



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**  
**Sciences Biologiques Appliquées et Santé**  
**(LST - SBAS)**

**Dépistage des porteurs et prévention des  
hémoglobinopathies par électrophorèse  
capillaire**

**Présenté par : FIAH-MTIOUI YOUSRA**

**Encadré par : Pr. GUISSI SANAE**

**Dr. MARZOUKI NAIMA**

**Soutenu le : 09 /06/2017**

**Devant le jury composé de :**

- **Présidente : Pr. GUISSI SANAE**
- **Examinatrice : Pr. SQALLI HAKIMA**
- **Encadrante : Dr. MARZOUKI NAIMA**

**Stage effectué à : Centre Hospitalier Universitaire Mohammed VI**  
**Marrakech**

**Année universitaire 2016-2017**



# Sommaire

<b>Dédicace</b> .....	i
<b>Remerciements</b> .....	ii
<b>Liste des abréviations</b> .....	iii
<b>Liste des figures</b> .....	vi
<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Revue bibliographique</b> .....	3
<b>I. LES HEMOGLOBINES:</b> .....	3
1. Structure de l'hémoglobine.....	3
2. Fonction de l'Hb.....	4
3. Génétique, biosynthèse et ontogénie.....	4
3.1. Gènes de l'hémoglobine.....	4
3.2. Ontogénie et biosynthèse.....	5
<b>II. LES HEMOGLOBINOPATHIES</b> .....	7
<b>A. Prévalence des hémoglobinopathies</b> .....	7
<b>B. Définition et classification</b> .....	7
1. Les hémoglobinoses.....	8
1.1. L'hémoglobinosose S ou drépanocytose :.....	8
1.2. Autres substitutions :.....	8
2. Les thalassémies (thal) et persistance de l'hémoglobine fœtale.....	9
2.1. Les $\beta$ -thalassémies:.....	9
2.2. Les $\alpha$ -thalassémie :.....	10
3. La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale PHHF.....	11
<b>C. Physiopathologie</b> .....	11
1. Physiopathologie de la drépanocytose :.....	11
2. Physiopathologie des thalassémies:.....	11
<b>III. MOYENS THERAPEUTIQUES</b> .....	12
1. Traitement de la drépanocytose :.....	12
2. Traitement des thalassémies :.....	13
3. Traitement des Hémoglobines instables :.....	14
<b>IV. QUAND RECHERCHER UNE ANOMALIE DE L'HEMOGLOBINE ?</b> .....	14
A. Circonstances du diagnostic :.....	14
B. Les Signes d'appel:.....	15

1. L'anémie :.....	15
2. Microcytose isolée :.....	15
3. Polyglobulie : .....	15
4. Cyanose :.....	15
5. Autres signes .....	15
C. Enquête biologique .....	16
1. Hémogramme .....	16
2. Bilan martial .....	16
3. Bilan d'hyperhémolyse.....	16
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>17</b>
I. Matériel et patients .....	17
1. Patients .....	17
2. Échantillons à analyser .....	17
II. STRATEGIE D'ETUDE DE L'HEMOGLOBINE :.....	17
1. Principe de l'électrophorèse capillaire:.....	17
3. <i>Technique analytique</i> :.....	22
4. Profils électrophorétiques:.....	22
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>24</b>
I .Etude des profils électrophorétiques des malades selon les différents types des hémoglobinoopathies obtenus avec le Kit CAPILLARYS HEMOGLOBINE :.....	26
1. Bilan normal:.....	26
2. Les $\beta$ - thalassémies hétérozygotes (A/F) :.....	27
3. Les $\beta$ -thalassémies homozygotes : .....	28
4. les drépanocytes homozygotes : .....	29
5. Les drépanocytoses hétérozygotes : .....	30
6. L' hémoglobinoase C (hétérozygote):.....	31
7. Les doubles hétérozygotes (S/C) :.....	32
<b>Discussion des résultats.....</b>	<b>33</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>34</b>
<b>Liste des références</b>	

# Dédicaces

*J'ai le plaisir de dédier ce travail :*

*A Allah Tout puissant Qui m'a inspiré et qui m'a guidé dans le bon chemin*

*Je lui dois ce que je suis devenue*

*Louanges et remerciements Pour sa clémence et miséricorde.*

*A mes très chers parents*

*Grâce à vos tendres encouragements et grands sacrifices, vous avez su créer le climat affectueux propice à la poursuite de mes études.*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, mes considérations et mon profond amour pour vous. Je prie Dieu de vous préserver et de veiller sur vous et j'espère que vous serez toujours fières de moi.*

*A mes chers frères: Simohamed, Rihab et Yahya.*

*Complicité fraternelle et amour inconditionnel nous réunissent.*

*A mes chers professeurs, pour leurs vaillants efforts qu'ils ont prodigués.*

*A mes chers amis: Youness, Farah, Jihane et Yasmine*

*Je vous exprime à travers ce modeste travail mes sentiments d'un profond amour.*

# Remerciements

*Mes remerciements sont adressés à Monsieur le Directeur du Centre Hospitalier Universitaire Med 6 qui a eu la bienveillance de m'accorder ce stage au sein de l'établissement, ainsi qu'au chef de service d'hématologie*

***Pr. Haouach** Khalil de m'avoir fait confiance afin de réaliser ce stage dans les meilleures conditions possibles.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à mon encadrante pédagogique de stage **Dr. Marzouki Naima** pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles elle a bien voulu diriger ce travail. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous sa direction, et j'ai trouvé auprès d'elle le conseiller et le guide*

*Je remercie aussi toute l'équipe des laboratoires ERRAZI pour leur collaboration et partage de connaissances, leur professionnalisme et la bonne humeur dont ils ont fait preuve à mon égard durant ce stage.*

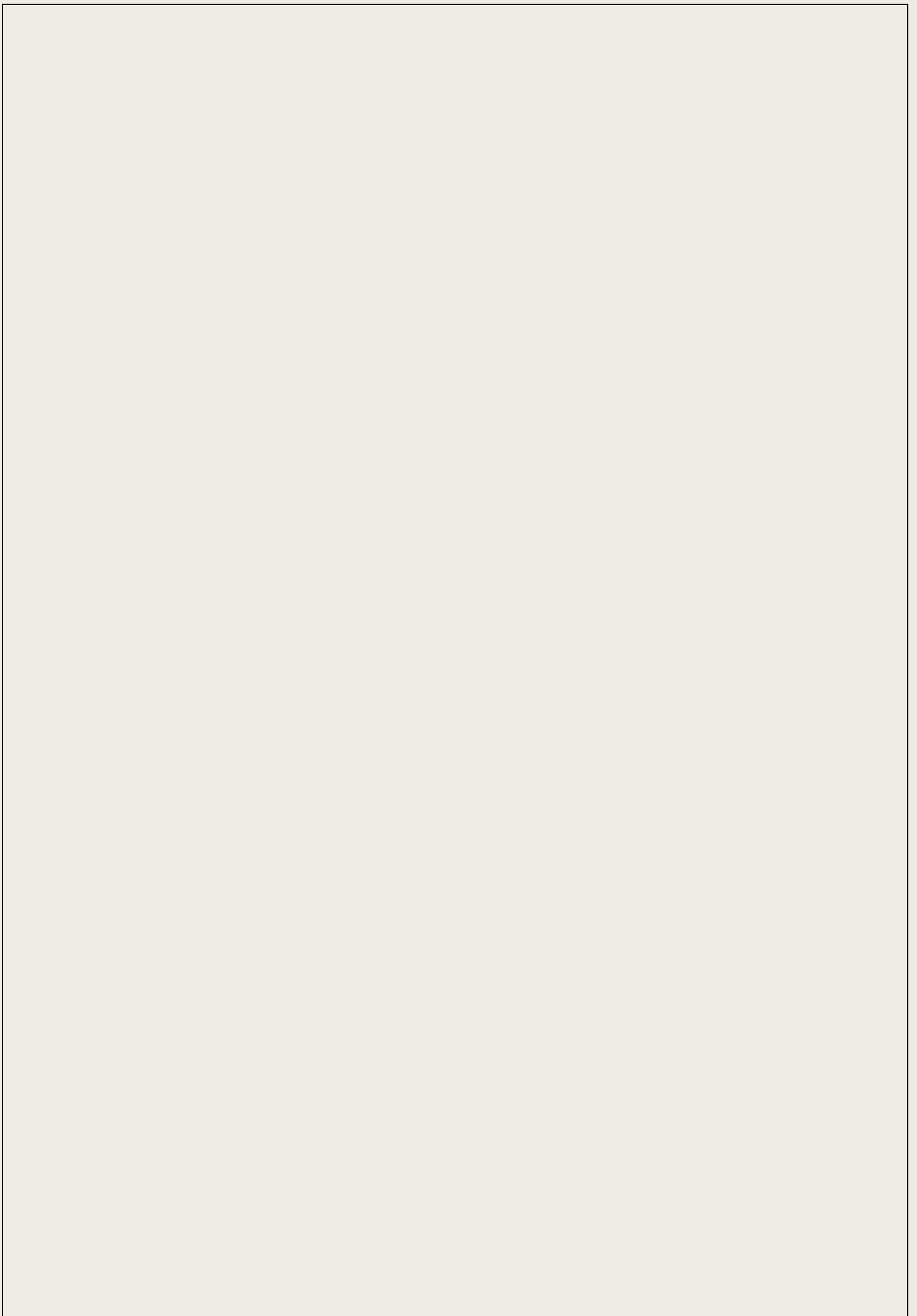
*J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadrante à la faculté des sciences et techniques **Pr. GUISSI SANAË** d'avoir accepté d'encadrer ce travail.*

*Votre compétence et vos qualités humaines exemplaires ont toujours suscité mon admiration.*

*Aux membres de jury : **Pr. GUISSI, Pr. SQALLI, Dr. Marzouki**, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce projet de fin d'études.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au responsable de la filière **Pr. Tazi ALI**, et à l'ensemble du personnel administratif et professoral de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès (FSTF) pour la Formation de qualité qu'ils me dispensent.*

*Que tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail trouvent l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.*



## Liste des abréviations

**ADN:** Acide Désoxyribonucléique

**AH SP:** Alpha-hemoglobin Stabilizing Protein

**AINS:** anti-inflammatoire non stéroïdien

**ARN:** Acide ribonucléique

**ARNm:** Acide ribonucléique messenger

**CHU:** Centre Hospitalier Universitaire

**CCMH:** Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine

**Cm:** Centimètre

**EDTA:** Ethylène-diamine-tétra-acétate.

**Fl :** Femtolitre

**g:** Gramme

**GCBH:** Gharb Chrarda Beni Hssein

**Gln:** Glutamine

**Glu:** Glutamate

**GR:** Globule Rouge

**GR /dl:** Globule rouge par décilitre

**Hb:** Hémoglobine

**Hb F:** Hémoglobine foetale

**HbP:** Hémoglobinopathie

**HPLC:** Chromatographie Liquide de Haute Performance

**kDa:** Kilodalton

**lys:** Lysine

**ml:** Millilitre

**nm:** Nanomètre

**O.M.S:** Organisation Mondiale de la Santé

**Pg:** Picogramme

**PHHF:** Persistance Hériditaire de l'Hémoglobine F

**Thal:** Thalassémie



**TCMH:** Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**UV:** Ultraviolet

**Val:** Valine

**VGM:** Volume Globulaire moyen

**µm:** Micromètre

**µmol:** Micromole

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte .....	3
<b>Figure 2:</b> Structure et organisation des deux familles de gènes de globine.....	5
<b>Figure 3:</b> Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours du développement humain .....	6
<b>Figure 4:</b> Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire.....	18
<b>Figure 5:</b> Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électro-osmotique à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon.....	19
<b>Figure 6:</b> Système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING (sebia).....	20
<b>Figure 7:</b> Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis automatique.....	23
<b>Figure 8:</b> Réalisation et interprétation des cas simples d'HbP .....	24
<b>Figure 9:</b> Anomalies quantitatives de l'Hb A2 (Sans carence martiale) .....	25
<b>Figure 10:</b> Anomalies qualitatives combinées ou rares de l'Hb .....	25
<b>Figure 11:</b> Profile électrophorétique d'un sang normal.....	26
<b>Figure 12:</b> Profile électrophorétique d'un sang $\beta$ - thalassémique hétérozygote.....	27
<b>Figure 13:</b> Profile électrophorétique d'une $\beta$ -thalassémie homozygote.....	28
<b>Figure 14:</b> Profile électrophorétique d'un sang avec variant homozygote HbS.....	29
<b>Figure 15:</b> Profile électrophorétique d'un sang avec variant hétérozygote HbS.....	30
<b>Figure 16:</b> Profile électrophorétique d'un sang avec hémoglobinose C hétérozygote.....	31
<b>Figure 17:</b> Profile électrophorétique d'un sang avec double hétérozygote S/C.....	32

## Introduction générale

L'hémoglobine (Hb), constituant principal du globule rouge (GR), est une hétéroprotéine ferroporphyrinique [1].

