figure 18** : Répartition géographique des naissances présentant une forme grave d'hémoglobinopathie (pour 1000 naissances) (source : organisation Mondiale de la Santé 2008).

## 1. Les hémoglobines anormales

### 1.1. L'hémoglobine S

La maladie drépanocytaire, qui regroupe la drépanocytose, le double hétérozygotisme SC et la  $\beta$  thalasso-drépanocytose ( $\beta$  thal), [et exceptionnellement le double hétérozygotisme SO Arab, SD Punjab, SE] est un problème de santé publique dans le monde [45].

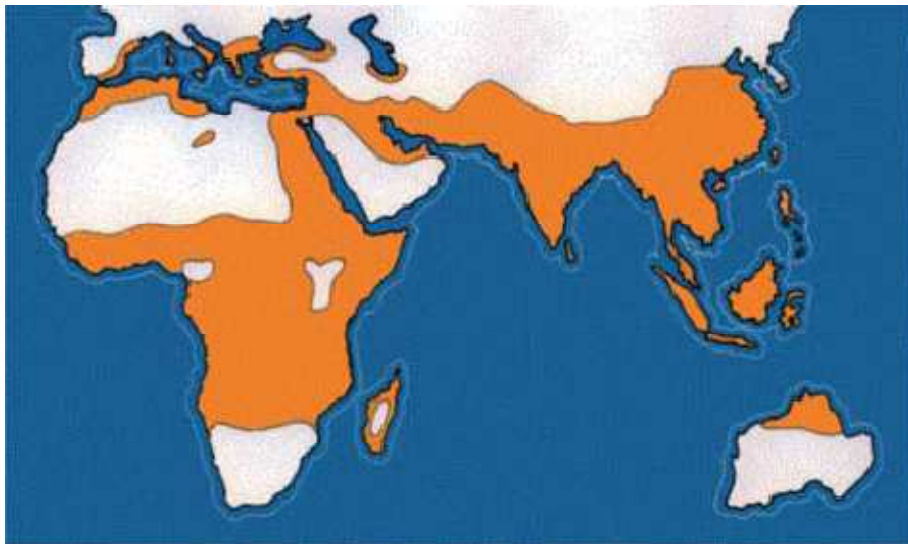
Selon l'OMS, 300 000 enfants naissent avec cette maladie dans le monde chaque année [46].

La drépanocytose est une maladie de la race noire avec deux foyers majeurs d'origine : l'Afrique subsaharienne d'une part et un arc arabo-indien d'autre part. La maladie est connue en Afrique noire, en Amérique (Etats-Unis, Brésil), aux Antilles, à Madagascar, dans les pays du Maghreb, dans tout le Moyen-Orient jusqu'en Arabie Saoudite, dans le sous-continent indien, dans le Bassin méditerranéen (figure). C'est un problème majeur de santé publique en Afrique noire où la prévalence du trait drépanocytaire est très élevée : 15 à 25% en Afrique

centrale et de l'ouest. Elle est de 10 à 12% dans les DOM d'Amérique, de 1 à 15% dans les régions méditerranéennes.

C'est une maladie de l'enfant, l'espérance de vie dépendant de la prise en charge : elle est d'autant plus élevée que le pays est développé (elle est de 40-50 ans pour les malades SS, de 65 ans pour les SC aux USA).

La drépanocytose se répand dans le monde du fait de l'augmentation des flux migratoires et de la diffusion géographique de certains gènes pathologiques : le nombre de migrants dans le monde qui était de 92,6 millions en 1960 était de 165,2 millions en 2000 (+79%), le nombre de migrants porteurs de l'allèle HbS est passé de 1,6 million en 1960 à 3,6 millions en 2000 (+125%) [45].



**Figure 19** : Répartition géographique de la drépanocytose [28].

## 1.2. L'hémoglobine C

On retrouve l'hémoglobine C principalement en Afrique de l'Ouest, notamment au Ghana, en Côte d'Ivoire, au Burkina Faso, au Togo et au Bénin, mais aussi chez les populations noires d'origine africaine vivant aux Etats Unis ou dans les Caraïbes. L'Afrique

du Nord (Maroc, Algérie) et le sud de l'Europe, notamment l'Italie et la Turquie, sont également concernés [35].

### **1.3. L'hémoglobine D**

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

La répartition géographique actuelle de ce variant de l'Hb peut être expliquée par les migrations de population divisées en deux phases. La première phase porterait sur la période de l'apparition de la mutation et de sa distribution dans le nord de l'Inde, l'Iran et la Turquie et peut refléter le rythme des migrations qui ont eu lieu dans cette région.

La seconde phase porterait sur la propagation de la mutation dans l'Europe occidentale à cause des mariages mixtes entre les Européens et les Indiens au cours des deux ou trois derniers siècles [47].

### **1.4. L'hémoglobine E**

Elle concerne essentiellement les populations du Sud-Est asiatique, où sa prévalence peut s'élever jusqu'à 60 % dans certaines régions. En raison d'une forte immigration des populations du Sud-Est asiatique vers les pays occidentaux, on l'observe aujourd'hui partout dans le monde [35].

### **1.5. Les hémoglobines instables**

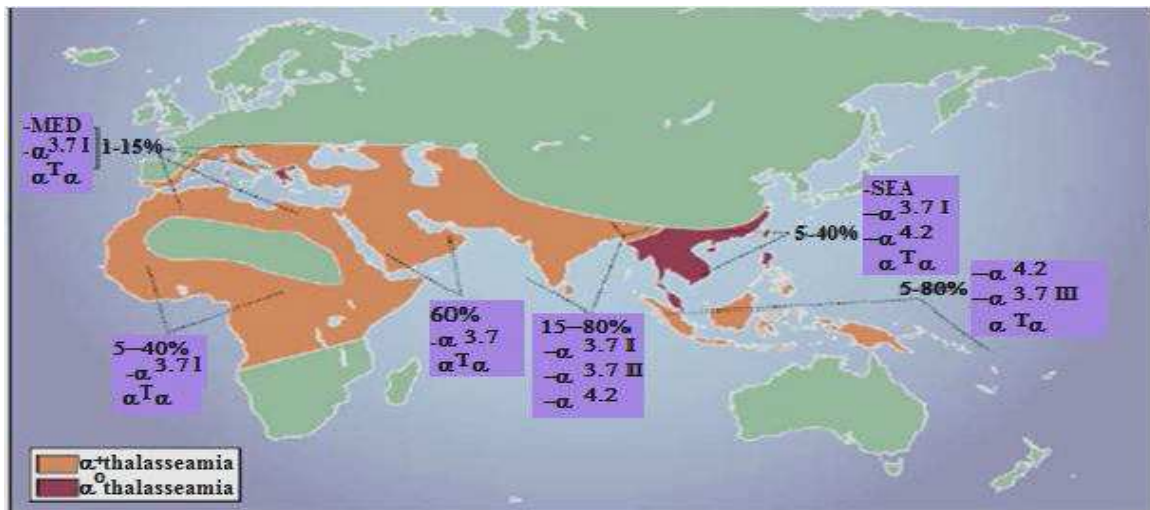
Les Hb instables sont, le plus souvent, des affections héréditaires à transmission autosomique dominante dont la majorité des patients sont hétérozygotes [48].

D'après le serveur de la base de données de variants de l'Hb humaine et de thalassémie (« [http://www.globin gene server](http://www.globin_gene_server) »), 121 variants d'Hb instables ont été enregistrés en l'année 2001, le chiffre monte à 134 au cours de l'année 2006, et actuellement plus de 200 variants de l'Hb instable avec des mutations, le plus souvent « privées », c'est-à-dire rares et qui ne concernent qu'un petit nombre de malade, ont été décrites [49].

## 2. Les thalassémies

### 2.1. Les $\alpha$ -thalassémies

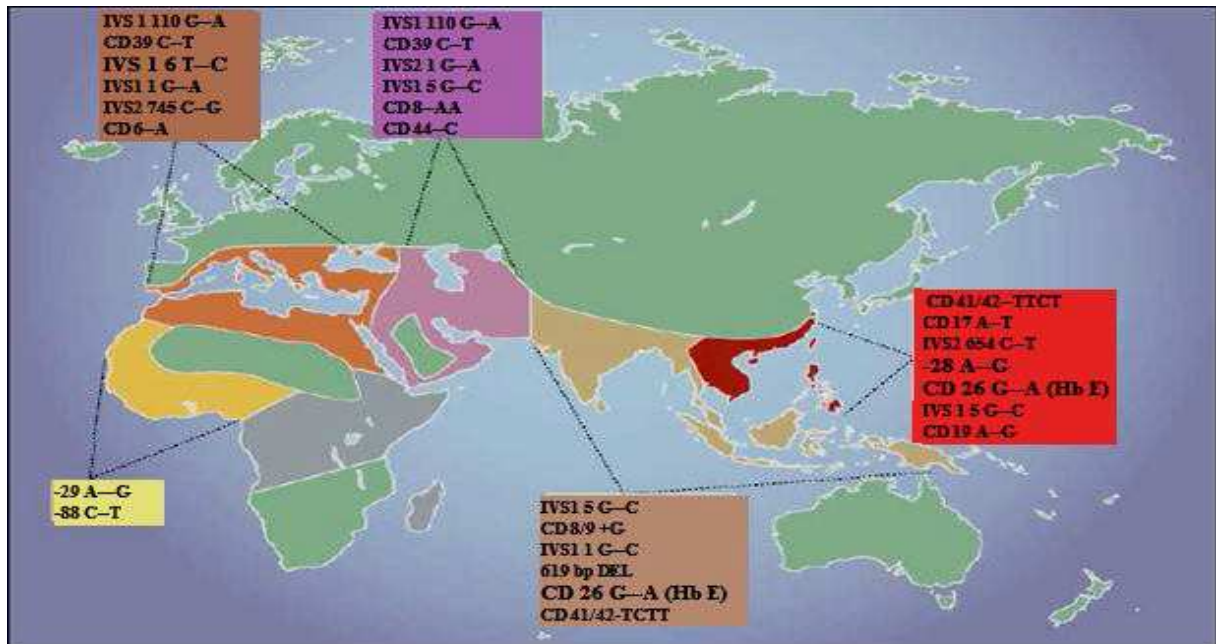
Elles ont une fréquence encore plus importante que les  $\beta$ -thalassémies en Afrique (équatoriale surtout), en Asie et autour de la Méditerranée, ainsi qu'en Chine. La délétion des quatre gènes  $\alpha$  concerne particulièrement les populations du Sud-Est asiatique (Laos, Thaïlande), (**figure 20**)



**Figure 20** : distribution globale des  $\alpha$ -thalassémies [50].

### 2.2. Les $\beta$ -thalassémies

La bêta-thalassémie atteint surtout les personnes originaires du pourtour méditerranéen (Corse, Italie, Sardaigne, Sicile, Grèce, Afrique du Nord), du Moyen-Orient, d'Asie (Chine, Inde, Viêt-Nam, Thaïlande) et d'Afrique noire [51].



**Figure 21** : Distribution globale des mutations de  $\beta$ -thalassémie [50].

## E. Symptomatologie clinique

### 1. Les hémoglobines anormales

#### 1.1.L'hémoglobine S

##### 1.1.1. Forme homozygote

Les signes cliniques de la maladie font leur apparition dans les premiers mois ou les premières années de vie, quand l'Hb drépanocytaire a progressivement remplacé l'Hb fœtale (Hb F). Des révélations cliniques plus tardives, après 4-5 ans, ne sont pas exceptionnelles.

La symptomatologie clinique de la drépanocytose homozygote comporte trois types de situations :

- Les phases stationnaires ;
- Les complications aiguës dont la fréquence diminue avec l'âge sans pour autant disparaître chez l'adolescent et l'adulte ;
- Les complications chroniques [40].

### **Phases stationnaires :**

L'anémie est constante (muqueuses et téguments pâles) ; l'ictère conjonctivale est variable dans le temps et d'un cas à l'autre ; la splénomégalie est constatées dès les premiers mois de vie en même temps que s'installent l'anémie et l'ictère. Cette splénomégalie quelques années pour disparaître spontanément (autosplénectomie), sauf dans quelques cas où elle persiste.

La croissance saturopondérale des enfants drépanocytaires homozygotes paraît sensiblement différente dans les zones tempérées et dans les zones tropicales. En zone tempérée, la croissance saturale est généralement normale. La croissance pondérale est souvent en dessous de la moyenne sans être pathologique à partir de 12-14 ans. En zone tropicale, le développement saturopondérale peut être identique à ce qui vient d'être décrit.

Le développement pubertaire se fait généralement de façon satisfaisante, bien qu'avec un certain retard de la maturation osseuse et du début de la puberté par rapport à la population non drépanocytaire du même âge. Ainsi les retards de croissance de la phase prépubertaire sont généralement compensés pendant l'adolescence [40].

### **Complications aiguës :**

Les principales complications aiguës observées chez les patients drépanocytaires homozygotes sont les crises douloureuses drépanocytaires, les infections, l'aggravation de l'anémie chronique, les accidents vaso-occlusifs graves et l'hyperbilirubinémie.

Les infections ont une forte incidence dans les premières années de vie et diminuent, sans disparaître, avec l'âge. Elles sont responsables d'une part importante de la morbidité et de la mortalité de la drépanocytose. Ce sont des méningites, des septicémies, des pneumopathies, des ostéomyélites.

Des épisodes d'aggravation de l'anémie chronique peuvent résulter d'une situation fébrile, de crises de séquestration splénique (particulières au petit enfant), d'une infection par le parvovirus B19.

Les accidents vaso-occlusifs graves sont des complications aiguës qui comportent des manifestations neurologiques, pulmonaires, des thromboses (thrombose de l'artère centrale de la rétine, priapisme...) et des hématuries microscopiques [52].

#### **Complications chroniques :**

Les complications chroniques sont plus volontiers observées chez les adolescents et les adultes que chez l'enfant. Il s'agit des ulcères de jambes, des nécroses osseuses (hanches, épaules), des rétinopathies, de lithiases biliaires et d'altérations progressives organiques et fonctionnelles des poumons, du cœur, des reins.

Il a été trouvé des corrélations entre l'évolution clinique et le taux d'hémoglobine F. Les sujets ayant le plus d'hémoglobine F (supérieure à 20 %) ont une forme moins sévère [52].

#### **1.1.2. Forme hétérozygote**

C'est en général un état asymptomatique. Des symptômes évocateurs de syndrome drépanocytaire (hémolyse, douleurs) doivent faire rechercher un facteur aggravant associé (hétérozygotie A/S Antilles). Le trait drépanocytaire expose toutefois à une atteinte rénale (hématuries, défaut du pouvoir de concentration des urines...), certaines manifestations vaso-occlusives comme l'infarctus splénique, dans des conditions d'hypoxémie profonde par exemple [45].

#### **1.1.3. Autres syndromes drépanocytaires**

La coexistence d'une ou deux mutations caractéristiques de la drépanocytose et d'une autre anomalie génétique peut être à l'origine de syndromes drépanocytaires majeurs dont la sévérité est variable [45].

Les syndromes drépanocytaires majeurs regroupent la forme homozygote S/S et les formes hétérozygotes composites S/C et S $\beta$ + ou S $\beta$  thalassémie. La forme homozygote SS a une évolution plus sévère, mais la plupart des complications y compris les plus graves peuvent être observées au cours des formes hétérozygotes composites [53].

### **1.2.L'hémoglobine C**

- **Hémoglobinose C :**

Les patients homozygotes pour cette mutation présentent généralement une anémie légère à modérée, associée à une fréquente splénomégalie. Le risque de lithiase biliaire et de déficit en folates est augmenté en raison de la chronicité de l'hémolyse. De rares cas de rétinopathies ont été rapportés [34].

- **Trait A/C :**

Le profil hétérozygote A/C ou trait hémoglobine C est totalement asymptomatique.

- **Hétérozygote composite :**

Les hétérozygotes composites C/ $\beta$ -thalassémiques présentent une symptomatologie assez proche de celle des homozygotes C/C, à savoir une anémie modérée à sévère ainsi qu'une splénomégalie. Si l'allèle de la  $\beta$ -thalassémie est de type  $\beta^0$  ; les signes peuvent être plus graves. L'association de l'hémoglobine C à l'hémoglobine Lepore, à la  $\beta$ -thalassémie ou encore à l'hémoglobine E conduisent à une clinique comparable.

Les hétérozygotes composites S/C souffrent de symptômes comparables à ceux de la drépanocytose, mais cependant légèrement atténués : anémie hémolytique chronique modérée, avec des crises vaso-occlusives moins fréquentes voire absentes, et risque de syndrome thoracique aigu diminué. Les complications demeurent toutefois les mêmes et sont même plus fréquentes que chez les patients drépanocytaires dans 2% des cas : nécrose des têtes fémorales, rétinopathies, infarctus spléniques répétés, risque d'accident vasculaire cérébral (AVC), perte d'audition.

A noter chez ces patients une augmentation de la viscosité sanguine, entraînant des complications, notamment chez la femme enceinte, avec un risque accru de CVO, de syndrome thoracique aigu et de toxémie gravidique [34].

### **1.3.L'hémoglobine E [35]**

- **Forme homozygote :**

Les effets sont mineurs, se limitant à une anémie microcytaire hypochrome modérée.

- **Trait A/E :**

Les hétérozygotes A/E sont asymptomatiques.

- **Hétérozygotes composites E /  $\beta$ -thalassémie :**

On retrouve aussi bien des patients hétérozygotes composites E/ $\beta$ 0 thalassémiques que des hétérozygotes composites E/ $\beta$ +-thalassémiques. En général, ces patients présentent une forme de  $\beta$ -thalassémie intermédiaire de sévérité variable. Les cas les plus graves sont dépendants des transfusions sanguines ( $\beta$ -thalassémie majeure), présentent une hépatomégalie ainsi qu'une splénomégalie, un ictère intermittent, un retard de croissance ainsi qu'une extension de la cavité de la moelle osseuse conduisant à des déformations faciales et à une implantation dentaire défectueuse. Dans ces cas là, une splénectomie s'avère généralement efficace pour modérer la dépendance aux transfusions.

- **Hétérozygote S/E :**

Le tableau clinique est similaire à celui des hétérozygotes composites S/ $\beta$ -thalassémiques : anémie hémolytique chronique modérée, avec crises vaso-occlusives rares mais dont la fréquence augmente durant la grossesse [35].

### **1.4. L'hémoglobine D**

L'Hb D-Punjab, est une variante structurale de la chaîne  $\beta$  qui prévaut dans le Punjab de l'Inde d'où son nom Hb D-Punjab [54].

Sa structure biochimique a été caractérisée par Baglioni, en 1961, qui a montré que 5 Hb D d'origines ethniques différentes avaient toutes une substitution de l'acide glutamique habituel en position 121 de la chaîne  $\beta$  par une molécule de glutamine ( $\beta$ 121Glu→Gln)[55].

- **La forme homozygote :**

La forme homozygote est peu fréquente. Les patients homozygotes pour cette mutation présentent souvent une anémie hémolytique légère et une discrète splénomégalie, contrairement à l'atteinte extrêmement sévère de l'hémoglobine S homozygote ou, en tout cas, marquée des hémoglobinoses C et E homozygotes [56].

- **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, alors que les hétérozygotes S/D-Iran ou S/D-Ibadan présentent plutôt un trait drépanocytaire, alors bénin.

On trouve également des patients D/ $\beta^0$ -thalassémiques, chez qui l'anémie hémolytique chronique est modérée [56].

### **1.5. Les hémoglobines instables**

Le tableau clinique d'une Hb instable est d'intensité variable, fonction de la nature de la mutation. L'anémie hémolytique est le signe clinique majeur, fréquemment accompagnée d'hépatosplénomégalie et d'ictère. L'émission de pigments dans les urines dus à des composés dipyrrolés, produits de catabolisme des corps de Heinz, est inconstante et indépendante du degré d'hémolyse.

Des crises d'hémolyse peuvent survenir suite à une infection virale ou bactérienne ou suite à la consommation d'oxydants chimiques.

Les Hb instables sont rares, et restent souvent limitées à une seule famille. La transmission est le plus souvent de type autosomique dominant [57].

## 2. Les thalassémies

### 2.1. Les $\alpha$ -thalassémies

Les  $\alpha$ -thalassémies s'expriment selon quatre formes cliniques, en fonction du nombre de gènes défectueux ou absents. En pratique, cette classification doit être nuancée par la différence d'expression des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ .

- **Hydrops foetalis de Bart's :**

L'Hydrops foetalis de Bart's ou anasarque fœto-placentaire est le tableau clinique associé à l'homozygotie pour la délétion des 2 gènes  $\alpha$  en cis. La synthèse des chaînes  $\alpha$  est totalement absente, on parle donc d' $\alpha 0$ -thalassémie homozygote. Cette anomalie est caractérisée par une grave anémie intra-utérine entraînant une mort intra-utérine [58].

- **Hémoglobinose H :**

L'hémoglobinose H « délétionnelle » est la plus fréquente, elle correspond génotypiquement à la délétion de 3 gènes  $\alpha$ . Les chaînes de globine non-  $\alpha$  en excès s'apparient entre elles pour former l'hémoglobine Bart's ( $\gamma 4$ ) à la naissance, puis l'hémoglobine H ( $\beta 4$ ) au fur et à mesure que la production de chaînes  $\beta$  se substitue à celle de chaînes  $\gamma$  l'hémoglobine H ou tétramère  $\beta 4$  est de nature relativement instable.

Les patients atteints, essentiellement orientaux ou méditerranéens, présentent des signes d'anémie hémolytique chronique, souvent bien tolérée ; et dont le degré de sévérité est entre autres corrélé au génotype responsable [59].

- **$\alpha$ -thalassémie 1 ou  $\alpha$ -thalassémie mineur :**

Elle correspond à l'inactivation de deux gènes de l' $\alpha$ -globine, il peut s'agir de :

- ✓ deux gènes  $\alpha$  en cis sur le même chromosome, on parle alors d'  $\alpha 0$ -T hétérozygote. Chez ces patients, on retrouve une pseudo- polyglobulie microcytaire hypochrome.

- ✓ deux gènes  $\alpha$  en trans, situés chacun sur un chromosome. Il s'agira alors d'  $\alpha$ -thalassémie homozygote. Elle est cliniquement asymptomatique [60].

- **$\alpha$ -thalassémie 2 ou  $\alpha$ -thalassémie silencieuse :**

L' $\alpha$ -thalassémie silencieuse ou bien  $\alpha$ -thalassémie hétérozygote, est due à une altération d'un seul des 4 gènes  $\alpha$  de la globine. C'est l' $\alpha$ -thalassémie la plus fréquemment rencontrée dans la population. Elle est pratiquement asymptomatique.

