

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée

Par : SAFI HAYET

Thème

**Mise en place des examens hématologique et de
l'électrophorèse de l'hémoglobine pour le diagnostic
de la drépanocytose dans la région de Ghardaïa**

Soutenu publiquement le : 25/05/2017

Devant le jury :

M. BENBRAHIM Fouzi	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Président
M^{me} TELLI Alia	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Encadreur
M. SEBA Omar	Médecin spécialiste	EPH Ghardaïa	Co- Encadreur
M. KRAIMAT Mohamed	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examineur
M^{me} KEBILI Zohra	Maître Assistant B	Univ. Ghardaïa	Examineur

Année universitaire 2016/2017

Mise en place des examens hématologique et de l'électrophorèse de l'hémoglobine pour le diagnostic de la drépanocytose dans la région de Ghardaïa

Résumé

La présente étude est réalisée au niveau de laboratoire central de l'EPH (Etablissement Public Hospitalier) de Ghardaïa, pour définir les méthodes biologiques pour le diagnostic de la drépanocytose (hémoglobine S), notamment l'électrophorèse de l'hémoglobine.

L'étude est effectuée sur des échantillons de patients suspects ou entrants dans le cadre de l'enquête familiale, un total de 46 patients étudiés, dont la tranche d'âge varie de moins d'un an à 67 ans, pendant une période de 3 mois.

Dans cette période, un nouveau cas de drépanocytose est enregistré alors que dans le cadre d'enquête familiale 8 cas de drépanocytose homozygote et en ce qui concerne la drépanocytose hétérozygote 11 cas sont notés, Les 26 cas restants sont variée entre des patients ne possèdent aucune pathologie de l'hémoglobine et les patients d'autres hémoglobinopathie.

Mots clés : Drépanocytose, hémoglobine S, électrophorèse, Ghardaïa.

Abstract

The present study is realized at the central laboratory of the Public Hospital of Ghardaïa, to define the biological methods for the diagnosis of sickle cell anemia (hemoglobin S), in particular hemoglobin electrophoresis.

The study was on blood samples of suspected patients or in the case of family survey, 46 patients studied, whose age ranged from less than one year to 67 years, for a period of 3 months.

In this period, a new case of sickle-cell anemia was founded, while in the family survey there is 8 cases of homozygous sickle-cell anemia, and 11 heterozygous sickle cell disease. The remaining 26 cases varied between patients without any pathology of hemoglobin and other hemoglobinopathy patients.

Key words: Sickle cell anemia, hemoglobin S, electrophoresis, Ghardaïa.

ملخص

أجريت هذه الدراسة في المخبر المركزي للمؤسسة العمومية الاستشفائية لولاية غرداية، للكشف عن الطرق البيولوجية لتشخيص فقر الدم المنجلي (الهيموغلوبين S)، خاصة اختبار الهجرة الكهربائية للهيموغلوبين (خضاب الدم). وقد أجريت الدراسة على عينات دم من مرضى مشتبه فيهم أو كجزء من التحري الأسري للمرضى المعروفين مسبقاً، قمنا بدراسة 46 مريض تمت أعمارهم من أقل من سنة إلى 67 سنة، تمت الدراسة في مدة زمنية تقدر بثلاثة أشهر. في هذه الفترة، تم تسجيل حالة جديدة من مرض فقر الدم المنجلي، وجزء من التحري الأسري وجدنا ثمانية حالات من مرض فقر الدم المنجلي وإحدى عشر حالة سمة فقر الدم المنجلي (حامل للسمة بصفة متنحية)، وستة وعشرون حالة المتبقية تتنوع بين مرضى ليس لديهم أمراض خضاب الدم، ومرضى الآخرين لديهم نوع مختلف من اختلال خضاب الدم. كلمات البحث: مرض الانيميا المنجلية، الهيموغلوبين S، الهجرة الكهربائية للهيموغلوبين، ولاية غرداية.

Remerciements et Dédicace

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie DIEU tout puissant, de m'avoir donné le courage et la volonté d'arriver au bout de ce modeste travail.

Je remercie particulièrement ma promotrice, Madame TELLI Alia, Maître assistante "A" au Département de la Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, université de Ghardaïa, d'avoir dirigé ce travail, pour ses conseils judicieux, à ses orientations tout au long de ce travail, et surtout pour son soutien moral.

Mes vifs remerciements s'adressent également à mon Co-promoteur Monsieur Seba Omar, Médecin spécialiste en hémoblogie et transfusion sanguine à l'EPH Ghardaïa, pour l'aide précieux qu'il m'a fournis pour achever ce travail.

Je suis très honoré à remercier de la présence à mon jury de mémoire, et je tiens à remercier :

Monsieur Ben Brahim Fouzi, Maître assistante "A" au Département de la Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, université de Ghardaïa, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être président de mon jury de mémoire.

Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour Monsieur Krimat Mohamed, Maître assistante "A" au Département de la Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, université de Ghardaïa, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de mémoire en qualité d'examinateur, pour le temps consacré à la lecture de ce mémoire, et pour les suggestions et les remarques judicieuses qu'il m'a indiquées.

Madame Kébili Zohra, Maître assistante "B" au Département de la Biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, université de Ghardaïa, pour sa participation à mon jury de mémoire, pour toutes remarques intéressantes qu'il m'a faites.

Mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, Un merci particulier :

-Au Docteur Bouhada nous ne saurions trouver les mots pour vous traduire les sentiments qui nous animent, en réponse à tout votre soutien, et encouragements.

-Au Mr Yahia Yahia, Mme Nadia Belahnini, et Mr Benali Abdelkarim Merci pour la disponibilité, pour le sacrifice, pour l'attention, et pour le soutien de tout genre, ... , En un mot, MERCI POUR TOUT.



Dédicace

Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères, tout particulièrement :

- A mes parents*
- A toute ma famille*
- A tous mes amis*
- Aux enfants souffrants de la drépanocytose*

Hayet

Table des matières

Synthèse bibliographique

I-Généralités sur le sang	03
I-1-Définition	03
I-2-Composition et rôles	03
I-2-1-Plasma sanguin	03
I-2-2-Eléments cellulaires	03
I-2-2-1 Leucocytes	04
I-2-2-2 Plaquettes (PLT)	04
I-2-2-3 Érythrocytes	04
II- Généralités sur l'hémoglobine (Hb)	06
II-1-Historique	06
II-2-Définition	06
II-2-1- Structure de l'hémoglobine	07
II-2-2- Hème	08
II-3-Variantes de l'hémoglobine.....	09
II-4- Structure des gènes de la globine	09
II-5- Hémoglobines normales	10
II-6- Hémoglobinopathies	11
III- Généralités sur la drépanocytose	12
III-1- Définition	12
III-2- Historique	12
III-3- Hémoglobine S (HbS)	14
IV- Techniques biologiques de détection de la drépanocytose	16
IV-1- Techniques Hématologique.....	16
IV-1- 1- Numération formule sanguine (NFS)	16
IV-1-2- Frottis sanguin	17
IV-1-3- Taux de réticulocyte	17
IV-1-4- Test de falciformation	17
IV-1-5-Test de solubilité réduite ou test d'Itano.....	18
IV-2-Electrophorèse	18
IV-2-1- L'électrophorèse à pH alcalin	19
IV-2-2- Electrophorèse à pH acide.....	20
IV-2-3- Isoélectrofocalisation.....	20
IV-2-4- Electrophorèse capillaire	21
IV-3- Chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP).....	21
V- Diagnostic clinique et biologique de la drépanocytose	21
V-1- Diagnostique cliniques de la drépanocytose hétérozygote et homozygote ...	22
V-2- Diagnostique biologique de la drépanocytose.....	23
VI- Diagnostic clinique et biologique de l'association Hb S hétérozygote avec d'autres hémoglobines	24

Partie expérimentale

I-Matériel et méthodes	29
I-1- Lieu d'expérimentation	29
I-2- Echantillon	29
I-3- Région d'étude	29
I-4- Prélèvement et la conservation du sang	30
I-5- Examens hématologiques	30
I-5-1- Numérotation de la Formule Sanguine (NFS)	30
I-5-2-Frottis sanguin	31
I-5-3- Taux de réticulocytes	33
I-5-4-Test de falciformation	34

I-6- Electrophorèse de l'hémoglobine	35
II- Résultats et discussions	
II-1- Examens hématologiques.....	43
II-2- Electrophorèse de l'hémoglobine	48
II-3- Caractéristiques générales des patients drépanocytaires	52
II-3-1- Répartitions des patients drépanocytaires selon l'âge	52
II-3-2- Répartitions des patients drépanocytaires par sexe	53
II-3-3- Répartitions des patients drépanocytaires selon l'âge et le sexe	54
Conclusion et perspectives.....	56
Bibliographie	58
Annexe	61

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Valeurs normales d'un hémogramme	16
02	Taux de l'hémoglobine chez les drépanocytaires hétérozygotes Hb A/S	23
03	Taux de l'hémoglobine chez les drépanocytaires homozygotes Hb S/S	24
04	Taux de l'hémoglobine selon le type, Hémoglobinoase PHHF/S	24
05	Taux de l'hémoglobine selon le type, Hémoglobinoase S / β^0 thal	25
06	Taux de l'hémoglobine selon le type, Hémoglobinoase S / β^+ thal	25
07	Quantité d'Hb S à l'électrophorèse Hémoglobinoases S / α thalassémie	26
08	Taux de l'hémoglobine par type, Hémoglobinoase S/C	26
09	Nombre de chaque type de patients	42
10	Patients drépanocytaires Homozygotes	43
11	Résultats des patients drépanocytaires Hétérozygotes	45
12	Résultats des patients ayant autre hémoglobinoathies	46
13	Patients qui ne présentent pas une pathologie d'hémoglobine	47
14	Taux de l'hémoglobine S chez les patients drépanocytaires homozygote	50
15	Taux de l'hémoglobine S chez les patients drépanocytaires hétérozygote	51

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Eléments figurés du sang au microscope optique	04
02	Aspect de globule rouge	05
03	Représentation d'une hémoglobine A humaine	07
04	Schéma de la globine	08
05	Structure des chaînes α et β	08
06	Structure de l'hème	08
07	Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines avant et après la naissance	09
08	Structure des gènes de la globine	10
09	Forme falciforme de globule rouge chez les drépanocytaires	12
10	Formation des hématies falciforme	14
11	Mutation sur la chaîne β , l'Hb S de la drépanocytose	14
12	Transmission de l'HbS	14
13	Aspect des drépanocytes au frottis sanguin	16
14	Aspect des réticulocytes	17
15	Aspect des hématies	17
16	Test de solubilité	18
17	Analyse par électrophorèse à pH alcalin,	19
18	Profil électrophorétique de l'hémoglobine de différents cas	20
19	Quelques complications cliniques de la drépanocytose	21
20	Procédure expérimentale des différents essais	29
21	Etapes de la réalisation de la NFS sur automate	31
22	Etapes de la réalisation d'un frottis sanguin	32
23	Teste de numération de taux de réticulocytes	33
24	Test de falciformation	34
25	Kit de produits d'électrophorèse	35
26	Composants du kit de réactifs d'électrophorèse de l'hémoglobine	36
27	Automate de l'électrophorèse Interlab G26	37
28	Accessoires de l'automate de l'électrophorèse Interlab G26	37
29	Barre de solution de lavage	38
30	Placement des échantillons	39
31	Placement des éponges	39
32	Placement de gel dans le support.	39
33	Insertion de support de gel en sa position de départ.	39
34a	Aspect des hématies en test de falciformation sous microscope (x 40)	44
34b	Aspect des hématies sous microscope (x 100)	44
35	Plaque prête à la lecture	48
36a	Profil électrophorétique d'un patient normal (sans hémoglobinopathie)	48
36b	Profil électrophorétique d'une β thalassémie hétérozygote	49
36c	Profil électrophorétique d'une α thalassémie hétérozygote	49
36d	Profil électrophorétique drépanocytose homozygote	50
36e	Profil électrophorétique drépanocytose hétérozygote	51
37	Répartition des patients drépanocytaires selon l'âge	52
38	Répartition des patients drépanocytaires par sexe	53
39	Répartition des patients drépanocytaires selon l'âge et le sexe	54

Introduction

Introduction

Le sang est le plus important liquide biologique dans notre corps, il irrigue tous les organes ; il leur apporte de l'oxygène, les éléments nutritifs et les débarrasse de leurs déchets (Gerald, 2015).

Les globules rouges sont les cellules sanguines les plus nombreuses, qui ont pour rôle de transporter l'oxygène entre les poumons et les organes, ou l'hémoglobine est leur principal constituant. Un taux d'hémoglobine inférieur à la normale cause une anémie (Choquet, 2007).

La drépanocytose, également appelée anémie à cellules falciformes, est une maladie héréditaire, due à une anomalie de l'hémoglobine provoque une déformation des globules rouge en forme de faucille. Les symptômes de cette maladie peuvent apparaître dès l'âge de 4 mois, mais ils varient beaucoup d'un individu à l'autre et au fil du temps (Giot *et al.*, 2003).

L'anémie hémolytique est le principal signe de la drépanocytose, mais elle s'accompagne souvent des crises douloureuses et d'une sensibilité accrue aux infections (Elion, 2014).

Le diagnostic biologique des maladies génétiques de l'hémoglobine fait appel à plusieurs techniques d'analyses. Parmi les techniques les plus utilisées dans la plupart des laboratoires d'analyse de référence, l'électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin sur différents supports (Giot, 2001).

Dans ce contexte, cette étude vise à la mise en place des différentes techniques utiliser dans le diagnostic de la drépanocytose, en particulier l'électrophorèse de l'hémoglobine à travers une étude biologique, biochimique menée auprès des patients suivis à l'Etablissement Public Hospitalier de Ghardaïa. Aussi, cette étude a comme but l'identification et la sensibilisation sur cette maladie, qui se produit principalement à partir du mariage consanguin qui est très répandu dans la région de Ghardaïa.

Synthèse bibliographique

I-Généralités sur le sang

I-1-Définition

Le sang est un tissu vital, unique par sa composition liquide qui le rend d'accès particulièrement facile, un individu contient de 5 à 7 l du sang dans son corps, ce qui représente environ 8% de son poids total (Dora *et al.*, 1989).

C'est aussi, un liquide biologique rouge, circulant dans les artères et les veines sous l'impulsion du cœur, c'est un tissu de transport contient une phase liquide (le plasma), et les cellules matures provenant de la moelle osseuse ou elles sont fabriquées (globules rouge, globules blanc et plaquettes) (Colombat *et al.*, 1991).

Le sang distribue l'oxygène, les hormones et les nutriments à toutes les cellules, tous les tissus et tous les organes du corps, ensuite, les débarrasser de leurs déchets, et il joue aussi un rôle dans la défense immunitaire. (Choquet, 2007).

I-2-Composition et rôles

Le sang se compose de 45% des éléments cellulaires, ou éléments figurés (Fig. 1), les 55% restants présentent le plasma sanguin, un liquide jaunâtre qui est la phase liquide dans laquelle sont en suspension (Dora *et al.*, 1989).

I-2-1-Plasma sanguin

Le plasma est le composant liquide du sang dans lequel baignent les éléments figurés. Il est constitué de l'eau (le solvant qui est le composant principal du sang), des ions et de différentes molécules, qui sont transportées à travers l'organisme.

Les principales molécules du plasma sont le glucose, les lipides et les protéines (Choquet, 2007).

I-2-2-Eléments cellulaires

Elément finis sont produits par la moelle osseuse (Fig. 1). Les cellules circulantes sont des cellules fonctionnelles, elles permettent l'oxygénation de l'organisme (érythrocytes), sa défense anti-infectieuse (leucocytes), ou contre les corps étrangers, l'élimination des débris (monocytes, basophiles) et la préservation de l'intégrité des vaisseaux (plaquettes) (Choquet, 2007).

I-2-2-1 Leucocytes

Globules blancs (GB) font partie du système immunitaire (Fig. 1) et permettent la destruction des agents infectieux. Ces cellules sont subdivisées en plusieurs groupes qui sont : les granulocytes ou polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), les lymphocytes, les monocytes et les thrombocytes (Dora *et al.*, 1989).

I-2-2-2 Plaquettes (PLT)

Ils ne contiennent pas de noyau ; ce sont des fragments de cellule (Fig. 2) provenant de leurs précurseurs, les mégacaryocytes, responsables de la formation du clou plaquettaire précédant la coagulation sanguine (Dora *et al.*, 1989).