Les hémoglobinopathies (Anomalies héréditaires de l'hémoglobine) sont transmises selon le mode mendélien autosomique récessif et sont les plus répandues dans le monde chez l'humain [2]. Ces maladies génétiques, souvent responsables d'anémies hémolytiques, sont dues à des mutations de séquences codantes, non codantes ou régulatrices des gènes de globine et qui sont à l'origine de deux groupes d'anomalies:

- Les anomalies structurales ou qualitatives générant des hémoglobines anormales (variants d'Hb), dont la plus fréquente est l'Hb S (**drépanocytose**),
- Les anomalies quantitatives touchant les chaînes de globine  $\alpha$  ou  $\beta$ , générant respectivement **l'alpha ou la bêta-Thalassémie** [1,2].

De par leur grande fréquence et leur gravité potentielle, ces affections représentent un problème majeur de santé public dans le monde [3]. Elles concernaient essentiellement les zones impaludées ainsi que les pays vers lesquels de nombreux esclaves d'origine africaine avaient migré. Depuis, la distribution globale de ces anomalies génétiques s'est considérablement modifiée en raison des flux migratoires vers les pays industrialisés, mais également des migrations de population des colonies vers les pays dont elles dépendaient [4].

A ce jour, plus de 1100 variants de l'hémoglobine sont dénombrés, auxquels s'ajoutent les thalassémies [5]. L'identification précise des hémoglobines anormales, maladies génétiques les plus fréquentes dans le monde, fait appel à un ensemble de techniques, nous permettant à la fois l'identification des différents variants de l'hémoglobine ainsi que la quantification des hémoglobines (normales ou non).

Un diagnostic précoce de certaines de ces anomalies permet une prise en charge précoce et une amélioration considérable de la qualité de vie des patients. Différentes techniques d'étude de l'hémoglobine ont été développées dans le passé, telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose à pH alcalin et l'électrophorèse en gel d'agarose à pH acide. Cependant, en raison du manque de sensibilité de ces dernières, d'autres techniques ont été mises au point pour le diagnostic des anomalies de l'hémoglobine. Ainsi, la chromatographie liquide de haute performance sur D 10 (HPLC capillaire) a contribué à l'identification plus rapide d'un grand

nombre de variants de l'hémoglobine et à une quantification plus précise de l'hémoglobine A2 et de l'hémoglobine F. Une quantification précise de ces deux fractions, présentes en faible concentration, est en effet nécessaire pour établir une orientation diagnostique [6].

Plus récemment, au début des années 2000, une méthode automatisée d'électrophorèse capillaire a été développée pour le diagnostic des hémoglobinopathies. En effet, le système Capillarys® (Sebia, France), initialement conçu pour l'électrophorèse capillaire, permet désormais la recherche des anomalies de l'hémoglobine [7].

L'arrivée de ces nouvelles technologies s'est accompagnée d'une actualisation des recommandations pour la stratégie diagnostique des hémoglobinopathies, celle-ci faisant nécessairement intervenir plusieurs techniques complémentaires [8]. Suite à la publication de ces nouvelles recommandations, le Service d'Hématologie Biologique du CHU de Marrakech a choisi sa stratégie d'étude de l'hémoglobine par l'électrophorèse capillaire sur capillarys 2 Flex-piercing (Sebia), avec une confirmation par confrontation aux résultats de la chromatographie liquide de haute performance sur D 10 (HPLC capillaire).

Dans le présent travail, nous nous proposons un dépistage des hémoglobinopathies chez des patients de sud Marocain par électrophorèse capillaire et HPLC capillaire et autres techniques non séparatives (test de résistance globulaire, test d'itano..Etc). Une exploitation des résultats obtenus et des données recueillies et une discussion de leurs tableaux cliniques et biologiques permettront une amélioration du diagnostic clinique et du suivi thérapeutique de la pathologie.

En outre, nous avons essayé d'explicitier l'intérêt de l'implantation de l'électrophorèse capillaire. Nous avons également tenté d'évaluer le système HPLC capillaire au sein de la démarche globale mise en œuvre lors d'une étude de l'hémoglobine et notamment sa complémentarité à l'électrophorèse capillaire.

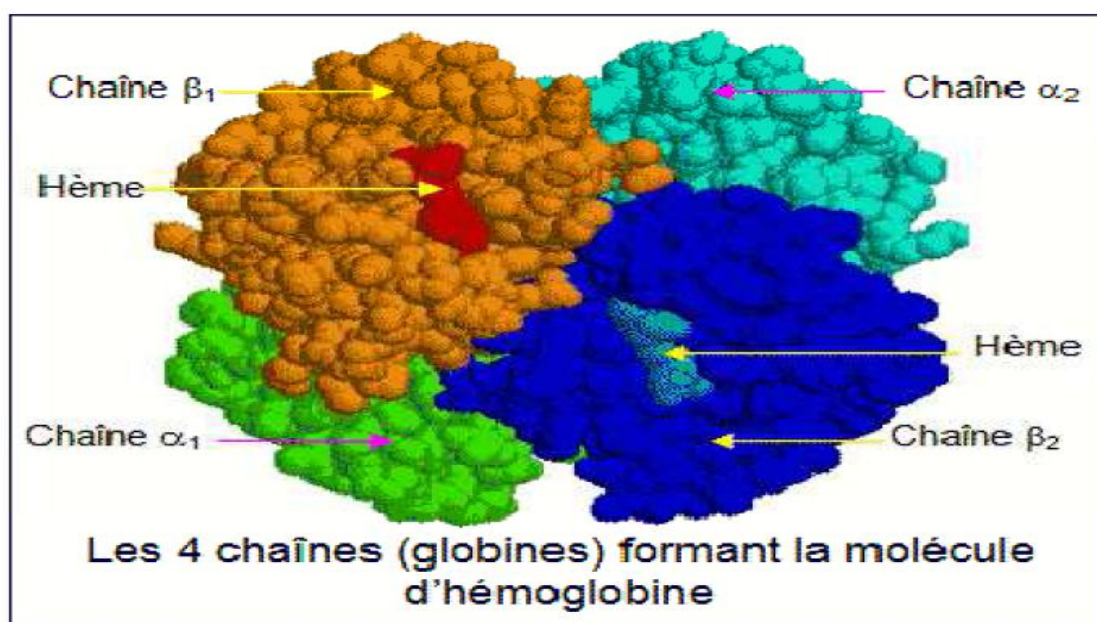
## Revue bibliographique

### **I. LES HEMOGLOBINES:**

- Pour comprendre les maladies de l'Hb, ou hémoglobinopathies (HbP), 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: [1,9]**

- Les différentes hémoglobines humaines sont des tétramères d'environ 65 kDa, constitués de deux polypeptides ou globines alpha ( $\alpha$ ) et deux globines non alpha, les quatre protomères étant identiques deux à deux. Chaque globine possède un groupe prosthétique, l'hème, constitué de la protoporphyrine et d'un atome de fer divalent qui fixe l'oxygène.



**Figure1: Structure tridimensionnelle de la molécule d'hémoglobine adulte [10].**

- Au cours du développement physiologique:

- ❖ **L'HbF**, comportant 2 chaînes alpha et 2 chaînes gamma ( $\alpha_2\gamma_2$ ), représente environ **80 %** de l'Hb totale du nouveau-né. Son taux diminue à 2 % un an après la naissance. Chez l'adulte, il varie de **0,5 à 1 %**.
  - ❖ **L'HbA**, composée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes bêta ( $\alpha_2\beta_2$ ), représente environ **20 %** de l'hémoglobine chez le nouveau-né, **50 %** après 3 mois et **98 %** après un an.
  - ❖ **L'HbA2**, formée de 2 chaînes alpha et de 2 chaînes delta ( $\alpha_2\delta_2$ ), est détectable 3 mois après la naissance. Elle représente alors **0,3 à 0,7 %** de l'hémoglobine du nouveau-né et **2,0 à 3,0 %** chez l'adulte.
- 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 [11].

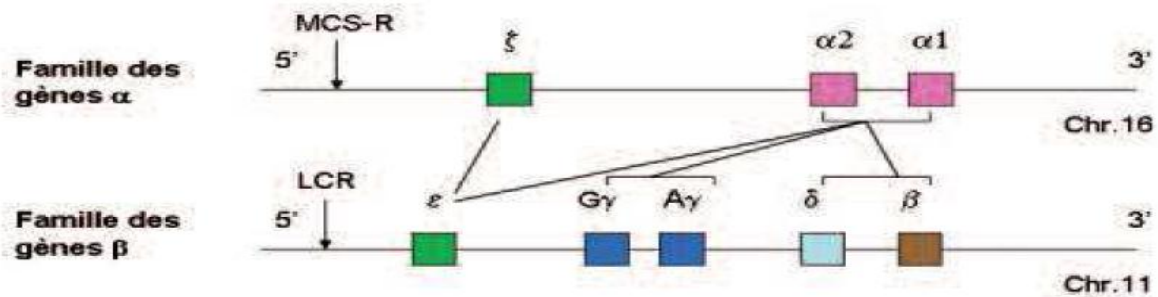
## **2. Fonction de l'Hb:**

- 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>.
- La structure de l'hémoglobine se modifie au cours de la fixation et de la libération de l'oxygène. [12]

## **3. Génétique, biosynthèse et ontogénie:**

### **3.1. 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 [13].



**Figure 2 : Structure et organisation des deux familles de gènes de globine [13].**

➤ *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. 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  $\alpha 1$  [14].

➤ *Groupes de gènes de type  $\beta$ :*

- Les gènes de type  $\beta$  se trouvent à l'extrémité distale du bras court du chromosome 11.
- 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  $\beta$  [14].

**3.2. Ontogénie et biosynthèse:**

- Pendant l'ontogénie, deux commutations (Switch) interviennent. 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 [15]. 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 37<sup>ème</sup> jour apparaît l'HbF ou fœtale:  $\alpha 2 \gamma 2$ , dont les proportions vont atteindre 90% entre la 8<sup>ème</sup> et la 10<sup>ème</sup> semaine de grossesse puis rester constantes jusqu'à la naissance.

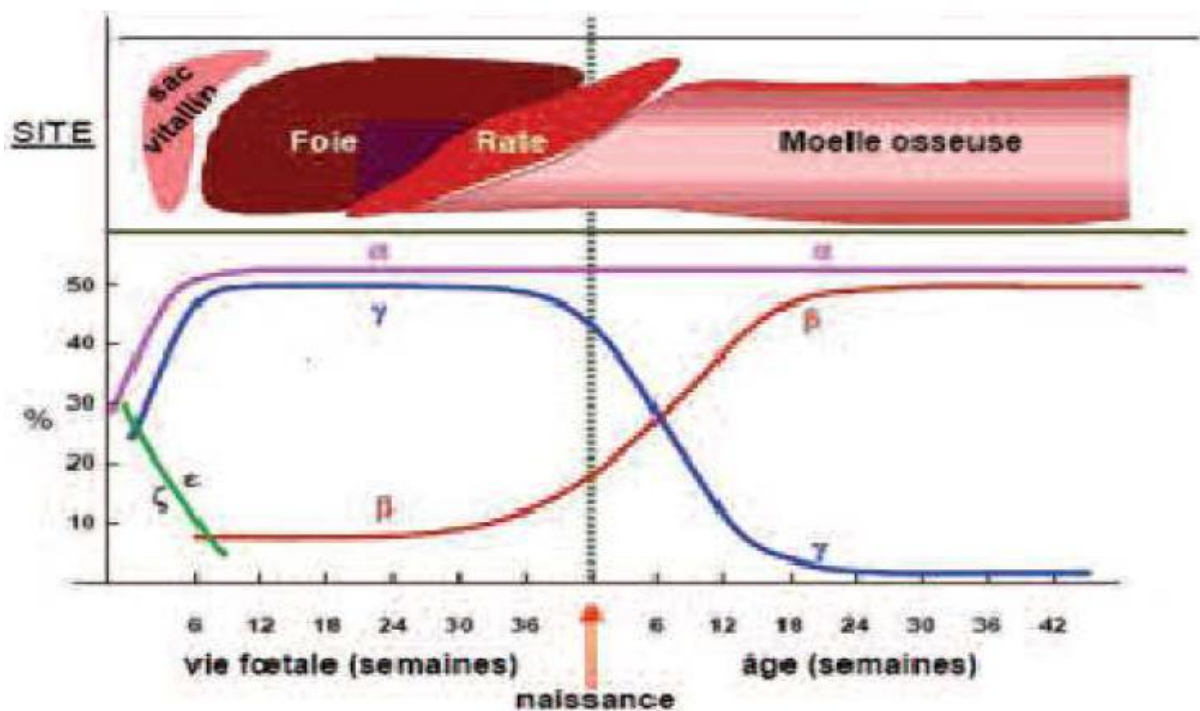
La synthèse de l'hémoglobine adulte HbA ( $\alpha 2 \beta 2$ ) débute mais à taux faible.