Elle peut cependant être suspectée quand elle est associée à une hémoglobine anormale, par exemple : hémoglobine S, C ou E, ou en cas de  $\beta$ -thalassémie de sévérité intermédiaire chez un homozygote  $\beta^0$ -thalassémique [60].

## 2.2. Les $\beta$ -thalassémies

Selon les manifestations phénotypiques, en l'occurrence la profondeur de l'anémie et les besoins transfusionnels, plusieurs formes de  $\beta$ -thalassémies peuvent être distinguées (**Tableau IV**). Cette distinction ne peut être réalisée qu'après quelques mois de vie, lorsque la synthèse de l'hémoglobine F n'est plus capable de masquer l'anomalie de synthèse de l'HbA.

Tout d'abord, la  **$\beta$ -thalassémie majeure**, aussi **appelée anémie de Cooley**, se caractérise par l'absence totale de chaînes  $\beta$ , correspondant au génotype  $\beta^0/\beta^0$ . Elle est révélée dès l'enfance par une anémie hémolytique très sévère associée à une hépatosplénomégalie et à des anomalies morphologiques résultant de l'hyperplasie des os plats secondaire à l'hyperactivité érythroïde. L'hémodiagramme révèle une anémie inférieure à 7 g/dL, microcytaire (volume globulaire moyen entre 60 et 65 fL), hypochrome (teneur moyenne en hémoglobine inférieure à 26 pg). Le frottis sanguin met en évidence une anisopoïkilocytose, des ponctuations basophiles fréquentes ainsi qu'une érythroblastose majeure.

L'étude de l'Hb permet le diagnostic, elle montre un pourcentage élevé d'HbF, allant de 50 à 98 % selon la synthèse résiduelle de la chaîne  $\beta$ . Le taux d'hémoglobine A2 est variable [60].

**Les  $\beta$ -thalassémies intermédiaires** constituent une autre forme de  $\beta$ -thalassémie et sont caractérisées par une anémie dont le taux d'hémoglobine se maintient entre 6 et 10 g/dL, ne requérant pas de transfusion mensuelle. Leur génotype est de type  $\beta^0/\beta^+$  ou  $\beta^+/\beta^+$ . Seule

l'observation des besoins transfusionnels permet de distinguer une thalassémie intermédiaire d'une thalassémie majeure. Les  $\beta$ -thalassémies intermédiaires se manifestent le plus souvent par une anémie hémolytique modérée avec pâleur et hépatosplénomégalie, pouvant éventuellement s'accompagner des complications osseuses de l'hyperplasie érythroblastique médullaire [60].

**Les  $\beta$ -thalassémies mineures** ou **silencieuses** sont quant à elles définies par un génotype hétérozygote de type  $\beta^o/\beta$  et se manifestent biologiquement par une pseudopolyglobulie associée à une microcytose et une hypochromie. Le pourcentage d'hémoglobine A2 est élevé (supérieur à 3,5%) tandis que celui de l'hémoglobine F est normal ou discrètement augmenté. Cliniquement, les patients sont bien portants et dénués de signes d'anémie. Exceptionnellement toutefois, une discrète splénomégalie peut être observée.

Enfin, les  $\beta$ -thalassémies silencieuses, de génotype  $\beta+/\beta$ , sont asymptomatiques cliniquement et hématologiquement [60].

**Tableau IV : Caractéristiques clinico-biologiques des  $\beta$ -thalassémies [60].**

Phénotype	Génotype	Tableau clinique	Diagnostic biologique	
			Hémogramme	Etude de l'Hb
$\beta$ -thalassémie silencieuse	$\beta^+/\beta$	Asymptomatique	Normal	Normale
$\beta$ -thalassémie mineure	$\beta^0/\beta$	Asymptomatique (parfois discrète microcytose)	Pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome ou microcytose isolée	Hb A2 $\uparrow$ (4 à 5 %) Hb F normale ou $\uparrow$ (2 à 7 %)
$\beta$ -thalassémie intermédiaire	$\beta^0/\beta^+$ $\beta^+/\beta^+$	Anémie hémolytique modérée avec hépatosplénomégalie  Transfusions sanguines exceptionnelles	Anémie microcytaire (Hb : 6-10 g/dL)	Hb A2 $\uparrow$ Hb F $\uparrow$ Hb A absente ou $\downarrow$
$\beta$ -thalassémie majeure	$\beta^0/\beta^0$	Anémie apparaissant au cours des premiers mois de la vie Hépatosplénomégalie et anomalies morphologiques  Evolution fatale en l'absence de transfusions sanguines	Anémie microcytaire hypochrome (Hb < 7 g/dL)	Hb F $\uparrow\uparrow$ (50 à 98 %) Hb A2 normale ou $\uparrow$ Hb A absente ou $\downarrow\downarrow$ selon les types d'anomalies moléculaires en cause

## F. Autres anomalies

### 1. Anomalies de synthèse des chaînes de globine

1.1.  $\delta\beta$ -thalassémie et les persistances héréditaires de l'hémoglobine fœtale (PHHF)

Les  $\delta\beta$ -thalassémies et les persistances héréditaires de l'hémoglobine fœtale (PHHF) sont des troubles hétérogènes caractérisés par la persistance d'un taux élevé d'Hb F à l'âge adulte, et par un défaut d'expression des hémoglobines A et A2. La distinction de ces pathologies est assez subtile, et repose sur des critères cliniques et hématologiques, comme le taux d'Hb F par exemple.

Chez les patients hétérozygotes pour la PHHF, le taux d'Hb F peut atteindre 30 %, alors que les patients hétérozygotes  $\delta\beta$ -thalassémiques présentent un taux d'Hb F plus bas, généralement retrouvé entre 5 et 20% [50]. Les patients homozygotes pour la PHHF peuvent quant à eux atteindre un taux de 100% d'Hb F. Ces chiffres sont donnés à titre indicatif, d'autant plus que le taux d'expression de l'Hb F est également variable selon les ethnies [6].

### **1.2.L'hémoglobine Lepore**

Les Hb Lepore s'apparentent aux  $\delta\beta$ -thalassémies ; il s'agit d'une forme avec expression d'une Hb structurellement anormale.

Les Hb Lepore sont caractérisées par un gène de fusion  $\delta\beta$  qui résulte d'un crossing-over entre gènes  $\delta$  et  $\beta$  de deux chromosomes, dû à un mauvais alignement des gènes au cours de la méiose. Les différentes localisations du crossing over définissent plusieurs Hb Lepore ; la plus fréquente est l'Hb Boston.

Par ailleurs, il existe également des Hb anormales appelées anti-Lepore dont la chaîne mutée commence par la séquence  $\beta$  et se termine par la séquence  $\delta$ .

Ces lésions sont responsables d'un syndrome thalassémique car la chaîne Lepore est exprimée cinq fois moins que le gène  $\beta$  normal.

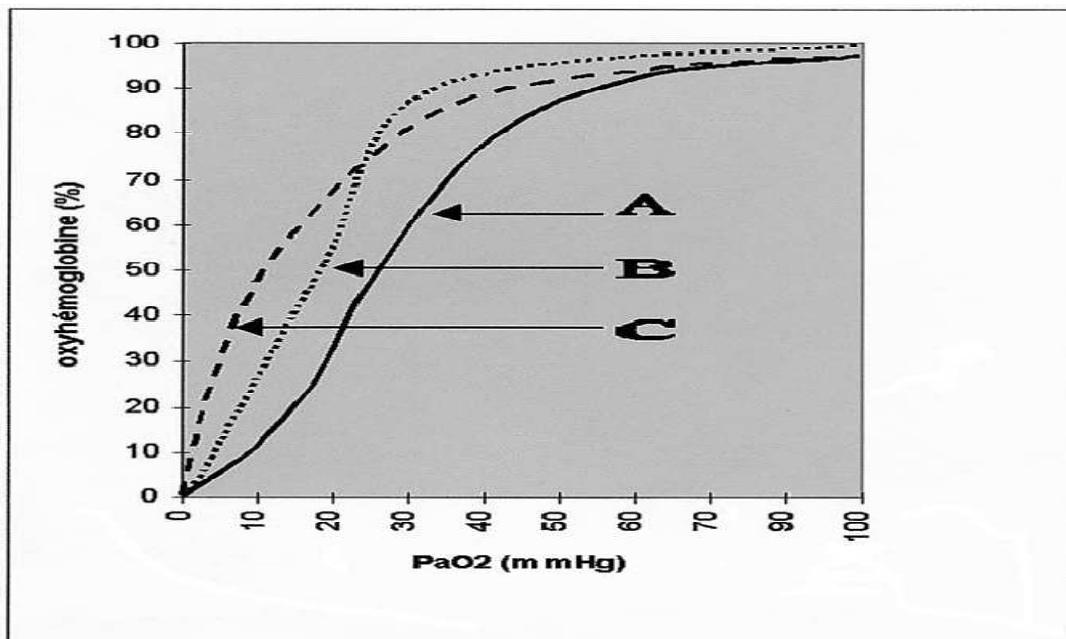
Les formes hétérozygote et homozygote des hémoglobines Lepore se comportent comme des  $\delta\beta$ -thalassémies hétérozygote ou homozygote, respectivement [35].

## **2. Anomalies structurales de la protéine**

### **2.1.Polyglobulie par « maladie de l'affinité» de l'hémoglobine pour l'oxygène**

Ce groupe rassemble 3 entités distinctes : les mutants hyperaffines de l'Hb pour l'oxygène, les déficits en 2-3 DPG et les méthémoglobinémies. Le déterminant commun entre ces maladies est l'existence d'une difficulté pour l'Hb à se libérer de son oxygène (hyperaffinité). Cette difficulté de libération de l'oxygène est dépistée par la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (**figure 22**). Cette courbe est établie aisément par des appareils automatiques, qui déterminent par spectrophotométrie, le pourcentage relatif

d'oxygène et de désoxyhémoglobine en fonction de la pression partielle en oxygène (PaO<sub>2</sub>) [61].



**Figure 22** : courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine [61].

## 2.2. Les mutants hyperaffines de l'hémoglobine pour l'oxygène

D'un point de vue physiopathologique, l'hyperaffinité s'explique par une anomalie structurale localisée de façon spécifique à certaines zones de la molécule d'Hb. Cette anomalie intéresse souvent le contact  $\alpha 1-\beta 2$  où se situe l'essentiel du mouvement qui accompagne la transition de la forme R vers la forme T. Quelques mutations interfèrent avec la liaison entre le 2-3 DPG et l'Hb. D'autres correspondent à un changement d'un acide aminé dans la portion C terminale d'une des chaînes de globine qui interfère avec la liaison avec l'hème.

Dans les cas les plus sévères, l'affinité de l'Hb mutée est identique à celle d'une chaîne de globine isolée et toute la coopérativité entre les molécules est abolie. Il en résulte habituellement une polyglobulie grave.

L'existence de signes cliniques est directement corrélée à l'existence d'une polyglobulie et à son importance. Ces signes cliniques sont totalement aspécifiques et sont à mettre en rapport avec le syndrome d'hyperviscosité (érythrose faciale et muqueuse, céphalées, vertiges, acouphènes, érythromélagie...).

D'un point de vue biologique, outre la polyglobulie, il existe fréquemment une carence martiale associée, s'expliquant par l'augmentation des besoins en fer, induits par l'augmentation de l'érythropoïèse. L'association d'une carence martiale et d'une polyglobulie inexplicquée est également évocatrice du diagnostic [61].

### **2.3.Polyglobulie par déficit en 2-3 DPG**

En pathologie, un déficit congénital en DiphosPho-Glycéro-Mutase, enzyme qui contrôle la production du 2-3 DPG, entraînant une carence de ce dernier, ce qui conduit à une augmentation de l'affinité de l'Hb pour l'oxygène et donc à une moindre libération de l'oxygène aux tissus périphériques.

Tout comme pour les mutants hyperaffines de l'hémoglobine, en dépit d'une PaO<sub>2</sub> normale, le capteur rénal perçoit une hypoxie, accroît la production d'érythropoïétine (EPO) ce qui conduit à la polyglobulie. Les polyglobulies par déficit en 2-3 DPG sont encore plus rares que les polyglobulies liées aux mutants hyperaffines de l'Hb [61].

### **2.4.Méthémoglobinémies**

La méthémoglobine est un produit d'oxydation de l'Hb dans lequel le fer, qui est passé de l'état ferreux à l'état ferrique, a perdu son pouvoir de fixer l'oxygène. À l'état normal, le sang renferme moins de 2 % de méthémoglobine. On parle de méthémoglobinémie en cas de présence de méthémoglobine dans le sang en quantité anormalement élevée.

C'est grâce à un système enzymatique intraérythrocytaire dont fait partie l'enzyme cytochrome b<sub>5</sub> réductase (encore appelée méthémoglobine réductase) que le taux de méthémoglobinémie est maintenu en permanence en dessous de 2 %.

Les méthémoglobinémies congénitales sont exceptionnelles. Il en existe 3 types, chacun pouvant être associé à une polyglobulie modérée : l'hémoglobine M, déficit en nicotinamide-adénine dinucléotide (NADH)-cytochrome b5réductase et déficit en cytochrome b5 [61].

Quel que soit le variant d'HbM, la mutation entraîne une oxydation de l'atome de fer de l'hème de la chaîne mutée, formant ainsi un dérivé phénolate ou carboxylate très résistant à la réduction enzymatique cellulaire [7]. L'HbM correspond à un tétramère hybride où un type de chaîne est à l'état Fe<sup>3+</sup>, et l'autre à l'état normal Fe<sup>2+</sup>, entravant la fixation et le transport de l'O<sub>2</sub>. Les chaînes normales restent capables de transporter l'oxygène. La mutation peut toucher la chaîne de globine  $\alpha$  comme la chaîne  $\beta$ , certaines mutations touchent même la chaîne  $\gamma$ , entraînant alors une cyanose néonatale, qui se résout spontanément avec le remplacement progressif de l'Hb F par de l'Hb A.

Cliniquement on observe une cyanose isolée cutanéomuqueuse, présente dès la naissance quand la mutation touche la chaîne  $\alpha$  (présente dans l'Hb F), et d'apparition plus intense et à partir de l'âge de 3 mois pour les mutations touchant la chaîne  $\beta$ , progressant au fur et à mesure du remplacement de l'Hb F par l'Hb A [62].



**TECHNIQUES D'ÉTUDE DE  
L'HÉMOGLOBINE**

# I. QUAND RECHERCHER UNE ANOMALIE DE L'HEMOGLOBINE ?

## A. Circonstances du diagnostic

Plusieurs situations peuvent conduire à la recherche d'une anomalie de l'Hb, dont :

- Le diagnostic étiologique d'anomalies biologiques :
  - ✓ Anomalie de l'hémogramme (anémie, microcytose, pseudopolyglobulie) et/ou du frottis sanguin (hématies cibles, drépanocytose, poïkilocytose, ponctuations basophiles, corps de Jolly)
  - ✓ Signes d'hémolyse (bilirubine libre augmentée, haptoglobine effondrée)
  - ✓ Découverte d'une fraction hémoglobinique anormale au cours d'une exploration électrophorétique ou chromatographique chez des patients explorés pour des raisons hématologiques, génétiques ou métaboliques (Hémoglobine A glyquée « HbA1c »,...).
- Le diagnostic étiologique d'anomalies cliniques :
  - ✓ Anémie hémolytique
  - ✓ Polyglobulie
  - ✓ Cyanose
  - ✓ Signes d'anémie (pâleur cutanéomuqueuse, asthénie, dyspnée, souffle cardiaque)
- Les consultations prénatales chez la femme enceinte d'ethnie « à risque » (Afrique, bassin méditerranéen, Asie, Antilles) avec étude de l'hémoglobine également chez le conjoint si nécessaire
- Le dépistage systématique chez un nouveau-né d'ethnie dite « à risque », avec confirmation de ce dépistage périnatal par étude complète de l'hémoglobine à 1 mois chez les enfants F/S
- L'enquête familiale suite à la découverte d'une hémoglobinopathie chez un proche[13, 63, 64].

## **B. Les signes d'appel**

Le caractère familial du signe d'appel, souvent associé à un contexte ethnique particulier, est un élément important d'orientation. Il n'est, cependant pas absolument constant.

### **1. L'anémie**

L'anémie est le signe le plus fréquent. Elle est très variable dans son intensité ; tous les intermédiaires existent entre les porteurs sains et les formes extrêmes des thalassémies majeures. Dans le cas d'un mutant de l'Hb, l'anémie est normocytaire et une microcytose doit faire rechercher une thalassémie associée ou une carence en fer.

Dans les thalassémies, la microcytose est constante avec une TCMH abaissée et une CCMH normale. Le fer sérique est normal ou parfois augmenté. Les signes d'hémolyse sont variables. Le taux de réticulocytes est également variable. La splénomégalie est fréquente, parfois associées à une hépatomégalie [65].

### **2. Microcytose isolée**

La microcytose isolée, sans anémie ni diminution de la sidérémie, est fréquente dans les thalassémies hétérozygotes.

### **3. Polyglobulie**

Une pseudoglobulie microcytaire est en faveur d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote. Une polyglobulie vraie, démontrée par une élévation de la masse globulaire, doit faire évoquer, surtout chez un sujet jeune, une augmentation de l'affinité de l'Hb pour l'oxygène, due à une Hb anormale ou à un défaut de synthèse du 2,3 DPG [65].

### **4. Cyanose**

Une cyanose est observée chez les porteurs d'une Hb M et exceptionnellement dans les cas de diminution de l'affinité des globules rouges pour l'oxygène. Il est important d'explorer

l'Hb dans ce cas avant d'envisager des investigations invasives telles qu'une cathétérisation cardiaque.

## **5. Autres signes**

Parmi les signes évocateurs d'une maladie de l'Hb, figurent également les lithiases vésiculaires et les urines épisodiquement foncées pour certaines Hb instables.

Enfin, l'Hydrops foetalis est la présentation classique des  $\alpha$ -T homozygotes observées exclusivement dans les populations asiatiques [65].

## **C. Enquête biologique**

Avant toute recherche d'anomalie de l'Hb, un bilan biologique relativement complet doit être réalisé, il comprend les paramètres suivants :

### **1. Hémogramme (Tableau V)**

Il reprend les paramètres de base qui sont :

- ✓ la numération des globules rouges en T/L
- ✓ l'hémoglobine en g/dL
- ✓ le VGM ou volume globulaire moyen en Fl
- ✓ la CCMH ou concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine en g/dL
- ✓ la TCMH ou teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine en pg

**Tableau V : Valeurs de référence de la numération globulaire et des paramètres érythrocytaires en fonction de l'âge et sexe [66].**

Paramètres (unités)	1ère semaine	8 jours à 3 mois	3 mois à 3 ans	3 à 6ans	6 à 15 ans	Adulte	
						Homme	Femme
Hématies (T/L)	5,0 à 6,0	3,8 à 4,8	3,6 à 5,2	4,1 à 5,3	4,0 à 5,4	4,5 à 5,8	3,8 à 5,4
Leucocytes (G/L)	10,0 à 30,0	6,0 à 18,0	6,0 à 15,0	5,0 à 13,0	5,0 à 11,0	4,0 à 10,0	
Plaquettes (G/L)	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	150 à 400	
Hémoglobine (g/dL)	14,5 à 22,5	11 à 16	11 à 13,5	11 à 13,5	12 à 14,5	13,5 à 17,5	12,5 à 15,5
Hématocrite (%)	44 à 58	38 à 44	36 à 44	36 à 44	37 à 45	40 à 50	37 à 47
VGM (fl.)	100 à 120	85 à 96	70 à 86	73 à 89	77 à 91	82 à 98	
TCMH (pg)	34 à 38	24 à 34	23 à 31	24 à 30	24 à 30	> ou = 27	
CCMH (g/dL)	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	32 à 36	

Ces valeurs vont nous permettre de déterminer s'il y a une anémie et de caractériser sa nature.

Enfin on portera une attention particulière aux potentielles anomalies morphologiques des érythrocytes (poikilocytose, drépanocytes, cellules-cibles...) et on notera la présence éventuelle d'inclusions érythrocytaires (corps de Howell-Jolly, corps de Heinz, ponctuations basophiles...).

### 1.1.Hémoglobines anormales

#### ❖ Drépanocytose [45]

##### ➤ Forme homozygote

- L'hémogramme sert à surveiller l'état basal : numération formule sanguine et réticulocytes avec anémie hémolytique régénérative (Hb  $\cong$  7g/dL, réticulocytes : 200-

600 G/L), hyperleucocytose >15 000 /mm<sup>3</sup> et hyperplaquettose > 400 000/mm<sup>3</sup>. Seul le taux d'Hb est donné dans le tableau II, les paramètres hématologiques variant selon le génotype, l'âge et le sexe des patients, avec des différences selon que l'examen est réalisé au cours d'une phase stationnaire ou au cours d'une crise aiguë ou de complications.

- Frottis sanguin:
  - ✓ Erythroblastose, poïkilocytose
  - ✓ Quelques drépanocytes spontanés
  - ✓ Corps de Jolly (hyposplénisme acquis)
- Test de falciformation entre lame et lamelle : **test d'EMMEL** +
  - **Forme hétérozygote**
    - ✓ Hémogramme normal, pas de drépanocyte circulant
    - ✓ Falciformation provoquée positive

#### ❖ **Hémoglobinose C [45]**

##### ➤ **Forme homozygote :**

Le taux d'hémoglobine est entre 10 et 13 g/dL, il y a 100-200 G/L de réticulocytes, 50 à 90% d'hématies en cible. A l'électrophorèse de l'Hb : HbC > 90%, HbA2 absente, HbF 3 à 8%.

##### ➤ **Forme hétérozygote :**

C'est une maladie inapparente. Le diagnostic est basé sur l'électrophorèse de l'Hb.

## **1.2. Les thalassémies**

### ❖ **β-thalassémies [35]**

#### ➤ **β-thalassémie homozygote majeure**

- ✓ Anémie sévère, intensément microcytaire et hypochrome, peu régénératif, les réticulocytes sont normaux
- ✓ Frottis : dysérythropoïèse : anisocytose, poïkilocytose, microcyte, annulocytose, il existe des GR en cible et des ponctuations basophiles

### ➤ **$\beta$ -thalassémie hétérozygote**

Il montre une microcytose, souvent sans anémie. Il peut même exister une pseudopolyglobulie avec augmentation du nombre de GR mais le taux d'Hb et l'hématocrite sont normaux. Les réticulocytes sont normaux ou peu augmentés.