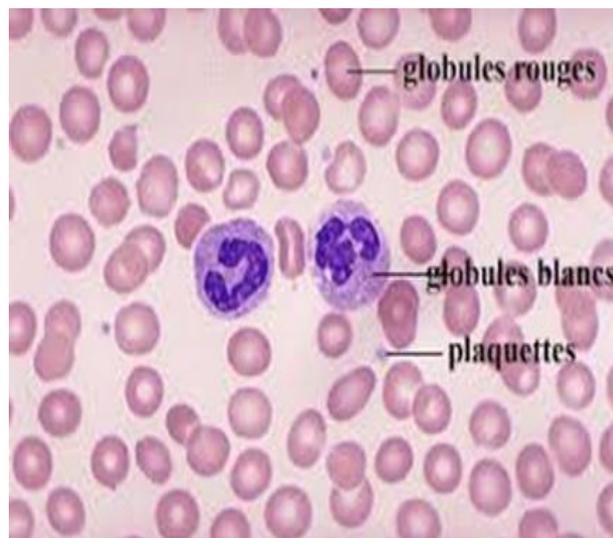


Figure 1 : Eléments figurés du sang au microscope optique
(Jean *et al.*, 2006).

I-2-2-3 Érythrocytes

Hématie (Fig. 2) ou globule rouge (GR) de 7 à 8 μm de diamètre, elle ne possède ni noyau ni organelle. C'est une cellule très simplifiée anucléée, biconcave, produite essentiellement dans la moelle osseuse à partir des cellules souches. Elle est douée d'une grande déformabilité qui lui permet de franchir des capillaires. Leur durée de vie est de 110 à 120 jours et leur destruction est opérée au niveau de la rate (Dora *et al.*, 1989 ; Choquet, 2007 ; Medkour, 2008).

La couleur rouge de l'érythrocyte provient de pigment, l'hémoglobine, qui est son constituant principal. A l'état normal tous les globules rouges du sang ont la même forme, la même taille et la même coloration.

Le globule rouge comprend deux parties, la membrane qui est formée par plusieurs couches de nature protéique et lipidique, ou se situe le squelette protéique du GR qui assure sa forme et sa capacité de circuler à travers les micro-vaisseaux, et elle contient aussi de l'eau dans laquelle dilues les protéines, essentiellement l'hémoglobine, des enzymes et des électrolytes notamment le potassium (K⁺) et du glucose (Dora et *al.*, 1989).

Leur rôle est de transporter l'oxygène ainsi que le fer mais aussi le dioxyde de carbone ou le monoxyde de carbone, elle contient également des enzymes leur permettent de fonctionner et de survivre (Choquet, 2007).



Figure 2 : Aspect de globule rouge
(source : www.dondusang.net)

II- Généralités sur l'hémoglobine (Hb)

C'est une protéine dont la structure est bien connue, un pigment respiratoire transporteur de l'O₂, elle est le constituant majeur du globule rouge, qui occupe 33% de son poids (Choquet, 2007 ; Dora *et al.*, 1989).

II-1-Historique

Le terme « hémoglobine » a été évoqué par le physiologiste Allemand Hoppe-Seyler en 1862. L'hémoglobine est parmi les premières protéines les plus étudiées. En effet, elle est la première protéine cristallisée par Reichert en 1849. Son poids moléculaire est déterminé par Gilbert Smithson Adair en 1924. Sa synthèse *in vitro* est réalisée dans un système acellulaire par Schweet et Coll en 1958. L'ARNm de cette protéine est isolé et sa séquence en bases azotées est déterminée en 1964 par Marbaix et Burny, permettant à la théorie de la transition allostérique de Monod, Wyman et Changeux (1965) d'être illustrée dans l'effet de coopération, nécessaire au transport de l'oxygène par l'hémoglobine découvert par Haurowitz en 1938 (Direckson, 1983).

II-2-Définition

L'Hb a été donc la première protéine étudiée et cela d'une part grâce à sa facilité d'extraction et sa disponibilité et d'autre part, grâce à la facilité de son étude. De ce fait, l'Hb a servi de prototype pour l'étude des autres protéines (Medkour, 2008).

L'étude de sa structure a permis de tirer des conclusions sur le nombre de gènes codant pour les différentes chaînes de globine, et cela avant même d'effectuer l'étude génotypique par la biologie moléculaire (Medkour, 2008).

Par ailleurs, l'étude de l'Hb a un intérêt majeur dans la compréhension des bases moléculaires et physiopathologiques des hémoglobinopathies.

L'hémoglobine est une protéine oligomérique (hétérotétramérique) de poids moléculaire égal à 64 500 daltons, Ces 4 sous unités sont identiques 2 à 2 et se distinguent en sous unités de type α et sous unités de type β (Choquet, 2007).

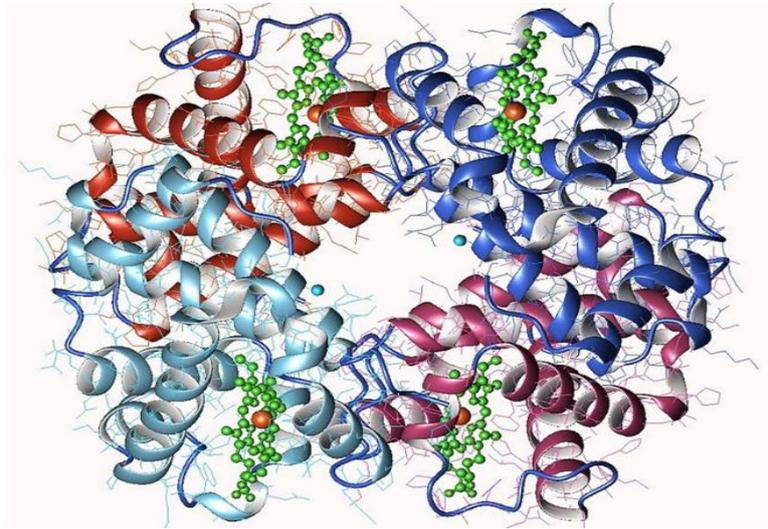


Figure 3 : Représentation de l'hémoglobine A humaine montrant les quatre hèmes en vert, avec le cation de fer en orange (tétramère $\alpha_2\beta_2$) (Choquet, 2007).

Chaque sous unité est formée de deux parties (Fig. 3), une partie protéique la globine qui correspond à l'association de chaînes polypeptidiques ; il en existe deux types les α (ζ , α_1 , α_2) et les non α (ϵ , γ , δ , β) et une partie non protéique (l'hème), dont le centre est occupé par un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) qui est responsable de la fixation de l' O_2 (Choquet, 2007).

II-2-1- Structure de l'hémoglobine

Les chaînes α ou α -globines renferment 141 acides aminés et les chaînes β ou β -globines renferment 146 acides aminés (Fig. 5). Chaque chaîne adopte une conformation spatiale lui conférant une forme globuleuse et ménageant une « poche superficielle » dans laquelle se trouve logé l'hème. La cohérence du tétramère $\alpha_2\beta_2$, résulte principalement de liaisons « faibles », établies par les chaînes latérales hydrophobes des acides aminés situés à la périphérie des chaînes protéiques (Medkour, 2008).

Une chaîne polypeptidique α ou β présente sept (ou huit) segments en forme d'hélice droite reliés par des segments comportant parfois des coudes (Fig. 4), bien que les chaînes α et β aient des séquences différentes, elles présentent des structures tertiaires très similaires (Medkour, 2008).

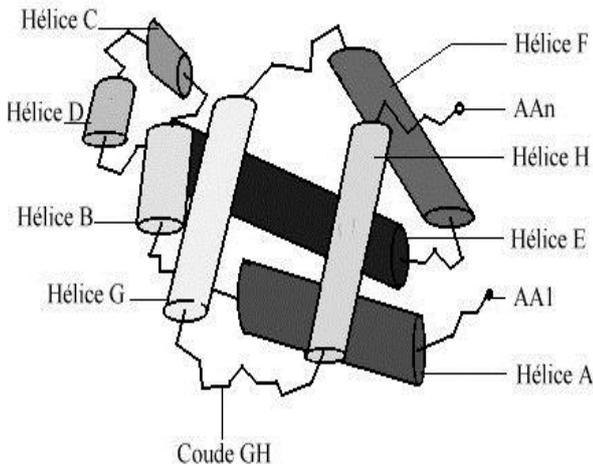


Figure 4 : Schéma de la globine
(source : www.fr/biotic/drepanocytose)

Structure des chaînes de l'hémoglobine humaine chez l'adulte

Chaîne alpha : 141 acides aminés

	A	B	C	E	F	G	H	
1	3/18	20/35	36/42	52/71	80/88	94/112	118/138	141

Chaîne bêta : 146 acides aminés

	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	4/18	19/34	35/41	50/56	57/76	85/93	99/117	123/143	146

Hélice
4 18 ——— numéros d'ordre des acides aminés

Figure 5 : Structure des chaînes α et β
(source : www.inrp.fr/biotic/drepanocytose)

La structure tétramérique de l'hémoglobine disposée de façon à ce que la sous-unité α_1 soit au contact de la sous-unité β_2 et α_2 de β_1 (Medkour, 2008).

II-2-2- Hème

La molécule d'hème est une molécule plane, ou légèrement bombée (Fig. 6). Sa structure est connue depuis le début du siècle, qui est constituée par une protoporphyrine ayant en son centre un atome de fer. La protoporphyrine est formée de quatre cycles pyrroliques unis par l'intermédiaire de ponts méthényles (-CH=) et substitués par des groupes méthyle, propionate et vinyle. Que la molécule d'hémoglobine soit oxygénée (oxyhémoglobine) ou désoxygénée (désoxyhémoglobine), le fer reste sous sa forme réduite (Fe^{++}) (Dora et al., 1989).

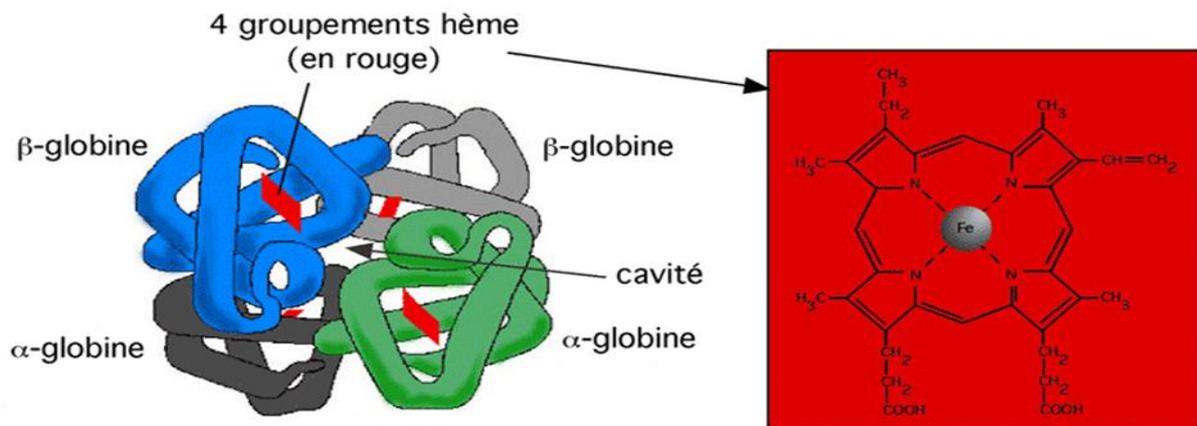


Figure 6 : Structure de l'hème
(Russell, 1996).

II-3-Variantes de l'hémoglobine

Selon la nature des sous-unités, on distingue plusieurs hémoglobines se succédant au cours de la vie.

L'hémoglobine existe en différentes variantes telles que A, A₂, F, Gower I, Gower II et portland. Trois ne sont présents que pendant la vie embryonnaire, d'autres sont présents dans des proportions différentes pendant la vie fœtale et adulte (Colombat et al., 2005).

Au cours de l'évolution, le profil des hémoglobines change deux fois (Fig. 7). La première coïncide avec le passage de la vie embryonnaire à la vie fœtale : $\epsilon \rightarrow \gamma$ et $\zeta \rightarrow \alpha_1$ et α_2 , La seconde avec celui de la vie fœtale à la vie adulte (ne concerne que les gènes non α) : $\gamma \rightarrow \beta$, δ (Colombat et al., 2005).

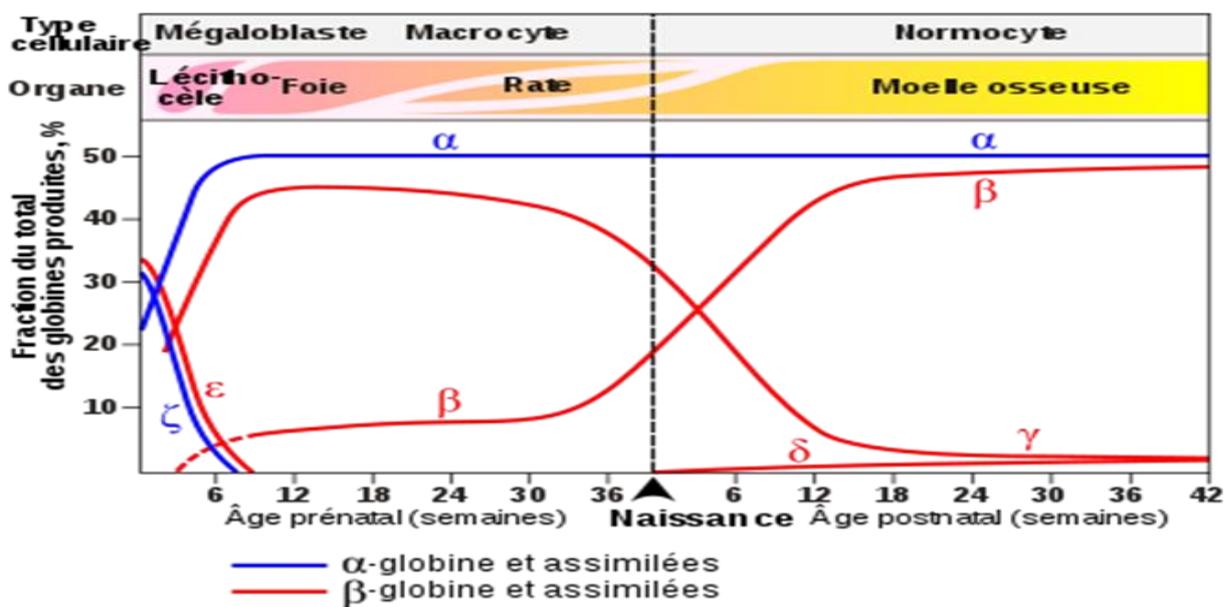


Figure 7 : Production des différentes globines chez l'homme dans les semaines avant et après la naissance (Couque, 2013).

II-4- Structure des gènes de la globine

Les chaînes polypeptidiques de type alpha (ζ et α) et les chaînes polypeptidiques de type bêta (ϵ , γ , β et δ) sont codés par les grappes de gènes α et β -globine (Fig. 8) situés sur les chromosomes 16 et 11 respectivement (Polonovski, 1977).

II-5- Hémoglobines normales

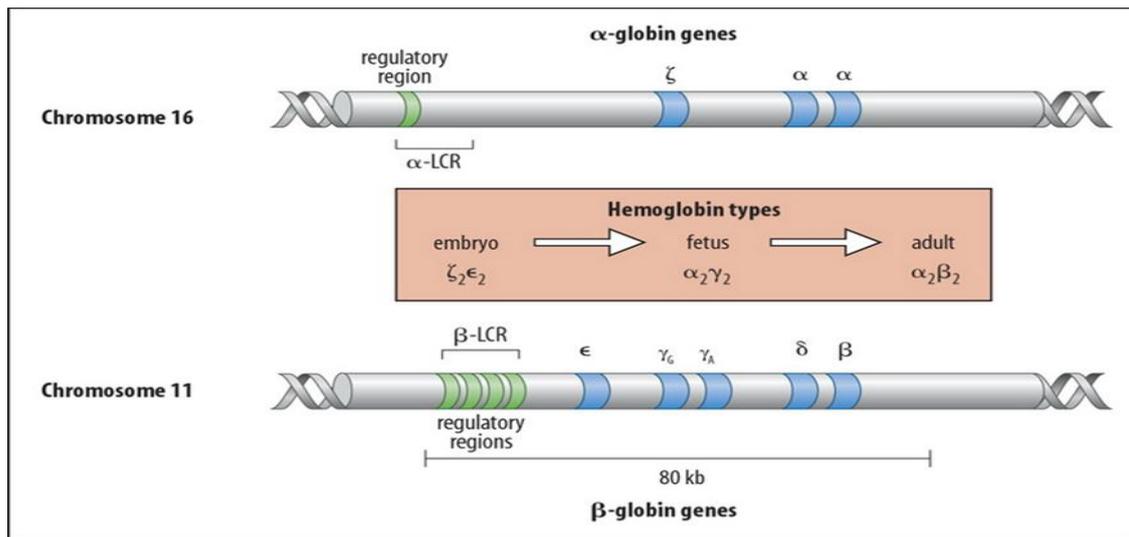


Figure 8 : Structure des gènes de la globine (Brian et Staveley, 2003).