### 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%) [16].



**Figure 3** : Evolution de la synthèse des différentes chaînes de globine au cours du développement humain [16].



- 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 [17].

## **II. LES HEMOGLOBINOPATHIES :**

### **A. Prévalence des hémoglobinopathies :**

- La prévalence des hémoglobinopathies au sein de la population mondiale est estimée à près de **7%**, *avec une prédominance en Afrique*. Chaque année, environ **330 000** enfants atteints de ces maladies naissent dans le monde, dont **83 %** sont *drépanocytaires* et **17 %** *thalassémiques*. La mortalité enregistrée est importante dès les premières années de la vie dans les pays défavorisés [18].
- Les troubles de l'hémoglobine sont responsables d'environ **3,4 %** des décès chez les moins de 5 ans. A l'échelle mondiale, **7% environ des femmes enceintes** seraient porteuses d'une forme de la *thalassémie* et **1%** des couples sont *à risque* [19].
- Au Maroc, l'épidémiologie des hémoglobinopathies reste inconnue. L'OMS estime le **taux des porteurs au Maroc à 6,5%** ; ce qui laisserait supposer l'existence de 30.000 cas de formes majeures de Thalassémie et drépanocytose au Maroc [20].
- Plusieurs études non publiées menées par l'hôpital d'enfants des centres hospitaliers universitaires (CHU) ont montré que le nord-ouest du Maroc est une zone de prédilection des hémoglobinopathies et que la région de Gharb Chrarda Beni Hsein (GCBH), semble la région la plus touchée plus particulièrement au niveau de Kenitra, au niveau de la commune MNASRA qui constitue un foyer riche de thalassémie [21].
- Au sud du Maroc, région Marrakech-Tensift-elhaouz, une étude épidémiologique est en cours par le laboratoire d'hématologie de CHU de Marrakech en collaboration avec le service d'hématologie clinique et service de transfusion de la même région. Les études préliminaires montrent que la beta-thalassémie est la plus fréquente suivie par la drépanocytose puis l'hémoglobinoase C.

### **B. Définition et classification :**

- Les hémoglobinopathies peuvent être classées en trois grandes catégories :
  - Anomalies quantitatives de synthèse de l'Hb: production structurellement normale mais diminuée de chaînes de globine (syndrome de thalassémie).

- Trouble (qualitatif) 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 entraînera une diminution de gravité de ces maladies (effet protecteur) [22].
- 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 anémiques. Lorsque les deux parents sont porteurs, leurs enfants ont 25% de chance d'être normaux, une chance d'être affecté de 25% par la maladie, et un risque d'être porteur de 50 % [22].

### **1. Les hémoglobinoses :**

- On parle d'hémoglobinoïse lorsqu'il y a synthèse d'une nouvelle chaîne de globine par substitution d'un ou de plusieurs acides aminés de l'une des chaînes de la globine [23]. Il existe plusieurs types d'hémoglobinoses différentes les unes des autres par la qualité et la position de l'acide aminé substitué dans la chaîne de la globine [24].

#### **1.1. L'hémoglobinoïse S ou drépanocytose :**

- La drépanocytose a été décrite en 1910 par Herrick [25]. Cette affection transmise selon le mode récessif autosomique est due à une modification du 6e codon de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine (substitution de l'acide glutamique par de la valine) qui entraîne la formation d'hémoglobine (Hb) S. Les sujets peuvent être homozygotes SS ou hétérozygotes (AS) le plus souvent asymptomatiques [26].
- D'autres mutations associées aboutissent à des hétérozygotes composites :
  - synthèse d'hémoglobine C par mutation du 6e codon en leucine (hétérozygotes SC) ;
  - $\beta$ -thalassémie (hétérozygotes S- $\beta$  thalassémiques).

Homozygotes SS, hétérozygotes SC et S- $\beta$  thalassémiques sont regroupés sous le terme de syndromes drépanocytaires majeurs [27].

#### **1.2. Autres substitutions :**

- D'autres hémoglobines correspondent à des substitutions de différents acides aminés. Elles se traduisent par l'apparition de **cellules cibles** sur un frottis sanguin :

- ✚ HbC, mutation au niveau de la chaîne  $\beta$  (glu6 $\rightarrow$ lys), en Afrique et en Maghreb ;
- ✚ HbD, dont HbD Panjab (glu121 $\rightarrow$ gln) en Inde ;
- ✚ HbE (mutation au niveau de la chaîne  $\beta$  (glu26  $\rightarrow$  lys), dans le Sud-est asiatique.
- ✚ Hb O-Arabe résulte d'une mutation ponctuelle au niveau du codon 121, cela a pour conséquence le remplacement de l'acide glutamique de la chaîne  $\beta$  par une lysine [28].

## **2. Les thalassémies (thal) et persistances de l'hémoglobine fœtale :**

- Les syndromes thalassémiques sont des affections génétiques, le plus souvent transmises selon le mode autosomal récessif. Ils entraînent une réduction de la synthèse des chaînes de globine, soit alpha ( $\alpha$ -thalassémies), soit ( $\beta$ -thalassémies). Le déséquilibre de synthèse entre chaînes alpha et non- $\alpha$  provoque la précipitation des chaînes non appariées, une érythropoïèse inefficace et une anémie [29]. Les thalassémies sont développées dans certaines régions du monde (bassin méditerranéen, Asie du Sud- Est) [30].

### **2.1. Les $\beta$ -thalassémies:**

- Deux cents anomalies moléculaires sont actuellement décrites [31]. Les  $\beta$ - thalassémies résultent en majorité de mutations ponctuelles sur le gène  $\beta$  (plus de 100 mutations décrites), spécifiques d'une population donnée: ces mutations se situent au niveau de la transcription de l'ADN en ARN, de l'épissage de l'ARN messenger (phénotype  $\beta^\circ$  ou  $\beta^+$ ) ou de la traduction de l'ARNm. Les délétions à l'origine d'une  $\beta$  - thalassémie sont plus rares [30].

#### **a. Forme homozygote ou thalassémie majeure :**

- La  $\beta$  -thalassémie homozygote majeure ou anémie de Cooley ( $\beta^\circ$  thal) où le patient présente une anémie hémolytique, pouvant se compliquer de lithiase biliaire, des déformations morphologiques, une hypertrophie de la lignée érythroblastiques, une splénomégalie, une hépatomégalie et une surcharge en fer [32]. Les cellules érythropoïétiques médullaires ne subissent pas après la naissance la répression au niveau du gène  $\gamma$  et synthétisent l'hémoglobine F ( $\alpha 2\gamma 2$ ), la synthèse d'HbA2 étant possible ( $\alpha 2\delta 2$ ) [33].

#### **b. Forme hétérozygote :**

- Les sujets porteurs d'une  $\beta$ -thalassémie hétérozygote sont bien-portants. Ils ne sont pas anémiques ; exceptionnellement, une splénomégalie de petite taille peut être palpée sous le grill costal. Biologiquement, le taux d'hémoglobine est normal ou discrètement diminué, le taux des réticulocytes est normal ou élevé [34].

- Les deux signes biologiques caractéristiques sont la **microcytose** avec une **élévation de l'hémoglobine A (> 3,5%)**. Ce dernier signe peut être masqué par une carence en fer, c'est pourquoi, en pratique, on peut être amené à faire un contrôle biologique après un traitement martial de quelques semaines, si le fer sérique est bas au premier examen [35].

#### **c. Cas particulier à rattacher aux $\beta$ -thalassémies :**

- La forme la plus habituelle est la bêta thalasso-drépanocytose qui présente un tableau clinique et hématologique très semblable à celui d'une drépanocytose homozygote. L'étude de l'hémoglobine décèle un fort pourcentage de fraction S associé à un certain pourcentage d'hémoglobine F et à une augmentation de l'hémoglobine A2 et l'absence (S  $\beta^{\circ}$ Thal) ou la présence (S  $\beta$  +Thal) d'hémoglobine A [36].

### **2.2. Les $\alpha$ -thalassémie :**

- Elles sont le plus souvent la conséquence de la délétion d'un ou plusieurs gènes  $\alpha$ . 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 [37].

#### **a. Formes homozygotes : l'anasarque fœtal ou hydrosfetalis :**

- C'est le syndrome le plus grave, relativement fréquent dans le Sud-est Asiatique .Il induit la mort in utero ou très précocement après la naissance .Cette forme correspond à la délétion des quatre gènes  $\alpha$  et donc à un déficit total en chaîne  $\alpha$ , de génotype  $\alpha^{\circ}$  thal homozygote (-- /--). 80 à 90% de l'hémoglobine détectée est l'hémoglobine Bart's embryonnaire ( $\gamma_4$ ) et l'hémoglobine H ( $\beta_4$ ) .Il peut même apparaître de l'hémoglobine Portland ( $\zeta_2 \gamma_2$ ), les hémoglobines A et F étant absentes [31].

#### **b. Formes hétérozygotes :**

- L'hémoglobinosose H : l'inactivation de trois gènes  $\alpha$  (--/ $\alpha$ ) est responsable d'une maladie à hémoglobine H. Les chaînes non- $\alpha$  en excès s'apparient sous forme d'Hb Bart's à la naissance puis de tétramères  $\beta_4$  ou hémoglobine H lorsque les chaînes  $\beta$  se substituent aux chaînes  $\gamma$ . L'expression clinique est variable allant d'une anémie hémolytique chronique modérée (pâleur, ictère, hépatosplénomégalie) dans la plupart des cas à une anémie plus sévère nécessitant des transfusions répétées [38].
- Les autres formes hétérozygotes sont la conséquence de la délétion :
  - de deux gènes, trait  $\alpha^{\circ}$ -thal ( $\alpha \alpha / --$ ) hétérozygote ou  $\alpha^+$ -thal ( $\alpha / \alpha^-$ ) homozygote, thalassémie mineure asymptotique (Afrique noire). Dans la plus part des cas, il

est détecté une diminution de l'HbA<sub>2</sub>, et la présence d'une petite quantité d'hémoglobine Bart's à la naissance.

- ou d'un gène : trait  $\alpha^+$ -thal hétérozygote, sans manifestations clinicobiologiques (Afrique noire, Méditerranée, Asie) [31].

### **3 .La persistance héréditaire de l'hémoglobine fœtale PHHF :**

- Ce terme désigne un groupe d'affections caractérisées chez l'homozygote par la production exclusive d'hémoglobine F, sans aucune conséquence clinique, ni hématologique sérieuse. La synthèse des chaînes  $\beta$  et  $\delta$  est diminuée à des degrés variables. Cependant la synthèse en compensation de chaîne  $\gamma$  est suffisante. Plusieurs formes sont décrites en fonction de degré de dépression de la synthèse de la chaîne  $\beta$  et  $\delta$  et du taux d'hémoglobine F [33].