### ❖ **$\alpha$ -thalassémies [35]**

Dans les  $\alpha$ -thalassémies 2, le volume globulaire moyen est souvent normal.

Dans les  $\alpha$ -thalassémies 1, le frottis sanguin montre une microcytose, une hypochromie et des cellules cibles.

Dans l'hémoglobinoses H, on observe :

- ✓ une microcytose importante (souvent inférieur à 50 fl)
- ✓ des anomalies de la morphologie érythrocytaire : hypochromie, punctuations basophiles, schizocytose, cellules cibles...
- ✓ une réticulocytose supérieure à 5 %.

## **2. Bilan martial**

Avant de rechercher une éventuelle hémoglobinopathie, il est impératif d'éliminer une anémie ferriprive.

En cas de carence martiale : La ferritine sanguine est diminuée (< 20  $\mu\text{g/L}$  chez la femme, < 30  $\mu\text{g/L}$  chez l'homme et la femme ménopausée), souvent effondrée.

Le fer sérique est diminué (< 11  $\mu\text{mol/L}$ ), souvent effondré. Seul il n'est pas interprétable et doit être associé à un autre examen : transferrine qui est augmentée, capacité total de fixation de la transferrine (augmentée), coefficient de saturation de la transferrine (diminué).

Le contraste entre une hypochromie et une ferritinémie normale ou augmentée élimine une carence martiale, évoque un syndrome thalassémique ; (carence martiale et syndrome thalassémique peuvent être associés ; le diagnostic de thalassémie ne pourra être fait qu'après correction de la carence martiale) [65].

### **3. Bilan inflammatoire**

Sidérémie et ferritine : la sidérémie est basse au cours des carences martiales comme au cours des syndromes inflammatoires. Pour lui donner un pouvoir discriminant, il faut coupler cet examen à l'étude de la capacité totale de fixation de la transferrine (ou sidérophiline), qui est élevée dans les carences martiales et pas dans les syndromes inflammatoires. Plus simplement, la ferritine est basse dans les carences martiales et normale ou élevée dans les syndromes inflammatoires.

La vitesse de sédimentation et surtout la CRP: sont de bons examens de dépistage des syndromes inflammatoires

L' haptoglobine et l'orosomucoïde sont élevées dans la plupart des situations inflammatoires, elles sont considérées comme les plus spécifiques des protéines de l'inflammation [65].

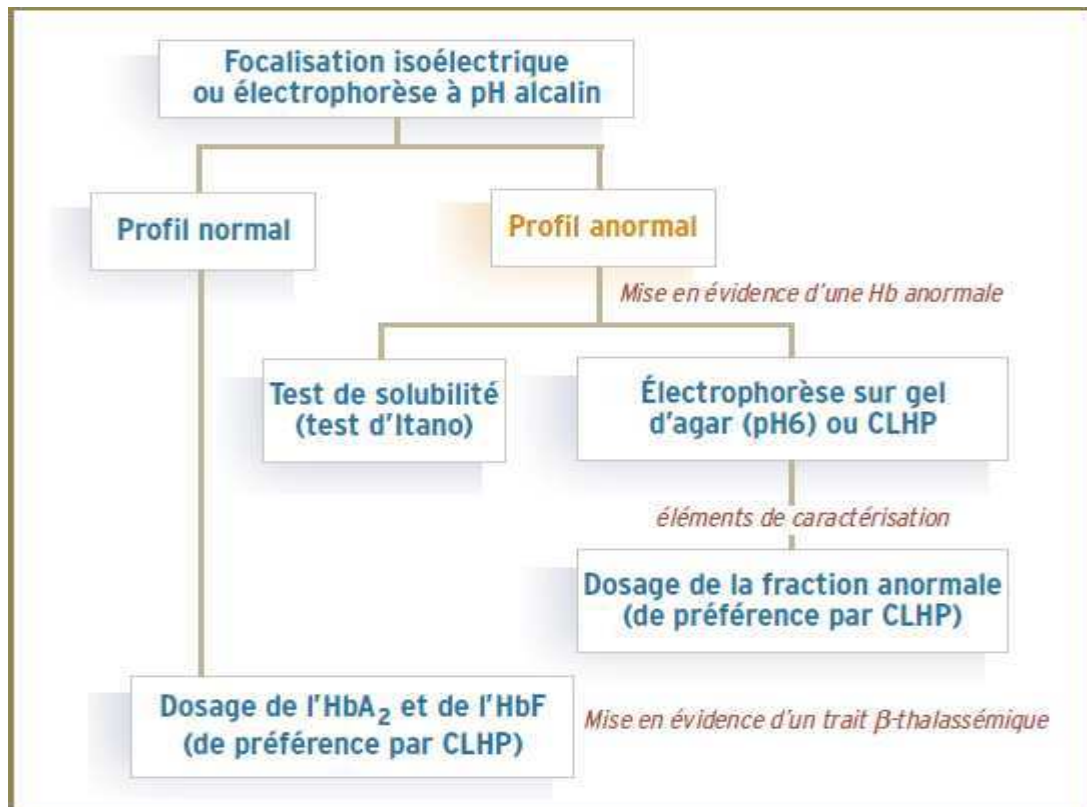
### **4. Bilan d'hyperhémolyse**

Il comprend notamment le dosage de la bilirubine libre et conjuguée, le dosage de l'haptoglobine, et éventuellement la quantification de la LDH, permet de confirmer le caractère hémolytique de l'anémie [65].

## II. STRATEGIE D'ETUDE DE L'HEMOGLOBINE

Selon le contexte, l'exploration des hémoglobinopathies passe par la mise en œuvre de techniques de première intention dont les examens réalisables en urgences, puis des techniques de deuxième intention [67]. L'isoélectrofocalisation ou l'électrophorèse à pH alcalin est en première intention, et au moins la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) en complément qui permet une quantification précise des fractions mineures de l'Hb (Hb A2 et Hb F).

La nomenclature des actes de biologie médicale, qui n'a pas changé depuis 1996, précise que 3 techniques au minimum sont nécessaires pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine (au moins une technique d'électrophorèse et 2 autres tests) (**figure 23**). C'est la complémentarité de celles-ci qui permet d'être le plus exhaustif possible dans le dépistage des anomalies de l'Hb. En effet, le changement de la charge électrique de l'Hb selon la technique utilisée entraînera une modification de sa migration, ce qui explique la nécessité de combiner ces différentes méthodes. De plus, il faut à la fois bénéficier d'une bonne technique séparative, mais qui nous permette également une quantification précise des fractions mineures que sont l'Hb A2 et l'Hb F, utile pour le diagnostic des thalassémies. En effet, une augmentation de l'Hb A2 et de l'Hb F orientera plutôt vers une  $\beta$ -thalassémie alors qu'une diminution de l'Hb A2 nous dirigera d'avantage vers la recherche d'une  $\alpha$ -thalassémie. La quantification des variants anormaux est aussi nécessaire pour éliminer par exemple une  $\alpha$ -thalassémie associée [64].



**Figure 23** : Stratégie proposée par la SFBC pour la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine [64].

## A. Techniques d'étude séparatives

### 1. Prélèvement

Le prélèvement se fait en général sur EDTA, parfois sur héparinate de lithium. L'utilisation d'ACD (adénine citrate dextrose) comme anticoagulant permet une meilleure conservation de l'échantillon. Un volume de 5 mL de sang est suffisant pour une étude de l'Hb par les techniques de première intention. Le sang total se conserve huit jours environ au réfrigérateur, 1 mois à -20 °C et quelques mois à -80°C, cependant la suspicion d'une Hb instable doit faire réaliser les analyses dès la réception du prélèvement.

L'étude des Hb doit se faire à distance (4 mois) de toute transfusion et en l'absence de carence martiale de préférence. En effet lors d'une carence martiale, la fraction A2 de l'Hb est la première touchée. Cette carence peut donc masquer une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote ou conduire à évoquer à tort la présence d'une  $\alpha$ -thalassémie mineure. Lors de la recherche d'une hémoglobinoïse, l'exploration peut être réalisée même en présence d'une carence martiale. Une demande d'étude de l'Hb doit s'accompagner de renseignements cliniques tels que l'origine géographique du sujet, les circonstances motivant l'examen, les statuts martial et transfusionnel du patient, les résultats de la numération formule si non pratiquée dans le même laboratoire [67].

## **2.Électrophorèse de l'hémoglobine**

Historiquement, l'électrophorèse s'est imposée comme la méthode de choix pour l'identification et la quantification des différentes fractions de l'Hb. L'électrophorèse implique la séparation d'espèces chargées sous l'influence d'un champ électrique, généralement basée sur leur rapport charge/masse. Cette technique est particulièrement bien adaptée à l'étude de l'Hb, dont les principaux variants peuvent être distingués par des rapports charge/masse différents. Initialement développée par Tiselius dans les années 1930, l'électrophorèse en veine liquide, réalisée dans un tube en U, a par la suite été supplantée par l'électrophorèse de zone, pratiquée dans une trame solide imprégnée d'une solution tampon [68,69].

### **2.1. L'électrophorèse de zone a pH alcalin (pH = 8,6)**

Sur support solide (acétate de cellulose ou agarose) est encore une technique largement utilisée. À pH alcalin, les Hb 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, soumis au champ électrique, il va être séparé 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.

La coloration avec un colorant protéique (amidoschwarz ou rouge Ponceau) permet une meilleure visualisation des bandes. La séparation des principaux mutants d'intérêt à pH alcalin est représentée (**figure 24**). Cette technique permet donc la séparation des principales hémoglobines : HbA, HbF, HbS/D/G et HbC/E/O-Arab [70].

**Les limites de l'électrophorèse de l'Hb à pH alcalin :** Une première limite est liée au principe de l'électrophorèse et à la structure de l'Hb. En effet, l'électrophorèse met en évidence des mutations ayant un retentissement sur la charge électrique globale de la molécule. Or, il existe des mutations qui ne modifient pas cette charge. C'est le cas, entre autres, des mutations concernant les zones de contact entre sous-unités et la poche de l'hème. Ces mutations auront souvent un retentissement sur les aptitudes fonctionnelles de l'Hb. Pour les mettre en évidence, il sera nécessaire de faire appel à des tests complémentaires autres que l'électrophorèse.

Une deuxième limite est liée aux conditions techniques de l'électrophorèse ; la charge électrique globale d'une protéine dépend en effet du pH du tampon dans lequel elle se trouve. Des Hb différentes peuvent avoir une même position électrophorétique à un pH donné ; elles ne seront séparées que sur des tracés électrophorétique utilisant des tampons à d'autres pH [65].

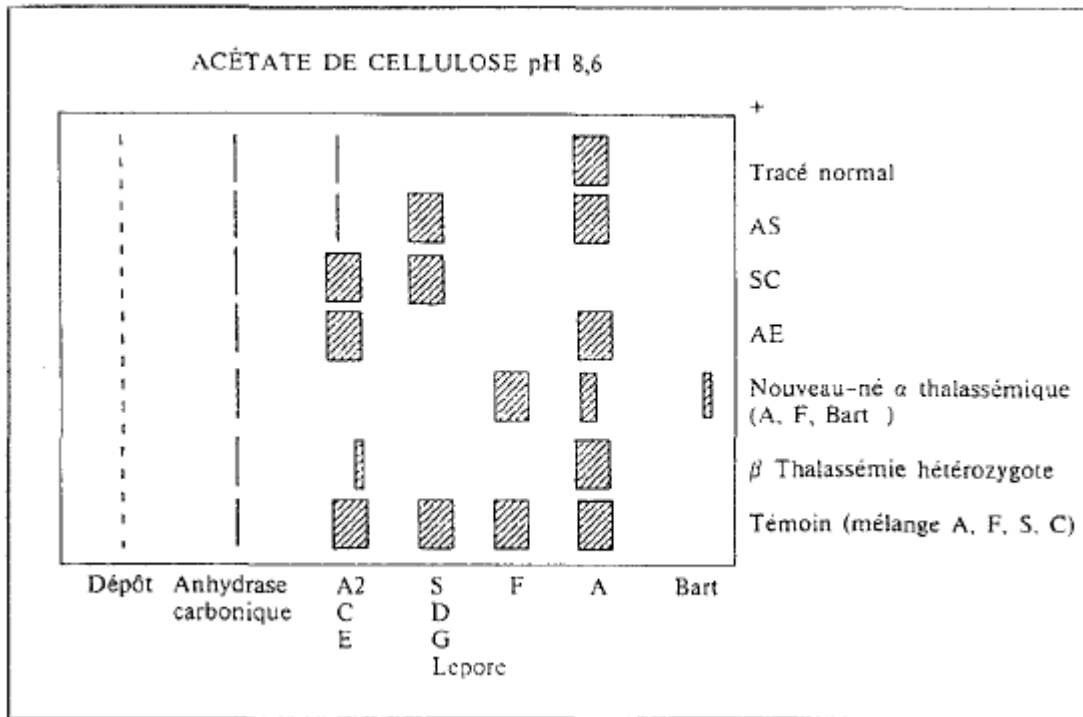


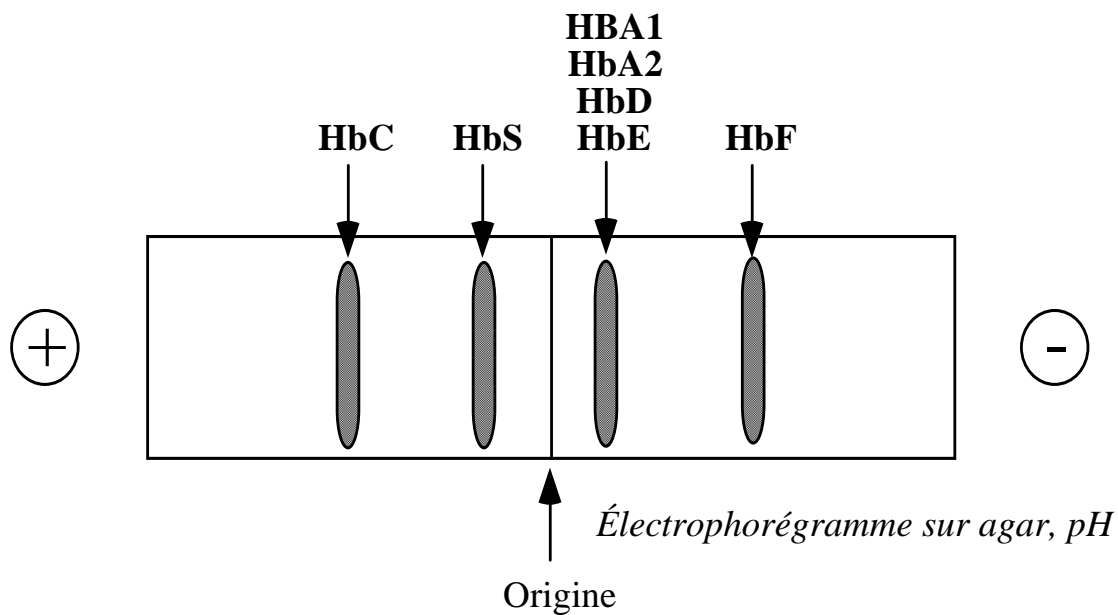
Figure 24 : Electrophorèse à pH alcalin : position des différentes hémoglobines [65].

## 2.2. L'électrophorèse à pH acide

Cette technique complète l'électrophorèse à pH alcalin. La migration des Hb sur gel d'agar en citrate à pH acide n'est pas à proprement parler une électrophorèse puisque la migration n'y est pas en rapport avec la charge. Dans ces conditions, l'Hb se lie de façon réversible à l'agaropectine, et le complexe formé migre vers l'anode. D'autre part, le courant d'électro-endosmose provoque une diffusion continue vers la cathode. Ces deux mouvements de directions opposées séparent donc les Hb en fonction de leur affinité pour l'agaropectine. Cette affinité est directement liée à la conformation de certaines régions de la molécule, en particulier celle où se situe la substitution de l'HbS, et toutes les zones impliquées dans les interactions avec les anions [71].

Son principal avantage est qu'en complément de l'électrophorèse à pH alcalin, elle peut séparer l'HbS des mutants « S-like », et l'Hb C de l'HbE.

Ces deux techniques présentent l'inconvénient d'être consommatrices de temps et de main d'œuvre. En outre, elles manquent de précision pour la quantification des Hb en concentrations faibles, comme l'Hb A2, et pour la détection des variants à migration rapide, comme l'Hb H ou l'Hb Bart's. Il est même maintenant admis que la quantification des variants par densitométrie manque de précision et que ces deux techniques d'électrophorèse doivent être utilisées à visée qualitative. Elles sont donc aujourd'hui le plus souvent utilisées combinées à une autre méthode, principalement la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) [2,64].



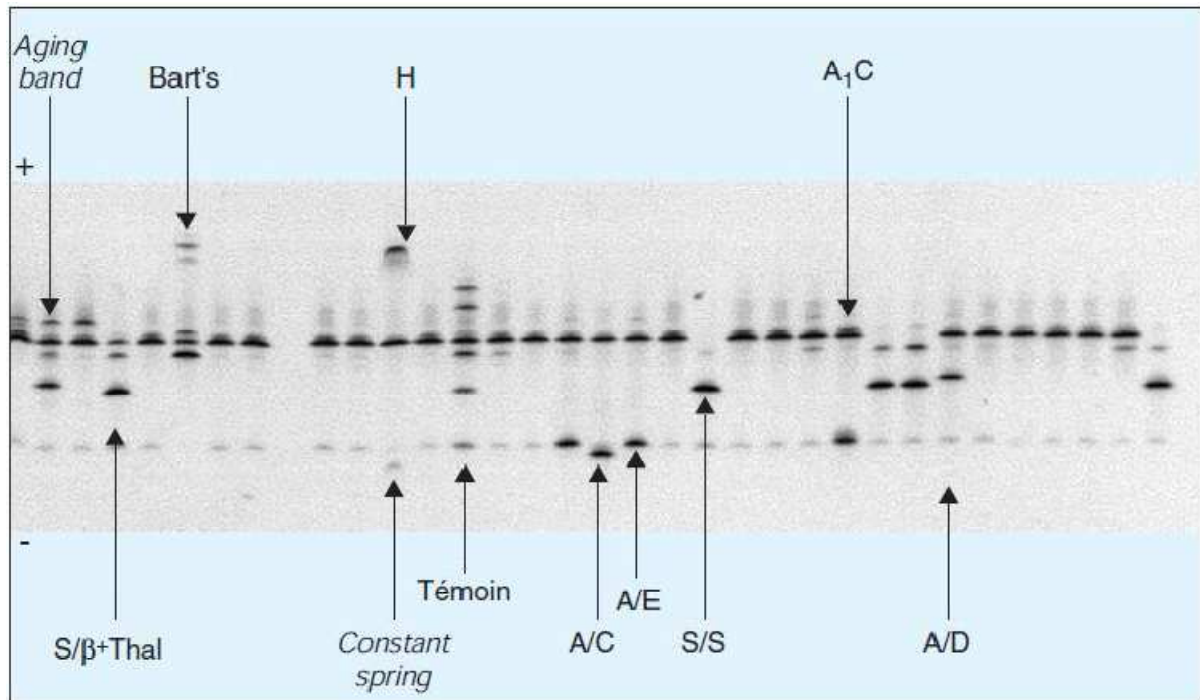
**Figure 25** : Electrophorèse sur gel d'agar à pH = 6 [71].

### 2.3. Isoélectrofocalisation (figure 26)

Cette technique semi-automatisée, permet la séparation des Hb en fonction de leur point isoélectrique dans un gradient de pH (pH 6 à pH 8), sous voltage élevé. La visualisation définitive des fractions hémoglobiniques est réalisée par une brève fixation par l'acide trichloracétique. Cette méthode permet, d'une part, la séparation rapide de la plupart des Hb, notamment les Hb C et E, ou S et D, et d'autre part, elle permet la mise en évidence d'Hb instables non identifiables par les techniques classiques d'électrophorèse à pH alcalin. De

plus, grâce à la bonne séparation de l'Hb F et de l'Hb A, la focalisation isoélectrique constitue la méthode de choix dans le dépistage des hémoglobinopathies chez le nouveau-né.

**Limites de la technique** : cette technique présente l'inconvénient de ne pas permettre d'effectuer un dosage précis des diverses fractions ni de différencier Hb S de Hb D, Hb G et Hb Lepore, non plus que Hb C et Hb E de Hb O-Arab [64].



**Figure 26** : Isoélectrofocalisation en gel d'agarose [64].

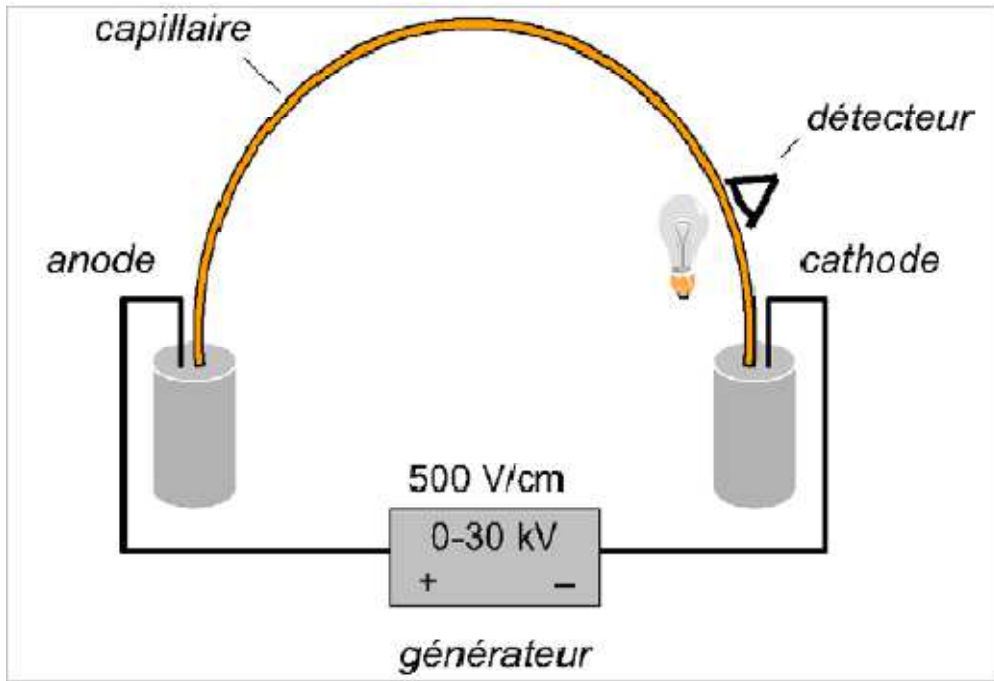
Cependant, ces techniques électrophorétiques manuelles laissent de plus en plus place à l'électrophorèse capillaire, rapide et automatisée. En effet, cette dernière, dont le principe sera décrit plus précisément dans le chapitre suivant, permet une quantification précise des différentes fractions de l'Hb, semblable à celle de la CLHP. Elle est donc aujourd'hui en plein essor et fait l'objet de développements commerciaux importants. Ainsi, Sebia a commercialisé le système Capillarys® en 2001, puis le système Minicap® en 2007.