Il existe trois hémoglobines normales A, A₂ et F. Ces hémoglobines contiennent toutes deux chaînes alpha qui sont couplées à deux autres chaînes soit beta, soit delta, soit gamma (Dora et *al.*, 1989 ; Nelemans et Huisman, 2006).

II-5-1- Hémoglobine A (HbA)

La principale hémoglobine des adultes, représente 95% à 99% du total de l'hémoglobine, se compose d'une paire chaînes polypeptidiques alpha (α) et bêta (β) et sa structure est désignée par $\alpha_2\beta_2$ (Dora et *al.*, 1989 ; Nelemans et Huisman 2006).

II-5-2- Hémoglobine A₂ (HbA₂)

Ce type représente 2% à 3% de l'hémoglobine totale, qui est formée d'une paire des chaînes alpha (α) couplée avec une paire des chaînes (δ) (Dora et *al.*, 1989 ; Nelemans et Huisman, 2006).

II-5-3- Hémoglobine foetale (HbF)

L'hémoglobine prédominante dans la vie foetale, contient une paire des chaînes alpha (α) et une paire de chaînes gamma (γ), elle représente de 80% à 100% à la naissance, puis tombe à des taux inférieurs à 2% à la fin de la première année (Dora et *al.*, 1989).

II-6- Hémoglobinopathies

La génétique médicale a permis de définir le nombre de gènes codant pour chaque type de sous unité constituant l'Hb et leur localisation dans le génome. Ces gènes peuvent être le siège d'anomalie moléculaire, qualitatives et quantitatives responsables de pathologies appelées hémoglobinopathies (Labie et Elion, 1985).

Les hémoglobinopathies sont classiquement séparées en deux grandes catégories :

II-6-1- Variantes de l'Hb avec anomalie qualitative

C'est la synthèse en quantité normale d'une hémoglobine anormale ou avec une chaîne mutante, elles sont aussi composées de deux chaînes alpha (α) normales et de deux chaînes beta (β) présentant une forme de mutation. On connaît plus d'une centaine de mutations du gène β aboutissant à des hémoglobines anormales, plus ou moins fonctionnelles. Les plus courantes sont l'hémoglobine C (HbC), l'hémoglobine S Antilles (HbS Antilles), l'hémoglobine D Punjab (HbD Punjab), l'hémoglobine O Arab (HbO Arab), l'hémoglobine E (HbE) et l'hémoglobine Lepore (Hb Lepore) (Siguret et Andreux, 1997).

II-6-2- Variantes de l'Hb avec anomalie quantitative

C'est un Défaut quantitatif de production d'une hémoglobine normale, ce qui correspond à une thalassémie, soit α thalassémie ou β thalassémie (Siguret et Andreux, 1997).

Quelques variantes de l'Hb ont la particularité d'associer à la fois un défaut qualitatif et quantitatif (Siguret et Andreux, 1997).

Des cas plus rares peuvent se présenter, dont le diagnostic est également important pour le patient, où l'hémoglobine a une affinité modifiée pour l'oxygène, hémoglobines instables et Hb M (Siguret et Andreux, 1997).

III- Généralités sur la drépanocytose

III-1- Définition

La drépanocytose, ou anémie falciforme (sickle cell disease) est une hémoglobinopathie à transmission autosomique récessive. Cette maladie résulte d'une mutation ponctuelle du sixième codon du gène β -globine, l'acide glutamique est remplacé par une valine, conduit à la synthèse d'une hémoglobine anormale qui est l'hémoglobine S. La polymérisation de l'hémoglobine S à l'état désoxygéné est à l'origine d'une anémie hémolytique chronique (Lainé, 2004).

La maladie est très répandue chez la population de race noire (les pays Africains), en raison des mouvements récents de populations qui caractérisent notre époque, elle existe aujourd'hui sur tous les continents (Arnal et Girot, 2002).

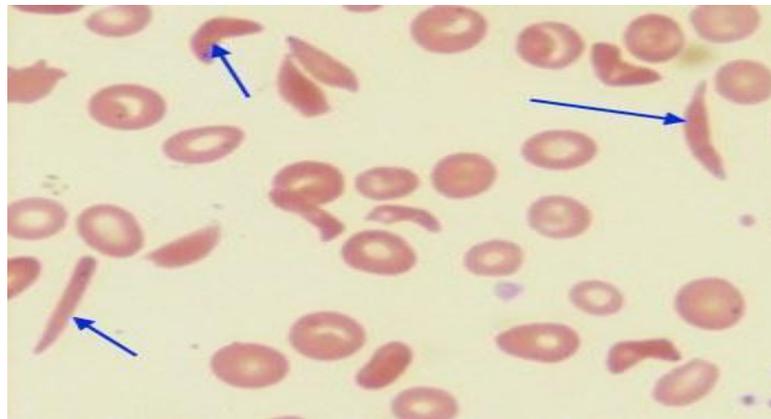


Figure 9 : Forme falciforme de globule rouge chez les drépanocytaires (Jean et *al.*, 2006).

III-2- Historique

La première description de la drépanocytose est faite par le médecin Américain James Herrick en 1910. Il est noté la présence des hématies déformées en faucilles (Fig. 9) chez un patient Jamaïcain (Beyeme et Chiabi, 2004).

En 1917, le caractère familial de cette maladie est évoqué par Emmel et en 1927, Hahn et Gillespie montrent que la déformation en faucilles des hématies est en rapport avec la désoxygénation de l'hémoglobine (Beyeme et Chiabi, 2004).

En 1940, Sherman (étudiant à John Hopkin's Medical School, aux Etats Unis) a suggéré que la diminution de l'oxygène modifie la structure de l'hémoglobine (Beyeme et Chiabi, 2004).

Neel (1947) a présenté le mode de transmission Mendélien des formes homozygote et hétérozygote de cette maladie (Beyeme et Chiabi, 2004).

En 1949, Linus Pauling et Harvey Itano, ont mis en évidence la présence de l'hémoglobine S chez les patients drépanocytaires en utilisant la nouvelle technique de séparation des protéines l'électrophorèse (Beyeme et Chiabi, 2004).

La formation d'un gel par l'hémoglobine S concentrée et désoxygénée est mentionnée par Harris en 1950 (Beyeme et Chiabi, 2004).

En 1956, Vernon Ingram a montré que l'hémoglobine S ne diffère de l'hémoglobine A que par un acide aminé en position 6 de la chaîne polypeptidique l'acide glutamique remplacé par la valine. C'est la première maladie génétique dont la structure moléculaire est connue (Beyeme et Chiabi, 2004).

Messer et Harris (1970) ont étudié les modifications morphologiques des globules rouges hémoglobine SS (HbSS), ainsi que la diminution de leur déformabilité sous la désoxygénation progressive. Leurs travaux ont révélé que la diminution de la déformabilité apparaît avant les modifications morphologiques, ce qui implique une altération de la déformabilité membranaire des érythrocytes HbSS (Beyeme et Chiabi, 2004).

En 1973, Eaton a montré que la diminution de la déformabilité des globules rouges HbSS est liée à la concentration élevée en calcium, qui est 8 fois supérieure à celle des globules rouges HbAA, Cette hyperconcentration est due à un flux calcique plus élevé à travers la membrane érythrocytaire (Beyeme et Chiabi, 2004).

En 1984, la première transplantation de la moelle osseuse chez un enfant drépanocyttaire conduit à la guérison complète (Beyeme et Chiabi, 2004).

III-3- Hémoglobine S (HbS)

L'hémoglobine S est composée de deux chaînes α normales et de deux chaînes β mutantes, la mutation de la chaîne β est ponctuelle (modification d'une seule paire de bases azotées dans la molécule d'ADN), le changement Glu \rightarrow Val, (Fig.11) produit une diminution de la solubilité de la molécule (Fig.10), cette moindre solubilité peut expliquer les déformations si caractéristiques des globules rouges (hématies falciforme) (Polonovski, 1977).

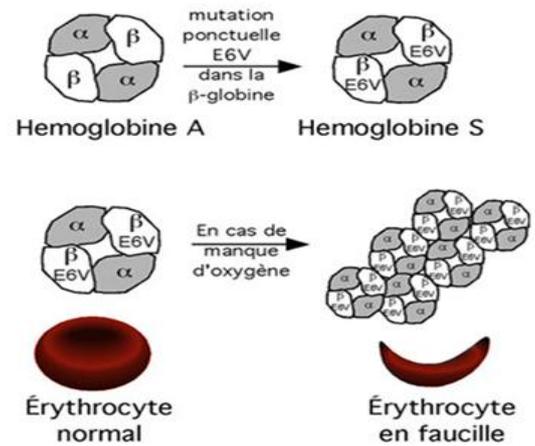


Figure 10 : Formation des hématies falciforme (Renaudier, 2004).

	1	2	3	4	5	6	7	...
Hb A (chaîne β)	Val-	His-	Leu-	Thr-	Pro-	Glu-	Glu-	...
Hb S (chaîne β)	Val-	His-	Leu-	Thr-	Pro-	Val-	Glu-	...

Figure 11 : Mutation sur la chaîne β , l'Hb S de la drépanocytose (Polonovski, 1977)

La mutation qui produit HbS, portée par le gène β , est transmise selon le mode mendélien co-dominant. Lorsque l'un des parents est normal et l'autre hétérozygote pour l'HbS, la moitié des enfants seront hétérozygotes. Lorsque les deux parents sont hétérozygotes, 50% des enfants seront hétérozygotes, 25% seront homozygotes et 25% normaux (Fig.12).

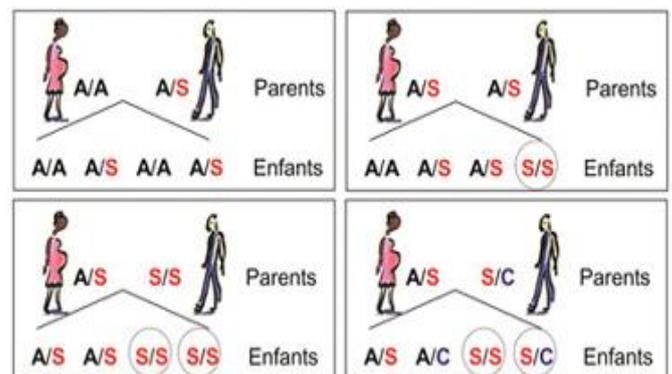


Figure 12 : Transmission de l'HbS

III-4- Mécanisme génétiques des hémoglobinoses

La plupart des mutations observées à propos des hémoglobines anormales sont des mutations ponctuelles, Il faut néanmoins noter qu'un quart seulement de ces mutations sont détectées par les moyens couramment utilisés, tel que l'électrophorèse de l'hémoglobine qui ne met en évidence que des différences de charge électrique (Beyeme et Chiabi, 2004).

La substitution d'un acide aminé par un autre acide aminé de même charge à de plus grandes chances de passer inaperçue, si la substitution porte sur une zone superficielle de la molécule de l'hémoglobine celle-ci apparaît à l'électrophorèse et par analyse de structure comme étant normale ; un tel mécanisme a été invoqué pour expliquer certaines thalassémies (Beyeme et Chiabi, 2004).

III-5- Physiopathologie de la drépanocytose

L'hémoglobine anormale se polymérise lorsque l'oxygénation du sang diminue et elle se précipite sous forme de cristaux qui déforment l'hématie et lui donnent une forme de faucille (falciformation) (Renaudier, 2004).

Donc tout facteur de désoxygénation favorise la falciformation comme l'acidose, la stase sanguine, la déshydratation, le ralentissement du transit capillaire (Renaudier, 2004).

La falciformation ralentit la microcirculation, obstrue les capillaires et provoque des thromboses et infarctus, particulièrement dans les organes très vascularisés tels que la rate, les reins et la moelle osseuse (Renaudier, 2004).

L'hématie ainsi déformée a une durée de vie très courte ; elle est facilement détruite d'où hémolyse et anémie (Renaudier, 2004).

Le système des phagocytes mononuclés est débordé dans la fonction de macrophage par ces hématies détruites et n'est plus disponible pour la lutte contre les bactéries, qui provoque une sensibilité du drépanocytaire aux infections (Renaudier, 2004).

En outre, la moelle osseuse, sollicitée à l'excès pour préparer le déficit en globules rouges, donne des atteintes des os (Renaudier, 2004).

IV- Techniques biologiques de détection de la drépanocytose

IV-1- Techniques Hématologique

IV-1- 1- Numération formule sanguine (NFS)

Les anomalies hématologiques de la drépanocytose sont dominées par les signes d'anémie hémolytique. La formation et la destruction continue des drépanocytes sont à l'origine d'une anémie hémolytique sévère (Tiendrebeogo, 2013).

C'est un examen biologique simple, standardisé et automatisé permettant de comptabiliser les différents éléments figurés du sang tels que les plaquettes, les globules rouges et les différentes catégories de globules blancs (Choquet, 2007).

Actuellement, les appareils utilisés, ayant une grande précision, ils ne font pas que le comptage des éléments du sang ; ils sont également capables de mesurer le volume et le contenu en hémoglobine des globules rouges, le volume des plaquettes (Tableau 1), et de signaler les formes cellulaires anormales (Collection, 2006).

Tableau 1 : Valeurs normales d'un hémogramme

Catégorie	3 à 10 ans	Femme	Homme
Hématies (millions/mm³)	4,0-5,4	4.0 - 5.3	4.2 - 5.7
Hémoglobine (g/100 ml)	12.0 - 14.5	12.5 - 15.5	14.0 - 17.0
Hématocrite (%)	36 - 45	37 - 46	40 - 52
VGM (μ³) volume globulaire moyen	74 - 91	80 - 95	80 - 95
TCMH (pg) teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine	24 - 27	28 - 32	28 - 32
CCMH (%) concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine	28 - 33	30 - 35	30 - 35
Leucocytes (/mm³x1000)	5000 - 11000	4000 - 10000	4000 - 10000

IV-1-2- Frottis sanguin

Malgré le perfectionnement des analyseurs automatisés d'hématologie destinés à la réalisation des hémogrammes, l'examen du frottis sanguin au microscope (Fig. 13) reste indispensable lorsque les données fournies par les appareils sont qualitativement ou quantitativement anormale, pour mieux distinguer les formes et les tailles des cellules sanguines (Berdin *et al.*, 2014).

Le frottis sanguin est l'étalement d'une goutte de sang sur une lame de microscope, afin d'observer les cellules et de les dénombrer.

Le frottis préparé doit être coloré pour visualiser certaines cellules qui sont transparentes (Berdin *et al.*, 2014)

IV-1-3- Taux de réticulocyte

La moelle osseuse libère dans la circulation des globules rouges immatures appelés réticulocytes (Fig.14). Il s'agit d'une réaction normale à une demande accrue d'oxygène. La numération des réticulocytes se fait par un frottis d'une goutte de sang coloré, permet de mesurer la vitesse approximative de la régénération des globules rouges par la moelle osseuse. Les réticulocytes représentent 1 % des globules rouges dans le sang d'une personne en bonne santé. (Cloutier et al., 2014).

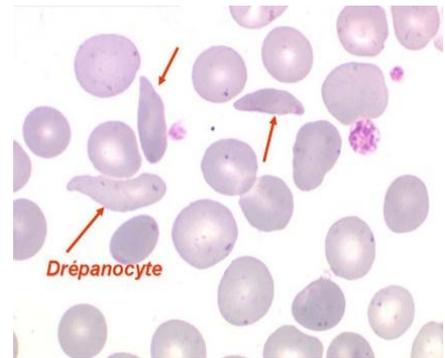
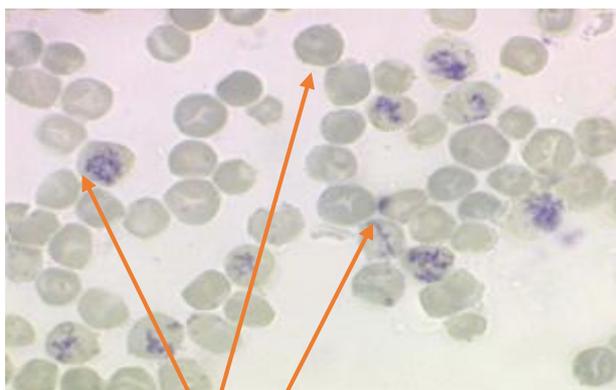


Figure 13 : Aspect des drépanocytes au frottis sanguin (Jean *et al.*, 2006)



réticulocytes

Figure 14 : Aspect des réticulocytes (Jean *et al.*, 2006).