## **C. Physiopathologie :**

### **1. Physiopathologie de la drépanocytose :**

- La mutation de la chaîne  $\beta$  de globine ( $\beta^6\text{val}$ ) est la cause de la drépanocytose. Les molécules d'hémoglobine S (HbS) diffèrent de l'hémoglobine A normale (HbA) par une nouvelle propriété, celle de former des polymères quand elles sont désoxygénées, ce qui induit la falciformation [39]. La falciformation et la polymérisation de l'HbS sont réversibles lors de la réoxygénation, les hématies reprenant une forme normale [40].
- La polymérisation de l'hémoglobine S induit une déshydratation cellulaire par perte d'ions et d'eau. Elle augmente ainsi la densité cellulaire, la concentration de l'Hb et accélère la formation des polymères en cas de désoxygénation des globules rouges drépanocytaires [41].
- Les études de la physiopathologie ont montré que les globules rouges denses et déshydratés jouent un rôle central dans les manifestations aiguës et chroniques de la maladie drépanocytaires basées sur les vaso-occlusions et la réduction du flux sanguin dans les vaisseaux, conséquence de la falciformation dans les petits vaisseaux [42].
- Ceci contribue à des événements vaso-occlusifs additionnels et à la destruction des globules rouges dans la circulation.

### **2. Physiopathologie des thalassémies:**

- Les syndromes thalassémiques regroupent des anomalies quantitatives plus ou moins sévères de la synthèse des chaînes de globine. Ils prédominent dans le Bassin

méditerranéen et en Asie, où leur fréquence les met au premier rang mondial des maladies monogéniques [43].

- Leur transmission est le plus souvent de type autosomique récessif. Selon la chaîne de globine insuffisamment synthétisée, on distingue les  $\alpha$  et  $\beta$ -thalassémies. Les syndromes thalassémiques sont la conséquence du déséquilibre de synthèse entre les chaînes  $\alpha$  et non  $\alpha$  : une  $\alpha$ -thalassémie est caractérisée par un rapport  $\alpha$ /non  $\alpha$  inférieur à 1, une  $\beta$ -thalassémie par un rapport  $\alpha$ /non  $\alpha$  supérieur à 1.
- Dans les formes symptomatiques de thalassémie, l'excès relatif de chaînes « célibataires » forme des polymères peu solubles dans l'érythroblaste, responsables d'une érythropoïèse inefficace [44]. Il en résulte une hypersécrétion d'érythropoïétine qui stimule l'érythropoïèse et suscite une hyperplasie avec expansion érythroblastique caractéristique des thalassémies. L'anémie est la résultante de deux mécanismes : une dysérythropoïèse et une hyperhémolyse.
- L'importance de ces manifestations est très variable suivant les patients, conséquence tant de l'anémie chronique (pâleur, asthénie) que de l'hyperplasie érythroïde compensatrice (hépatosplénomégalie, déformations osseuses...). Les transfusions peuvent donc avoir deux objectifs, corriger l'anémie et réduire l'érythropoïèse inefficace [45].

### **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. 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 [46].

• **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 [47].

## 2. 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 [48].
- 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.

### **3. 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 [49].

## **IV. 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'héogramme (anémie, microcytose, pseudopolyglobulie) et/ou du frottis sanguin (hématies cibles, 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 » 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 [50, 51, 52].

## **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. 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 [53].

### **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 [53].

### **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  $\alpha$ -Thalassémies.[53]

## **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 :**

- 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.
- Ces valeurs permettent de déterminer s'il y a une anémie et de caractériser sa nature.

### **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) [53].

### **3. 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 [53].

## Matériel et Méthodes

### **I. Matériel et patients :**

#### **1. Patients :**

- Chaque étude est réalisée sur des sujets répertoriés dans les services cliniques de deux sexes et de différents âges.

#### **2. Échantillons à analyser :**

##### **a. Prélèvement et conservation des échantillons :**

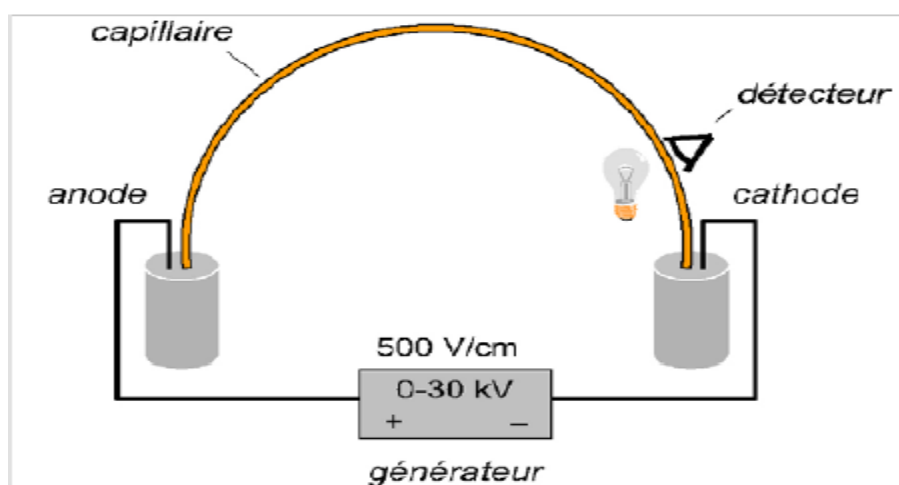
- L'analyse se fait sur des échantillons de sang total frais prélevés sur anticoagulant contenant de l'EDTA.
- Les échantillons de sang total peuvent être conservés au maximum 7 jours entre 2 et 8°C, puisqu'au-delà de ce délai, la dégradation des hémoglobines dans l'échantillon risque d'être trop importante.
- Si l'analyse ne peut pas être réalisée dans un délai de 7 jours, les échantillons de culots globulaires lavés doivent alors être conservés rapidement, au maximum dans les 8 heures suivant le prélèvement, à - 80°C. Dans ces conditions, les échantillons congelés sont stables au maximum 3 mois.

### **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. L'électrophorèse capillaire est en première intention, et 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).
- Historiquement, **l'électrophorèse capillaire** 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.

## 1. Principe de l'électrophorèse capillaire:

- 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 .
- 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 plongé 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 côté cathode (**Figure 4**).

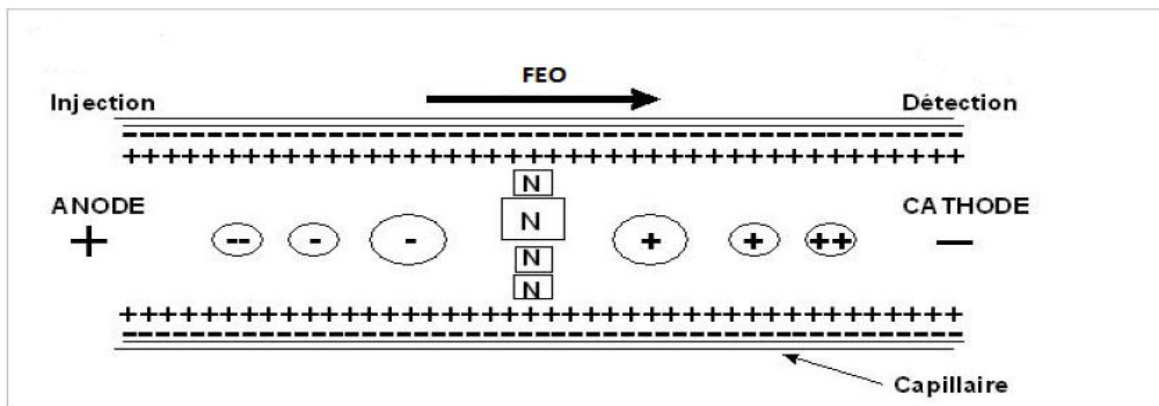


**Figure 4.** Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse capillaire [54].

- 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 5**).



**Figure 5.** Principe de l'électrophorèse capillaire, caractérisée par la présence du flux électro-osmotique à l'interface entre la paroi du capillaire et le tampon [55].

- Les capillaires sont lavés avant chaque analyse par une solution de lavage, puis par le tampon d'analyse. Avec le tampon utilisé à pH basique, l'ordre de migration des principales hémoglobines normales et anormales est le suivant, de la cathode vers l'anode :  $\delta A^2$  (variant de A2), C, A2/O-Arab, E, S, D, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore et H. Il est à noter que l'anhydrase carbonique n'est pas détectée sur le profil électrophorétique des hémoglobines en électrophorèse capillaire, ce qui permet d'identifier certains variants de l'hémoglobine A2 dans sa zone de migration.

## **2. Fonctionnement du système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING :**

- Le kit CAPILLARYS HEMOGLOBINE permet la séparation en milieu basique (pH 9, 4) des hémoglobines normales du sang humain (A, F et A2) et à la détection des principales hémoglobines anormales (notamment S, C, E et D) par électrophorèse capillaire dans le système automatique CAPILLARYS (**Figure 6**).



**Figure 6. Système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING (sebia)**

- Le système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING comprend une série de capillaires en parallèle, permettant 8 analyses simultanées à partir du sang total. Sur ce système, l'injection dans les capillaires de l'échantillon dilué dans la solution hémolysante est effectuée à l'anode par aspiration.
- Les kits CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E) fournissent différents réactifs nécessaires à l'analyse :
  - tampon basique (pH 9,4)
  - solution hémolysante, pour dilution et hémolyse des hématies
  - solution de lavage
  - cupules réactif
  - filtres, pour filtration du tampon, de la solution de lavage et de l'eau distillée ou déminéralisée
  - boîtes pour cupules usagées, permettant la récupération automatique des cupules réactif usagées
  - étiquettes code-barres pour identification de la solution hémolysante.
- Bien que non fourni dans le kit CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E), un contrôle Hb A2 Normal est également nécessaire. Il est obtenu à partir d'un pool de sangs humains normaux et est conservé sous forme lyophilisée. Ce réactif est utilisé comme contrôle de migration avant toute nouvelle série d'analyses. Le contrôle Hb A2 Normal sert aussi de contrôle de qualité de la méthode de dosage de l'hémoglobine humaine A2. Il est pour cela recommandé d'inclure ce contrôle dans chaque série d'analyses.

**✚ Analyse d'échantillons sans Hb A ou Hb A2 (ces échantillons peuvent être quantifiés mais pas caractérisés par zone d'identification) :**

- Pour une identification des fractions de l'hémoglobine présentes dans un échantillon sans hémoglobine A ou hémoglobine A2, il est recommandé de préparer l'échantillon selon la méthode suivante :
  - ❖ Le tube de sang total est agité au vortex pendant 5 secondes. Dans un tube conique pour contrôle, un volume (50 µL) de sang total à analyser est mélangé avec un volume (50 µL) de Contrôle Hb A2 Normal. Le tube est ensuite bouché et agité au vortex pendant 5 secondes. Il est placé sur un support de maintien des tubes de contrôles sur un portoir de CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. Le portoir est introduit dans le système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING et l'analyse est effectuée selon la technique habituelle.
- Les résultats obtenus sont alors automatiquement pris en compte par le logiciel pour le traitement des données.

**✚ Analyse d'échantillons conservés à – 80 °C:**

- Pour analyser un échantillon conservé à – 80 °C, il sera préparé selon la méthode suivante :
  - ❖ Le tube de globules rouges décongelé est agité au vortex pendant 5 secondes. Dans un microtube, un volume (50 µL) de globules rouges est mélangé avec 8 volumes (400 µL) de solution hémolysante CAPILLARYS HEMOGLOBIN(E). Une agitation au vortex pendant 5 secondes est ensuite réalisée. 100 µL de l'hémolysat préparé sont déposés dans les puits d'une barrette de dilution verte neuve qui sera ensuite placée sur le portoir No. F0 de CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. Le portoir est introduit dans le système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING.
- Les résultats obtenus sont alors automatiquement pris en compte par le logiciel pour le traitement des données.

**✚ Analyse d'échantillons dont le volume est inférieur à 1 ml :**

- ❖ Le tube de sang total est agité au vortex pendant 5 secondes. 100 µL de sang total à analyser sont déposés dans un tube conique pour contrôle qui sera ensuite bouché. Le tube est placé sur un support de maintien des tubes de contrôles sur un portoir de

CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. Le portoir est introduit dans le système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING au début d'une série d'analyses. L'analyse de l'échantillon est effectuée selon la technique habituelle.