## **2.4.Électrophorèse capillaire**

### **2.4.1.Principe**

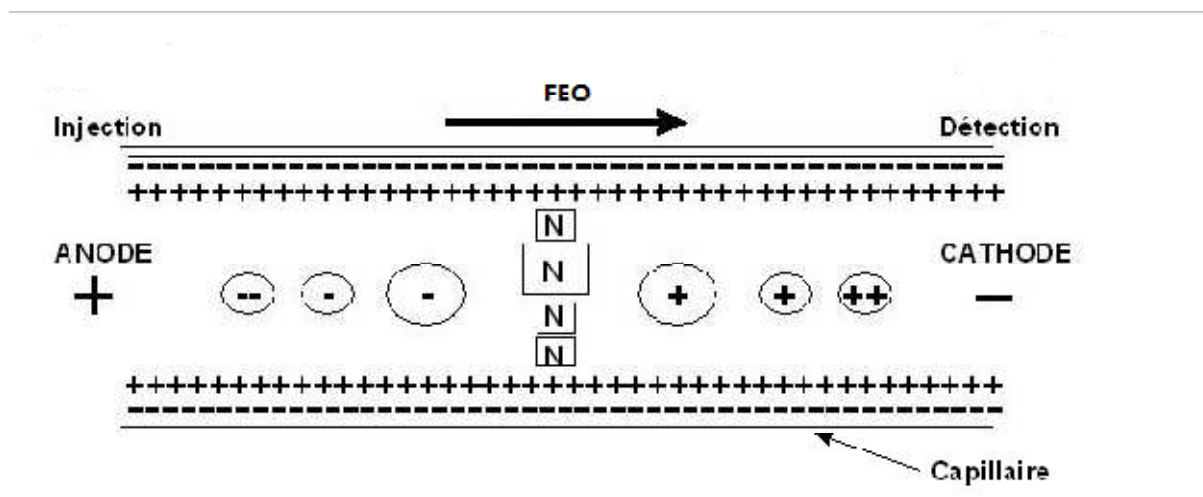
L'invention de l'électrophorèse capillaire remonte à la fin des années 1960, quand Hjertén puis Everaerts et Keulemans réussirent à contrôler les problèmes de convection, liés à l'effet Joule et rencontrés en électrophorèse sur support solide, en réalisant l'électrophorèse dans des tubes en Téflon [72, 73].

Classiquement, l'électrophorèse capillaire est pratiquée dans un capillaire de silice fondue recouvert d'une couche de polyimide de 20 à 200  $\mu\text{m}$  de diamètre interne et de 20 à 200 cm de longueur. Le capillaire, placé dans un système de thermostatisation, est rempli d'une solution tampon et plonge dans deux réservoirs contenant cette même solution. Chaque réservoir est connecté à une électrode reliée à un générateur de courant. Une forte différence de potentiel (plusieurs milliers de volts) est appliquée aux bornes de chaque capillaire pour séparer les molécules sur la base de leur rapport charge/masse. L'appareillage comporte également un système de détection, le plus souvent un spectrophotomètre UV-visible, en lien avec la longueur d'onde d'absorption spécifique des hémoglobines à 415 nm (**Figure 27**) [68,72, 73].



**Figure 27** : Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire [73].

Cette technique, basée sur une séparation électrocinétique, est caractérisée par l'interface solide-liquide entre la paroi du capillaire en silice et l'électrolyte qui le remplit. En fonction du pH du tampon, les groupements silanols de la silice s'ionisent, conférant à la paroi des charges négatives à l'origine du flux électro-osmotique, plus ou moins important, orienté vers la cathode. D'autre part, chaque molécule chargée est caractérisée par sa propre mobilité électrophorétique dans un tampon de pH donné, celle-ci étant fonction de la charge, taille et forme de la molécule et de la viscosité du tampon. Dans un tampon de pH donné, les molécules chargées sont alors séparées en fonction du flux électrophorétique, dépendant de la mobilité électrophorétique de la molécule et du champ électrique appliqué, et en fonction du flux électro-osmotique (**Figure 28**) [72, 73].



**Figure 28** : Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électroosmotique à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon [74].

L'électrophorèse capillaire a connu un développement important et a donné naissance à toute une famille de techniques telles que l'isotachophorèse capillaire, l'électrophorèse capillaire en zone et la focalisation isoélectrique capillaire notamment [73].

Ainsi, les premières analyses de l'Hb par électrophorèse capillaire ont été réalisées en 1975 par Arlinger qui a mis au point une technique d'isotachophorèse. Dans cette technique, le capillaire est rempli par un électrolyte meneur de mobilité plus élevée que celle des analytes et un électrolyte terminal de mobilité plus faible. L'échantillon est placé entre ces deux tampons et les analytes se séparent en bandes en fonction de leur mobilité électrophorétique. Cependant, les séparations obtenues présentaient l'inconvénient de ne pas être suffisantes, complètes. De ce fait, peu de méthodes utilisant ce principe ont fait l'objet de publications [73, 75].

Par la suite, l'électrophorèse capillaire en zone, classique, a beaucoup plus été étudiée et utilisée pour le diagnostic des hémoglobinopathies. Ainsi, dès 1991, Chen a réalisé la séparation des Hb A, S et C par électrophorèse capillaire en zone à pH alcalin (8,6) avec des résultats comparables voire supérieurs à ceux obtenus sur support solide, dans des temps d'analyse relativement courts (8 minutes) [76]. D'autres méthodes similaires ont été ensuite évaluées. Par exemple, Jenkins a développé une méthode comparable en termes de capillaire

et de pH permettant une détection et une quantification satisfaisante des Hb S, D et E, sans toutefois parvenir à séparer l'Hb F de l'hémoglobine A [73, 77]. En 1999, l'équipe de Cotton, de même que Mario *et al.*, a montré qu'un recouvrement dynamique des parois du capillaire par des polymères chargés permettait d'obtenir une séparation très reproductible et très rapide (5 minutes) des variants les plus courants [78].

Une autre technique d'électrophorèse capillaire, la focalisation isoélectrique capillaire, a ensuite été mise au point par de nombreuses équipes au début des années 1990 [73]. Il s'agit de l'une des méthodes les plus résolutive sur support solide, permettant d'excellentes séparations dans des temps d'analyses raisonnables. Le principe général de cette méthode consiste en une focalisation de l'Hb dans une solution d'ampholytes créant un gradient de pH de 3 à 10 dans un capillaire neutre, avec recouvrement permanent des parois. Parmi les équipes ayant développées cette méthode, on peut citer Zhu et Molteni [79]. Ceux-ci ont montré la séparation de variants courants (Hb S, Hb C, Hb E, Hb G Philadelphia) ainsi que celle d'Hb anormales associées aux  $\alpha$ -thalassémies (Hb H, Hb Bart's). D'autres équipes ont obtenu des résultats similaires, dont Mario *et al.* [80], ainsi que Hempe *et al.* qui a également étudié la séparation de variants plus rares et a mis en évidence certaines limites de la méthode, comme par exemple une mauvaise séparation des Hb E, Hb C-Harlem et Hb O-Arab [81, 82].

L'électrophorèse capillaire s'est donc rapidement imposée comme méthode de choix, au même titre que la CLHP, pour l'étude des hémoglobinopathies. De plus, elle présente un intérêt économique : bien que le coût matériel soit comparable à celui de la CLHP, les dépenses en réactifs sont nettement moindres. En effet, le prix d'un capillaire est très inférieur à celui d'une colonne de chromatographie et les volumes de tampon utilisés sont bien plus faibles, de l'ordre de 1000 fois moins. Ses performances analytiques, combinées à un coût raisonnable, ont contribué au développement rapide du système d'électrophorèse capillaire en zone Minicap® commercialisé par Sebia, fondé sur la même technologie que l'appareil Capillarys® [73].

### **2.4.2. Electrophorèse capillaire en zone MINICAP**

Le Kit MINICAP HEMOGLOBIN permet la séparation en milieu basique (pH 9,4) des Hb du sang humain (A, F et A2) et la détection des principales Hb anormales (notamment S, C, E et D) par électrophorèse capillaire dans le système automatique MINICAP.

Le système MINICAP permet de réaliser toutes les séquences de l'électrophorèse jusqu'à l'obtention du profil des Hb pour l'analyse qualitative ou quantitative. L'analyse peut être réalisée sur l'hémolysât de globules rouges sédimentés, centrifugés ou lavés, à partir de sang prélevé sur anticoagulant contenant de l'EDTA-potassium ; en effet le lavage des globules rouges n'est pas indispensable.

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

Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies. La détection directe donne automatiquement une quantification relative précise de chaque fraction individualisée dont les Hb présentant un intérêt particulier, telles que l'Hb A2 pour le diagnostic des  $\beta$ -thalassémies. De plus, la bonne séparation des différentes fractions permet de détecter des variants de l'Hb, en particulier, de différencier l'Hb S de l'Hb D, et l'Hb E de l'Hb C.

La quantification de l'Hb A2 est également possible en présence d'Hb E [83].

#### **a) principe**

Le système MINICAP utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre, qui présente la forme la plus courante de l'électrophorèse capillaire. Il permet la séparation de molécules chargées en fonction de leur mobilité électrophorétique propre dans un tampon de pH donné, et selon le pH d'électrolyte, d'un flux électro-osmotique plus ou moins important. Le système MINICAP comprend 2 capillaires en parallèle, permettant 2 analyses simultanées.

Sur ce système, l'injection dans les capillaires de l'échantillon dilué dans la solution hémolysante est effectuée à l'anode par aspiration. La séparation est ensuite réalisée en appliquant une différence de potentiel de milliers de volts aux bornes de chaque capillaire. La

détection directe des Hb est effectuée à 415 nm côté cathode. Avec le tampon utilisé à pH basique, l'ordre de migration des principales Hb normales et anormales est le suivant, de la cathode vers l'anode :  $\delta$ A2 (variant d'A2), C, A2/O-Arab, E, S, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore et H [83].

**b) Interprétation des profils électrophorétiques [84, 85].**

- **Les profils électrophorétiques normaux**

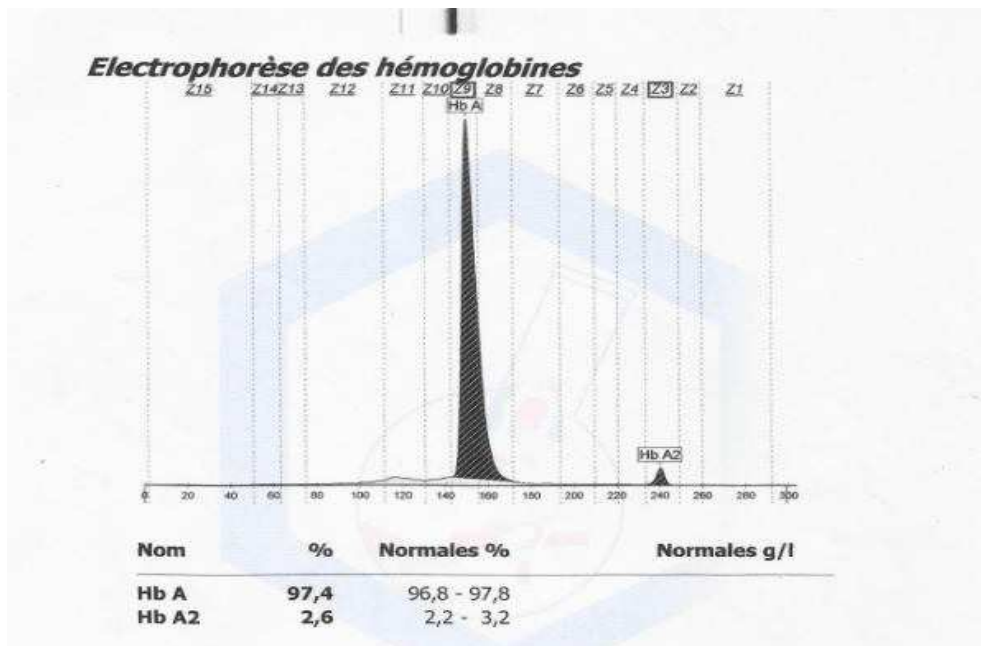
- **Chez l'adulte :**

Chez l'adulte normal, la concentration relative (pourcentages) de chaque fraction d'Hb détectée sur l'électrophorèse capillaire à 415nm est la suivante :

Hémoglobine A : comprise entre 96,8 et 97,8 %

Hémoglobine F : < 0,5 %

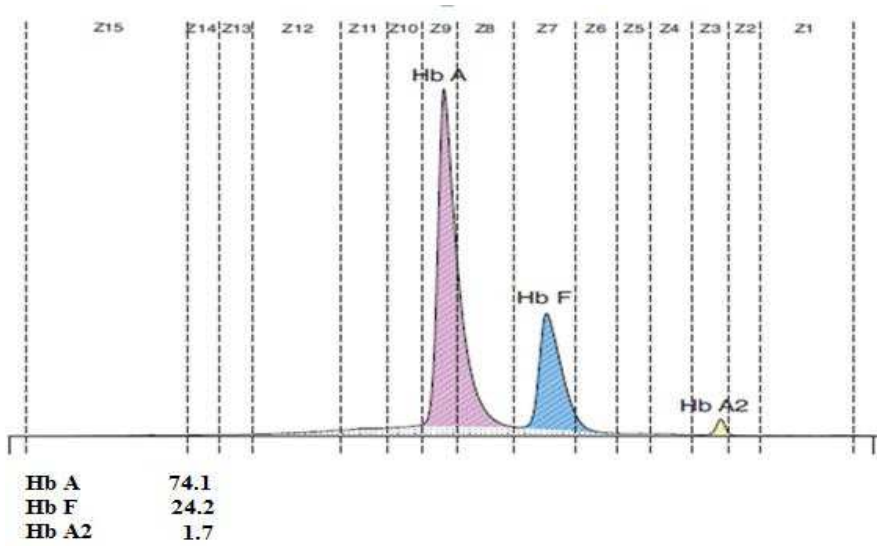
Hémoglobine A2 : comprise entre 2,2 et 3,2 %



**Figure 29 :** Profil électrophorétique normal chez un adulte

➤ **Chez le nourrisson avant 6 mois**

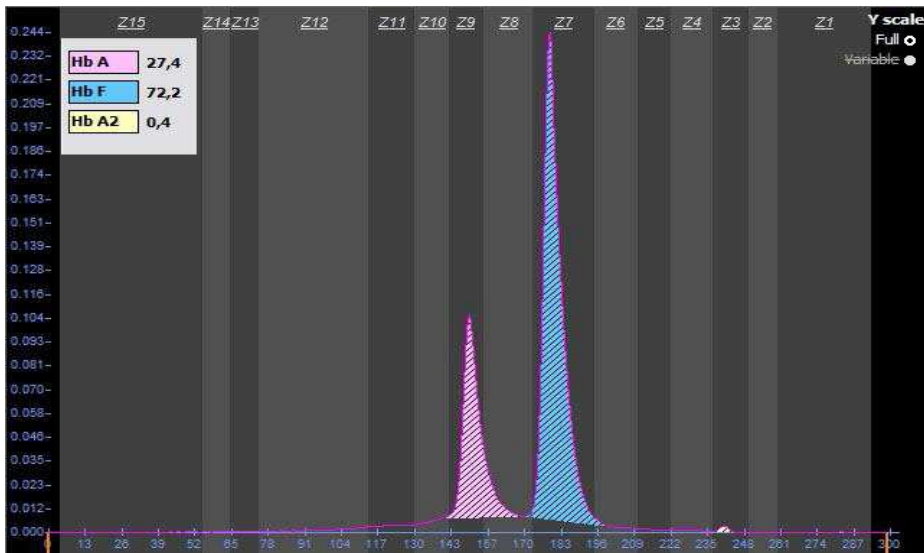
L'Hb devient majoritaire à partir de 3 mois, avec présence de l'Hb F. le profil adulte est atteint entre 6 et 12 mois d'âge.



**Figure 30 :** Profil électrophorétique obtenu chez un jeune enfant

➤ **Chez le nouveau-né**

À la naissance, le pourcentage d'Hb A est de 15 à 30%, tandis que l'Hb fœtale représente 60 à 80% de l'Hb du nouveau-né.



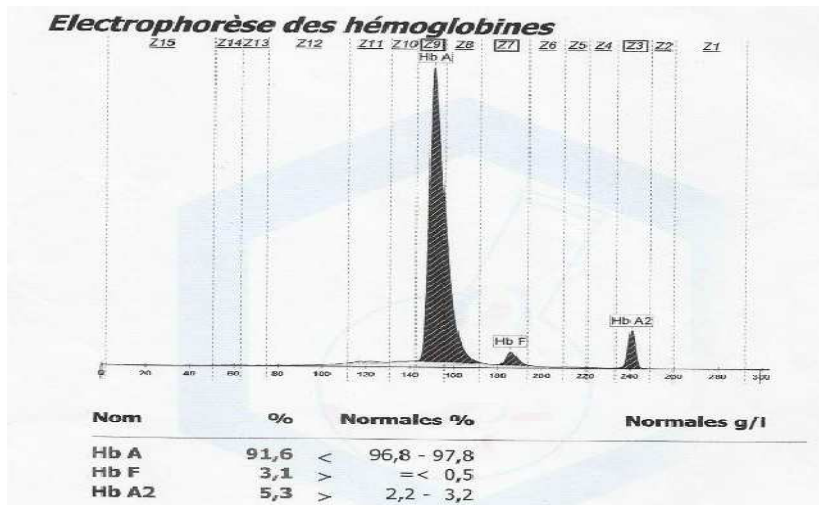
**Figure 31** : Profil électrophorétique d'un nouveau né de 3 semaines

## Anomalies quantitatives

### ➤ Les $\beta$ -thalassémies

Elles sont caractérisées par la diminution ou l'arrêt de synthèse des chaînes  $\beta$ . La synthèse de l'Hb A ( $\alpha_2, \beta_2$ ) est, soit diminuée ou arrêtée. Les pourcentages des Hb F et A2 sont augmentés. La technique MINICAP HEMOGLOBIN(E) permet, à partir des valeurs des différentes fractions d'Hb, de détecter les cas de  $\beta$ -thalassémie homozygote et hétérozygote

### **$\beta$ -thalassémie hétérozygote :**

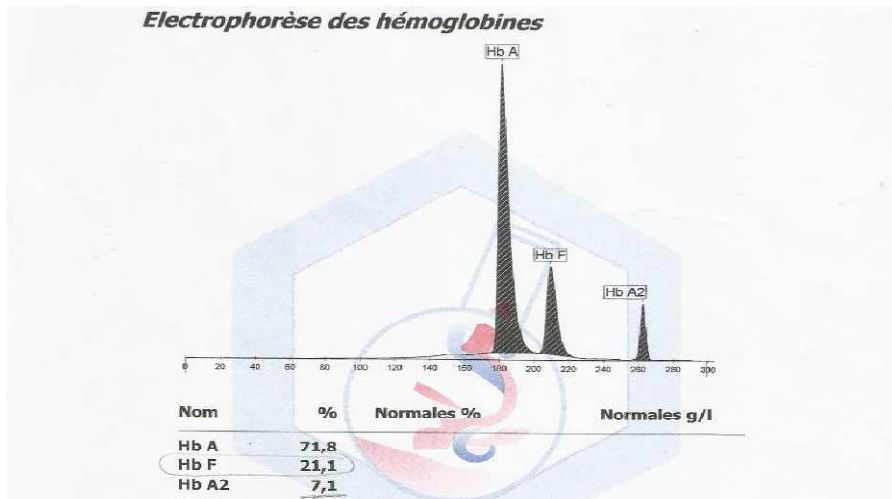


**Figure 32 :** Tracé électrophorétique d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote

Le profil des  $\beta$ -thalassémies hétérozygotes est caractérisé par une augmentation de l'HbA2 (> 3,3%), généralement entre 4 à 6 % et une Hb F qui peut être normale ou peu augmentée (2 à 7%) dans 30 à 50% des cas.

### **$\beta$ -thalassémie homozygote :**

Au cours des  $\beta$ -thalassémies homozygotes, la classification dépend de la synthèse diminuée des chaînes  $\beta$  ( $\beta^+$ ) ou supprimée ( $\beta^0$ ). La distinction entre les thalassémies de forme majeurs ou intermédiaires n'est possible qu'après plusieurs mois de vie, après que l'Hb F ne masque plus l'anomalie de synthèse de l'Hb A.



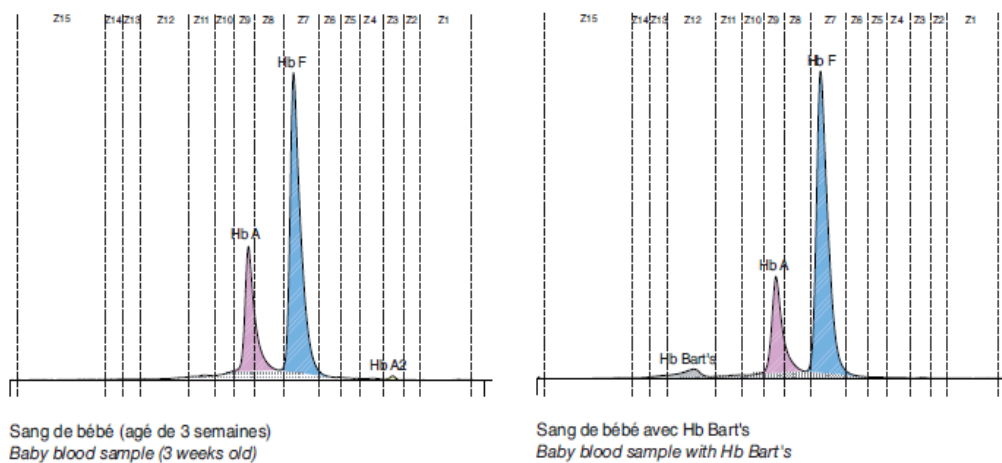
**Figure 33 :** Profil électrophorétique d'une  $\beta^+$  thalassémie

➤ **Les  $\alpha$ -thalassémies**

L'excès de synthèse des chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  par rapport aux chaînes  $\alpha$  provoque la formation de tétramères sans chaîne  $\alpha$  :

Hémoglobine Bart =  $\gamma_4$ ,

Hémoglobine H =  $\beta_4$ .