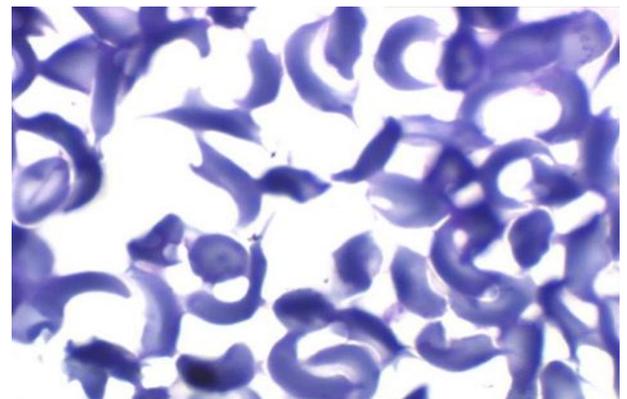


Figure 15 : Aspect des hématies falciforme (Jean *et al.*, 2006).

IV-1-4- Test de falciformation

Il a été mis au point en 1917 par Emmel qui a constaté la déformation en faucille des hématies des sujets atteints de drépanocytose lorsque celles-ci sont placées dans un milieu pauvre en oxygène (Siguret et Andreux, 1997).

Le test de falciformation ou test d'Emmel est un bon procédé alternatif pour le diagnostic de la drépanocytose à condition de respecter exactement le mode opératoire.

Son principe consiste à provoquer entre lame et lamelle de microscope la désoxygénation (réduction) totale de l'échantillon de sang à examiner, l'hémoglobine S se polymérise alors sous forme de cristaux insolubles allongés qui déforment les hématies (Fig.15). Cette déformation est facilement observée par microscope optique (Balédent, 2000).

IV-1-5-Test de solubilité réduite ou test d'Itano

Mis au point par Itano, il consiste à mélanger un hémolysat de globules rouges avec un tampon phosphate concentré en présence d'un réducteur, l'hydrosulfite de sodium. L'apparition d'un trouble dans le milieu indique l'existence d'une Hb anormale HbS ou HbC (Fig.16) que l'on peut par la suite différencier par centrifugation (Siguret et Andreux, 1997).



Figure 16 : Test de solubilité

(source : erasmeinfo.ulb.ac/globule)

IV-2-Electrophorèse

L'électrophorèse est une technique utilisée en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules chargées dans un champ électrique. La séparation par cette méthode peut être effectuée soit selon la charge (état natif des molécules) soit selon la taille moléculaire (état dénaturant), (Cotton et *al* 2006).

L'agarose et le polyacrylamide sont les principaux gels utilisés comme support de séparation dans cette technique. Le rapport poids/volume de polymère/tampon a une grande influence sur le taux de réticulation, et par conséquent sur le diamètre des pores. Cette propriété permet à ajuster le diamètre des pores en fonction de la taille des molécules à analyser (Kamoun, 1997).

L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5 % à 2 % (poids/volume). Ce gel permet la séparation des molécules de très grande taille, en particulier les acides nucléiques tels que l'ADN et l'ARN (Audigié et *al.*, 1995).

Le gel du polyacrylamide (ou PAGE pour *Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*) est utilisé à des concentrations de 4 % à 20 % (poids/volume) pour la séparation des molécules de petites

tailles comme les protéines, les peptides et les fragments des acides nucléiques (Audigié et *al.*, 1995).

Le principe de l'électrophorèse est basé sur la migration des différents types d'Hb dans un champ électrique sur un support approprié, en fonction de leur charge électrique et de leur solubilité. Le sang est prélevé sur anticoagulant et débarrassé du plasma et des leucocytes. Les globules rouges sont ensuite lysés pour obtenir une solution d'Hb libre (Tiendrebeogo, 2013).

IV-2-1- L'électrophorèse à pH alcalin

L'électrophorèse à pH alcalin est une technique largement utilisée, électrophorèse sur support solide (acétate de cellulose ou agarose) et à pH alcalin (pH = 8,6), les hémoglobines sont chargées négativement et migrent vers l'anode (+), (Fig.18). 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'Hb A. On parle de mutant « rapide » s'il est plus chargé négativement que l'Hb A et donc migre plus près de l'anode que l'Hb A, ou de mutant « lent » s'il est moins chargé négativement et donc migre moins près de l'anode que l'Hb A.

La coloration avec un colorant protéique (amidoschwarz ou rouge Ponceau) permet une meilleure visualisation des bandes. Cinq grands groupes se distinguent en fonction de leur migration électrophorétique : A, N, J, S et C (Fig. 1) (Audigié et *al.*, 1995 ; Tiendrebeogo, 2013)

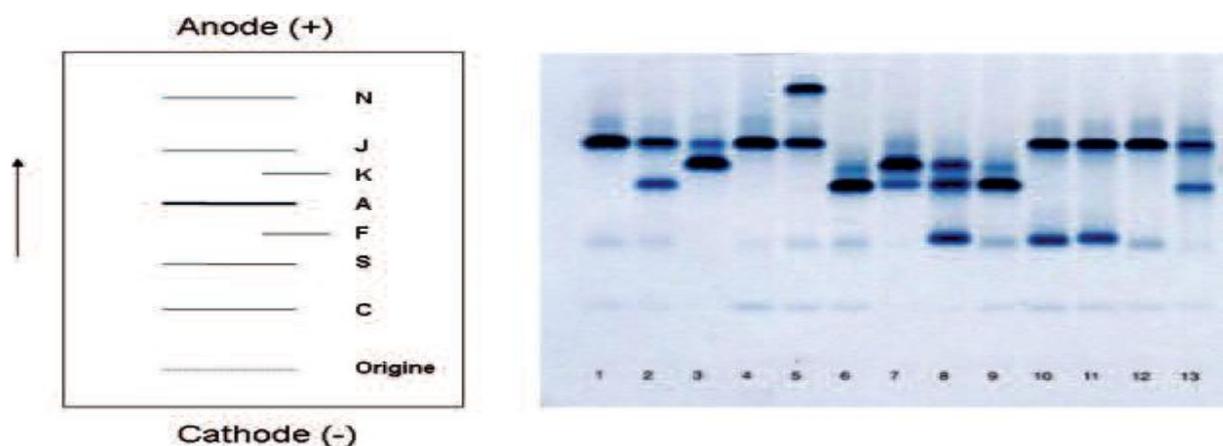


Figure 17 : Analyse par électrophorèse à pH alcalin (Tiendrebeogo, 2013)

Cette technique permet donc la séparation des principales hémoglobines HbA, HbF, HbS/D/G et HbC/E/O-Arab (Fig.17), Elle est facile à mettre en oeuvre, mais présente

l'inconvénient de ne pas permettre une quantification fiable des fractions mineures et d'être peu résolutive (Couque, 2013).

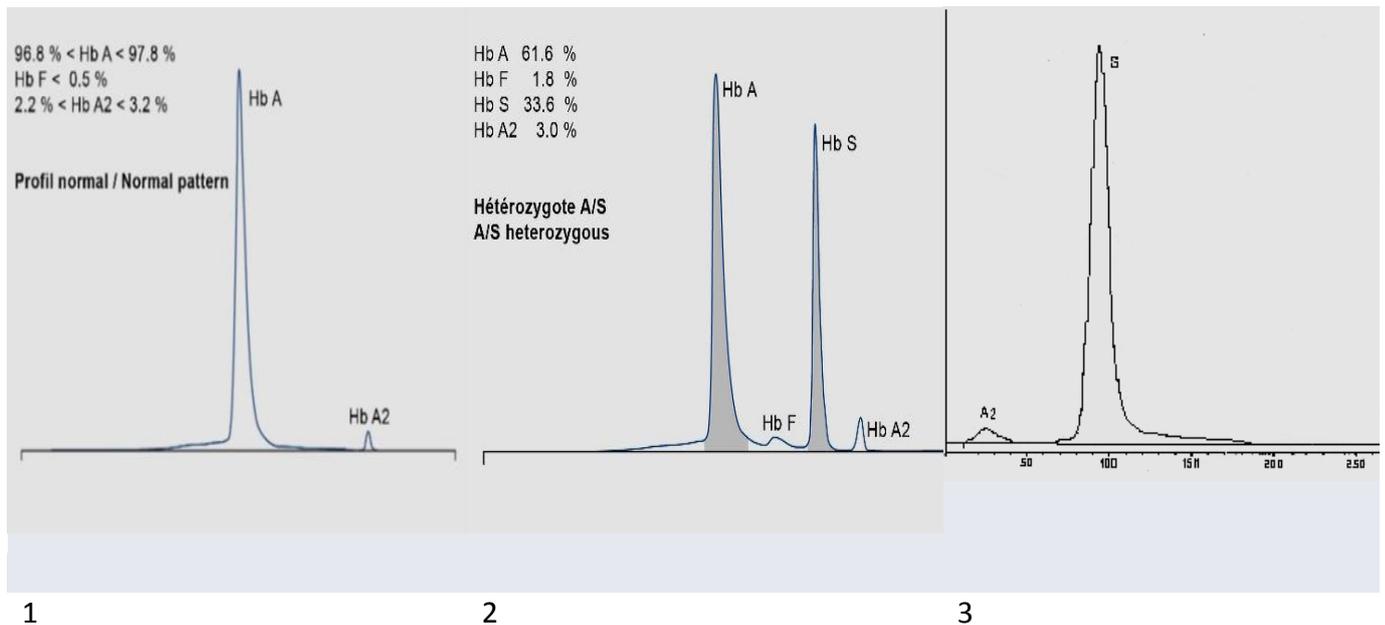


Figure 18 : Profile électrophorétique de l'hémoglobine de différents cas,
 1. profil normal AA ; 2. Hétérozygote AS. 3. homozygote SS: HbS = 95,6 %, HbA2 = 4,4 %
 (Tiendrebeogo, 2013)

IV-2-2- Electrophorèse à pH acide

L'électrophorèse sur citrate d'agar à pH 6,2 permet l'identification des Hb S, D Punjab, C, E et O Arab. Son inconvénient est qu'il est difficile de doser les fractions anormales ; L'électrophorèse sur gel d'amidon à pH 6,5 est utilisée pour la détection de l'Hb H (tétramère β_4) ou de l'Hb Barts (tétramère γ_4) (Kamoun, 1997).

IV-2-3- Isoélectrofocalisation

Cette méthode d'électrophorèse mise au point par KOEPKE en 1975 permet la séparation des différentes fractions d'Hb en fonction de leur point isoélectrique dans un gradient de pH. Dans ce système de gradient la protéine arrête de migrer quand elle arrive à son point isoélectrique (pHi) où sa charge nette est nulle. L'isoélectrofocalisation sur gel d'agarose contenant des ampholytes (pH 6 à 9) permet une bonne séparation des fractions avec une différence de pHi entre l'HbA et l'Hb F et entre l'Hb F et l'Hb S (Tiendrebeogo, 2013).

Après la focalisation, le dosage des fractions s'effectue par densitométrie à 520 nm sans coloration (Tiendrebeogo, 2013).

Cette méthode a le meilleur pouvoir de résolution et offre une meilleure séparation des différentes Hb (normales ou pathologiques). Malheureusement cette technique de pointe n'est pas souvent disponible dans les pays en développement. (Tiendrebeogo, 2013).

IV-2-4- Electrophorèse capillaire

Il s'agit d'un système automatisé qui permet la séparation des hémoglobines normales (A, F et A2) et la détection des principales hémoglobines anormales (notamment S, C, E et D) et la quantification des fractions d'hémoglobines (Favier et al, 2012).

IV-3- Chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) par échange d'ions

Cette technique permet le dosage des différentes fractions de l'Hb et l'identification d'un nombre important d'Hémoglobines anormales. Elle permet en particulier le dosage d'HbA2 et d'HbF, très utile dans l'interprétation des profils d'Hb pour le diagnostic néonatal de la drépanocytose (Rouessac et al, 1992 ; Kamoun, 1997).

Le prélèvement est injecté dans une colonne de chromatographie remplie par une phase d'échange d'ions (les billes de silice recouvertes par des groupements acides) (Rouessac et al, 1992).

L'élution est réalisée par un gradient de pH ou par la force ionique. Les protéines sont éluées selon leurs charges de telle façon que les protéines les plus chargées négativement sont éluées en premier (Rouessac et al, 1992).

V- Diagnostic clinique et biologique de la drépanocytose

On distingue deux formes cliniques de la drépanocytose, homozygotes qui possèdent essentiellement de l'Hb S et hétérozygotes dont les globules rouges contiennent plus d'Hb A que d'Hb S

Les drépanocytaires homozygotes souffrent d'une anémie hémolytique chronique grave permettant rarement une espérance de vie normale.



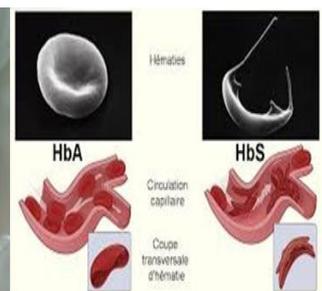
a



b



c



d

Figure 19 : Quelques complications cliniques de la drépanocytose

a : Syndrome mains gonflées ; **b** : Syndrome pieds gonflées ; **c** : Ictère et la pâleur ; **d** : Vaso-occlusions des hématies

La gélation de l'Hb S à l'intérieur de la cellule a deux conséquences majeures :

- La première est une augmentation de la viscosité du sang, ce qui aboutira à des crises vaso-occlusives très douloureuses entraînant des lésions dans divers organes.
- La deuxième conduite à une fragilisation de la membrane cellulaire et à une destruction précoce des cellules, la durée de vie des globules rouges est ramenée à 17 jours contre 120 chez le sujet normal.

V-1- Diagnostic cliniques de la drépanocytose hétérozygote et homozygote**V-1-1- Aspects cliniques de la drépanocytose hétérozygote Hb A/S**

La drépanocytose hétérozygote est une affection cliniquement inapparente (quelques cas de crises drépanocytaires ont été décrits, à type d'infarctus splénique, dans des situations extrêmes (altitude et exercice physique intense) (Gerot et *al*, 2003).

V-1-2- Aspects cliniques de la drépanocytose homozygote Hb S/S

Les signes cliniques principaux de la drépanocytose, sont : la pâleur, l'ictère, et les douleurs osseuses, ils apparaissent quelques mois après la naissance, (la synthèse de l'Hb S débute quand l'Hb F n'est plus présente dans les GR), Ou parfois plus tardivement, vers 2-4 ans (Zandecki et *al*, 2011).

Le syndrome anémique est d'importance variable et la pâleur cutanéomuqueuse peut-être modifié par les crises vaso-occlusives.

Diverses circonstances peuvent provoquer les accidents ischémiques aigus, le plus souvent vaso-occlusifs et douloureux, comme, la déshydratation, l'acidose, l'hyperthermie, l'infection, l'hypoxémie, les troubles ventilatoires, et l'exposition au froid (Zandecki et *al*, 2011 ; Polonovski, 1977).

Les complications chroniques à long terme et les accidents ischémiques aboutissent à des séquelles définitives et diverses altérations sont observables cardiopulmonaires (HTAP), rénales, endocriniennes (retard de croissance), neuro-sensorielles (cécité, surdité, déficits moteurs), ostéoarticulaires, L'atrophie splénique est la règle dans la drépanocytose homozygote Hb S/S, alors qu'une splénomégalie doit faire évoquer une Hb S/β thalassémie (Gerot et *al*, 2003).

Les causes majeures de mortalité chez l'enfant drepanocytaire sont la sensibilité accrue aux infections (notamment pneumocoque et Hemophilus), l'atrophie splénique progressive de la rate (asplénie vers l'âge de 8-10 ans) et l'érythroblastopénie aiguë transitoire suite à une infection avec parvovirus B19 provoque une absence de régénération médullaire et un syndrome anémique sévère (Zandecki et *al.*, 2011 ; Polonovski, 1977).