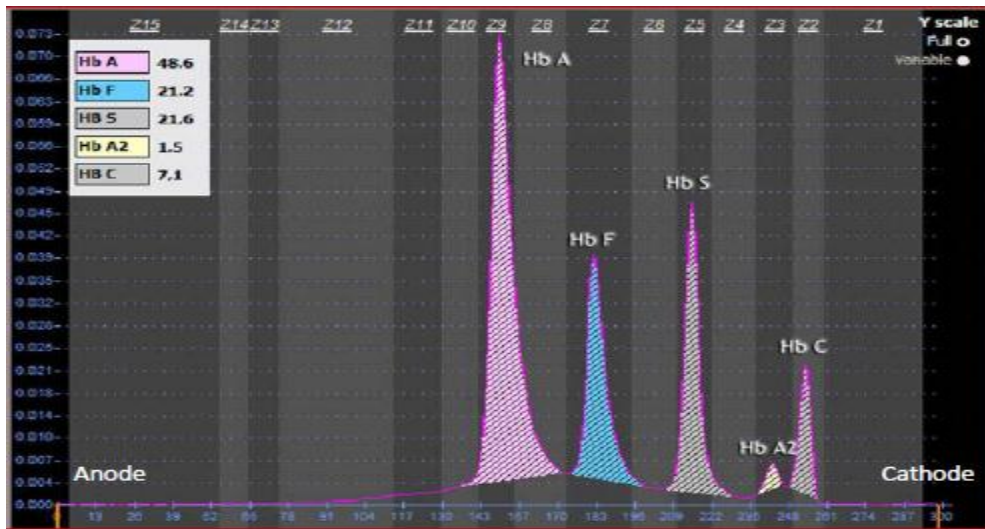
### **3. Technique analytique :**

- Le système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING est un instrument multiparamétrique automatique qui assure l'analyse des hémoglobines sur 8 capillaires en parallèle selon le protocole suivant:
  - ❖ L'analyse commence par la lecture des codes-barres des tubes primaires (jusqu'à 8) et du portoir. Les échantillons doivent être agités avant analyse. L'hémolyse et la dilution des échantillons sont réalisées à partir des tubes primaires après lavage des capillaires. Les échantillons hémolysés sont injectés. La séparation et la détection directe des hémoglobines se fait dans les capillaires.
- Les étapes manuelles sont les suivantes :
  - ❖ Les tubes primaires (avec bouchons) sont mis en place dans les portoirs en position 1 à 8, une barrette neuve est également mise en place sur le portoir. Ce dernier est introduit dans le système CAPILLARYS 2 FLEX-PIERCING. Les portoirs sont récupérés après analyse.
- Treize portoirs peuvent être introduits successivement et de nouveaux portoirs pourront être introduits en continu au fur et à mesure des analyses.

### **4. Profils électrophorétiques:**

- Dès la fin de l'analyse, la quantification relative des fractions est automatiquement effectuée et les profils peuvent être interprétés. Les pics d'hémoglobine A (Hb A), F (Hb F) et A2 (Hb A2) sont identifiés de façon automatique et le pic d'Hb A est positionné au centre de la fenêtre de reprise.
- Les profils électrophorétiques sont analysés visuellement pour détecter les anomalies.
- Les positions potentielles des différents variants de l'hémoglobine (identifiées par les zones Z1 à Z15) sont repérées à l'écran et sur le compte-rendu résultats.[Figure7]

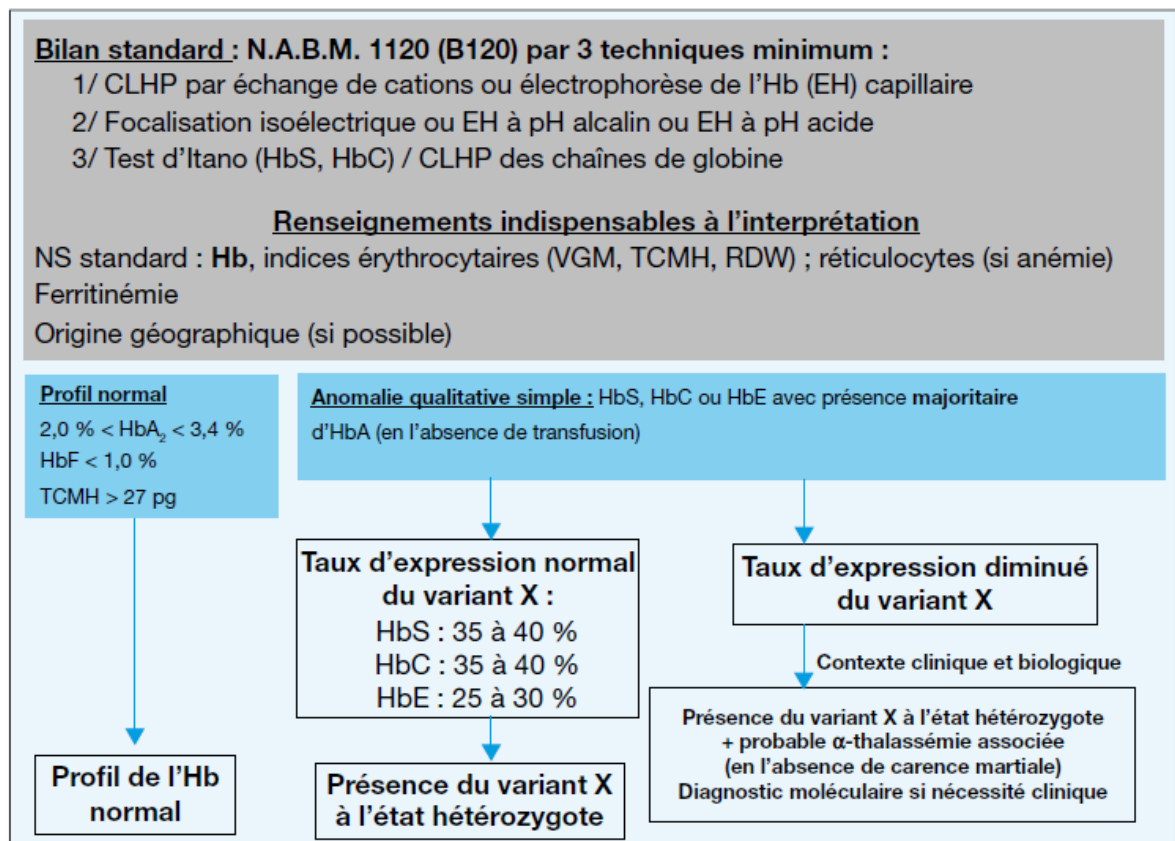




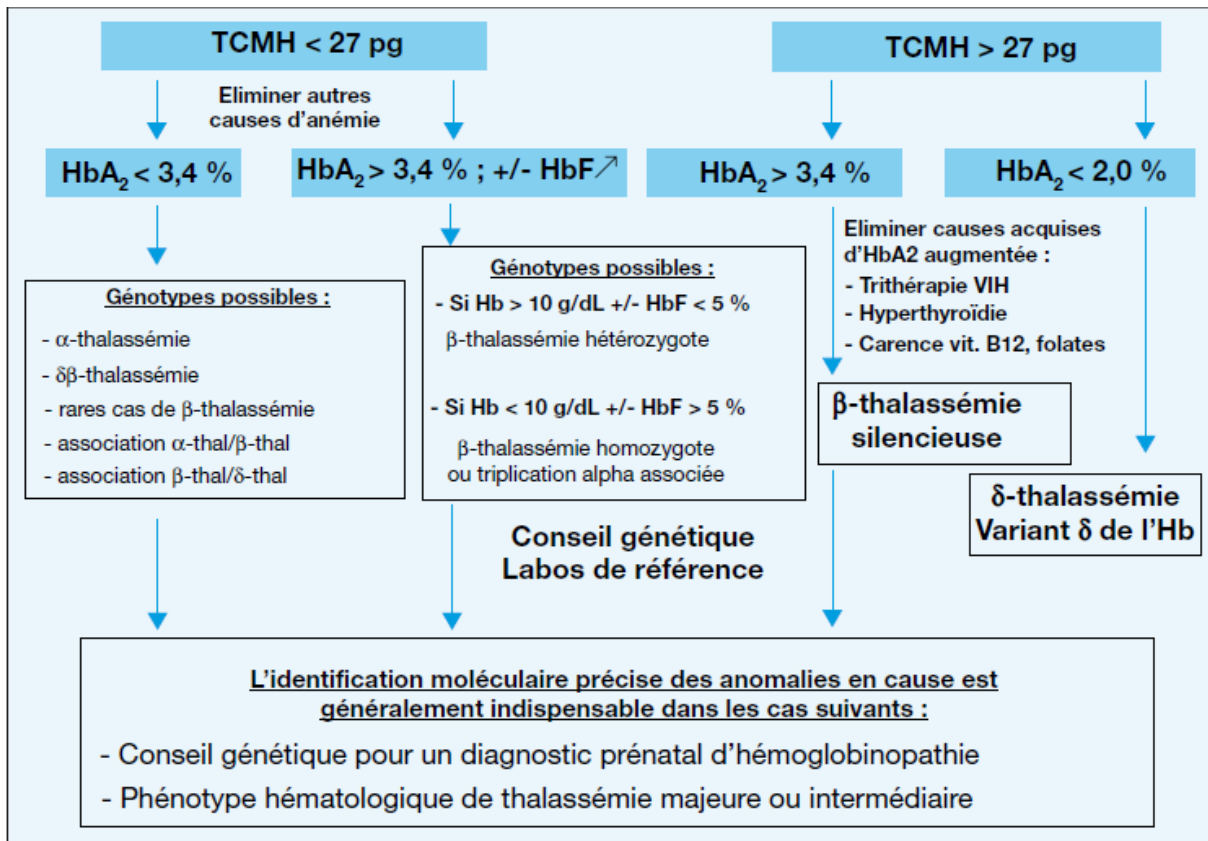
**Figure 7.** Profil électrophorétique visualisé sur le logiciel Phoresis automatique.

## Résultats et Discussion

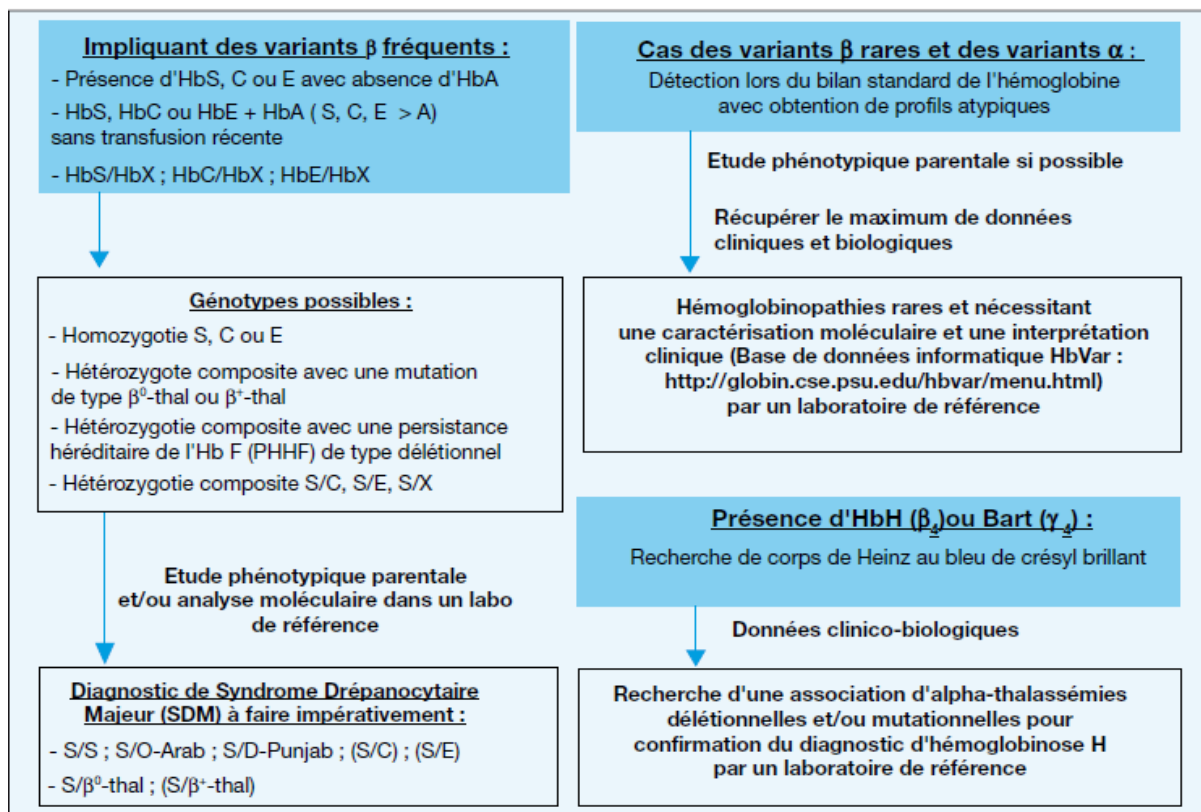
- Comme il a été mentionné précédemment, avant qu'un porteur de HbP ne soit dépisté au laboratoire, le médecin doit avoir demandé une analyse de sang. L'indication de l'analyse sanguine est souvent clinique et, hormis les considérations ethniques, les médecins ne cherchent pas plus loin qu'une anémie.
- Les figures [8, 9,10] illustrent les différents arbres décisionnels appliqués à l'interprétation des résultats de l'étude phénotypique de l'Hb.