**Figure 34 :** Profil électrophorétique d'Hb Bart's

L'Hb H possède un point isoélectrique relativement bas. Dans la technique MINICAP HEMOGLOBINE, elle migre en position plus anodique que l'Hb A (et peut être présente sous la forme d'une ou de plusieurs fractions).

- **Anomalies qualitatives**

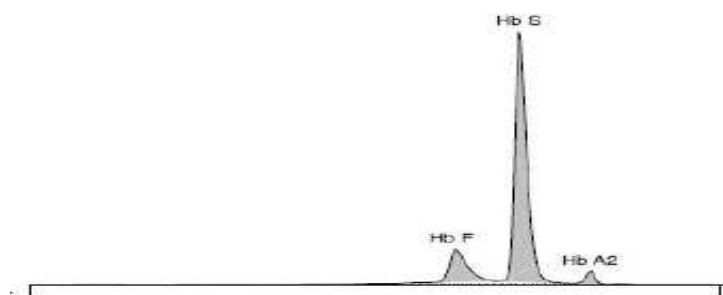
- **Hémoglobine S**

Dans la technique MINICAP HEMOGLOBIN(E), en tampon alcalin, l'Hb S migre entre les fractions A et A<sub>2</sub>, à environ 1/3 de la distance A-A<sub>2</sub>, du côté A<sub>2</sub>.

**Drépanocytose homozygote :**

Il existe une absence d'Hb A, deux cas peuvent se présenter : soit l'Hb S est nettement majoritaire et elle est en général associée à une bande minoritaire d'Hb F, soit l'Hb S est associée à une autre Hb anormale.

Dans la **figure 35**, un taux d'Hb S en moyenne entre 77 et 98 % permet d'évoquer une drépanocytose homozygote SS associée ou non à une  $\alpha$ -thalassémie, ou un syndrome drépanocytaire S $\beta$ 0 ; en cas de trait  $\alpha$ -thalassémique associé, il peut y avoir atteinte d'un seul gène (sujets SS  $\alpha^-/\alpha\alpha$ ) ou de deux gènes (SS  $\alpha^-/\alpha^-$ ).



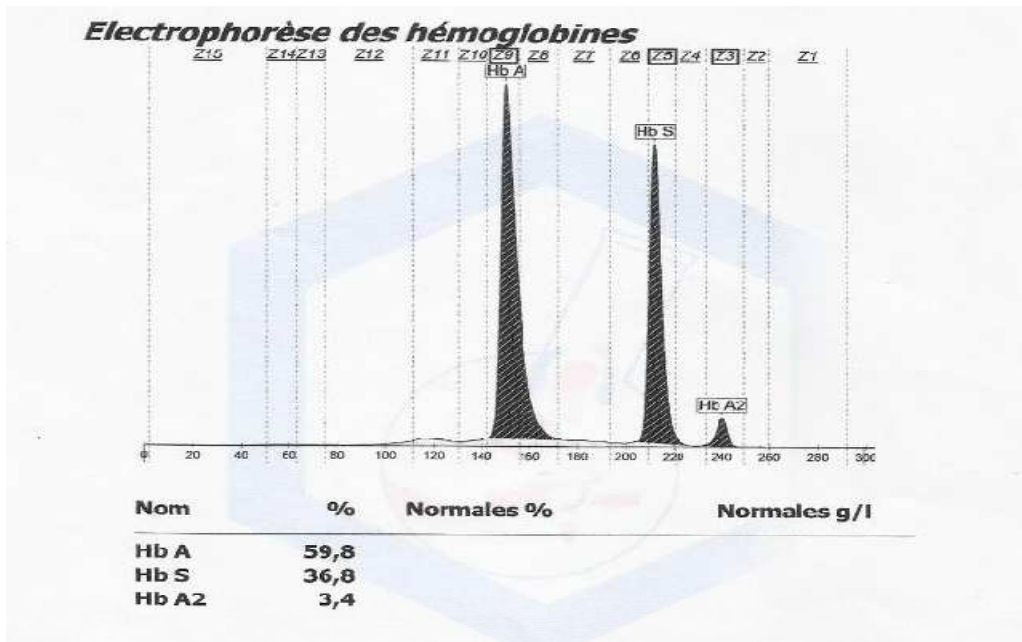
**Hb S = 77 à 98%**

**Hb F = 2 à 20%**

**Hb A<sub>2</sub> = 2 à 3%**

**Figure 35 :** Profil électrophorétique d'un sang avec variant homozygote HbS

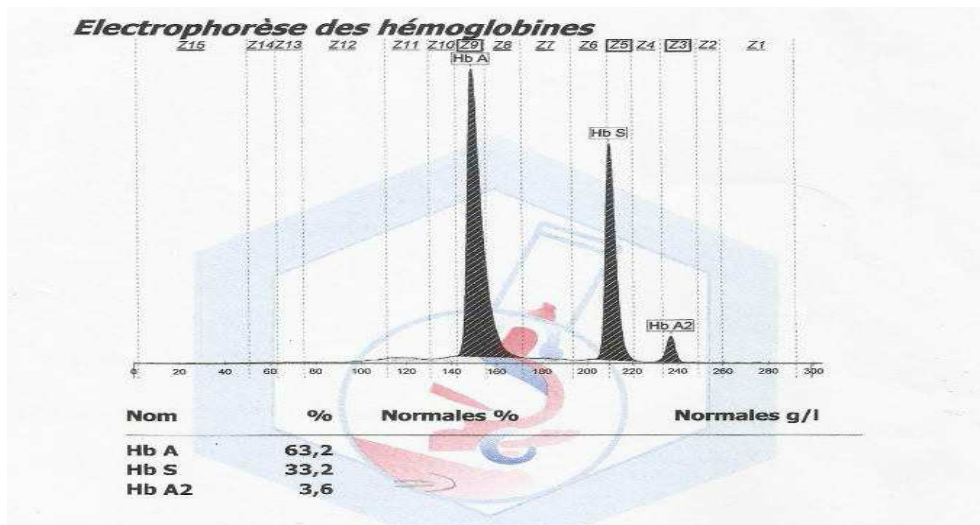
### Drépanocytose hétérozygote :



**Figure 36 :** Tracé électrophorétique d'une hémoglobinose S hétérozygote

L'Hb S représente une fraction de l'ordre de 35 à 40% de l'hémoglobine totale. Le taux l'Hb A peut atteindre 60 à 65%, tandis que le taux d'Hb A2 est variable car le dosage de l'Hb A2 peut être l'objet d'une contamination par des fractions dérivées de l'Hb S.

## S hétérozygotes et $\alpha$ -thalassémies associées :



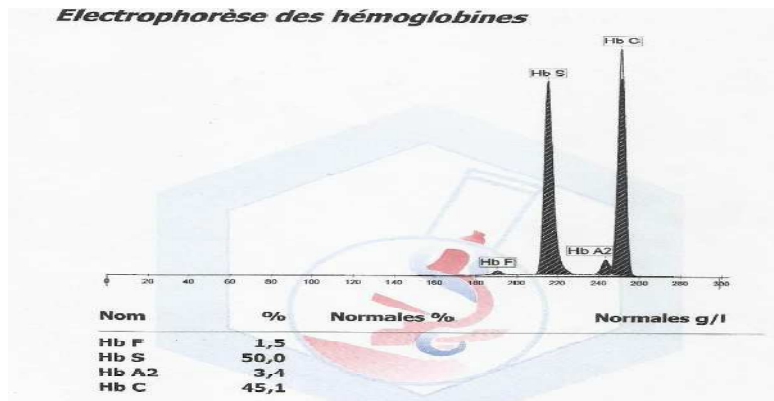
**Figure 37 :** Electrophorèse d' Hb S hétérozygotes associée avec une  $\alpha$ -thalassémies

Cette association est caractérisée par une diminution du taux de l'Hb S en fonction du nombre de gènes  $\alpha$  délétés : un seul gène  $\alpha$  délété, le taux de l'Hb S se situe entre 30 à 35% deux gènes  $\alpha$  délétés, le taux de l'Hb S est inférieur à 30%.

### Hétérozygotie composite S/C

Les hétérozygotes composites (SC), chez qui l'électrophorèse de l'Hb montre 50% d'HbC et 50% d'HbS (**figure 38**), associé à une anémie modérée microcytaire ou normocytaire.

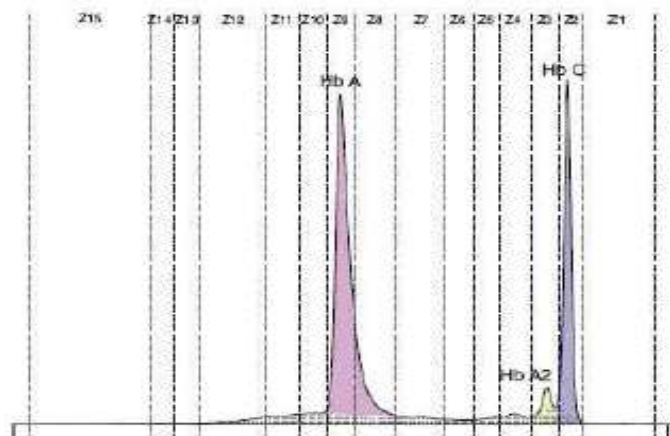
Ils doivent être considérés comme des drépanocytaires homozygotes SS, bien que la symptomatologie soit en général un peu moins sévère que chez les sujets SS.



**Figure 38** : Tracé électrophorétique d'une hétérozygotie composite S/C.

➤ **L'hémoglobine C**

**Hb C hétérozygote :**



**Figure 39** : Profil électrophorétique d'un sang avec hémoglobine C hétérozygote

**Hb A = 66,5%**

**Hb A2 = 2,5%**

**Hb C = 31,00%**

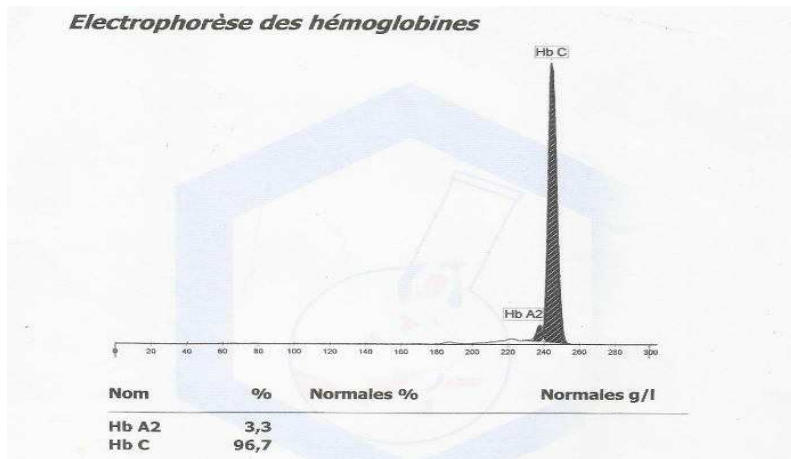
L'hémoglobine C est due à une substitution d'un acide glutamique de la chaîne  $\beta$  par une lysine; elle présente ainsi un point isoélectrique augmenté par rapport à l'hémoglobine A. Sa charge négative globale est donc diminuée au pH de l'analyse : cette hémoglobine migre

plus rapidement que les hémoglobines A et A2, dont elle est partiellement séparée, ce qui améliore nettement le diagnostic (**figure 39**).

Les hétérozygotes (A/C) peuvent être assimilés aux hétérozygotes (AS), ils ne manifestent aucun symptôme de la maladie, à l'exception du risque génétique de transmettre le gène anormal, ils sont détectés au cours d'une enquête familiale.

#### **Hb C homozygote :**

Présence exclusive d'Hb C à un taux supérieur à 90%.



**Figure 40 :** Tracé électrophorétique d'une hémoglobinose C homozygote

#### ➤ **Hémoglobine O-Arab**

L'hémoglobine O-Arabe migre au niveau de la fraction A2. La fraction HbA2 dépasse rarement 9%. L'hémoglobine O-Arabe est donc facilement identifiée

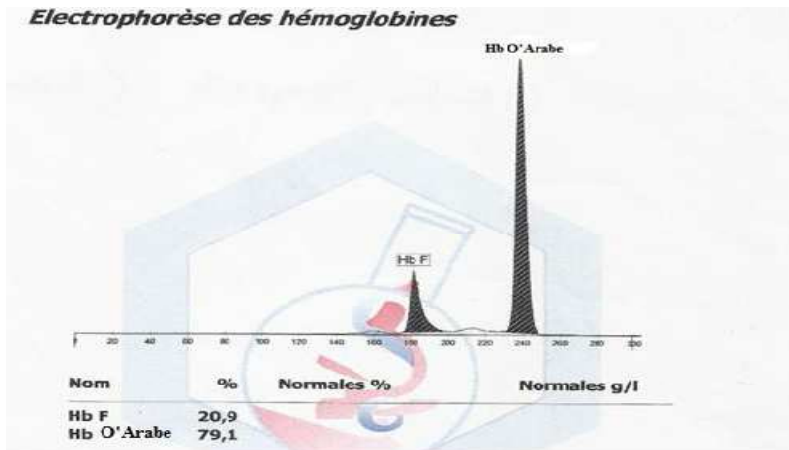


Figure 41: Tracé électrophorétique d'une hémoglobine O-Arabe homozygote

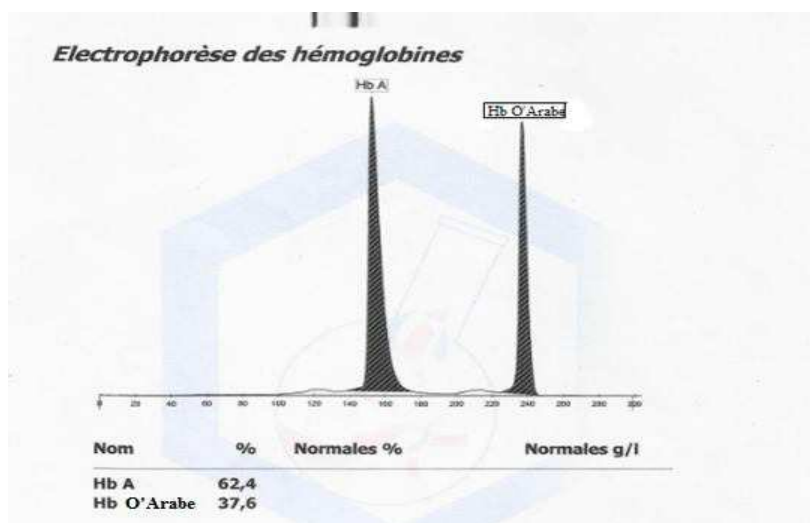
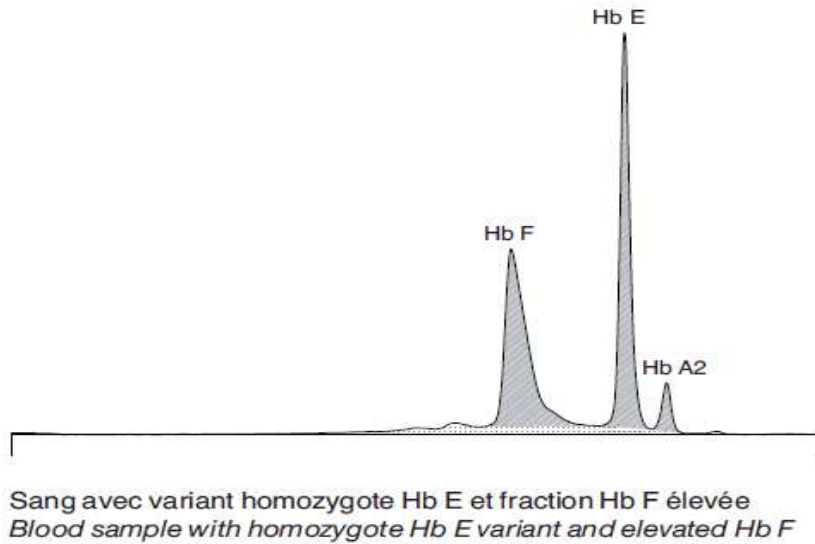


Figure 42 : Tracé électrophorétique d'une hémoglobine O-Arabe hétérozygote

### ➤ Hémoglobine E

Un acide glutamique de la chaîne  $\beta$  est remplacé par une lysine. Dans la technique MINICAP HEMOGLOBIN, l'Hb E migre juste après l'Hb A2 dont elle est totalement séparée. En présence d'Hb E, la fraction A2 peut alors être quantifiée afin de détecter une  $\beta$ -thalassémie.

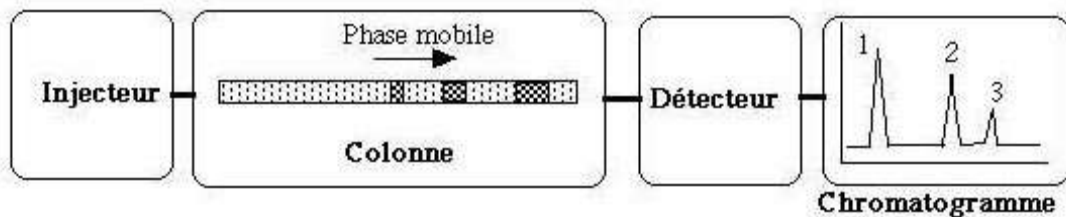


**Figure 43 :** Tracé électrophorétique d'hémoglobine E

### 3. Chromatographie liquide à haute pression (CLHP)

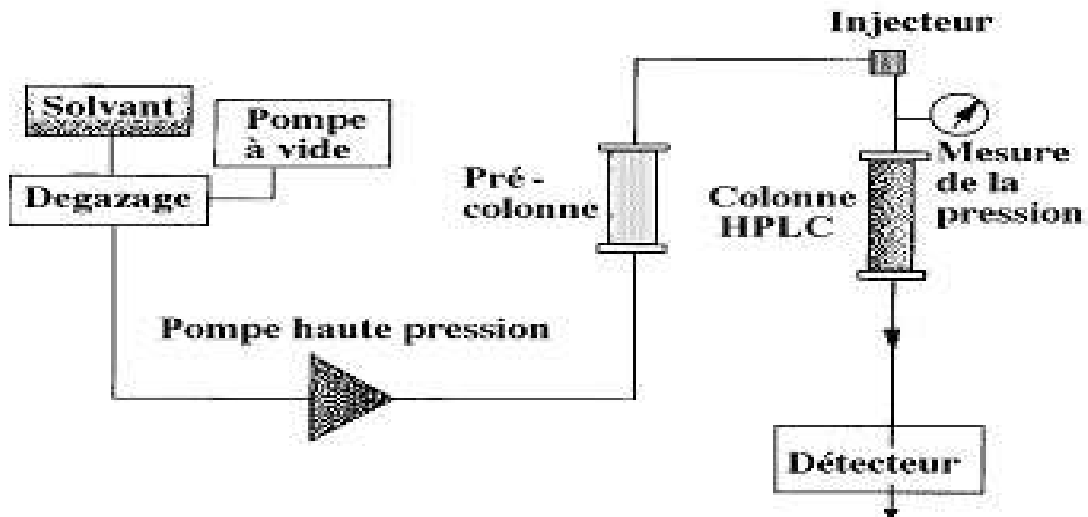
#### Principe de la CLHP

La chromatographie est une technique de séparation analytique au cours de laquelle un échantillon est entraîné par un liquide, constituant la phase mobile, à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire. La différence de solubilité des hémoglobines entre ces 2 phases va permettre leur séparation, chacune étant plus ou moins retenue par la phase stationnaire et ayant donc un temps de rétention ( $t_R$ ) caractéristique qui lui est propre.



**Figure 44 :** Schéma simplifié de la chromatographie [86].

La phase mobile est injectée dans la colonne par un injecteur, et un détecteur placé en sortie de colonne va pointer l'élution de chaque composé et ainsi permettre le tracé d'un chromatographe, chaque pic correspondant à un composé différent, élué à un temps de rétention spécifique. Dans le cas de la CLHP, le débit d'écoulement de la phase mobile sera élevé grâce à une pompe à haute pression, ce qui va diminuer le temps nécessaire à la séparation des différents composés (**Figure 45**).



**Figure 45** : Schéma d'un chromatographe de CLHP [86].

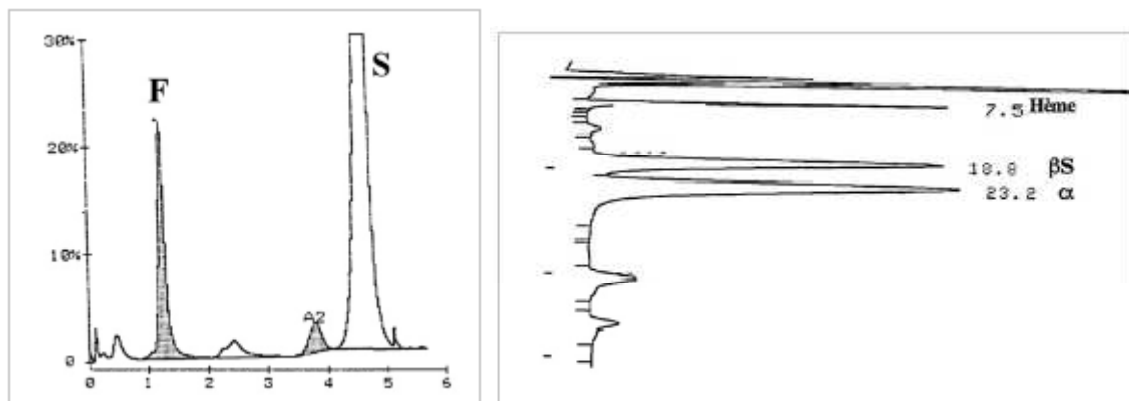
La CLHP a été développée pour permettre à la fois le dépistage et la confirmation des hémoglobinopathies chez les nouveau-nés avec une grande sensibilité et spécificité. En effet, sa bonne sensibilité vis-à-vis des variants majeurs impliqués en pathologie ainsi que sa rapidité de réalisation (environ 3 minutes par échantillon), permettant l'analyse d'un grand nombre d'échantillons, ont fait de la CLHP une méthode particulièrement adaptée au dépistage des anomalies de l'Hb.