V-2- Diagnostique biologique de la drépanocytose

V-2-1- Drépanocytose hétérozygote Hb A/S

Le diagnostic est réalisé surtout lors d'une enquête familiale, l'hémogramme est normal, et la morphologie des globules rouge (GR) est normale, avec la présence de quelques cellules falciformes (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

Le test de falciformation ou test d'EMMEL présente la falciformation d'une partie des GR, et le test de solubilité d'ITANO est positif, l'Hb S est le seule à précipiter en milieu réducteur à forte concentration saline, la turbidité de la solution est proportionnelle à la quantité d'Hb S (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

L'électrophorèse de l'hémoglobine montre la présence d'Hb A avec l'Hb S, et le Taux d'Hb S est inférieur à 45% (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

Tableau 2 : Taux de l'hémoglobine chez les drépanocytaires hétérozygotes Hb A/S

Types d'Hb	Hb A	Hb S
Taux en %	55 - 70%	30 - 45%

V-2-2- Drépanocytose homozygote Hb S/S

La drépanocytose homozygote est caractérisée par une anémie progressive après quelques mois de la naissance. Les drépanocytes n'apparaissent que vers 6 mois à une année. La NFS présente une anémie de 7 - 9 g/dl d'Hb, normochrome (CCMH > 31 – 32%), normocytaire (VGM = 80- 100) et un taux de réticulocytes régénérative. Le frottis sanguin révèle la présence constante de drépanocytes (GR en forme de faucille) de 5 -15 %, et de 10 - 30 % d'hématies en cible. Le nombre de leucocytes est normal, ou parfois élevé (polynucléose neutrophile) et les plaquettes de nombre normal, ou parfois thrombocytose (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

Le test de solubilité d'ITANO Positif montre la faible solubilité de l'Hb S à l'état désoxygéné et le test de falciformation déforme la totalité des GR en drépanocytes.

L'électrophorèse de l'hémoglobine prouve l'absence de Hb A avec la dominance de l'Hb S (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

Tableau 3: Taux de l'hémoglobine chez les drépanocytaires homozygotes Hb S/S

Types d'Hb	Hb A	Hb S	Hb A2	Hb F
Taux en %	0 %	80 – 95 %	2 à 3.4 %	1 - 10 %

VI- Diagnostic clinique et biologique de l'association Hb S hétérozygote avec d'autres hémoglobines

On utilise les données de l'hémogramme et notamment le VGM, dans les situations abordées ci-dessous le VGM est nettement diminué (sauf pour l'Hb S/C).

VI-1- Hémoglobinose S et persistance héréditaire de l'Hb fœtale (PHHF)

C'est une maladie, asymptomatique ; anémie absente ou discrète (12 – 14 g/dl chez l'adulte ; VGM microcytotitaire). L'aspect de l'électrophorèse de l'Hb à la naissance peut évoquer une drépanocytose homozygote (perturbe le dépistage systématique). le frottis sanguin présente une microcytose avec hématies en cible, et l'électrophorèse de l'hémoglobine, montre l'absence de Hb A avec un taux élevé de l'Hb F (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

Tableau 4 : Taux de l'hémoglobine selon le type, Hémoglobinose PHHF/S

Type Hb	Hb A	Hb S	Hb A2	Hb F
Taux en %	0 %	30 – 60 %	N	> 20 – 30 %

VI-2-Hémoglobinose S / β thalassémie

Ce sont des manifestations cliniques variables, allant de formes très sévères à des situations quasi asymptomatiques, la splénomégalie est fréquente, à l'opposé de l'Hb S/S où il y a atrophie splénique.

VI-2-1- Hémoglobinose S / β_0 thalassémie

C'est une maladie souvent sévère, avec splénomégalie, pas de synthèse d'Hb A. Le taux de l'Hb est de 7 à 10 g/dl avec Microcytose (différence avec drépanocytose homozygote) (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

L'absence de drépanocytes (ou très rares) au frottis sanguin avec de nombreux GR en larme et des hématies cibles (Zandecki *et al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

L'électrophorèse de l'Hb montre l'absence de l'Hb A, et les taux d'Hb A₂ et Hb F sont supérieur à la norme notamment l'Hb F (différence avec Hb S/S).

Tableau 5 : Taux de l'hémoglobine selon le type, Hémoglobinoses S / β₀ thalassémie

Type Hb	Hb A	Hb S	Hb A ₂	Hb F
Taux en %	0 %	> 80 %	4 – 6%	5 -20%

VI-2-2- Hémoglobinoses S / β⁺ thalassémie

C'est une maladie plus au moins symptomatique, avec splénomégalie, et une synthèse d'Hb A en quantité faible et une anémie modérée (Hb de 10 à 12 g/dl).

L'absence de drépanocytes (ou très rares) au frottis sanguin avec des nombreux GR en larme et des hématies cibles.

L'électrophorèse de l'Hb montre que les taux d'Hb A₂ et Hb F sont supérieurs aux normes notamment l'Hb F et la présence de Hb A avec un taux faible (différence avec Hb S/S).

Tableau 6 : Taux de l'hémoglobine selon le type, Hémoglobinoses S / β⁺ thalassémie

Type Hb	Hb A	Hb S	Hb A ₂	Hb F
Taux en %	10 – 30 %	60 – 80 %	4 – 6%	5 -20%

VI-3- Hémoglobinoses S / α thalassémie

L'association d'une α thalassémie avec une hémoglobinoses S diminue la quantité d'HbS de l'hématie, et diminue sa tendance à se cristalliser. Les malades subissent des crises douloureuses fréquentes, mais des complications moins nombreuses, absence d'anémie, mais avec microcytose et hypochromie.

Tableau 7 : Quantité d'Hb S à l'électrophorèse Hémoglobinoses S / α thalassémie

types	Quantité d'Hb S à l'électrophorèse
Hb S hétérozygote sans thalassémie	35 – 45 %
Hb S hétérozygote et - α / $\alpha\alpha$	30 – 35 %
Hb S hétérozygote et - α / α	20 – 30 %
(Hb S avec hémoglobine H est très rare)	
Hb S homozygote et - α / α	tableau de drépanocytose biologiquement moins franc (pas de drépanocytes) mais pas de diminution de la sévérité clinique

VI-4- Hémoglobine S/C

C'est une maladie drépanocytaire plus modérée avec crises douloureuses moins fréquentes, mais les complications sont possibles, notamment une perte progressive de la vision à l'âge adulte (rétinopathie) (Zandecki et *al*, 2011 ; Polonovski, 1977).

Une anémie modérée Hb de 10 à 14 g/dl, Microcytose modérée ou absente le VGM est de 75 à 90 (Polonovski, 1977).

Le frottis sanguin présente des hématies en cible de 30 à 50 %, les drépanocytes très rares, mais quelques « gros drépanocytes » ou GR en forme de bateau, parfois quelques GR déformés avec une zone claire sans Hb et une partie dense d'Hb C polymérisée sous forme de cristaux de forme anguleuse (Zandecki et *al*, 2011 ; Polonovski, 1977).

L'électrophorèse de l'Hb montre la présence de l'Hb C avec un taux proche de ce de l'Hb S (Zandecki et *al.*, 2011 ; Baledent, 2000).

Tableau 8 : Taux de l'hémoglobine par type, Hémoglobine S/C

Type Hb	Hb A	Hb S	Hb C	Hb A ₂	Hb F
Taux en %	0 %	40 – 50 %	40 – 50 %	N	N ou \pm augmentée.

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

I-Matériels et méthodes

I-1-Lieu de l’expérimentation

Cette étude est réalisée au niveau de laboratoire central de l’Etablissement Public Hospitalier (EPH), Tirichine Brahim, situé à Sidi Abbaz commune de Bounoura wilaya de Ghardaïa.

I-2- Echantillon

Notre étude est effectuée sur 46 patients, qui sont suivis au niveau de l’EPH de Ghardaïa. Les échantillons de sang, sont prélevés sur une période de trois mois (février, mars et avril) de l’année 2017. Le prélèvement peut être effectué sur du sang capillaire ou sur du sang veineux recueilli sur EDTA (éthylène diamine tétra acétique).

I-3- Région d’étude

La wilaya de Ghardaïa se situe dans la partie nord Saharienne de l’Algérie, avec une population de 450 000 habitants (DPSB, 2015), elle est connue par la présence des mariages consanguins, qui augmentent par conséquence le pourcentage d’apparition des maladies héréditaire, dont la drépanocytose.

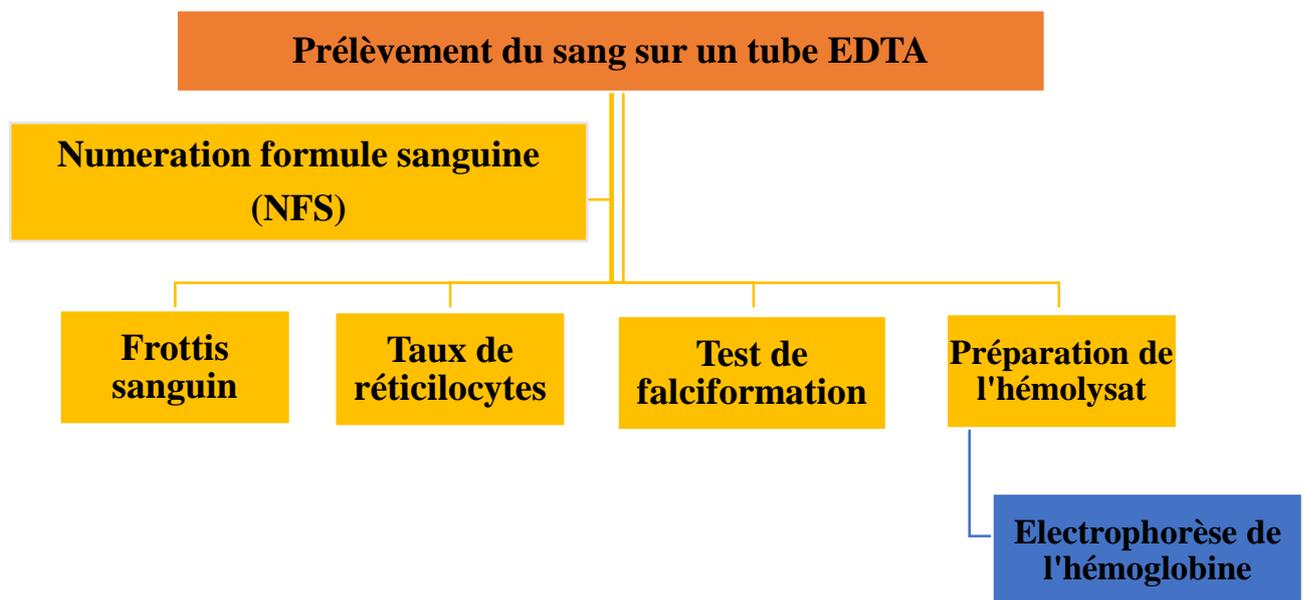


Figure 20 : Procédure expérimentale des différents essais

I-4- Prélèvement et conservation du sang

Pour mieux interpréter les résultats fournis par les examens effectués, un formulaire renfermant tous les renseignements des patients, est rempli par leur médecin traitant (annexe1).

Tous les examens hématologiques s'effectuent le même jour de prélèvement du sang, sauf l'électrophorèse de l'hémoglobine, puisque elle est liée à la collecte d'un nombre précis d'échantillons (indiquée sur la plaque de gélose), et qui est 13 échantillons dans notre cas.

Les différentes techniques d'exploration sont réalisées sur sang total EDTA (acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique), 4ml de sang est recueilli, et peut être conservé durant 7 jours à +4°C, et un mois à -20°C (Biomnis, 2012).

I-5- Examens hématologiques

I-5-1- Numérotation de la Formule Sanguine (NFS)

I-5-1-1 Intérêt du dosage

Cet examen est le premier a effectué, il est essentiel pour apprécier des perturbations dites « périphériques » (anémies, augmentation des globules blancs en réponse à une attaque de l'organisme, problème des plaquettes...), il est réalisé par un automate du laboratoire Sysmex ou Mindray.

La numération sanguine consiste à compter les différents éléments cellulaires du sang à savoir :

- Globules blancs (ou leucocytes),
- Globules rouges (ou hématies)
- Plaquettes sanguines.

Des paramètres liés à ces éléments sont également mesurés pour certains (taux d'hémoglobine, volume globulaire moyen = VGM) ou calculés (hématocrite, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine = TCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine = CCMH).

I-5-1-2-Etapes de réalisation

Chaque échantillon est identifié par un numéro mentionné sur le tube, le bon d'examen, ainsi que les registres d'hématologie et de l'électrophorèse de l'hémoglobine. Chaque tube est mélangé soigneusement avant l'utilisation pour le rendre homogène et le placé dans le cylindre de l'automate.



Figure 21 : Etapes de la réalisation de la NFS sur automate

1 : Echantillons du sang total sur tube EDTA

2 : Passage du sang par l'automate

3 : Résultat fournis par l'automate

1-5-2-Frottis sanguin

Le frottis sanguin permet l'observation et l'évaluation des variations morphologiques des différentes cellules sanguines (les drépanocytes).

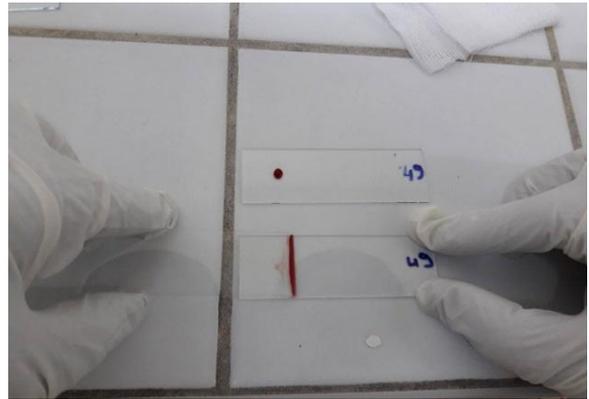
La réalisation d'un frottis sanguin est faite selon les étapes suivantes :

- Chaque lame porte le numéro d'échantillon ;
- Agiter le tube soigneusement pour le rendre homogène ;
- Déposer une gouttelette de sang à l'aide d'une micropipette près de l'extrémité d'une lame ;
- Mettre l'extrémité d'une seconde lame en contact avec la gouttelette et laissez cette dernière s'incliner également derrière la lame, l'angle entre les deux lames doit être de 30 à 40 degrés ;
- Etaler vers la gauche dans un mouvement fluide et rapide, le frottis devrait couvrir près de la moitié de la lame ;
- Lame séchée pendant 5 à 10 min à l'air libre,

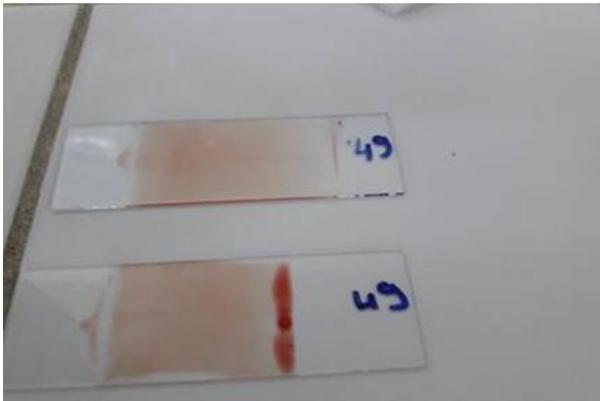
- Rinçage avec le méthanol pour la fixation
- Séchage de la lame pendant 5 à 10 min à l'air libre ;
- Coloration avec MGG (May Grünwald GEIMSA) ;
- Rinçage avec de l'eau de robinet ;
- Séchage pendant 5 à 10 min à l'air libre ;
- Observez les frottis au microscope à l'objectif x 100.



1



2



3



4

Figure 22 : Etapes de la réalisation d'un frottis sanguin

- 1 : Mettre une goutte de sang
- 2 : Etalement de la goutte de sang
- 3 : Frottis sanguin avant coloration
- 4 : Frottis sanguin pré a la lecture

1-5-3- Taux de réticulocytes

La numération des réticulocytes renseigne sur l'activité érythropoïétique de la moelle osseuse, (taux de réticulocytes très élevé chez les drépanocytaires), les étapes de cet examen sont :

- Agiter le tube du sang (EDTA) pour une homogénéisation ;
- Ajouter dans le tube sec 100 μmol du sang plus 100 μmol du colorant bleu de crésyl brillant ;
- Mettre le tube préparé dans l'étuve pendant 20 minutes ;
- Mettre une goutte du mélange sur une lame ;
- Étalement de la goutte pour avoir un frottis ;
- Séchage de 5 à 10 min à l'air libre ;
- Lecture au microscope a l'objectif x100.