**Figure 8 :** Réalisation et interprétation des cas simples d'HbP [56, 57].



**Figure 9:** Anomalies quantitatives de l'Hb A2 (Sans carence martiale) [56, 57].

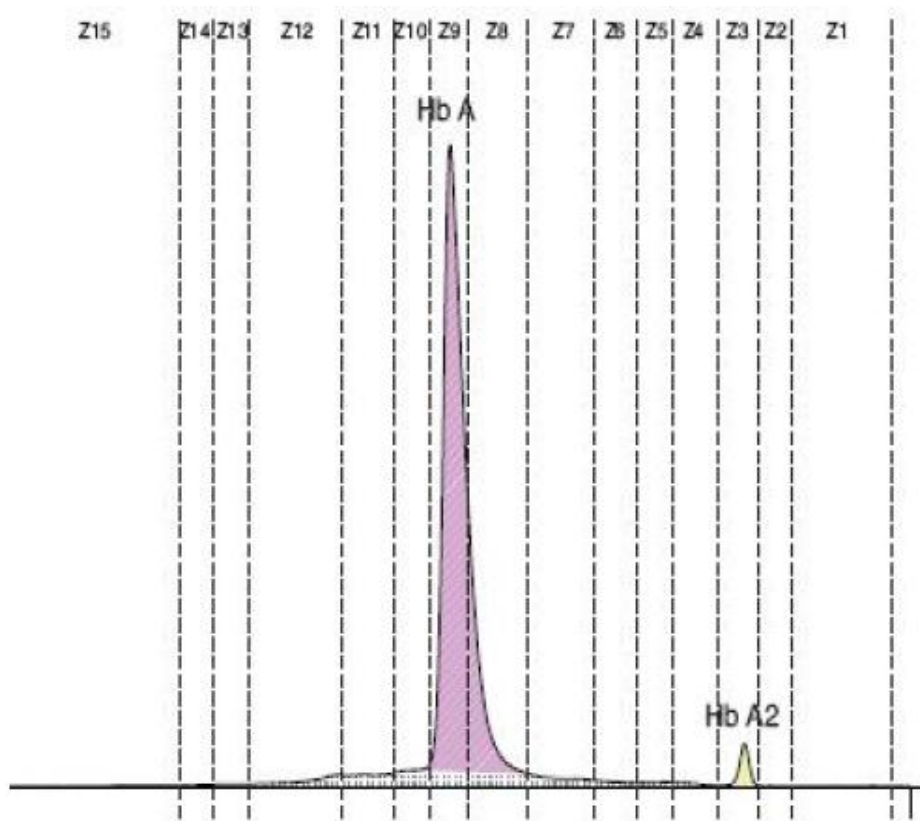


**Figure 10:** Anomalies qualitatives combinées ou rares de l'Hb [56,57].

## I. Etude des profils électrophorétiques des malades selon les différents types des hémoglobinopathies obtenus avec le Kit CAPILLARYS HEMOGLOBINE :

- Les résultats traités si-dessous sont relatifs aux cas des hémoglobinopathies les plus fréquents que sont : les  $\beta$ -thalassémies hétérozygotes (A/F) , les  $\beta$ - thalassémies homozygotes (F/F), les drépanocytoses homozygotes (S/S) ,les drépanocytoses hétérozygotes (A/S), les hétérozygotes A/C et les doubles hétérozygotes S/C.
- La détection directe sur le capillaire à 415 nm permet de définir les concentrations relatives (pourcentages) de chaque fraction.
  - Les différentes zones de migration de variantes (identifiées de Z1 à Z15) sont repérées sur l'écran et sur le compte rendu des résultats.
  - Au cours de la détection de ces différentes hémoglobinopathies, le système CAPILLARYS HEMOGLOBINE représente des images électrophorétiques différentes selon les anomalies hémoglobiniques détectées.

### 1. Bilan normal:

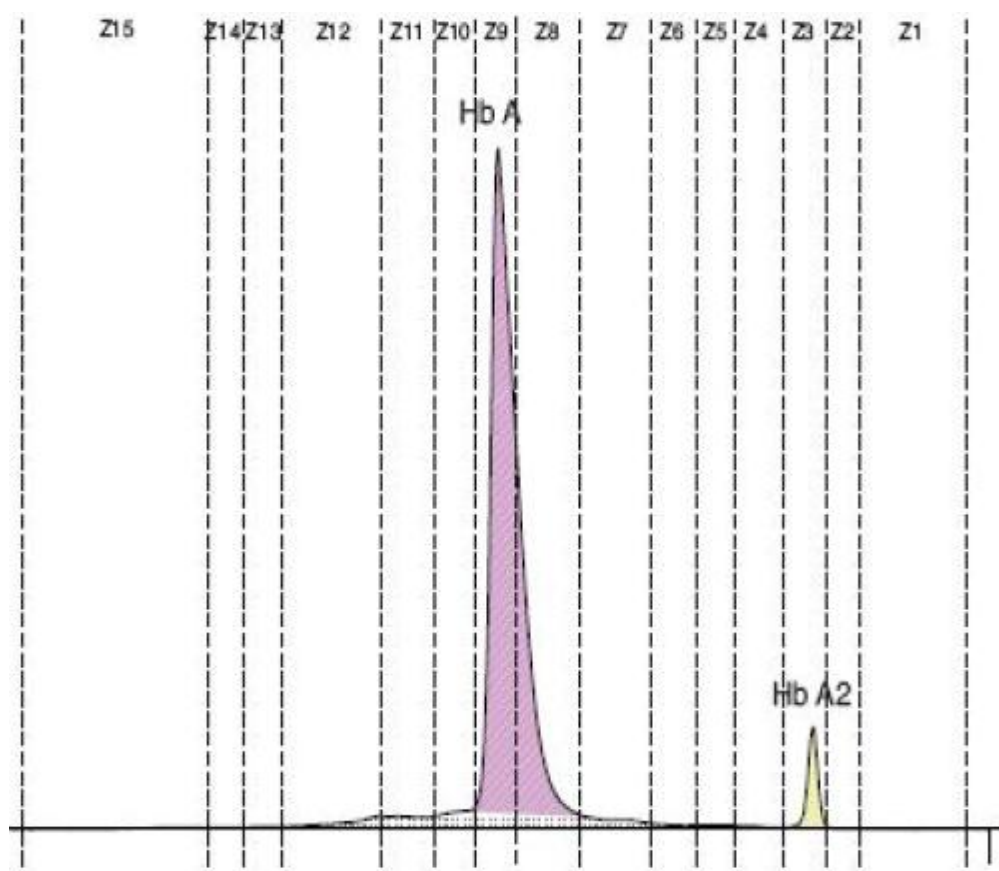


**Figure 11.** Profil électrophorétique d'un sang d'un sujet normal

**Hb A:** 97,2%;  
**Hb A2:** 2,8%  
**Hb:** 10,7g/dl;  
**VGM:** 73,8fl;  
**TCMH:** 27pg;  
Pas de carence martiale

→ Les taux physiologiques d'HbA2 (2,0 à 3,4 %) ,d'HbA (96, 8 à 97, 8 % ) et d'HbF (< 1 %) sont observés . Ce profil hémoglobinique est normal .

## 2. Les $\beta$ - thalassémies hétérozygotes (A/F) :



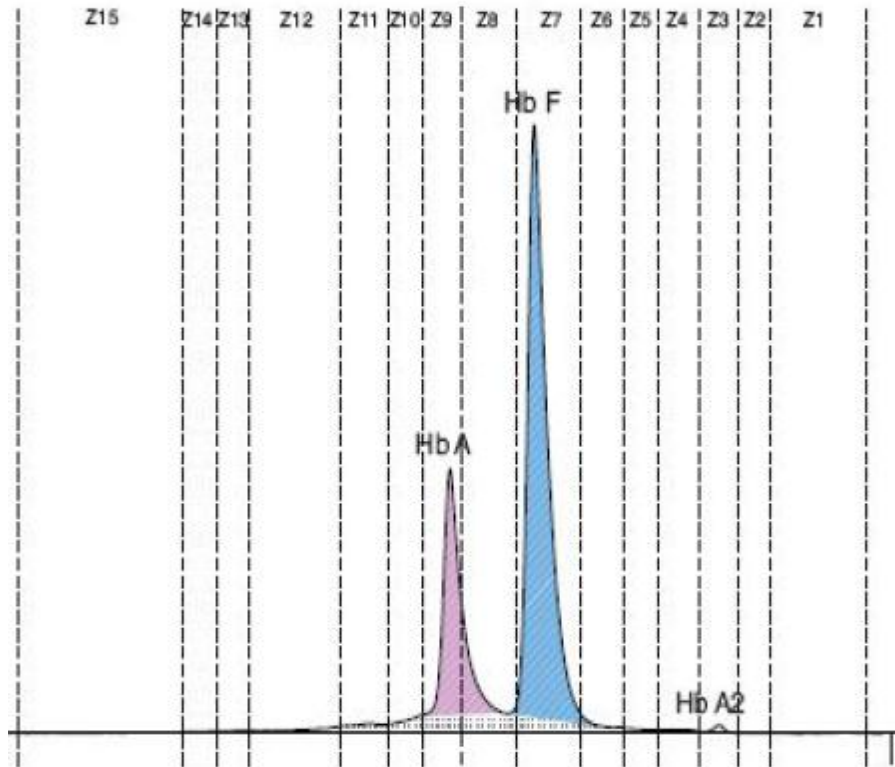
**Figure 12.** Profil électrophorétique d'un sang  $\beta$ - thalassémique hétérozygote

**Hb A:** 96,1%  
**Hb A2:** 3,9%  
**Hb:** 11,0g/dl  
**VGM:** 68,8fl  
**TCMH:** 21,7pg

→ La présence d'une hypochromie (TCMH<27pg) avec une augmentation du taux d'HbA2 (> 3,4 %) chez ce patient est généralement pathognomonique d'une  $\beta$ -thalassémie. le taux

d'Hb est supérieur à 10 g/dL, il s'agit très certainement d'une mutation à l'état hétérozygote correspondant à un trait  $\beta$ -thalassémique.

### 3. Les $\beta$ -thalassémies homozygotes :

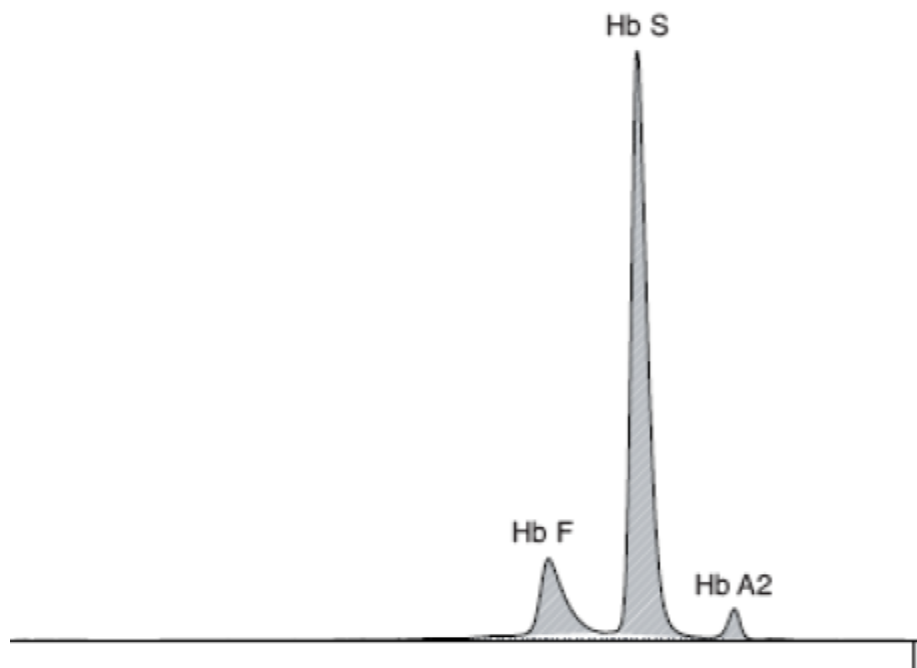


**Figure 13.** Profil électrophorétique d'une  $\beta$ -thalassémie homozygote

**Hb A = 35 %**  
**Hb F = 75%**  
**Hb A2 = 3,8%**  
**TCMH= 20,7pg**  
**Hb: 7,2g/dl**  
**VGM: 63,8fl**

- La coexistence d'un taux d'Hb F entre 50 et 80 % et d'une anémie microcytaire hypochrome chez ce patient évoque une  $\beta$ -thalassémie majeure. En effet, il existe une répartition hétérogène de l'Hb F dans les hématies : une population d'hématies contient de l'Hb F, l'autre non.