Ce temps d'analyse rapide a été possible par la mise au point d'une technique de CLHP par échange de cations (**Figure 46**). Les différentes hémoglobines sont séparées par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants. Cette technique, automatisée et adaptée à de grandes séries, permet une quantification précise de l'Hb A2, Hb F, Hb A, Hb S

et Hb C notamment. Cependant, puisque certains variants de l'hémoglobine peuvent co-éluer et certaines Hb éluent avant la zone d'intégration des pics, cette technique ne peut être utilisée seule [87].

Elle doit être couplée à une autre technique, par exemple électrophorétique, de manière à confronter les résultats obtenus par ces deux techniques différentes [68].

Une autre technique chromatographique est la CLHP en phase inverse, utilisée pour la caractérisation des chaînes de globines (**Figure 46**). Dans cette technique, les chaînes polypeptidiques sont séparées en fonction de leur hydrophobicité. La CLHP en phase inverse est particulièrement intéressante pour la caractérisation des Hb embryonnaires et fœtales et elle contribue à la séparation et à la quantification de variants rares par l'analyse de leurs chaînes mutantes. De ce fait, elle reste réservée aux laboratoires spécialisés dans l'étude de l'Hb [64].



**Figure 46 :** Profil chromatographique d'un patient homozygote S/S en CLHP par échange de cations (à gauche) et en CLHP en phase inverse (à droite) [88].

#### 4. La spectrophotométrie de masse (SM) [89]

Dans la SM, le paramètre de mesure est la masse moléculaire, ou plus exactement, le rapport masse sur charge des molécules d'analytes. Toutes les molécules ont une masse moléculaire; donc, théoriquement, toutes les molécules sont mesurables avec SM. Les masses moléculaires des chaînes de globine embryonnaires ( $\epsilon$ ,  $\zeta$ ), fœtales ( $\gamma A$ ,  $\gamma G$ ) et adultes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ) sont listés dans le **Tableau VI** et sont caractéristiques pour les différentes séquences d'acides

aminés des chaînes de globine. Les mutations génétiques conduisant à des substitutions d'acides aminés (mutations faux-sens) dans les chaînes de globine sont le plus souvent accompagnées d'une variation de la masse de la chaîne de variant. 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.

En outre, des mutations génétiques peuvent entraîner des modifications post-traductionnelles des chaînes de globine, telles que la glycosylation chez le diabète sucré ou la carbamylation chez les patients urémiques, qui peuvent également modifier la masse moléculaire des chaînes de globine. Pour la raison que les techniques de la SM permettent la détection et l'identification des variants de l'Hb ainsi que les modifications post-traductionnelles des chaînes de globine, la SM est devenue l'une des technologies clés dans l'analyse de l'Hb.

**Tableau VI : les chaînes de globine humains et hémoglobines [89].**

Globin chain	Molecular mass (Da)	Number of amino acids	Hemoglobins
$\alpha$	15,126.4	141	Hb A; Hb A <sub>2</sub> ; Hb F
$\beta$	15,867.2	146	Hb A
$\gamma^A$ and $\gamma^G$	16,009.3 and 15,995.3	146	Hb F Hb Portland <sup>a</sup>
$\delta$	15,924.3	146	Hb A <sub>2</sub>
$\epsilon$	16,071.6	146	Hb Gower 1 <sup>a</sup> Hb Gower 2 <sup>a</sup>
$\zeta$	15,505.8	141	Hb Gower 1 <sup>a</sup> Hb Portland <sup>a</sup>

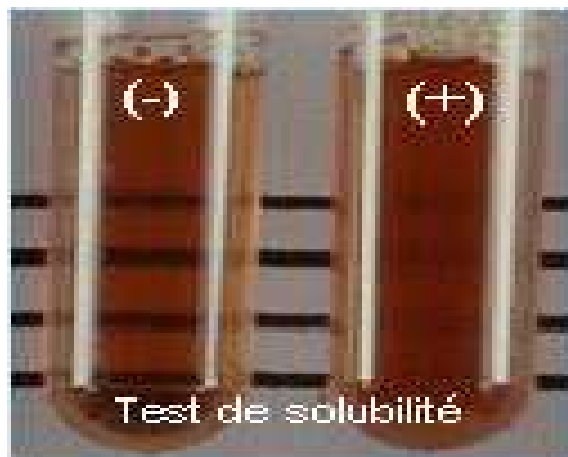
<sup>a</sup> Embryonic hemoglobins.

## B. Techniques d'étude non séparatives

### 1. Test de solubilité de l'hémoglobine S ou test d'Itano

Le test de solubilité de l'hémoglobine S, également appelé test d'Itano, est réservé à la confirmation de la présence d'Hb S. Ce test manuel est basé sur la précipitation de l'Hb S désoxygénée lorsqu'elle se trouve en solution saline concentrée (**Figure 47**).

Une des limites de cette technique est sa faible sensibilité. En raison du risque de faux négatifs, elle ne doit donc pas être utilisée chez le nouveau-né ou chez un sujet présentant une faible concentration d'Hb S. Il existe également un risque de faux positifs, notamment avec l'Hb H et l'Hb C-Harlem, qui précipitent dans les mêmes conditions. En outre, le test d'Itano est dépendant de la qualité des réactifs (saponine, hydrosulfite de sodium) et des conditions opératoires (température) [64, 65].



**Figure 47** : Test de solubilité de l'hémoglobine S (test d'Itano) [90].

### 2. Test de falciformation d'Emmel

Le test de falciformation d'Emmel peut représenter une alternative au test d'Itano. Il consiste à mettre en contact, sur une lame, une goutte de sang à analyser avec une goutte de métabisulfite de sodium. En raison de la diminution de solubilité de l'Hb S en condition de désoxygénation, les hématies contenant de l'Hb S changent de forme et subissent une falciformation. Cette technique manque toutefois de sensibilité et de spécificité.

Certaines Hb autres que l'Hb S, comme l'Hb C-Harlem, précipitent également lorsqu'elles sont désoxygénées et induisent une falciformation des globules rouges. Le test de falciformation est donc aujourd'hui de moins en moins utilisé [64, 91].

### **3. Le test de stabilité à l'isopropanol ou test de Carrel**

Le test de stabilité à l'isopropanol est quant à lui un examen réservé aux laboratoires spécialisés pour l'étude de l'Hb dans le cadre du diagnostic d'Hb instable. Il consiste à incuber un hémolysât à 37°C dans un tampon contenant 17 % d'isopropanol.

Dans un tel milieu apolaire, les forces de cohésion internes de la molécule d'Hb diminuent et celle-ci précipite. Alors que l'Hb A précipite après 50 à 60 minutes à 37°C, les Hb instables précipitent précocement, en 5 à 20 minutes selon les variants. Cette technique présente quelques limites liées à un risque de faux positifs (Hb F, méthémoglobine, chaînes libres (hémoglobine H ou Bart's), précipitation des protéines non héminiques chez des patients ayant une forte réticulocytose) et de faux négatifs, notamment en cas d'Hb hyperinstables. En effet, ces dernières sont très rapidement détruites, dans les minutes ou heures qui suivent leur biosynthèse. Elles ne sont alors pas mises en évidence par ce test mais nécessitent l'utilisation de techniques de biologie moléculaire. En outre, il existe un certain nombre de variants instables *in vitro* et ne s'accompagnant d'aucune anomalie hématologique ou clinique [64, 65].

### **4. Mesure de l'affinité pour l'oxygène**

La recherche d'une Hb à affinité modifiée est à effectuer dans le cadre soit d'une polyglobulie vérifiée par la mesure de la masse sanguine, soit d'une anémie chronique inexplicée. Une étude de l'Hb comportant isoélectrofocalisation, électrophorèse de globine en présence d'urée/triton, et une étude de l'hémolysât par CLHP échangeuse de cations et CLHP en phase inverse permettent habituellement de mettre en évidence la fraction d'Hb anormale quand elle existe. Cette étude doit être précédée par un calcul de la P50 par co-oxymétrie sur sang veineux et par un dosage du 2-3 DPG. L'étude fonctionnelle de l'Hb est à réserver aux cas déjà bien documentés. Les causes d'erreurs sur prélèvements de sang total

sont multiples (pH anormal, taux de 2-3DPG diminué lors de la conservation, HbCO chez les fumeurs ou pour d'autres expositions chroniques au CO, oxydation (metHb) due aux conditions de conservation ou à des problèmes toxiques) [64].

## 5. Détection des hématies Fœtales

### 5.1. Test de Kleihauer

Le test de Kleihauer (TK) a pour vocation de mettre en évidence les hématies fœtales présentes dans la circulation sanguine maternelle. Il est fondé sur la différence de résistance des Hb fœtales et adultes à l'élytion à pH acide. Depuis 1957 la technique a été peu modifiée et reste la référence malgré sa réalisation manuelle. Pour observer les hématies, on prépare un frottis fin à partir de sang prélevé sur tube EDTA séché à l'air libre et fixé à l'alcool. On élye ensuite l'Hb adulte par l'hématoxyline acide avant de contre-colorer par l'éosine. Les frottis colorés sont regardés au microscope et les hématies fœtales éventuellement présentes, colorées en rose, sont décomptées par rapport au nombre d'hématies maternelles, qui apparaissent comme des "fantômes" car décolorées [92]. Les frottis seront ensuite lus au microscope et on comptera ainsi le nombre d'hématies fœtales pour 10 000 hématies. Pour valider la bonne réalisation des différentes étapes, on effectue en parallèle deux lames témoins (négatif et positif).

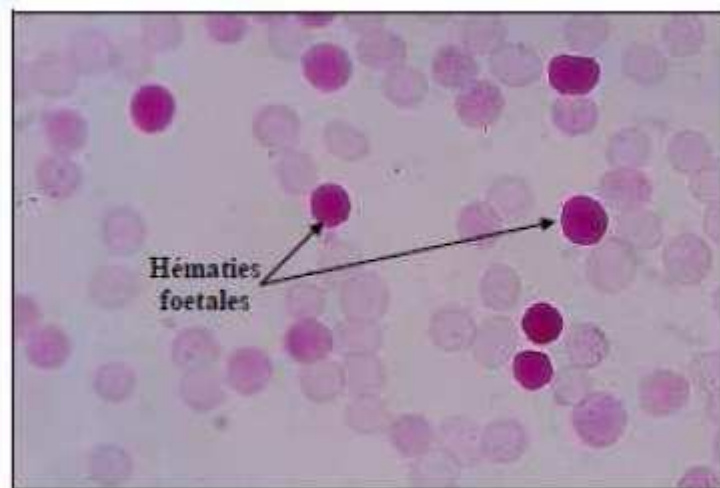


Figure 48 : test de Kleihauer [93].

- **Indications :**

Le TK est utilisé pour détecter les hémorragies fœto-maternelles et doit être prescrit dans toutes les situations à risque pendant la grossesse, et lors de l'accouchement en cas de risque d'allo-immunisation materno-fœtale anti-RH1 ou en cas de suspicion de saignement important [94].

- **Limites :**

- **Avantages :**

Le TK est facile à mettre en place au laboratoire : sa réalisation est rapide et demande des réactifs peu coûteux. De plus le bénéfice pour le patient est grand puisque le prélèvement est peu invasif et le test plus sensible que la clinique.

- **Inconvénients :**

Malheureusement, le TK nécessite un opérateur expérimenté puisqu'il faut estimer correctement le nombre d'hématies observées sur chaque champ au microscope, et parfois faire la différence entre des dégradés de coloration rose.

Ainsi le TK souffre de son manque de reproductibilité qui peut être partiellement corrigé par un système de lecture automatisé réservé à des laboratoires ayant un recrutement très important. Outre la variabilité analytique, ce test peut rendre des résultats faussement négatifs : incompatibilité materno-fœtale, injection d'immunoglobulines qui augmentent la rapidité de destruction des hématies fœtales, ou encore prélèvement précoce au cours d'une HFM débutante.

Cependant le problème majoritairement rencontré est l'interférence de l'HbF des hématies maternelles induisant des résultats faussement positifs. En effet, c'est la quantité d'HbF dans les hématies qui donne une couleur plus ou moins rose. En cas normal, les hématies fœtales de la mère ont une coloration pâle dite "intermédiaire" aisément distinguable par un lecteur expérimenté. En revanche, en cas d'hémoglobinopathie les hématies de la mère

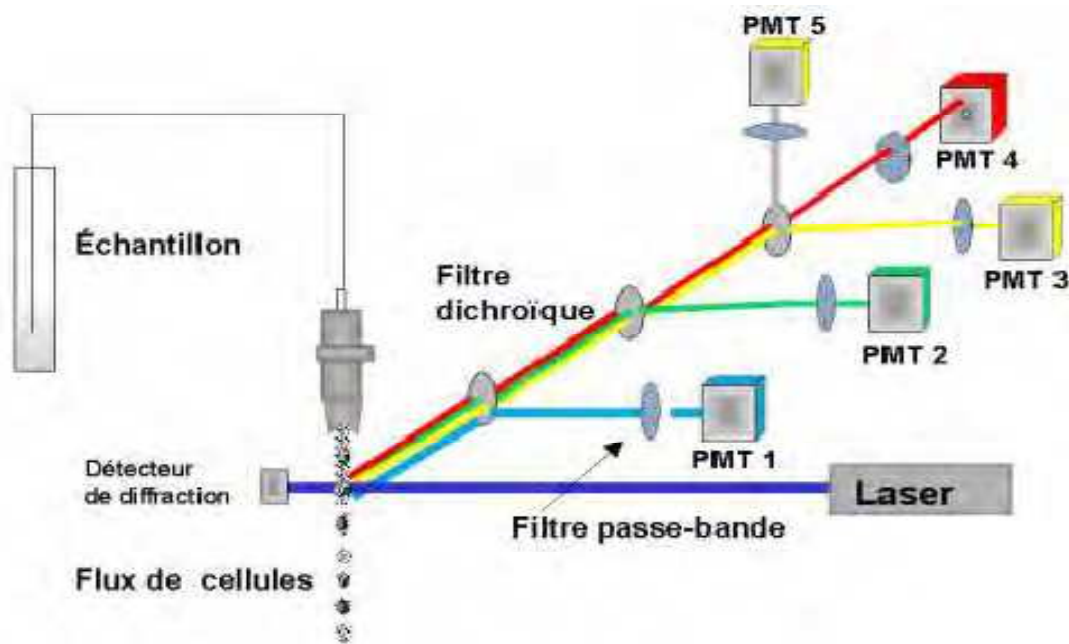
ont plus d'HbF et donc une coloration plus intense : il est impossible de les différencier des globules rouges fœtaux [95, 96, 97].

## 5.2.Cytométrie en flux

- **Principe :**

La cytométrie en flux (CMF) permet d'évaluer individuellement et simultanément plusieurs paramètres sur chaque élément présent dans une suspension, préalablement marqué par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. En hématologie, elle est particulièrement employée pour étudier les populations leucocytaires mais son utilisation se développe pour caractériser les hématies : diagnostic des hémoglobinuries paroxystiques nocturnes ou des infections palustres notamment [98, 99].

La CMF fait appel à différentes technologies : fluïdique, optique et électronique (**figure 49**). Une suspension cellulaire est introduite par une pompe au centre d'une gaine pressurisée. Les cellules sont hémodynamiquement contraintes par un flux liquidien de s'aligner et de défiler une à une dans la zone d'analyse, devant une ou plusieurs sources d'excitation lumineuse (laser). Des informations morphologiques sont apportées par deux paramètres indépendants de la fluorescence : la taille est donnée par la mesure de la lumière diffractée à 180 degrés (forward angle scatter, FS) et la granularité est indiquée par la mesure de la lumière émise à 90 degrés (right angle scatter, SS). Les fluorochromes sont capables d'absorber l'énergie lumineuse provenant du laser à une longueur d'onde proche de leur maximum d'absorption, puis de la libérer par émission de photons de longueur d'onde supérieure. Les fluorochromes les plus utilisés sont l'isothiocyanate de fluorescéine et la phycoérythrine. Les photons émis sont focalisés puis séparés par une alternance de miroirs dichroïques, qui transmettent les longueurs d'onde non réfléchies, et de filtres, qui ont une bande passante sélective. Les signaux optiques détectés sont transformés en signaux électroniques proportionnels par des photomultiplicateurs (PMT) et digitalisés pour être représentés informatiquement sous forme d'histogrammes. Sur chaque population sélectionnée on peut alors obtenir des informations statistiques quantitatives et qualitatives : nombre de cellules, intensité de fluorescence, etc. [100].



**Figure 49** : Principe de la cytométrie en flux [101].

- **Applications à la détection des hématies fœtales**

Depuis quelques années, différents anticorps ont été utilisés pour caractériser les hématies fœtales au sein d'une population maternelle. Les premiers essais employaient des anticorps monoclonaux anti-RH1 [102], les antigènes rhésus étant présents à la surface des hématies dès la sixième semaine de gestation [103]. Les applications se réduisaient donc au diagnostic des HFM de fœtus RH:1 et de mère RH:-1 et à l'adaptation des doses d'immunoglobulines administrées pour éviter l'allo-immunisation maternelle. Puis, rapidement, l'utilisation d'anticorps anti-HbF s'est développée [104, 105] pour identifier les hématies fœtales par leur quantité d'HbF supérieure à celle de la mère.

Selon les protocoles, des doubles marquages sont proposés pour mieux distinguer les populations maternelles et fœtales : Ac anti-RH1 et Ac anti-HbF [106], Ac anti-HbF et Ac antianhydrase carbonique [107] normalement uniquement présente dans les hématies adultes.

Les protocoles sont semblables : recueil de sang sur tube EDTA, fixation des hématies par le glutaraldéhyde, perméabilisation si nécessaire par du Triton X-100, marquage par les Accouplés à un fluorochrome, acquisition de 50000 ou 100000 cellules sur le cytomètre et exploitation des résultats sur des histogrammes mono ou biparamétriques.

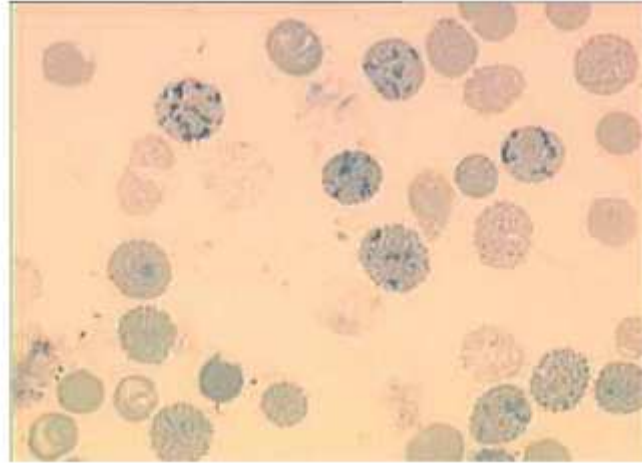
La recherche d'HFM par CMF est bien corrélée à la technique cytochimique de référence, mais est plus précise et plus productible. L'utilisation de la CMF permet d'éviter la surestimation systématique observée avec le test de Kleihauer, qui peut conduire à des injections de gammaglobulines anti-D par excès. Ceci est dû au fait que le réactif anti-HbF utilisé en CMF permet une bonne distinction entre les hématies fœtales et les hématies adultes riches en HbF, facilitant l'interprétation des résultats chez les femmes présentant un taux modérément augmenté d'HbF (cas fréquent au cours de la grossesse, et chez les mères atteintes d'hémoglobinopathies) [108].

## **6. Recherche des corps de Heinz [109]**

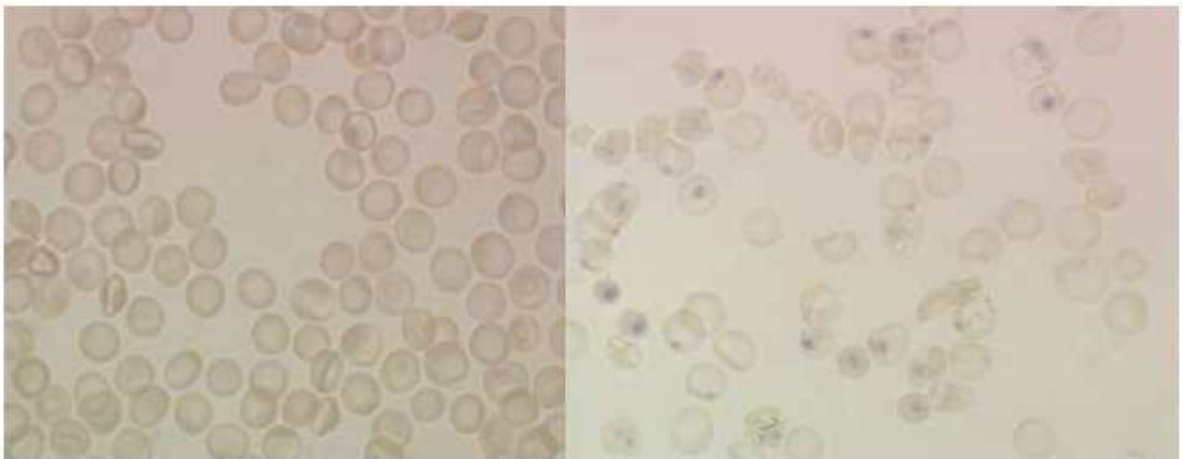
Leur recherche est effectuée quand on suspecte la présence d'une Hb instable, ou une hémoglobinose H (**Figure 50**).

Ces corps de Heinz, qui correspondent en réalité à la précipitation d'Hb dénaturée, sont recherchés par simple réalisation d'un frottis coloré par le bleu de crésyl brillant pendant 1h à 37°C.

En effet, une coloration traditionnelle au May-Grünwald-Giemsa ne permet pas leur mise en évidence. Pour l'Hb H, les corps de Heinz sont petits, les hématies ont alors un aspect « en balle de golf » (**Figure 50**). L'aspect est un peu différent pour les autres Hb comme les Hb instables (taches colorées bleutées et plus grosses) (**Figure 51**).

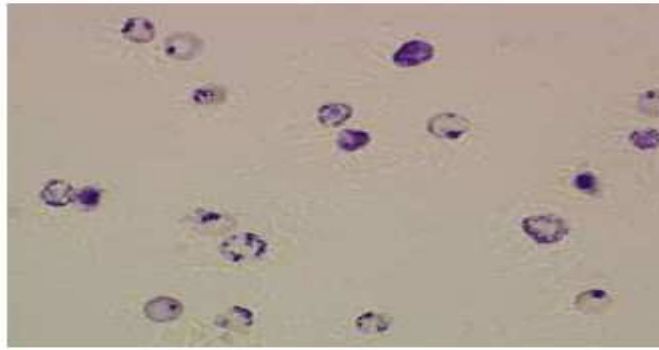


**Figure 50** : Aspect en balle de golf de l'hémoglobine H [109].



**Figure 51** : Corps de Heinz spontanés (Témoin négatif à gauche, Patient malade à droite) [109].

La formation des corps de Heinz *in vitro* peut aussi être provoquée par ajout d'acétylphénylhydrazine. On considère que la recherche est positive quand plus de 30% des hématies présentent au moins 5 grains colorés (**Figure 52**).