1

2

3

Figure 23 : Test de numération de taux de réticulocytes

1 : Préparation des échantillons de sang

2 : Etalement du sang coloré

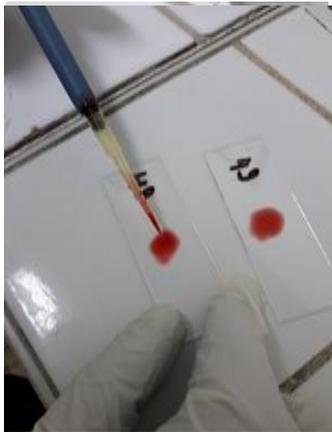
3 : Lames prêtes à la lecture

I-5-4-Test de falciformation

La Stimulation du manque de l'oxygène chez les hématies provoque une falciformation subtotale et facile à observer.

Le test consiste à mettre une très petite goutte de sang (environ 5 μ l) sur une lame, juste à côté mettre une autre goutte environ 4 fois plus épaisse (environ 20 μ l) de l'eau physiologique (eau avec 9 g/l de sel).

- Mélanger rapidement et soigneusement les deux gouttes ;
- Aspirer environ la moitié du liquide ;
- Couvrir rapidement d'une lamelle sans faire aucune bulle d'air ;
- Recouvrir les 4 bords de lamelle avec de la paraffine pour que l'oxygène ne puisse pas pénétrer ;
- Observer au microscope, objectif 40, après 1 heure puis après 2 h, 6h et 24 heures.



1

2



3



4

Figure 24 : Test de falciformation

- 1 : Mettre une goutte de sang sur la lame
- 2 : Recouvrement de la goutte du sang avec une lamelle
- 3 : Recouvrement des bords de lamelle avec de la paraffine
- 4 : Lames prêtes à la lecture

I-6- Electrophorèse de l'hémoglobine

L'électrophorèse de l'hémoglobine analyse les différentes formes d'hémoglobine du sang (qualitative, et quantitative différentes selon l'âge), pour but de confirmer les examens hématologiques précédents.

Pour la mise en place de l'analyse électrophorétique on utilise :

- Echantillons préparés le jour même « hémolysât ».
- kit de réactifs d'électrophorèse de l'hémoglobine.
- Automate d'électrophorèse Interlab G26.

I-6-1-Préparation de l'hémolysât

D'abord il faut extraire l'hémoglobine contenue à l'intérieur des globules rouges par l'hémolyse.

I-6-1-1-Lavage des globules rouges

- Centrifuger le sang entier à 5000 tr / min pendant 5 minutes ;
- Retirer le surnageant ;
- Ajouter 2 ml de solution saline dans le tube et agiter doucement les globules rouges en inclinant le tube ;
- Centrifuger à 5000 tr / min pendant 5 minutes et éliminer le surnageant ;
- Répétez les étapes jusqu'à que le surnageant semble clair et incolore.

I-6-1-2-La Lyse des globules rouges

- Mélanger 50 µl de globules rouges lavés avec 200 µl de réactif de l'hémolyse (Fig.25) ;
- Incuber 5 minutes à température ambiante (15 ° C à 30 ° C) avant de distribuer l'hémolysât.

I-6-2-kit de réactifs d'électrophorèse de l'hémoglobine



Le kit

Figure 25 : Kit de produits d'électrophorèse

contient :

- Plaques de gel d'agarose,
- Eponges tamponnées (2 pièces),
- Solution de l'hémolyse (60 ml),
- Colorant bleu acide (500 ml),

- Solution de lavage pour applicateurs (80 ml),
- Plaques d'échantillons jetables (10 pièces).



Figure 26 : Composants du kit de réactifs d'électrophorèse de l'hémoglobine

- 1 : Plaque de gel d'agarose,
 2 : Eponges tamponnées (2 pièces),
 3 : Solution de l'hémolyse (60 ml),
 4 : Colorant bleu acide (500 ml),
 5 : Solution de lavage pour applicateurs (80 ml),
 6 : Plaques d'échantillons jetables (10 pièces)

I-6-3-Automate Interlab G26

L'Interlab G26 (Fig. 28 a et b) est un système d'électrophorèse automatisé qui fonctionne, sur de petites plaques de gel d'agarose soutenu par un film plastique,

Il fonctionne en conjonction avec un ordinateur personnel sur lequel s'exécute un Logiciel comportant des menus déroulants et des icônes intuitives, pour un contrôle facile de l'instrument, de la sélection des méthodes analytiques, et d'évaluation et gestion des données.

Les petites dimensions des plaques Permettent de travailler avec de petites quantités de réactifs et les plaques électrophorétiques sont automatiquement scannées par un densitomètre intégral.



Figure 27 : Automate de l'électrophorèse Interlab G26

I-6-3-1-Etapes manuelles d'utilisations de

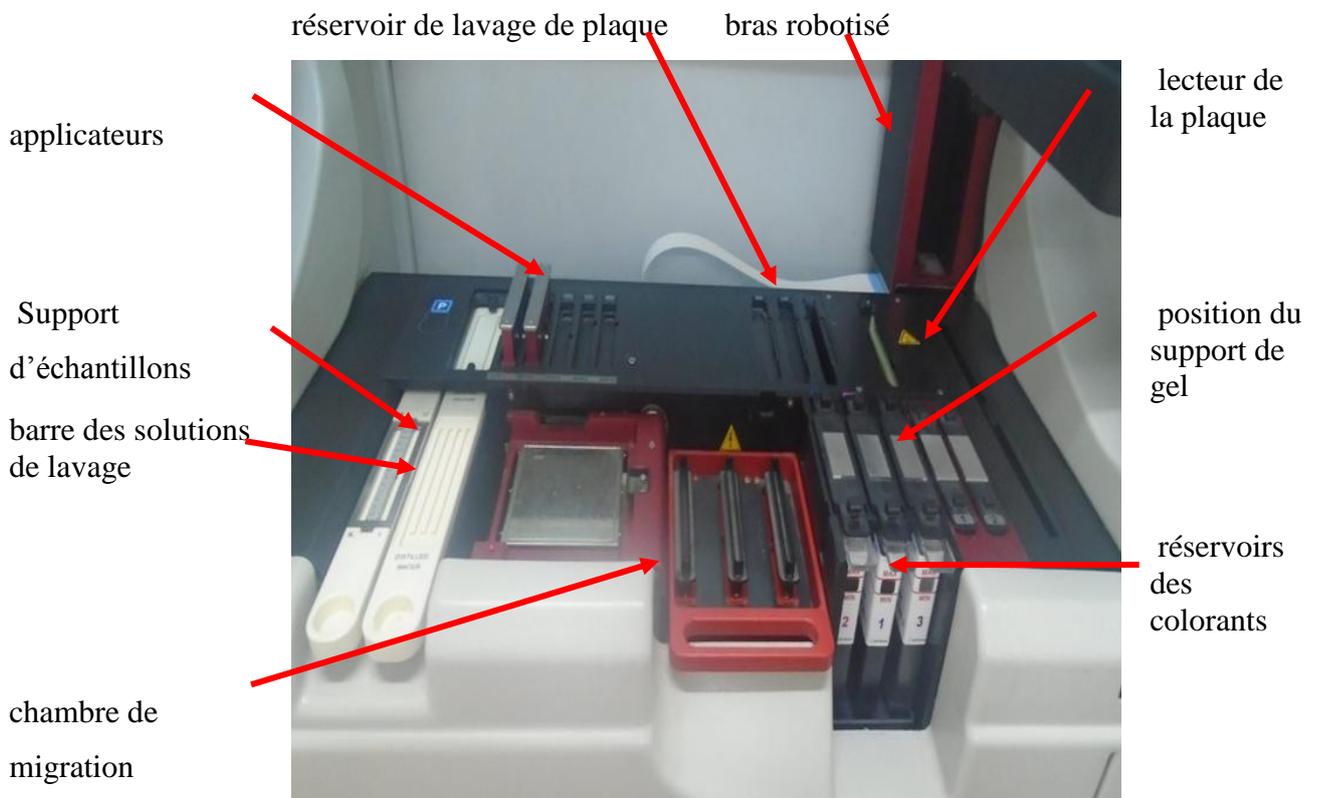
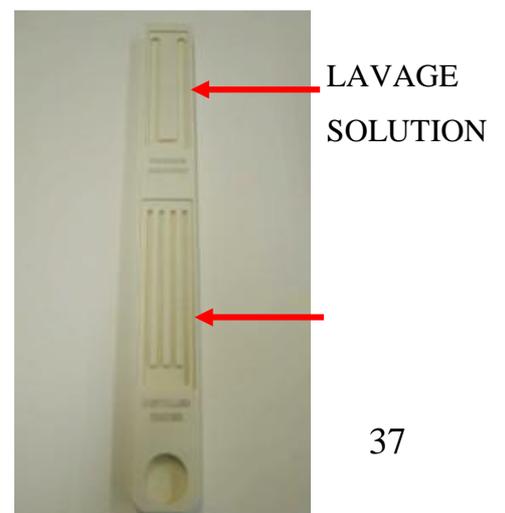


Figure 28 : Accessoires de l'automate de l'électrophorèse Interlab G26

l'automate d'électrophorèse Interlab G26

On commence d'abord par la vérification de niveau du liquide dans le réservoir de déchets (pour le vider s'il est plein), et que les applicateurs sont dans leurs positions appropriées (responsables de mettre les échantillons sur la plaque de gel d'agarose) (Fig.29), puis le remplissage des réservoirs avec les solutions et les volumes appropriés.



Le réservoir de solution de coloration « 1 » doit être rempli avec une quantité de solution comprise entre le niveau MIN et le niveau MAX suggéré, et le réservoir de solution de décoloration contient au moins 3 L.

DISTILLED
WATER

Allumez l'Interlab G26 et le microordinateur correspondant, et Utilisez le logiciel Elfolab pour sélectionner le type d'analyse électrophorétique (Electrophorèse de l'hémoglobine).

Figure 29 : Barre de solution de lavage

Les solutions de lavage pour les applicateurs sont remplies respectivement dans une barre de solution de lavage :

- Distribuer 6 ml d'eau distillée dans le compartiment "DISTILLED WATER" de la barre (Fig.29).
- Distribuer 7 ml de solution de lavage pour les applicateurs dans le compartiment "LAVAGE SOLUTION" de la barre (Fig.29).

Les puits de la plaque des échantillons jetables sont numérotés, grâce à une serrure métallique, on doit respecter l'ordre numérique lors du remplissage des échantillons, chaque numéro est associé à un patient selon la feuille de travail d'analyse.

- Placez une plaque des échantillons jetable dans la barre 'SAMPLE' (Fig.30) ;
- Mettez le cadre métallique sur la plaque d'échantillon jetable (Fig.30) ;
- Distribuer 30µl de chaque échantillon dans les puits (Fig.30) ;
- Diffuser les échantillons comme spécifié (Fig.30).



Figure 30 : Placement des échantillons

La chambre de migration doit être préparée, avec un ensemble de deux éponges tamponnées jetables, ils doivent être insérés dans leurs intervalles appropriés.

- Extraire la chambre de migration ;

- Décoller le film en aluminium de la boîte contenant les éponges tamponnées ;
- Insérer les éponges tamponnées dans leurs intervalles appropriés (Fig.31) ;
- Installation de la chambre de migration (Fig.31).

La plaque de gel est insérée dans un cadre appelé « Gel Holder », le support de gel est ensuite inséré à l'intérieur de l'aire de stationnement de l'instrument, dans le stationnement approprié.

- Décoller le film en aluminium de la boîte contenant la plaque de gel d'agarose, Faites glisser le gel dans le support (Fig. 32) ;
- Il faut s'assurer que la plaque de gel est correctement et fermement positionnée.

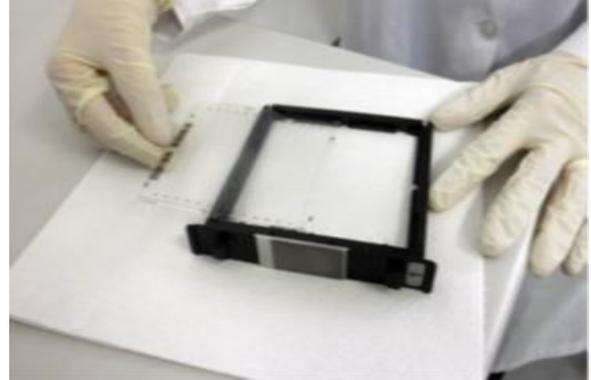


Figure 32 : Placement de gel dans le support.

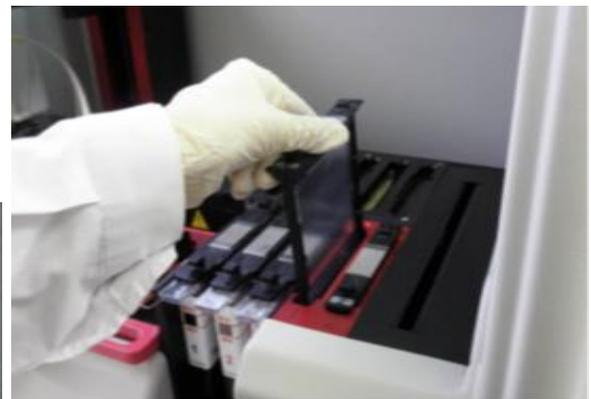


Figure 33 : Insertion de support de gel en sa position de départ.

- Insérer le support de gel en sa position de départ (fig.33).

À la fin, on doit fermer le capot avant, et utiliser le logiciel Interlab G26 pour démarrer le processus de démarrage de l'analyse électrophorétique.

I-6-3-2- Etapes effectuées par l'automate Interlab G26

Une fois l'analyse démarrée, le bras robotisé de l'instrument porte le support de gel et le déplace à la zone d'application,

Figure 31 : Placement des éponges tamponnées dans la chambre de migration. puis il utilise l'applicateur pour mettre les échantillons sur la plaque de gel d'agarose, l'applicateur est ensuite lavé dans la barre de lavage.

Le support de gel est ensuite déplacé vers la zone de migration où la migration a lieu en raison du Champ électrique généré par les électrodes et par les éponges tamponnées.

Après la migration, le support de gel est déplacé vers une zone de séchage où le gel d'agarose est dénaturé.

Après cette étape, le bras robotique déplace le support de gel dans la zone de coloration, dans le réservoir rempli avec le colorant bleu acide.

Après la coloration, le bras robotique déplace le support de gel à la zone de décoloration, dans le réservoir qui sera rempli automatiquement avec la solution décolorante.

Après la coloration, et le lavage de la plaque, le bras de l'instrument déplace le support de gel dans la zone de séchage où la plaque est séchée.

À la fin, le bras déplace le support de gel à la zone de lecture pour la lecture. Toutes les commandes sont envoyées à l'instrument par les logiciels Elfolab et Interlab G26 qui fonctionnent sur L'ordinateur personnel.

Le programme Elfolab est consacré aux données des patients et à l'analyse de base de données de résultats, tandis que le logiciel Interlab G26 est entièrement dédié au contrôle de l'instrument, la sélection de la méthode, le commencement de l'analyse et le suit de ses phases différentes dans la Fenêtres Interlab G26.

Résultats et discussions

II- Résultats et discussions

L'électrophorèse de l'hémoglobine est un examen spécifique, demandé par des médecins spécialiste, lorsqu'il s'agit d'un doute.

Il a été Constaté, le nombre des patients examinés au niveau de laboratoire est limité, et cela au cours de l'élaboration de notre étude pendant la durée de trois mois.

A cet effet, des patients connus, suivis au niveau de L' EPH de Ghardaïa, ont étaient convoqués avec leurs familles pour procéder à une enquête familiale.

Les examens hématologiques et élèctrophorétique effectué sur 46 patients, ont donné un résultat présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : Nombre de chaque type de patients

Types de Patients	drépanocytaires		Avec autre hémoglobinopathie		Pas d'hémoglobinopathie	Total
	Hétérozygote	Homozygote	α thal	β thal		
Nbr de patients	15	11	1	1	18	46

Nbr : Nombre

α thal : α thalassémie hétérozygote

β thal : β thalassémie hétérozygote

Nous remarquons que presque la moitié des patients (20 patients), ne présentent aucune anomalie de l'hémoglobine, dont deux parmi eux ont une anomalie quantitative (α thalassémie, et β thalassémie) ; les patients restants (26 patients) sont divisés en deux catégories, 11 patients drépanocytaires homozygotes, et 15 patients drépanocytaires hétérozygote

Les résultats obtenus sont divisés en quatre groupes, les drépanocytaires homozygotes, les drépanocytaires hétérozygotes, les patients avec autre hémoglobinopathie et d'autres qui ne possèdent aucune anomalie de l'hémoglobine.