#### 4. les drépanocytes homozygotes :



**Figure 14:** Profile électrophorétique d'un sang avec variant homozygote HbS

**Hb S = 80%**

**Hb F = 11,2%**

**Hb A2 = 3 %**

**Hb: 8g/dl**

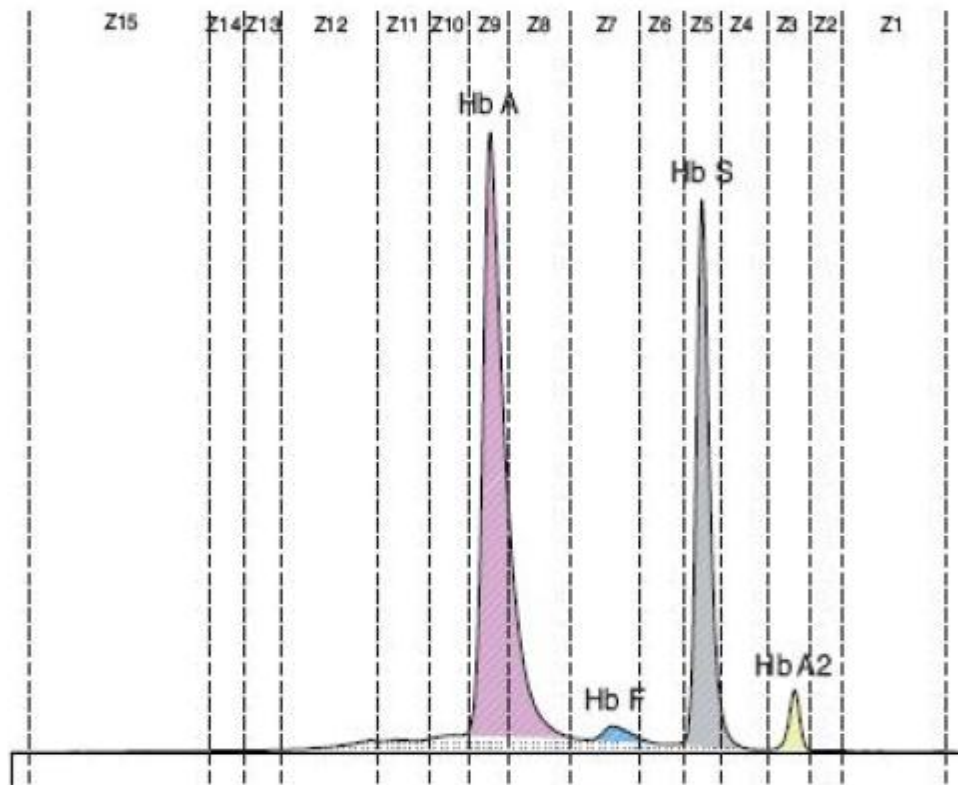
**VGM:95,6fl**

**TCMH: 32,3pg**

- Chez ce patient, on retrouve majoritairement de l'HbS sans HbA associée, il est très vraisemblablement atteint d'un syndrome drépanocytaire majeur (SDM).
- Comme il y a absence d'Hb A, deux cas peuvent se présenter : soit l'Hb S est nettement majoritaire et elle est en général associée à une bande minoritaire d'Hb F, soit l'Hb S est associée à une autre hémoglobine anormale. Dans le premier cas de figure, un taux d'Hb S en moyenne entre 77 et 98 % permet d'évoquer une drépanocytose homozygote SS associée ou non à une  $\alpha$ -thalassémie, ou un syndrome drépanocytaire S $\beta$  ; 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  $\alpha^-/\alpha^-$ ).



## 5. Les drépanocytoses hétérozygotes :



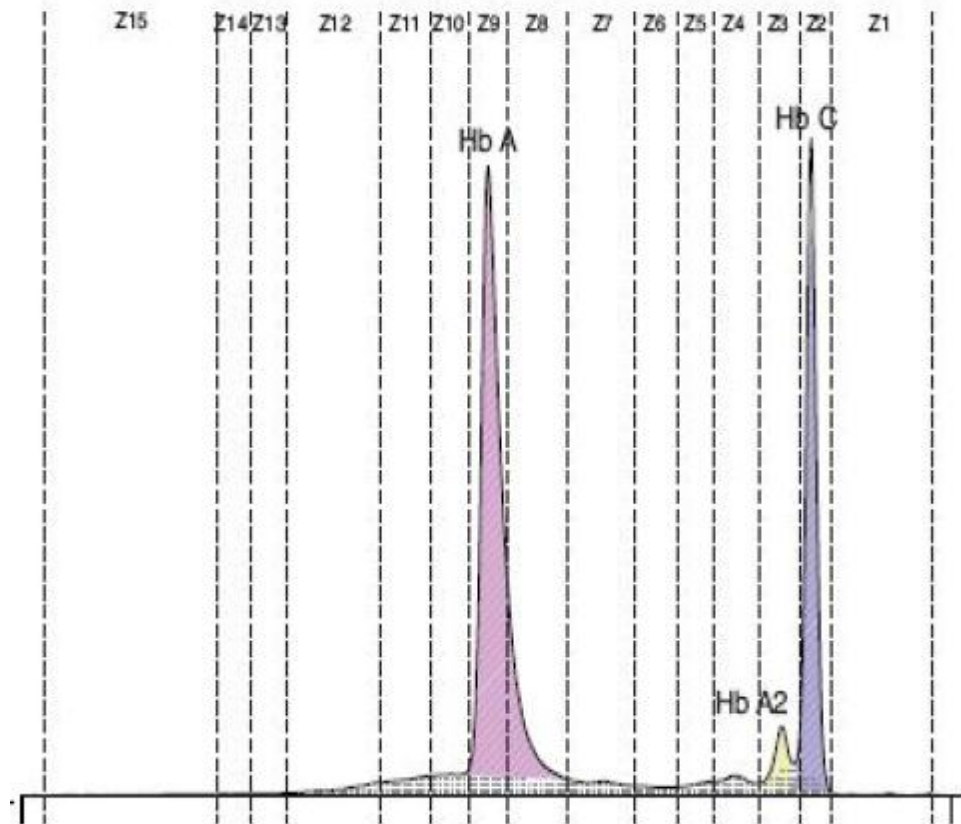
**Figure 15:** Profil électrophorétique d'un sang avec variant hétérozygote HbS

**Hb S:** 33,6%  
**Hb A:** 61,6%  
**Hb F:** 1,8%  
**Hb A2:** 3%  
**Hb:** 11,6g/dl  
**VGM:** 68,1fl  
**TCMH:** 23,3pg  
**Rét:** 57200/ $\mu$ l  
**ferritine:** 7,9ng/ml

- Le patient suivant représente une anémie hypochrome microcytaire.
- Ce profil doit être distingué de celui d'un sujet drépanocytaire homozygote transfusé, où l'Hb A risque de fausser l'interprétation des résultats.
- Le Taux d'Hb S de 33,6% (de 30% à 35%) fait penser à une  $\alpha$ -thalassémie associée avec délétion d'un seul gène  $\alpha$ .



## 6. L' hémoglobinosse C (hétérozygote):



**Figure 16:** Profile électrophorétique d'un sang avec hémoglobinosse C hétérozygote

**Hb C:** 31%

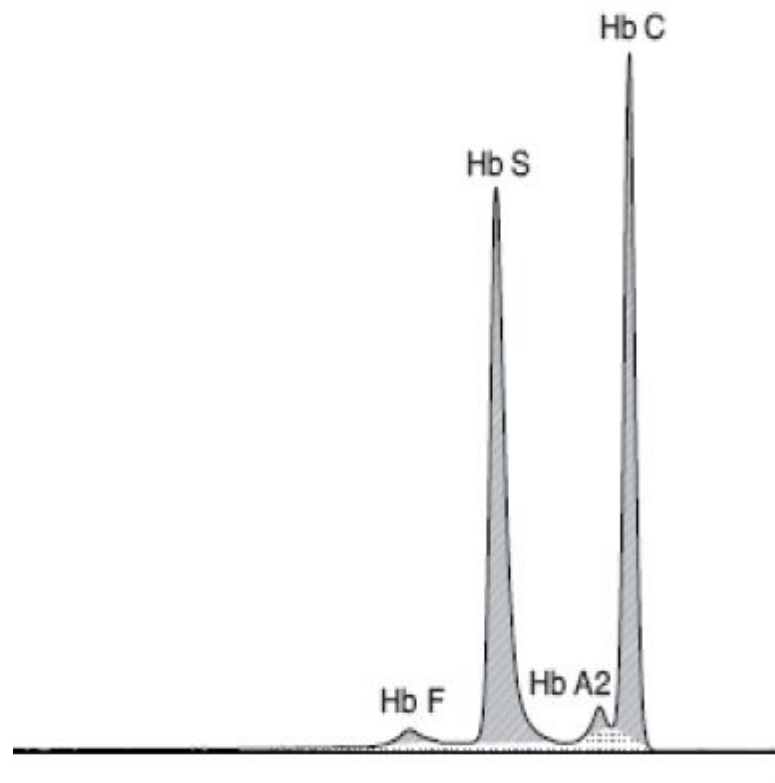
**Hb A:** 66,5%

**Hb A2:** 2,5%

→ Le résultat d'électrophorèse capillaire de ce patient est en faveur d'une hémoglobinosse C hétérozygote.

→ Le taux d'Hb C < 35% fait penser à une hémoglobinosse C associée à une  $\alpha$ -thalassémie.

## 7. Les doubles hétérozygotes (S/C) :



**Figure 17:** Profile électrophorétique d'un sang avec double hétérozygote S/C

**Hb C** = 42, 1 %

**Hb S** = 54, 1 %

**Hb F** = 1, 5 %

**Hb A2** = 2, 3 %

→ Les taux d'HbC et d'Hb S avoisinent les 40% à 50% , le taux d'HbF étant en dessous de 10% ; ces résultats sont en faveur d'une hétérozygotie composite S/C.

## Discussion des résultats

- La prédominance de l'hémoglobinoase S et de la  $\beta$ -thalassémie a été rapportée dans des séries, notamment algérienne et indienne [58, 59], ainsi que dans la littérature [60, 61,62].
- Selon le sexe, les cas répertoriés dans plusieurs études étaient répartis de façon égale entre les deux sexes (soit un sex-ratio de 1). Ce résultat est cohérent avec les différents travaux de la littérature [58, 59,63]. D'ailleurs, la transmission des hémoglobinopathies prédit une fréquence égale parmi les deux sexes.
- L'étude prospective réalisée à Orissa en Inde [59] affirme que l'âge au moment du diagnostic des cas d'HbP varie entre 2 et 65 ans. Le maximum de fréquence observé dans les tranches d'âges comprises entre 11 et 20 ans, 41 et 50 ans. Le faible % noté chez les patients de moins de 10 ans, par comparaison avec d'autres études peut s'expliquer par le mode de recrutement des malades, les circonstances de diagnostic voire l'effectif variable.
- Dans les cohortes étudiées, le diagnostic de l'HbP a été porté soit de façon fortuite, dans le cadre de la prise en charge d'une autre pathologie ou sur la base de l'observation d'un tableau clinique ou biologique évocateur. Il n'a pas été procédé à un dépistage systématique de ce type d'affection, dans une population cible.
- Selon le motif d'hospitalisation, les principaux motifs d'hospitalisation qui constituent des signes révélateurs des HbP sont dominés par les anomalies biologiques, suivis dans l'ordre décroissant de leur fréquence des signes cliniques notamment la splénomégalie, le syndrome anémique et les douleurs osseuses.