**Figure 52 :** Recherche positive de corps de Heinz provoqués [109].

### **C. Analyse d'ADN des variants d'hémoglobine et thalassémies**

Dans la pratique clinique contemporaine, l'analyse de l'ADN est utilisée comme un test finale pour les hémoglobinopathies diagnostiquées. En outre, la technologie SM ne peut pas détecter la cause de la perturbation des gènes conduisant à une perte d'expression de protéine, telles que les mutations non-sens, la perturbation des sites d'épissage, ou les mutations de promoteur. Dans le cas des  $\beta$ -thalassémies, ce sont les mutations non délétionnelles qui prédominent. D'autre part, la majorité des  $\alpha$ -thalassémies reconnues impliquent des délétions d'un ou les deux gènes  $\alpha$ -globine. Cette différence peut guider aux choix des techniques d'analyse moléculaire des mutations. Dans certains laboratoires, après l'analyse des taux de ferritine plasmatique par HPLC, et SM, l'ADN du patient peut être soumis au séquençage si une  $\beta$ -thalassémie est suspectée. Toutefois, si les données d'HPLC ou SM n'indiquent pas une variante  $\beta$  ou une  $\beta$ -thalassémie, l'ADN du patient sera soumis à des essais du gap-PCR pour exclure la présence d'une  $\alpha$ -thalassémie [89].

#### **1. Polymerase chain reaction :**

Un dosage à base de PCR sophistiqué a été développé pour détecter 6 délétions les plus communes du gène  $\alpha$ .

Ce test utilise un ensemble de 12 amorces pour analyser les 6 délétions dans multiplex gap-PCR à tube unique, réduisant ainsi le temps, les coûts, et l'utilisation du volume de l'échantillon d'ADN du patient.

## **2. Hybridation inverse :**

Des essais plus avancées de bande de thalassémie sont également basées sur le principe du multiplex PCR et peut détecter des mutations ainsi que des délétions menant à la fois  $\alpha$  et  $\beta$ -thalassémie mais incluent aussi plusieurs variantes de globine. Après multiplex PCR à tube unique, les produits d'amplification biotinylés sont hybridés à des sondes oligonucléotidiques qui sont liés de manière covalente sur des bandes de test et sont ensuite visualisées via des groupes chromogènes qui sont liés spécifiquement à la biotine. Cette technique permet la détection de 21 mutations couvrant plus de 90% des patient des défaut en  $\alpha$ -globine et 47 mutations couvrant plus de 90% avec des défaut en  $\beta$ -globine trouvés dans la Méditerranée, Moyen-Orient, et les pays d'Asie du Sud [89].

## **3. Multiplex ligation-dependent probe amplification**

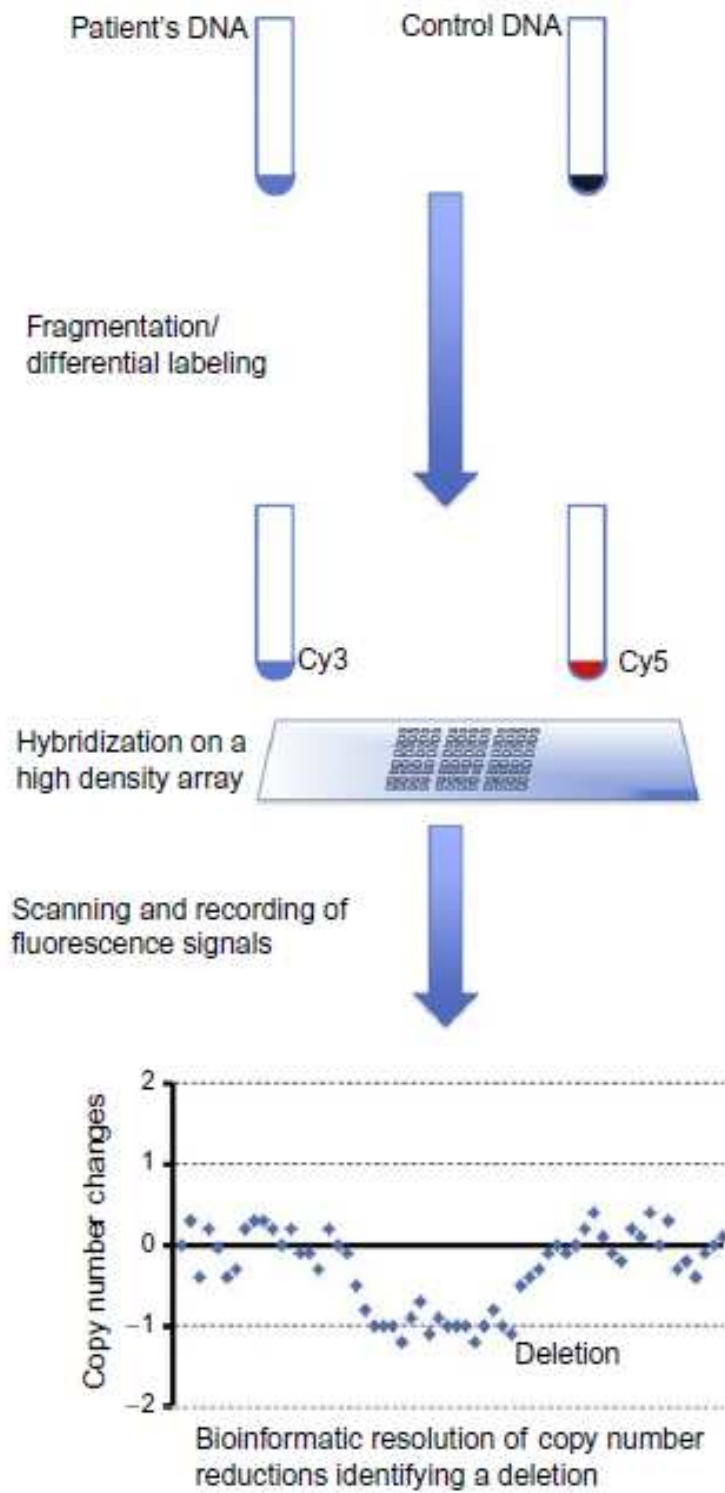
MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA) est un test qui permet de détecter les nombres de copies de séquences d'ADN génomiques variées. Dans MLPA, la séquence cible n'est pas amplifiée, mais une sonde qui hybride à la séquence cible, typiquement dans un exon. Cette sonde est synthétisée comme deux-demi sondes, la sonde 5'MLPA et la sonde 3'MPLPA. En plus du site spécifique de la cible, elles contiennent des sites d'amorce universels et des séquences de bourrage. Dans la première étape de la procédure MLPA, l'ADN cible est dénaturé et les sondes MLPA sont hybridés à la cible. Les deux sondes 5'MLPA et 3'MLPA hybrident immédiatement aux séquences cibles adjacentes sans écart. La sonde 3'MLPA est phosphorylée et donc la sonde 5'MLPA et la sonde 3'MLPA peuvent être ligaturés dans un oligonucleotide plus grand. Cette étape est possible lorsque les deux amorces sont hybridées correctement et sans écart à leurs cibles adjacentes. Après ligature, la sonde complète résultante est amplifiée par PCR avec des amorces marquées par fluorescence qui sont liés à des sites universelles de la sonde complète. La

séparation des produits d'amplification est réalisée par l'électrophorèse capillaire avec détection par fluorescence. Avec MLPA, plus de 40 séquences génomiques différentes peuvent être analysés dans une seule analyse. La comparaison des aires sous la courbe sur un échantillon donné avec celle obtenue sur un échantillon de référence, la quantité relative de chaque amplicon peut être déterminée.

Ainsi, un changement du nombre de copies, par exemple, une délétion de la séquence cible donnée peut être déterminée. Avec les techniques MLPA, plusieurs nouvelles délétions au sein des locus  $\alpha$  et  $\beta$ -globine ont été identifiés [89].

### **ARRAY-BASED WHOLE GENOME SCANNING TECHNOLOGIES**

L'hybridation génomique comparative (CGH) à base de microréseaux est réalisée avec des sondes qui peuvent être des oligonucléotides courts ou des fragments génomiques. Pour identifier les délétions ou les duplications, la totalité d'ADN génomique du patient et de l'individu sain sont marqués de façon différentielle avec deux différents fluorochromes (**figure 53**).



**Figure 53:** Principes de base de microréseaux CGH [89].

Après que les échantillons sont cohybridés à la même matrice, le taux de fluorescence pour chaque sonde est généré à partir de contrôle par rapport à des patients. Une perte ou un gain de l'intensité du signal de fluorescence à partir de l'ADN du patient indique une délétion ou une duplication à l'intérieur du génome du patient. Par conséquent, l'utilisation de sondes de puces à ADN avec des positions connues du génome humain permet l'identification directe des délétions de toutes les tailles dans les gènes d'Hb [89].

### **III. MOYENS THERAPEUTIQUES**

Certaines formes d'hémoglobinopathies ne nécessitent aucun traitement. D'autres entraînent une anémie importante qui doit être traitée par des transfusions fréquentes. Pour les formes graves, les futurs parents peuvent avoir recours au conseil génétique et au dépistage prénatal afin d'estimer les risques encourus pour leur enfant.

#### **1. Conseil génétique**

Le principal objectif du conseil génétique est de donner aux parents toutes les informations leur permettant d'exercer un choix libre et éclairé, de recourir au diagnostic prénatal en vue d'une éventuelle IMG. Pour que les couples puissent avoir ce choix, le dépistage par une étude de l'hémoglobine (Hb) doit être proposé systématiquement aux couples ayant des origines familiales dans les populations les plus concernées. La consultation de conseil génétique a lieu idéalement en binôme médecin et psychologue.

Trois situations dominant :

- demande d'information génétique de la part de personnes porteuses d'un trait d'hémoglobinopathie. Tout dépistage d'un trait devrait déboucher sur une information génétique.
- demande spontanée d'un couple : savoir s'il constitue un « couple à risque » avant la conception.
- le couple est adressé en conseil génétique au moment d'une grossesse en vue d'un diagnostic prénatal par un autre praticien. La grossesse est débutée, le risque

d'hémoglobinopathie grave pour le fœtus est présomptif et fondé sur des analyses antérieures et les antécédents [110].

## **2. Traitement de la drépanocytose**

- **Mesures préventives :**

Les progrès dans le traitement sont venus d'une meilleure connaissance de la physiopathologie et de l'histoire naturelle de la maladie.

Les mesures préventives sont essentielles :

- ✓ Prévention précoce des infections (pneumocoque, Haemophilus)
- ✓ Hydratation orale régulière et adaptée aux circonstances
- ✓ Traitement précoce des épisodes infectieux
- ✓ Education du malade
- ✓ Prise en compte des problèmes sociaux
- ✓ Evaluation médicale régulière du patient [21].

- **Traitement :**

- ✓ Hyperhydratation
- ✓ Traitement des crises : utilisation progressive des antalgiques (paracétamol, AINS, dérivés morphiniques)
- ✓ Programme transfusionnel (transfusions, échanges transfusionnels)
- ✓ Traitement chélateur du fer
- ✓ Hydroxyurée : diminue la fréquence et la sévérité des crises douloureuses et améliore la qualité de vie par induction de la synthèse d'hémoglobine fœtale, entre autres mécanismes [111].

### 3. Traitement des thalassémies

La base du traitement de la forme majeure repose sur les transfusions répétées afin de maintenir le taux d'hémoglobine à des valeurs subnormales mais également pour réduire l'hypersécrétion d'érythropoïétine et les conséquences de l'hyperplasie érythroblastique. On y associe un traitement chélateur de fer. Cette association permet de conférer à ces patients une espérance de vie de plus de 30 ans.

Le seul « traitement » curatif demeure l'allogreffe de moelle osseuse.

Des essais pour des molécules réactivant la synthèse d'hémoglobine F (azacytidine, hydroxyurée, 5-fluoro-uracile) sont en cours [20].

On place également de grands espoirs dans la thérapie génique; des études récentes ont mis en évidence une **protéine chaperon de l' $\alpha$ -hémoglobine**, l'*alpha-hemoglobin stabilizing protein* (**AHSP**), qui est exprimée à forte concentration dans les progéniteurs érythroïdes tardifs. Cette molécule joue un rôle crucial dans l'adressage et le repliement correct des protéines prévenant ainsi leur agrégation et leur précipitation en des dérivés toxiques à l'intérieur de la cellule. Ils interviennent également dans le maintien de la structure active des protéines. Ces différents mécanismes sont impliqués dans un nombre croissant de pathologies cellulaires. La découverte du chaperon de l'AHSP a ouvert de nouvelles perspectives relatives à son implication dans les processus biologiques normaux du GR et dans sa pathologie, en particulier son rôle dans la formation de l'Hb et son implication dans l'expression de certaines hémoglobinopathies. L'AHSP apparaît comme un nouveau marqueur spécifique de la lignée érythroïde et pourrait être utilisée dans différents scénarii cliniques pour la détection des précurseurs érythroïdes nucléés normaux et anormaux.

Enfin, l'utilisation de l'AHSP pour le développement d'un test de mesure du pool d' $\alpha$ -Hb dans les syndromes thalassémiques permettra non seulement de définir un indice de gravité de la maladie mais aussi de suivre l'évolution du déséquilibre de synthèse  $\alpha/\beta$  observé chez les patients en réponse à un traitement particulier [112].

#### **4. Traitement des Hémoglobines instables**

Dans les cas modérés, le traitement est généralement préventif et supplétif. Il faut prévenir et traiter rapidement les infections, en limitant les épisodes fébriles avec de l'aspirine et éviter les médicaments oxydants.

Dans les cas graves, la question de la splénectomie doit toujours être posée en tenant compte du rôle important de la rate dans la petite enfance contre les infections bactériennes. Une vaccination antipneumococcique et une prévention antibiotique doivent être mises en route en cas de splénectomie. La splénectomie n'est cependant pas toujours bénéfique.

Des essais de traitement par hydroxyurée pour des cas graves ont montré une augmentation du taux d'hémoglobine fœtale et une diminution du taux d'hémoglobine instable, ainsi qu'une réduction de l'hémolyse [41].

### **IV. RECOMMANDATION POUR UNE MEILLEUR ANALYSE DE L'HEMOGLOBINE**

A la fin de ce travail nous arrivons aux recommandations pour une meilleure prise en charge biologique des hémoglobinopathies, permettant au biologiste d'établir un diagnostic précis, et disposer par la suite de données épidémiologiques fiables.

1/ Le dépistage des hémoglobinopathies devrait être effectué à la première consultation prénatale chez toutes les femmes enceintes appartenant à des groupes raciaux et ethniques dont on sait qu'ils présentent un risque d'hémoglobinopathies élevé (asiatiques, africains et méditerranéens). Chez tous les nouveau-nés issus des groupes ethniques à haut risque, il faut recommander le dépistage des hémoglobinopathies à l'aide de sang séché sur papier filtre.

2/La présence d'une anomalie de l'Hb est à rechercher devant des signes d'appel «classiques» (anémie, microcytose, hémolyse, polyglobulie, cyanose). Les Hb à rechercher en urgence sont:

– l’HbS à l’état homozygote ou en association avec une Hb anormale responsable d’un syndrome drépanocytaire majeur (S/S ; S/β thalassémie ; S/C, S/D Punjab ; S/O-Arab ; A/S Antilles ; A/S Oman) ;

– la méthémoglobine (metHb), lors d’intoxications alimentaires ou médicamenteuses.

De plus la quantification de l’HbS s’avère urgente lors de l’évaluation de tout patient atteint d’un syndrome drépanocytaire majeur en soins intensifs, pour tout enfant fébrile et anémié, et lors d’une urgence opératoire pour un patient connu drépanocytaire, ou pouvant l’être.

**3/** La pratique d’une seule technique pour le diagnostic des anomalies des Hb n’est pas recommandée pour deux raisons principales :

- un profil normal, quelque soit le système utilisé, ne permet pas d’éliminer un variant de l’Hb  
- plusieurs variants peuvent se comporter de la même façon dans un système.

**4/** Pour rendre un diagnostic précis d’hémoglobinopathie, il faut que le biologiste dispose au moment de l’interprétation de toutes les données clinico-biologiques : âge du patient , origine ethnique , contexte familial , contexte clinique , contexte transfusionnel (il est indispensable de faire l’analyse à distance d’une transfusion, 3 mois minimum), constantes érythrocytaires , bilan martial (incontournable en cas de microcytose) et le bilan d’hémolyse en cas d’anémie (réticulocytes, haptoglobine, bilirubine), qui sont nécessaires à l’interprétation des résultats, d’où l’importance de la feuille de renseignements.

**5/-** Un profil normal, avec des taux d’HbA2 et Hb F normaux, doit être interprété en fonction de l’hémogramme, du bilan martial, de l’origine ethnique, du contexte clinique, familial et transfusionnel du patient.

**6/** Un profil normal avec une microcytose associée sans carence martiale doit faire évoquer une α-thalassémie probable ou une α-thalassémie dite silencieuse. Dans un contexte de grossesse, il est préconisé de faire un hémogramme et une étude de l’Hb chez le conjoint.

**7/** Un profil normal en présence de carence martiale doit faire l’objet d’un contrôle après correction de la carence si la microcytose persiste.

**8/** Le diagnostic de l’Hb S est réalisé par des techniques électrophorétiques et/ou chromatographiques. Un seul test n’étant pas suffisant pour affirmer son existence. Il est

recommandé de confirmer sa présence par des tests fonctionnels (test de solubilité, test de falciformation) pour différencier l'Hb S des autres variants migrants ou co-éluants en même temps. Le dosage précis des différentes fractions est indispensable pour affiner le diagnostic.

**9/** Dans les syndromes drépanocytaires majeurs, l'existence d'une  $\alpha$ -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'Hb S, en présence d'Hb Bart's ou d'Hb H) ou recherchée spécifiquement par des techniques de biologie moléculaire.

**10/** Le diagnostic des formes mineures d' $\alpha$ -thalassémie est évoqué devant une microcytose non expliquée par une  $\beta$  ou  $\delta\beta$ -thalassémie (taux d'Hb A2 et F normaux) ou une carence martiale. L'étude moléculaire constitue le diagnostic de certitude, envisagée uniquement dans le cadre de conseil génétique.

**11/** L'association Hb S/Hb C est grave puisqu'elle conduit à un syndrome drépanocytaire majeur. La présence d'Hb C doit donc être prise en compte dans le conseil génétique de la drépanocytose. Les couples risquant d'avoir un enfant avec une hémoglobinopathie SC doivent être informés du risque de syndrome drépanocytaire majeur dans leur descendance.

**12/** Dans les  $\beta$ -thalassémies, les taux d'Hb A2, A et F sont variables en fonction du type d'anomalies moléculaires en cause → l'étude de l'Hb doit être complétée par des techniques de biologie moléculaire qui précisent la nature des anomalies et permettent de rechercher une  $\alpha$ -thalassémie associée.

**13/** Un profil S/F ne permet pas de différencier entre un S/PHHF, S/ $\beta^0$  thalassémie et un S/S → une étude familiale ou celle du gène est recommandée.



## **CONCLUSION**

Les hémoglobinopathies comptent parmi les anomalies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Le Maroc est une région de prédilection des désordres de l'hémoglobine de par sa situation géographique et des origines ethniques de sa population. Les mariages consanguins sont bien acceptés par sa culture et favorisent les complications cliniques plus ou moins sévères dans les familles à risque.

Les techniques utilisées pour l'étude de l'hémoglobine restent simples pour les objectifs les plus courants. La combinaison des méthodes d'étude de l'hémoglobine devient indispensable pour assurer un résultat de qualité et l'interprétation des résultats n'est pas toujours évidente en l'absence d'autres données cliniques (transfusion récente?) hématologiques (l'hémoграмme, le statut martial sont presque indispensables) et épidémiologiques.

L'électrophorèse capillaire est certes une bonne technique de séparation et d'identification des hémoglobines, mais elle ne peut s'affranchir de l'utilisation concomitante d'autres techniques que sont l'isoélectrofocalisation et la chromatographie liquide à haute pression qui fournit des données qualitatives et aussi quantitatives (pour les hémoglobines A2 et F). La biologie moléculaire reste quant à elle une technique de référence pour l'identification de ces variants d'hémoglobine, mais son utilisation en systématique est difficilement applicable et ne doit intervenir qu'en dernière intention.

Les hémoglobinopathies représentent en effet une réalité dans notre pays. Elles méritent de futures investigations pour une meilleure maîtrise de leurs complications et de leur traitement. De ce fait, elles doivent bénéficier de plus d'intérêt surtout dans certaines régions où la concentration de la maladie est importante.



## RESUME

**Titre :** Rôle du laboratoire dans le diagnostic des hémoglobinopathies

**Mots clés :** Techniques d'étude - Diagnostic – Hémoglobinopathies – Hémoglobine

**Auteur :** Ghalmane Mouad

Les hémoglobinopathies, définies par la présence d'anomalies qualitatives et/ou quantitatives des chaînes de globine, figurent parmi les maladies génétiques les plus fréquentes dans le monde. Historiquement endémiques dans certains pays d'Afrique et d'Asie, elles sont devenues cosmopolites suite aux différents flux migratoires ces dernières décennies. Leur diagnostic repose sur la clinique, l'origine ethnique, les antécédents familiaux et la mise en évidence d'anomalies biologiques au niveau de l'hémoграмme, du frottis sanguin et de l'étude de l'hémoglobine.

L'objectif de notre travail est de rapporter les moyens d'études des principales hémoglobinopathies en soulignant leur intérêt dans le diagnostic de ces pathologies. Selon la Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (code 1120), la recherche d'une anomalie de l'hémoglobine doit se faire par 3 techniques minimum, dont une technique électrophorétique. En effet, les électrophorèses sur gel à pH alcalin et acide sont les techniques les plus utilisées en routine. Cependant, ces dernières manquent de spécificité pour le diagnostic de certains variants, d'où l'intérêt d'utiliser d'autres techniques électrophorétiques comme l'isoélectrofocalisation, technique hautement résolutive et l'électrophorèse capillaire qui a permis une avancée dans le diagnostic de nombreux variants de l'hémoglobine. Aussi, la CLHP caractérisée par sa sensibilité, efficacité, rapidité permettant le diagnostic de la plupart des hémoglobinopathies.