II-1- Examens hématologiques

Les résultats des examens hématologiques, sont exprimés dans les tableaux suivants :

II-1-1- Patients drépanocytaires homozygotes

Tableau 10 : Patients drépanocytaires Homozygotes

N°	Age (ans)	Taux d'Hb (g/dl)	Frottis sanguin (drépanocytes)	Taux de réticulocytes	Test de falciformation
01	14	08.6	Présence	Régénérative	+++
02	22	09.1	Présence	Régénérative	+++
03	3	04.8	Présence	Régénérative	+++
04	39	10.4	Présence	Arégénérative	+++
05	2	07.4	Présence	Régénérative	+++
06	18	07.0	Présence	Arégénérative	+++
07	15	07.3	Présence	Régénérative	+++
08	25	06.4	Présence	Régénérative	+++
09	7 (Mois)	10.0	Présence	Régénérative	+++
10	03	08.3	Présence	Régénérative	+++
11	02	06.2	Présence	Régénérative	+++

Hb : Hémoglobine

Nous constatons que les patients drépanocytaires homozygotes ont une anémie normochrome, normocytaire plus au moins sévère. Le taux de l'hémoglobine de ces patients est entre 4.3g/dl et 10 g/dl avec une moyenne de 7.77 g/dl, ces valeurs sont proches à celles trouvées par Balédent (2000) qui sont entre 6 g/dl et 8 g/dl.

L'examen du frottis sanguin révèle la présence d'hématies en forme de "faucille" ou drépanocytes qui caractérise cette maladie.

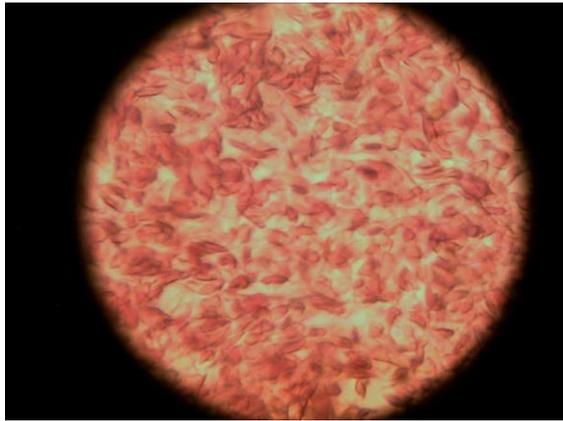
Les hématies observées ont une forme allongée avec deux extrémités pointues (Fig.34b2).

Les frottis sanguins des malades drépanocytaires homozygotes présentent un nombre plus au moins, élevé des hématies de forme de faucille.

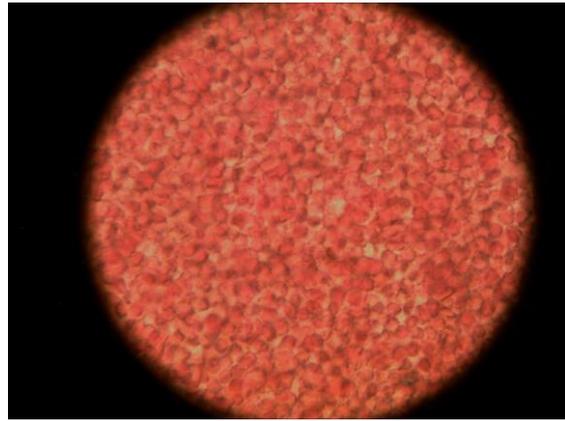
Les résultats présentés dans le tableau X, montrent que le taux de réticulocytes est très élevé chez les patients drépanocytaires homozygotes (Fig.34b1), et il est régénérative dans la majorité des cas sauf pour 2 patients où il est arégénérative. Le taux normal des réticulocytes quel que soit l'âge et le sexe varie entre 25 000 et 75 000 éléments/ mm³ environ. Il renseigne sur la

production médullaire si il est $25\ 000 <$ on parle de l'insuffisance de production (anémie arégénérative), et si il est $75\ 000 >$ excessive (anémie régénérative).

Le test de falciformation permet de confirmer et de détecter de façon spécifique les cellules falciformes (forme de faucille), Chez les patients drépanocytaires, les hématies prennent progressivement la forme typique en "faucille", le tableau indique que tous les tests sont fortement positifs (Fig.34a).



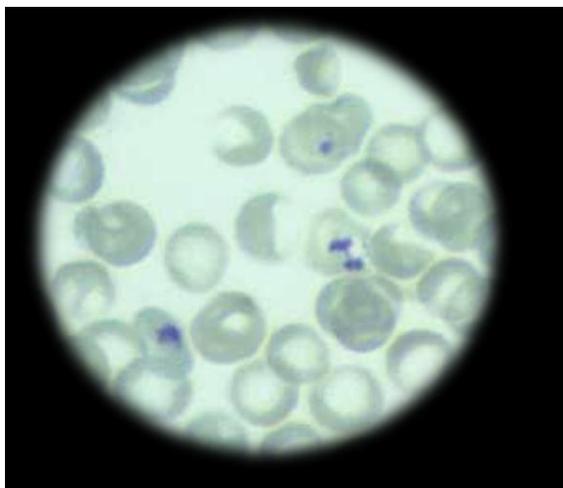
a1



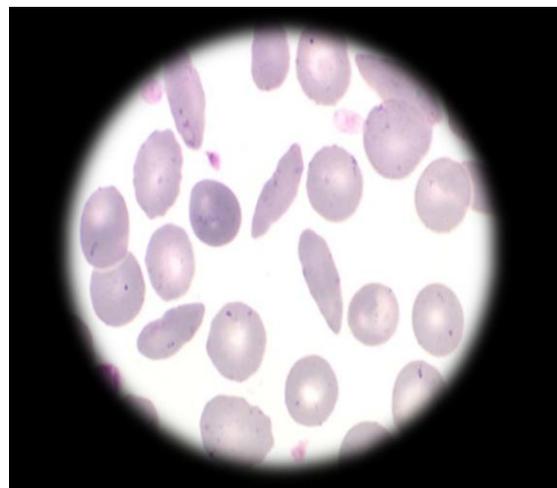
a2

Figure 34a : Aspect des hématies en test de falciformation sous microscope (x 40)

a1 : Hématies falciformes ; a2 : Hématies de forme normale



b1



b2

Figure 34b : Aspect des hématies sous microscope (x 100)

b1 : Hématies en taux de réticulocytes ; b2 : Hématies en frottis sanguin

II-1-2- Patients drépanocytaires hétérozygotes

Tableau 11 : Résultats des patients drépanocytaires Hétérozygotes

N°	Age (ans)	Taux d'Hb (g/dl)	Frottis sanguin (drépanocytes)	Taux de réticulocytes	Test de falciformation
01	64	09.9	Quelques	Régénérative	+
02	08	11.7	Quelques	/	+
03	44	09.0	Quelques	Régénérative	+
04	04	10.9	Quelques	Régénérative	+
05	10	11.5	Quelques	/	+
06	11	11.3	Quelques	/	+
07	15	12.2	Quelques	/	+
08	36	12.0	Quelques	/	+
09	40	10.3	Quelques	Régénérative	+
10	29	09.0	Quelques	Régénérative	+
11	50	13.9	Quelques	/	+
12	31	12.1	Quelques	/	+
13	40	10.7	Quelques	Régénérative	+
14	08	11.3	Quelques	/	+
15	07	10.9	Quelques	Régénérative	+

Pour les drépanocytaires hétérozygotes le taux de l'hémoglobine est dans les normes par rapport à celui des drépanocytaires homozygotes, il varie entre 9,0 g/dl et 13,9 g/dl, avec une moyenne de 11,33 g/dl, qui est justifié par la présence de l'hémoglobine A normal.

On prenant en considération d'autres causes de la petite baisse de taux de l'hémoglobine présentés dans le tableau précédent chez certains patients, le taux de l'hémoglobine est considéré comme étant normal dans la majorité des cas étudiés, dans les autres cas en remarque une anémie légère.

Chez les patients drépanocytaires hétérozygotes, le nombre des hématies falciformes observés dans un frottis sanguin est faible.

Le taux de réticulocytes ne s'effectue que dans le cas des anémies, les résultats présentés dans le tableau, montrent quelque cas d'anémie légère dont leurs taux de réticulocytes est régénérative.

Parfois, l'examen du frottis sanguin des patients drépanocytaire hétérozygotes, ne nous permet pas de bien observer les cellules déformer ; Pour cela, il est nécessaire de réaliser au laboratoire le test de falciformation en cas de doute d'une maladie drépanocytaire.

Comme il est indiqué dans le tableau 11, les hématies testées par cette méthode, prennent partiellement la forme en "faucille".

II-1-3- Patients ayant autre hémoglobinopathies

Tableau 12 : Résultats des patients ayant autre hémoglobinopathies

N°	Age (ans)	Taux d'Hb (g/dl)	Frottis sanguin (drépanocytes)	Taux de réticulocytes	Test de falciformation	Variété d'hémoglobinopathies
01	45	11.9	Absence	/	Négatif	α thalassémie hétérozygote
02	41	11.9	Absence	/	Négatif	β thalassémie hétérozygote

Le taux de l'hémoglobine indique une anémie légère de 11,9 g/dl d'Hb dans les deux cas d'hémoglobinopathies

A partir du frottis sanguin, nous constatons que la forme des globules rouges est normale, on remarque la présence des cellules cible (hématies avec un centre blanc), et la diminution du volume globulaire moyen (VGM).

Le test de falciformation est négatif, aucun changement de forme de globule rouge n'est remarqué.

II-1-4- Patients qui ne présentent pas une pathologie de l'hémoglobine

Tableau 13 : Patients qui ne présentent pas une pathologie d'hémoglobine

N°	Age (ans)	Taux d'Hb (g/dl)	Frottis sanguin (drépanocytes)	Taux de réticulocytes	Test de falciformation
01	33	09.5	RAS	régénérative	/
02	A	10.3	RAS	régénérative	/
03	1 (Mois)	11.7	RAS	/	/
04	4	10.7	RAS	régénérative	Négatif
05	5	12.6	RAS	/	/
06	A	07.9	RAS	régénérative	Négatif
07	50	12.3	RAS	/	/
08	39	11.8	RAS	/	/
09	A	12.8	RAS	/	/
10	10	11.9	RAS	/	/
11	2	04.5	RAS	régénérative	Négatif
12	3	10.8	RAS	régénérative	Négatif
13	A	11.9	RAS	/	/
14	1	10.8	RAS	régénérative	Négatif
15	A	11.1	RAS	/	/
16	A	13.4	RAS	/	/
17	A	08.4	RAS	régénérative	/
18	A	13.0	RAS	/	/

A : adulte

RAS : rien à signaler

Dans le tableau 13 des patients qui ne présentent aucune pathologie le taux de l'hémoglobine varie de 4,5 g/dl à 13,4 g/dl, cette variation peut être expliquée par la carence du fer et/ou des vitamines (B9 et B12) ou par un problème dans l'hématopoïèse, ou autres.

Le taux de réticulocyte est régénérative, pour les patients qui représentent une anémie.

Absence des drépanocytes dans Les frottis sanguins et les tests de falciformations (forme globulaire normale).

II-2- Electrophorèse de l'hémoglobine

Après la fin de toutes les phases de l'électrophorèse, on récupère la plaque finale (Fig 35) pour la comparaison et les confirmations des résultats données par l'Interlab G26.



Figure 35 : Plaque prête à la lecture

Le groupe des patients examinés qui ne possèdent aucune pathologie de l'hémoglobine, ayant profils électrophorétiques normaux (sans anomalie), les taux de l'hémoglobine A, A2 et F sont dans les normes.

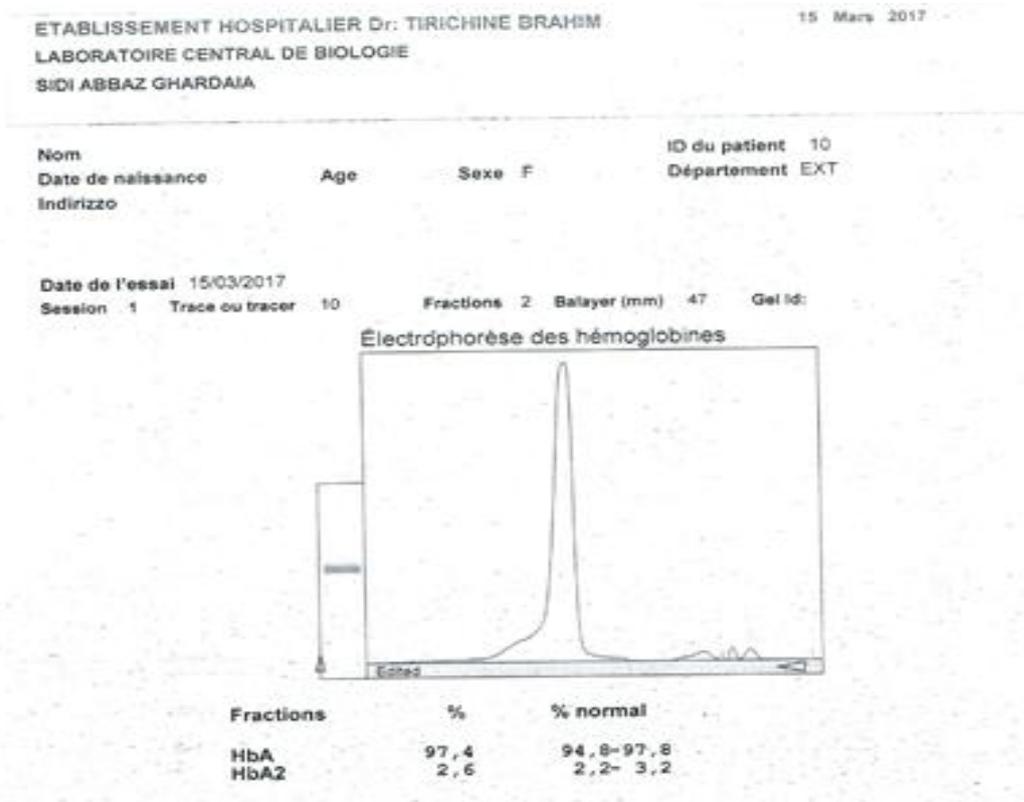


Figure 36a : Profil électrophorétique d'un patient normal (sans hémoglobinopathie)

Le groupe des deux patients, dont l'un possède la β thalassémie hétérozygote, avec un profil électrophorétique caractérisé par une augmentation de l'Hb A2 par rapport à la norme.

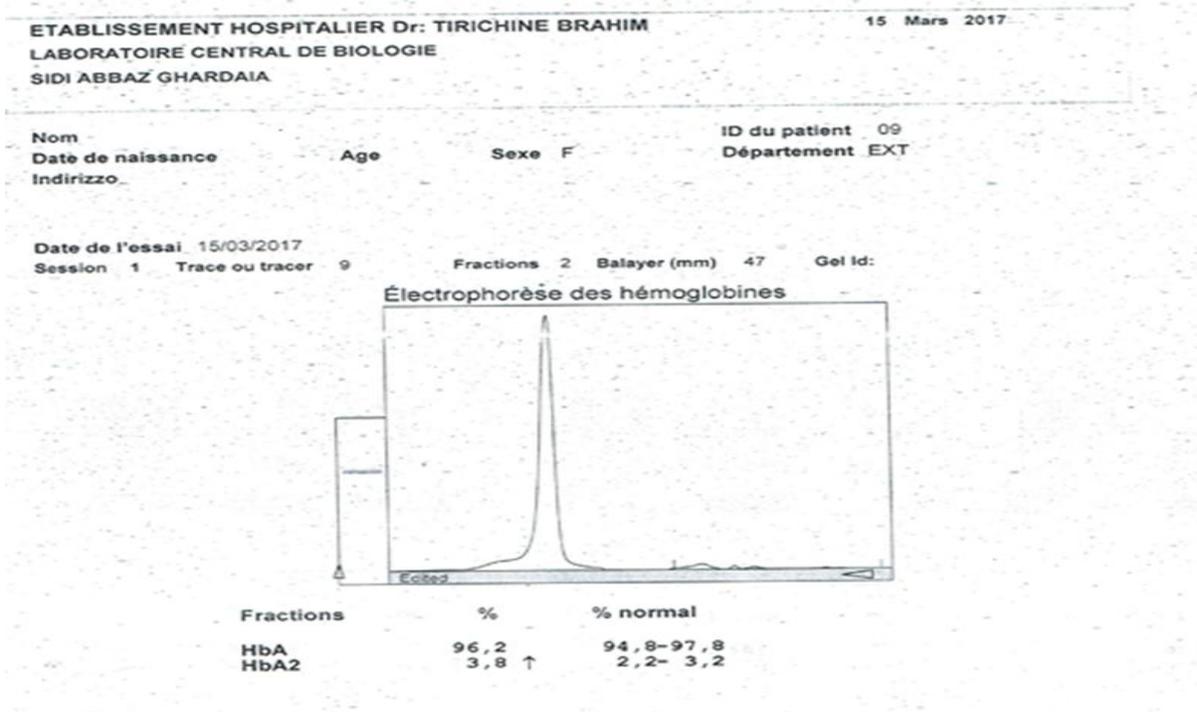


Figure 36 b : Profil électrophorétique d'une β thalassémie hétérozygote

Par contre le deuxième patient possède la α thalassémie hétérozygote, représente une diminution de l'Hb A2 (voir profil).