## 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'hémogramme, 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 comme la chromatographie liquide à haute performance 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.

## Liste des références

- [1]. **Hamane I.T.** Electrophorèse de l'hémoglobine chez 616 patients vus au CNTS de Bamako ; **2006**. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie;83 p.
- [2]. **Pr Leblouch P, Cavasana Calvo M, Gluckman E.** Succès d'un essai clinique en thérapie génique pour la  $\beta$ -thalassémie; **2010** .Revue nature.
- [3]. **Slaheddine F.**Les hémoglobinopathies en Tunisie ; **2006** : Revue actualisée des données épidémiologiques et moléculaires ; 84(11) :687-696.
- [4]. **Schmidt M.** Complémentarité des techniques d'électrophorèse capillaire et de CLHP dans le diagnostic des hémoglobinopathies ; **2012**. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie ; 115 p.
- [5]. <http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>
- [6]. **Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou C-N, Bak R.** Comparison of Sebia Capillary Electrophoresis With the Primus High-Pressure Liquid Chromatography in the Evaluation of Hemoglobinopathies; 2008. Am J Clin Pathol 130: 824–831.
- [7]. **Guis L, Chaumier A, Gall VL, Havrez S.** Intégration du Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) dans un laboratoire de biologie médicale spécialisée; **2013**. Rev Francoph Lab 2013:47–56.
- [8]. **Aguilar-Martinez P, Badens C, Bonello-Palot N, Cadet E, Couque N, Ducrocq R, Elion J, Francina A, Joly P, Pissard S, Rochette J,** Réseau DHOS Pathologie héréditaire de l'érythrocyte. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies ; **2010**. Ann Biol Clin (Paris) 68: 455–464.
- [9]. Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies; **2010**.OptionBio ; 20p.
- [10]. **Wajcman H. In** : Hémoglobines: structure et fonction; **2005**. EMC-Hématologie. 2(3): p. 145-157.
- [11]. **Labie D, Elion J.** Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine ; **2005**. EMC-Hématologie; 2: 220–239.
- [12]. **Gulbis B, Cotton F, Vertongen F.** Hémoglobines anormales rares ; **2004**. EMC-Hématologie: 106–114.

- [13]. **Barbara J B. In:** Haemoglobinopathy diagnosis; **2006**. 2nd edition.Oxford: Blackwell Publishing, p. 313.
- [14]. **Kaplan J.C, D.M. In :** Le modèle des maladies de l'hémoglobine ; **2007**. Biologie moléculaire et médecine 3ème édition. p. 379 - 393.
- [15]. **Harju S., McQueen K.J., Peterson K.R. In:** Chromatin structure and control of  $\alpha$ -like globin gene switching; **2002**. Experimental Biology and Medicine,. 227(9): p. 683-700.
- [16]. **Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. In:** On the nature of allosteric transitions: a plausible model; **1965**. Journal of molecular biology,. 12(1): p. 88-118.
- [17]. **Jeanne L. In :** Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies ; **2010**. Option/Bio. 21(434): p. 17-20.
- [18]. **Hessissen L, Harif M.** Quelles nouveautés dans la thalassémie ? **2010**. Annales de Médecine et de Thérapeutique ; 2(1) : 14 – 24.
- [19]. **Model B, Darlison, M.**Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators; **June 2008** .bulletin of the world health organization, 86; 480-487.
- [20]. **Hessissen, M.harif :** quelles nouveautés pour la thalassémie ; **Janvier 2010**, AMETHER ; volume2, n° :14-24
- [21]. **M.Agouzal, A.Quyou, M.Khattab:** étude de la prévalence de l'enfant atteint de thalassémie au nord ouest du Maroc; **avril 2013** ;revue de médecine pratique//n°22.
- [22]. **Giordano P. In:** Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls; **2013**. International journal of laboratory hematology. 35(5): p. 465-479.
- [23]. **Girodon E; Ghanem N; Goossens M.** Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies; **1995**. JIFCC ; 7 : 54-61.
- [24]. **Diakite S.** Les mécanismes de protection de l'hémoglobine C contre les formes graves de al paludisme A. P falciparum : résultats d'études préliminaires in vitro ; **2005** 41 :8 -100.
- [25]. **Herrick JB .** Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia; **1910**. Arch Intern Med; 6: 517- 521.

[26]. **Mac Donald CB; Bauer PW; Cox LC,Mac; Mahon L.** Otologic findings in a pediatric cohort with sickle cell disease; **1999.** Int J Pediatr Otorhinolaryngology; 47 : 23-28.

**Tavin ME; Rubin JS; Camacho FJ.** Sudden sensorineural hearing loss in haemoglobin SC disease; **1993.** J Laryngol Otol ; 107: 831- 833.

[27]. **Whitehead RE; Mac Donald CB, Melhem ER; Mac Mahon L.** Spontaneous labyrinthine hemorrhage in sickle cell disease; **1998.** Am J Neuroradiol: 1437-1440.

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

[28]. **Stryer. L;** Biochimie (2003). 5 éd .Paris, Flammarion Médecine-Sciences.

[29]. **Cao A ; Galanello R ; Rosatelli MC.** Pathologie moléculaire et diagnostic de la beta-thalassémie intermédiaire; **1995.** Hématologie ; 4 : 289-94.

[30]. **Montalembert M.** Syndromes thalassémiques ; **2002.** Encycl Med Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier), Hématologie, 13-006-D17.

[31]. **Vanbourdolle ; M et collaborateurs .**Biochimie hématologie ; **2007;** 6-1116 pages.

[32]. **Hagege I; Becker A; Kerdaffrec T; Kanfer A; Girot R.** Long-term administration of high-dose deferoxamine 2 days per week in thalassemic patients; **2001.** Eur J Haematol; 67 : 230- 1

**Bradai M ; Abad MT ; Pissard S ; Lamraoui F ; Skopinski L ; Montalembert M.** Hydroxyurea can eliminate transfusion requirements in children with severe  $\beta$ -thalassemia; **2003.** Blood; 102: 1529-30.

[33]. **Girot R.** Thalassémies : physiopathologie et diagnostic ; **1994.** .Revue du praticien, 44 : 52- 28.

[34]. **Ragusa A ; Amata S, Lombardo T.** Asymptomatic and mild  $\beta$ -thalassemia in homozygotes and compound heterozygotes for the IVS2+1G>A mutation : role of the  $\beta$ -globin gene haplotype ; **2003.** Haematologica ; 88 : 1099-105.

[35]. **Bruneteau G; Fenelon G; Khalil A; Kanfer A; Girot R.** [Spinal cord compression secondary to extramedullary hematopoiesis in a patient with thalassemia]; **2000.** Rev Neurol (Paris) ; 156: 510-3.

- [36]. **Kafando E ; Savadogo LGB ; Ayéroué J et coll** . Les syndromes drépanocytaires majeurs : une enquête anonyme auprès du corps médical au Burkina-Faso ; **2008**. Med. Trop, 68, 241-246.
- [37]. **Higgs DR** . alpha-Thalassemia; **1993**. In: Higgs DR&Weatherall DJ. The haemoglobinopathies, Clinical Haematology. Bailliere's.
- [38]. **Weatherall DJ and Clegg JB**. The thalassemia syndromes; **1981**. Oxford. Blackwell Scientific.
- [39]. **Morris CR; Kato GJ; Poljakovic M** .Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease; **2005**. JAMA ; 294 : 81-90.
- [40]. **Ferster A ; Vermylen C; Cornu G; Buyse M; Corazza F; Devalck C; Fondu P; Toppet M; Sariban E**. Hydroxyurea for treatment of severe sickle cell anemia; **1996** : a pediatric clinical trial. Blood; 88: 1960-4.
- [41]. **Eaton WA ;Hofrichter J** . Sickle cell hemoglobin polymerization ; **1990**. AdvProteinChem; 40: 63-2791.
- Ballas SK; Smith ED**. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis **1992**. Blood ; 79 : 2154-63.
- [42]. **Steinberg MH**. Management of sickle cell disease; **1999**. N Engl J Med; 340: 1021-30. **Solovey AA; Solovey AN; Harkness J; Hebbel RP** . ; Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease; **2001**: a pilot study. Blood ; 97 : 1937-41.
- [43]. **Weatherall DJ ; Clegg JB**. Thalassemia – a global public health problem; **1996**. Nat Med; 2 : 847-9.
- [44]. **Friedman DF; Jawad AF; Martin MB; Horiuchi K; Mitchell CF; Cohen AR** ;Erythrocytapheresis to reduce iron loading in thalassemia; **2003**. Blood ; 102 : 121.
- [45]. **Badens C; North ML; Lena-Russo D**. Les  $\beta$ -thalassémies en France métropolitaine; **2003**. Presse Med; 32: 1016-21.
- [46]. **Galacteros F**. Drépanocytose ; **Février 2000**, Encyclopédie Orphanet.
- [47].**Vasseur C., Baudin-Creuzat V**. In : Rôle du chaperon moléculaire de l'alphahémoglobine dans la formation de l'hémoglobine et l'expression clinique de certaines hémoglobinopathies ; **2015**. Transfusion Clinique et Biologique. 22(1): p. 49-57.



- [48]. **Badens C., Thuret I., Lena-Russo.D. In** : Les syndromes thalassémiques ; **2000**. Revue Française des Laboratoires. 2000(324): p. 23-27.
- [49]. **Rose C., Bauters F., Galacteros F. In**: Hydroxyurea therapy in highly unstable hemoglobin carriers [letter] ; **1996**. Blood. 88(7): p. 2807-2808.
- [50]. **Jeanne L. In** : Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies ; **2010**. Option/Bio, 21(434): p. 17-20.
- [51]. **Bain B.J. In**: Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls; **2011**. Blood Reviews. 25(5): p. 205-213.
- [52]. **Bardakdjian-Michau J., al.** Bonnes pratiques de l'étude de l'hémoglobine ; **2003**. in Annales de Biologie Clinique.
- [53]. **North M.L., M. Piffaut C., Duwig I. In** : Hémoglobinopathies : actualisation du diagnostic biologique; **1995**. Revue Française des Laboratoires, (275): p. 107-116.
- [54]. **Cotton F, Vertongen F, Gulbis B.** Électrophorèse capillaire et hémoglobinopathies ; **2006**. Immuno-Anal Biol Spéc 21: 45–50.
- [55]. **Laboratoire suisse d'Analyse du Dopage CHUV Lausanne. L'électrophorèse capillaire. In** : Prestations de laboratoire - Appareils & technologies ; **02/05/2014**. [En ligne]. Disponible sur [http://www.doping.chuv.ch/lad\\_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations- laboratoire appareils/lad-prestations laboratoire-appareils-ec.htm](http://www.doping.chuv.ch/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations- laboratoire appareils/lad-prestations laboratoire-appareils-ec.htm)).
- [56]. **Aguilar-Martinez P, Badens C, Nathalie Bonello P, Cadet E, Couque N, Ducrocq R et al.** Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies ; **2010**. Ann Biol Clin ; 68 (4) : 455-64.
- [57]. **Vinatier I.** Recommandations pour la mise en oeuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine ; **2009**. Les cahiers Cerba; 28p.
- [58]. **Belhadi K.** Etude des hémoglobinopathies dans la population de la région de Batna; **2011** . Mémoire de Magister en Biologie; 89p.
- [59]. **Balgir R. S, Mishra R. K., Murmu B.** Clinical and Hematological Profile of Hemoglobinopathies in Two Tribal Communities of Sundargarh District in Orissa, India; **2003**. Int J Hum Genet ; 3(4): 209-216

- [60]. **Labie D, Elion J.** Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine ; **2005.** EMC-Hématologie; 2: 220–239.
- [61]. Place de l'électrophorèse capillaire dans le diagnostic et le suivi des hémoglobinopathies; **2010.** OptionBio ; 20p.
- [62]. Drépanocytose et autres hémoglobinopathies; **2011.** OMS; Aide mémoire N° 308.
- [63]. **Berthet S, Monpoux F, Berard E, Sarles J, Badens C.**Dépistage néonatal de la drépanocytose au CHU de Nice : bilan de 8 dernières années ; **2010.** Archives de pédiatrie; 17 :1652-1656.