La stratégie du diagnostic des hémoglobinopathies doit donc reposer essentiellement sur l'utilisation impérative de plusieurs techniques, dont notamment l'électrophorèse capillaire, la CLHP ou l'isoélectrofocalisation.

## SUMMARY

**Title :** Role of the laboratory in the diagnosis of hemoglobinopathies

**Keywords :** Technical Study – Diagnosis – Hemoglobinopathies – Hemoglobin

**Author :** Ghalmane mouad

Hemoglobinopathies, defined by the presence of qualitative and/or quantitative abnormalities of globin chains are among the most common genetic diseases in the world. Historically endemic in some countries as Africa and Asia, they have become cosmopolitan response to various migration flows in recent decades. Their diagnosis is based on clinical, ethnicity, family history and on the identification of biological abnormalities in the blood count, blood smears and study of hemoglobin.

The objective of our work is to bring back the means of studies of the principal hémoglobinopathies by underlining their interest in the diagnosis of these pathologies. According to the Nomenclature of Medical Biology Acts (code 1120), the search for abnormal hemoglobin must be done by minimum 3 techniques, including electrophoretic technology. In fact, the electrophoreses on freezing with alkaline and acid pH are the most used techniques in routine. However, these techniques are lacking of specificity for the diagnosis of certain variants. Then, the interest to use other electrophoretic techniques like the isoelectrofocalisation, highly resolvent technique and the capillary electrophoresis which has allows a projection in the diagnosis the many variable ones of haemoglobin. Also, the HPLC characterized by its sensitivity, effectiveness, speed allowing the diagnosis of the majority of the hémoglobinopathies.

The diagnosis strategy of hemoglobinopathies must be therefore based on the use of several techniques, including capillary electrophoresis, HPLC or isoelectric focusing..

## ملخص

العنوان: دور المختبر في تشخيص امراض الهيموغلوبين

كلمات البحث: مهارات الدراسة - التشخيص - امراض الهيموغلوبين - الهيموغلوبين

من طرف: معاد غلمان

تعريف أمراض الهيموغلوبين : عبارة عن وجود تشوهات مجموعة من سلاسل غلوبين النوعية ، وهي من بين الأمراض الوراثية الأكثر شيوعا في العالم. وتعتبر أفريقيا وآسيا من البلدان الموبوءة تاريخيا، نتيجة انفتاحها على شعوب العالم . ويستند التشخيص السريري على العرق ، والتاريخ العائلي وتحديد التشوهات البيولوجية في تعداد الدم ، ودراسة الهيموغلوبين.

وتهدف هذه الدراسة إلى إبراز الوسائل الفعّالة والمناسبة لدراسة أمراض الهيموغلوبين الرئيسية ومحاولة تشخيصها. وتجدر الإشارة إلى أن البحث عن الهيموغلوبين يمكن ملامسته من خلال ثلاث تقنيات وفقا لجدول تعريفية الأعمال البيولوجيا الطبية (رمز 1120 )، بما في ذلك تقنية الكهربائي الشعرية. وبالنظر إلى الواقع ، تعتبر الكهربائي للهلام القاعدية والحمضية من التقنيات التي تستخدم بشكل روتيني ؛ لكنها تفتقر إلى الدقة لتشخيص بعض المتغيرات. من هنا تأتي الحاجة إلى استخدام تقنيات أخرى مثل الكهربائي كهرساوي ، وارتفاع الحد التكنولوجيا و الشعرية الكهربائي الذي يتيح انفراجا في تشخيص العديد من متغيرات الهيموغلوبين. كما يتميز الكروماتوغرافيا بنوع من الكفاءة والسرعة في تشخيص معظم امراض الهيموغلوبين.

وبالتالي فإن استخدام بد من العديد من التقنيات ، بما في ذلك الكهربائي الشعرية ، الكروماتوغرافيا أو بأر متساوي التكهرب ، والتي يجب أن تستند الاستراتيجية التشخيصية امراض الهيموغلوبين.



## **REFERENCES**

1. Barbara J B. In : Haemoglobinopathy diagnosis. 2nd edition. Oxford : Blackwell Publishing, 2006 p. 313.
2. Aguilar-Martinez P., al. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. in *Annales de Biologie Clinique*. 2010.
3. Biomnis. Electrophorese de l'Hemoglobine. précis de biopathologie analyses medicales spécialisées, 2012.
4. Keren D.F., al. In: Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *American journal of clinical pathology*, 2008. 130(5): p. 824-831.
5. Wajcman H. In : Hémoglobines: structure et fonction. EMC-Hématologie, 2005. 2(3): p. 145-157.
6. Labie D , and Elion J. In : Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. EMC-Hématologie, 2005. 2(4): p. 220-239.
7. Gulbis B., Cotton F., and Vertongen F. In: Hémoglobines anormales rares. EMC-Hématologie, 2004. 1(4): p. 106-114.
8. COUQUE N., DE MONTALEMBERT .M. In : Diagnostic d'une hémoglobinopathie, 2013. 311(18).
9. Baele Ph. pour les captures I à V. Service d'anesthésiologie, Cliniques Universitaires Saint-Luc, Université Catholique de Louvain (UCL). Belgique.
10. Kaplan J.C, D.M. In : Le modèle des maladies de l'hémoglobine. *Biologie moléculaire et médecine* 3ème édition 2007. p. 379 - 393.
11. Harju S., McQueen K.J., Peterson K.R. In: Chromatin structure and control of  $\beta$ -like globin gene switching. *Experimental Biology and Medicine*, 2002. 227(9): p. 683-700.
12. Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. In: On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of molecular biology*, 1965. 12(1): p. 88-118.
13. Jeanne L. In : Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies. *Option/Bio*, 2010. 21(434): p. 17-20.
14. Giordano P. In: Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *International journal of laboratory hematology*, 2013. 35(5): p. 465-479.

15. Carver M. and Huisman T. In: International hemoglobin information center variant list. Hemoglobin, 1996. 20(3): p. 213-213.
16. Wajcman H. Hémoglobines et hémoglobinopathies. 2006.
17. Adouni H., al. ANESTHÉSIE ET HÉMOGLOBINOPATHIES. 2012.
18. Langlois S., al. In : Dépistage des porteurs de thalassémie et des hémoglobinopathies au Canada. J Obstet Gynaecol Can, 2008. 30(10): p. 960-71.
19. Higgs DR. In : alpha-Thalassaemia. Baillieres Clin Haematol 1993, 6:117-150.
20. Badens C., Thuret I., Lena-Russo.D. In : Les syndromes thalassémiques. Revue Française des Laboratoires, 2000. 2000(324): p. 23-27.
21. Galacteros F. Drépanocytose, Encyclopédie Orphanet. Février 2000.
22. Baglioni C. In: The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1962. 48(11): p. 1880.
23. Perutz M. In: Molecular anatomy and physiology of hemoglobin. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management (Steinberg, MH, BG Forget, DR Higgs, and RL Nagel, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2001: p. 174-196.
24. Godart C., Riou J. Place de l'HPLC dans le diagnostic des hémoglobinopathies. BIO-RAD ( 2007).
25. Yameogo P. In : contribution à l'étude des paramètres hématologiques chez les femmes enceintes atteintes d'une alpha thalassemie au centre medical saint camille Ouagadougou. 2009. p. 11-14.
26. Joly P., Pondarre C., Badens C. Les bêta-thalassémies: aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. in Annales de Biologie Clinique. 2014.
27. Renaudier P. In : Physiopathologie de la drépanocytose. Transfusion Clinique et Biologique, 2014. 21(4): p. 178-181.
28. Bourée P. and Ensaf A. In : La drépanocytose: une hémoglobinopathie tropicale qui devient cosmopolite. Option/Bio, 2012. 23(481): p. 15-17.

29. Elion J., Laurance S., and Lapoumériou C. In : Physiopathologie de la drépanocytose. Médecine tropicale, 2010. 70(5-6): p. 454-458.
30. El Nemer,W., Colin Y., and Le Van Kim C. In: Role of Lu/BCAM glycoproteins in red cell diseases. Transfusion clinique et biologique, 2010. 17(3): p. 143-147.
31. Kato G.J., Gladwin M.T., and M.H. In: Steinberg, Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. Blood reviews, 2007. 21(1): p. 37-47.
32. Galacteros F. In : Bases physiopathologiques de la drépanocytose, prise en charge et actualités thérapeutiques. BULLETIN-SOCIETE DE PATHOLOGIE EXOTIQUE, 2001. 94(2): p. 77-79.
33. Itano H.A., Neel J.V. In: A new inherited abnormality of human hemoglobin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1950. 36(11): p. 613.
34. Bachir D.D., Galacteros F. Hemoglobin C. Orphanet Encyclopedia [www. orpha.net/data/patol/GB/uk](http://www.orphanet.net/data/patol/GB/uk). November, 2004.
35. NICOLE C., Les hémoglobinopathies. Laboratoire Marcel Mérieux 2000.
36. Khadijetou B, Etude épidémiologique des hémoglobinopathies chez les femmes enceintes. Faculté de Médecine de Nouakchott, mémoire 2013.
37. Galois A, M., A., C., L., S., M. Hémoglobinose C a propos d'un cas. .Laboratoire d'Hématologie, CHU Strasbourg Service d'Oncohématologie.
38. Dora B., Frédéric G. Hemoglobin E disease. Orphanet encyclopedia. November 2004.
39. Stamatoyannopoulos G.,Nute P., Miller M. In: De novo mutations producing unstable hemoglobins or hemoglobins M. Human genetics, 1981. 58(4): p. 396-404.
40. Girot R. In :Maladies génétiques de l'hémoglobine. Journal de Pédiatrie et de Puériculture, 1995. 8(1): p. 10-20.
41. Rose C., Batters F., Galacteros F. In: Hydroxyurea therapy in highly unstable hemoglobin carriers [letter]. Blood, 1996. 88(7): p. 2807-2808.
42. ORSINI A., ORSINI-ROUBIN J. Classification et mécanismes physiopathologiques et génétiques des hémoglobinoses. in Annales de pédiatrie. 1985.

43. Derek A, Persons. In: Gene therapy: Targeting [beta]-thalassaemia. *Nature*, 2010. 467(7313): p. 277-278.
44. Wahed A., Dasgupta A. In: Chapter 4 - Hemoglobinopathies and Thalassemias, in *Hematology and Coagulation*, A.W. Dasgupta, Editor. 2015, Elsevier: San Diego. p. 55-80.
45. Professeur Pierre A, D.B.-A.G., Hémoglobinoses. *Medecine Tropicale*, 2014.
46. Organisation Mondiale de la Santé 2006.
47. Vella F., Lehmann H. In: Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). *Journal of medical genetics*, 1974. 11(4): p. 341-348.
48. Beutler E., al. In: Disorders of hemoglobin structure: sickle cell anemia and related abnormalities. *Williams Hematology*, Seventh edition. Mc Graw Hill Companies Inc. USA, 2006: p. 667-780.
49. Giardine B., al. In: HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. *Human Mutation*, 2007. 28(2): p. 206-206.
50. Weatherall D. In: Phenotype—genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Reviews Genetics*, 2001. 2(4): p. 245-255.
51. Orphanet, E., La bêta-thalassémie. [www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/BetaThalassemie-FRfrPub51v01.pdf](http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/BetaThalassemie-FRfrPub51v01.pdf) | Juin 2008.
52. Bachir D. In : La drépanocytose. *Revue Française des Laboratoires*, 2000. 2000(324): p. 29-35.
53. Habibi A., Godeau B., Galacteros F. In : Drépanocytose et réanimation, 2007. 16(4): p. 310-317.
54. Yavarian M., al. In: Multi Centric Origin of Hb D-Punjab [ $\beta$ 121 (GH4) Glu→ Gln, GAA> CAA]. *Hemoglobin*, 2009. 33(6): p. 399-405.
55. Baglioni C. In: Abnormal human haemoglobins VIII. chemical studies on haemoglobin D. *Biochimica et biophysica acta*, 1962. 59(2): p. 437-449.
56. Desai D., al. In: Homozygous hemoglobin D disease: a case report. *The Internet Journal of Pathology*, 2004. 3: p. 1-4.

57. Bender J.W., Reilly M.P., Asakura T. In: Molecular Stability and Function of Hemoglobins Hasharon ( $\alpha 2$  47 (CD5) ASP $\rightarrow$  HIS $\beta$ 2) and Hasharon ( $\alpha 2$  47 (CD5) ASP $\rightarrow$  HIS  $\delta$ 2). Hemoglobin, 1984. 8(1): p. 61-73.
58. Tang W., al. In: Immunocytological test to detect adult carriers of (--SEA/) deletional  $\alpha$ -thalassaemia. The Lancet, 1993. 342(8880): p. 1145-1147.
59. Kanavakis E., al. In: Phenotypic and molecular diversity of haemoglobin H disease: a Greek experience. British journal of haematology, 2000. 111(3): p. 915-923.
60. Montalembert M.d. In : Syndromes thalassémiques. EMC-Hématologie [13-006-D-17] - Doi : 10.1016/S1155-1984(08)49950-8.
61. Pavic M., Rousset H. In : Les polyglobulies héréditaires. La Revue de Médecine Interne, 2003. 24(8): p. 514-521.
62. Percy M.J., McFerran N.V, and Lappin T.R. In: Disorders of oxidised haemoglobin. Blood reviews, 2005. 19(2): p. 61-68.
63. Bain BJ. In: Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. Blood Reviews, 2011. 25(5): p. 205-213.
64. Bardakdjian-Michau J., al. Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine. in Annales de Biologie Clinique. 2003.
65. North M.L., M. Piffaut C., Duwig I. In : Hémoglobinopathies : actualisation du diagnostic biologique. Revue Française des Laboratoires, 1995. 1995(275): p. 107-116.
66. Zandecki M , G.F., Hémogramme : Valeurs de référence. Laboratoire d'hématologie du chu d'Angers. Disponible sur : [http:// med2.univangersfr/ discipline/ lab\\_hema/page2g.html](http://med2.univangersfr/discipline/lab_hema/page2g.html).
67. Oliver M., Wolf A., Roche C., Moalic JL. In : Hémoglobinopathies. Diagnostic au laboratoire. Méd. Trop, 2011. 71: p. 217-222.
68. Clarke GM., Higgins TN., In: Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemas: review and update. Clinical chemistry, 2000. 46(8): p. 1284-1290.
69. Trivin F., Le Bricon T ; In : Nouvelles techniques d'électrophorèse: applications aux protéines et à l'ADN. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2003. 18(1): p. 11-22.
70. Cotton F., al. In: Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A2 and F. Clinical chemistry, 1999. 45(2): p. 237-243.

71. Girard F. Diagnostic biologique des pathologies génétiques de l'hémoglobine.
72. Blessum C., al. L'électrophorèse capillaire: principe et applications au laboratoire de biologie clinique. in *Annales de Biologie Clinique*. 1999.
73. Cotton F., Vertongen F., Gulbis B. In : *Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies. Immuno-analyse & Biologie spécialisée*, 2006. 21(1): p. 45-50.
74. Lausanne L. L'électrophorèse capillaire : Prestations de laboratoire - Appareils & technologies. [En ligne]. Disponible sur [http://www.doping.chuv.ch/lad\\_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestationslaboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm](http://www.doping.chuv.ch/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestationslaboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm) (Consulté le 02/05/2015).
75. Arlinger, L. In: *Analytical isotachopheresis in capillary tubes. Analysis of hemoglobin, hemoglobin cyanide and isoelectric fractions of hemoglobin cyanide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1975. 393(2): p. 396-403.
76. Chen F. T., al. In: *Capillary electrophoresis--a new clinical tool. Clinical chemistry*, 1991. 37(1): p. 14-19.
77. Jenkins M., Hendy J., Smith I. In: *Evaluation of hemoglobin A2 quantitation assay and hemoglobin variant screening by capillary electrophoresis. Journal of capillary electrophoresis*, 1996. 4(3): p. 137-143.
78. Mario N., al. In: *Capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital hemoglobinopathies. Clinical chemistry*, 1999. 45(2): p. 285-288.
79. Molteni S., Frischknecht H., Thormann W. In: *Application of dynamic capillary isoelectric focusing to the analysis of human hemoglobin variants. Electrophoresis*, 1994. 15(1): p. 22-30.
80. Mario N., al. In: *Capillary isoelectric focusing and high-performance cation-exchange chromatography compared for qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants. Clinical chemistry*, 1997. 43(11): p. 2137-2142.
81. Hempe J., Craver RD. In: *Separation of hemoglobin variants with similar charge by capillary isoelectric focusing: value of isoelectric point for identification of common and uncommon hemoglobin variants. Electrophoresis*, 2000. 21(4): p. 743-748.
82. Hempe J., al. In: *Analysis of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. Journal of capillary electrophoresis*, 1996. 4(3): p. 131-135.

83. Guis L, A.C., Le Gall V., Havrez S. In : Intégration du Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée. Revue Francophone des Laboratoires. 2013. 449: p. 47-56.
84. Keren D., al. In: Expression of hemoglobin variant migration by capillary electrophoresis relative to Hemoglobin A2 improves precision. American journal of clinical pathology, 2012. 137(4): p. 660-664.
85. Liao C., al. In: Detection of Hb Constant Spring by a capillary electrophoresis method. Hemoglobin, 2010. 34(2): p. 175-178.
86. Généralités sur la chromatographie. Faculté des sciences d'Orsay. Disponible sur : <http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/Generalites%20chromato.html>.
87. Rognerud Ou C.-N.,C.L. In: Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. Clinica chimica acta, 2001. 313(1): p. 187-194.
88. Bouzid K., al. In : Syndromes drépanocytaires atypiques: à propos de deux cas. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2011. 26(5): p. 267-275.
89. Troxler H., al. In: Advances in hemoglobinopathy detection and identification. Advances in clinical chemistry, 2012. 57: p. 2.
90. Itano H.A. In: Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin. Archives of biochemistry and biophysics, 1953. 47(1): p. 148-159.
91. Siguret V., Andreux J. In : Diagnostic biologique des hémoglobinopathies par analyse du phénotype. in Annales de biologie clinique. 1997.
92. Dacie J., Lewis S. In: Practical hematology sixth Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, Melbourne and New York p, 1984: p. 24-36.
93. [https://tulane.edu/som/departments/pathology/training/hematopathology\\_images\\_21.cfm](https://tulane.edu/som/departments/pathology/training/hematopathology_images_21.cfm).
94. Mollison P.L. In: Quantitation of transplacental haemorrhage. British Medical Journal, 1972. 3(5818): p. 115-115.
95. Duckett J.,Constantine G. In: The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 1997. 104(7): p. 845-846.

96. Pelikan D., al. In: Improvement of the Kleihauer-Betke test by automated detection of fetal erythrocytes in maternal blood. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2003. 54(1): p. 1-9.
97. Iyer R., al. In: False positive Kleihauer tests and unnecessary administration of anti-D immunoglobulin. *Clinical & Laboratory Haematology*, 2003. 25(6): p. 405-408.
98. Boissière A., Arnathau C., Duperray C., Berry L., Lachaud L., Renaud F., al. In : Isolation of *Plasmodium falciparum* by flow-cytometry: implications for single-trophozoite genotyping and parasite DNA purification for whole-genome high-throughput sequencing of archival samples. *Malar. J.* 2012;11:163.
99. Merle-Béral H., Le Garff-Tavernier M. In : Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie de flux. *EMC - Hématologie* 2008:1-12 [Article 13-000-L-10].
100. Gendron MC. *Cytométrie en flux. EMC - Biologie médicale* 2003:1-0 [Article 90-60-0065].
101. La cytométrie de flux [Internet]. [cité 26 janv 2013]. Disponible sur: <http://pedagogie.acamiens.fr/svt/info/logiciels/cytometrie/Cytometrie2.html>.
102. Nance SJ, Nelson JM, Arndt PA, Lam HC, Garratty G. In: Quantitation of fetal-maternal hemorrhage by flow cytometry. A simple and accurate method. *Am. J. Clin. Pathol.* mars 1989;91(3):288-292.
103. Urbaniak SJ. In: The scientific basis of antenatal prophylaxis. *Br J Obstet Gynaecol.* nov 1998;105 Suppl 18:11-18.
104. Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. In: Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion.* Août 1998;38(8):749-756.
105. Nelson M, Zarkos K, Popp H, Gibson J. In: A flow-cytometric equivalent of the Kleihauer test. *Vox Sang.* 1998;75(3):234-241.
106. Radel DJ, Penz CS, Dietz AB, Gastineau DA. In: A combined flow cytometry-based method for fetomaternal hemorrhage and maternal D. *Transfusion.* sept 2008;48(9):1886-1891.
107. Porra V, Bernaud J, Gueret P, Bricca P, Rigal D, Follea G, al. In : Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow

cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit. Transfusion. juill 2007;47(7):1281-1289.

108. Pastoret C, Le Priol J, Fest T, Roussel M. In : Evaluation of FMH QuikQuant for the Detection and Quantification of Fetomaternal Hemorrhage . Cytometry Part B 2013; 84B: 37-43.
109. Rifkind R.A. In: Heinz body anemia: An ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction. Blood, 1965. 26(4): p. 433-448.
110. Davies S.C., Gilmore A. In: The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. Blood reviews, 2003. 17(2): p. 99-109.
111. Vasseur C., Baudin-Creuzat V. In : Rôle du chaperon moléculaire de l'alpha-hémoglobine dans la formation de l'hémoglobine et l'expression clinique de certaines hémoglobinopathies. Transfusion Clinique et Biologique, 2015. 22(1): p. 49-57.

## *Serment de Galien*

*Je jure en présence des maîtres de cette faculté :*

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à 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**

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحس بالثمن لأعظم

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

"والله على ما أقول شهيد"



جامعة محمد الخامس - الرباط  
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم : 03

سنة : 2016

## دور المختبر في تشخيص أمراض الهيموغلوبين

### أطروحة:

قدمت ونوقشت علانية يوم .....

### من طرف

السيد : معاد غلمان

المزاداد في 04 يونيو 1989 بالرباط

## لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية : .مهارات الدراسة - التشخيص - امراض الهيموغلوبين - الهيموغلوبين

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة:

رئيس

السيد : عبد القادر بلمكي

أستاذ في علم الدم البيولوجي

مشرف

السيدة : سعاد بنكيران

أستاذ في علم الدم البيولوجي

السيد : عز العرب مسرار

أعضاء

أستاذ في علم الدم البيولوجي

السيدة: منى نزيه

أستاذ في علم الدم البيولوجي