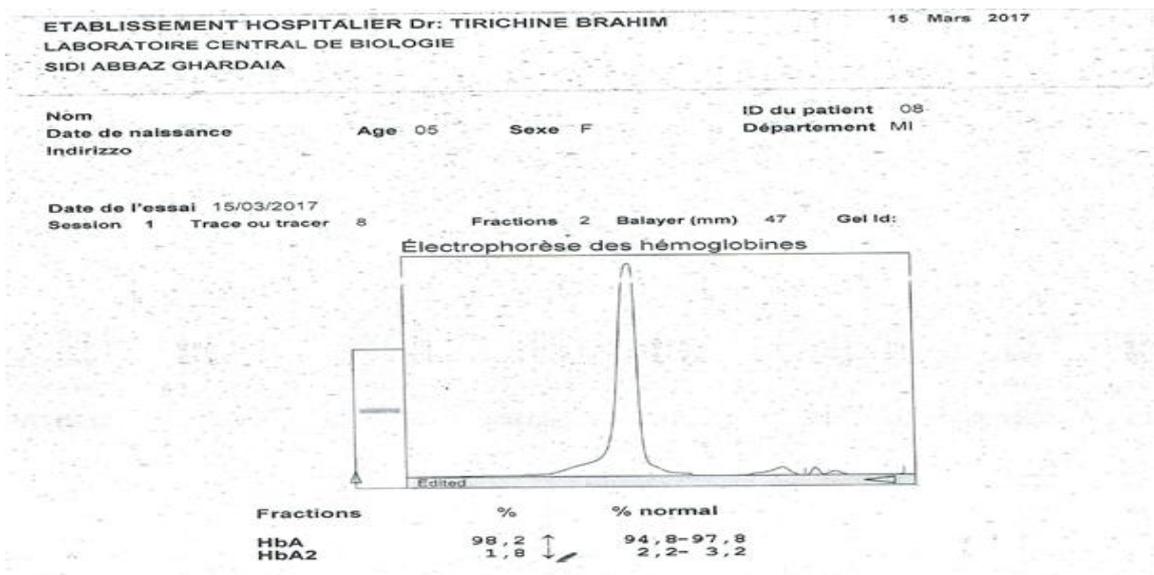


Figure 36 c : Profil électrophorétique d'une α thalassémie hétérozygote

II-2-1- Patients drépanocytaires homozygotes

Le profil électrophorétique des patients drépanocytaires homozygote, est caractérisé principalement par l'absence de l'Hb A, et la présence des taux élevés de l'Hb S, supérieure à 60%.

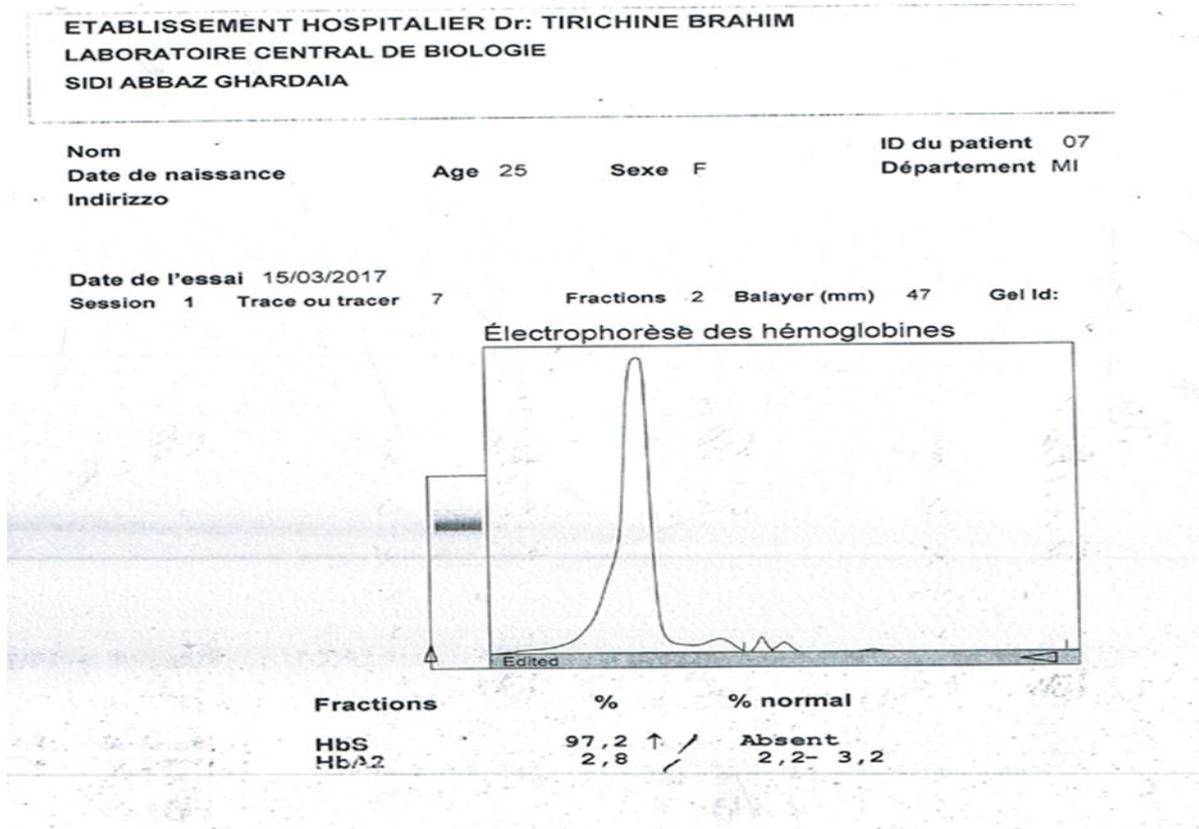


Figure 36 d : Profil électrophorétique drépanocytoses homozygotes

Le tableau ci-dessous, montre que les taux de l'hémoglobine S des patients drépanocytaires homozygotes sont très élevés, et nous orientent vers le diagnostic homozygote, ce qui confirme les résultats hématologique, et les signes clinique.

Le taux de l'hémoglobine S est compris entre 58.1% et 96.2 % (Tableau 14) dont le taux de 58.1% de patient N° 09 est expliqué par la présence d'Hb F (âge inférieur a 1 ans).

Tableau 14 : Taux de l'hémoglobine S chez les patients drépanocytaires homozygote

N°	01	2	03	04	05	06	07	08	09	10	11
Age (ans)	14	24	03	48	02	18	15	25	07 (mois)	03	02
Sexe	M	F	M	F	F	M	M	F	F	M	F
Taux Hb S (%)	73.0	63.4	87.1	85.7	64.7	95.6	96.2	97.2	58.1	77.3	71.9

M : masculin

F : féminin

II-2-2- Patients drépanocytaires hétérozygotes

Le profil des patients drépanocytaires hétérozygotes affiche la présence de l'Hb S ainsi que l'Hb A ; le taux de l'Hb S est inférieur à 45%.

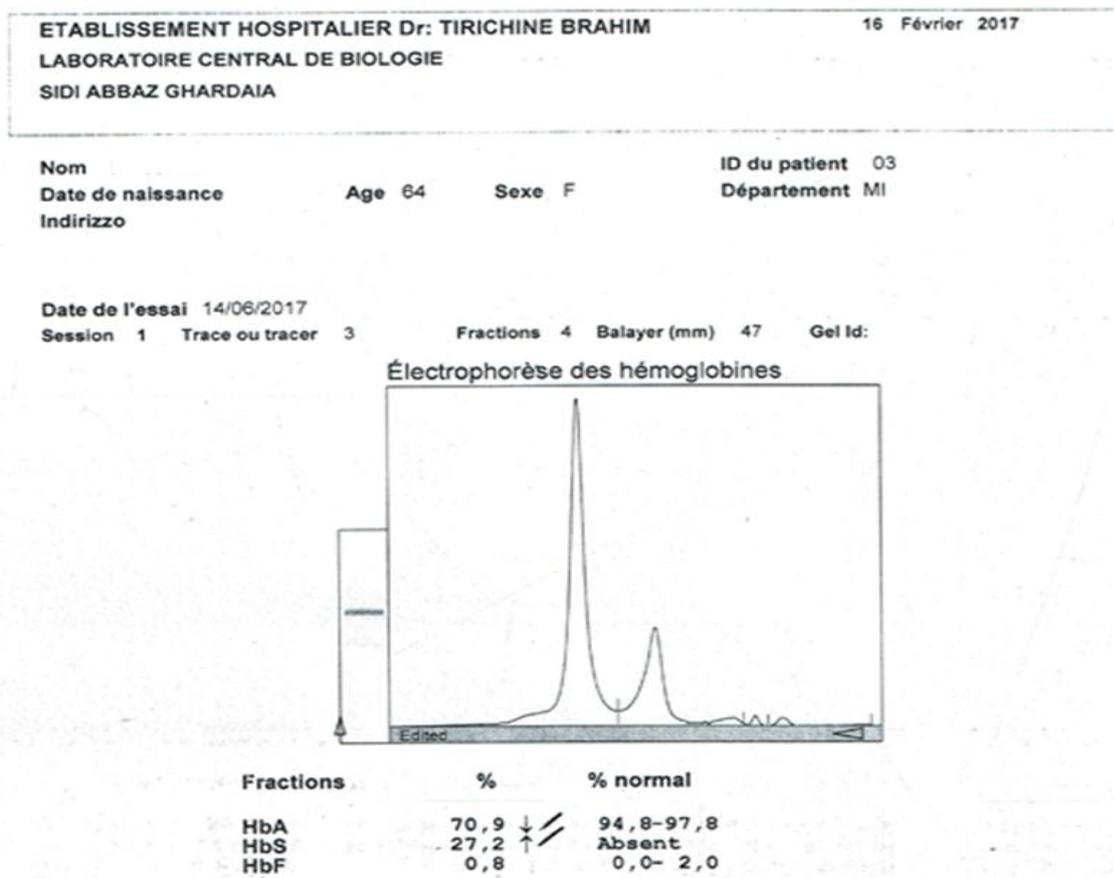


Figure 36 e : Profil électrophorétique drépanocytose hétérozygote

Le tableau N° 15 regroupe les patients ayant les taux de l'hémoglobine S inférieur à 41,1%, classés hétérozygotes, dont on constate l'absence des symptômes. La drépanocytose hétérozygote a été détectée en majorité, dans le cadre des examens de l'enquête familiale.

Tableau 15 : Taux de l'hémoglobine S chez les patients drépanocytaires hétérozygote

N°	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15
Age (ans)	64	08	44	04	10	11	15	36	40	29	50	30	40	08	07
sexe	F	F	F	M	M	F	M	F	F	F	M	F	M	F	M
Hb S (%)	27.2	41.1	32.3	36.1	39.8	40.5	39.4	27.2	33.7	37.9	40.4	40.2	39.1	40.6	40.1

II-3- Caractéristiques générales des patients drépanocytaires

II-3-1-Répartitions des patients drépanocytaires selon l'âge

La figure 41 indique, les différentes tranches d'âge des patients drépanocytaires étudiés, dont 11 patients ont moins de 10 ans, 05 patients de 10 à 20 ans, et 10 patients ont plus de 20 ans.

Le pourcentage des drépanocytaires hétérozygote est supérieur à celui des homozygotes. Dans ce cas on constate :

- Les patients homozygotes moins de 10 ans sont supérieur aux patients hétérozygotes
- Les patients homozygotes et hétérozygotes, entre 10 ans et 20 ans sont égaux.
- La majorité des patients, plus de 20 ans sont hétérozygote (8 patients).

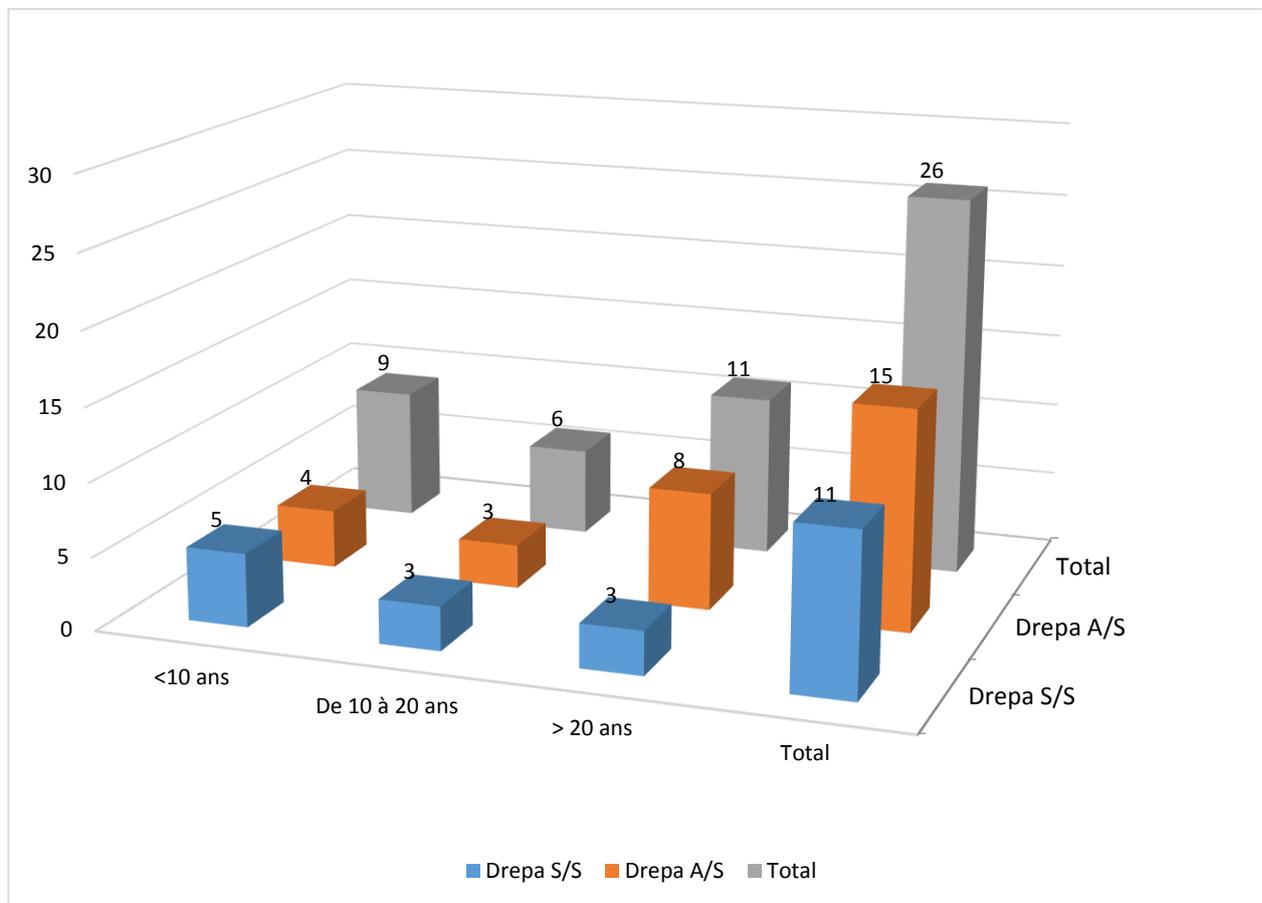


Figure 37 : Répartition des patients drépanocytaires selon l'âge

On remarque que le nombre des patients drépanocytaires homozygote augmente on fonction de la diminution d'âge qui implique l'absence de sensibilisation, car la maladie est encore présente avec un taux croissant, et surtout que l'enquête familial est pas obligatoire.

II-3-2- Répartitions des patients drépanocytaires par sexe

La figure ci-dessous résume la répartition des patients drépanocytaires par sexe, on constate les nombres de 15 féminins et 11 masculins.

Le sexe féminins porteurs de la drépanocytose est supérieur, au nombre de 15, dont 06 d'entre eux homozygotes.

En ce qui concerne le sexe masculin, on compte un nombre de 11, dont 05 sont homozygotes.

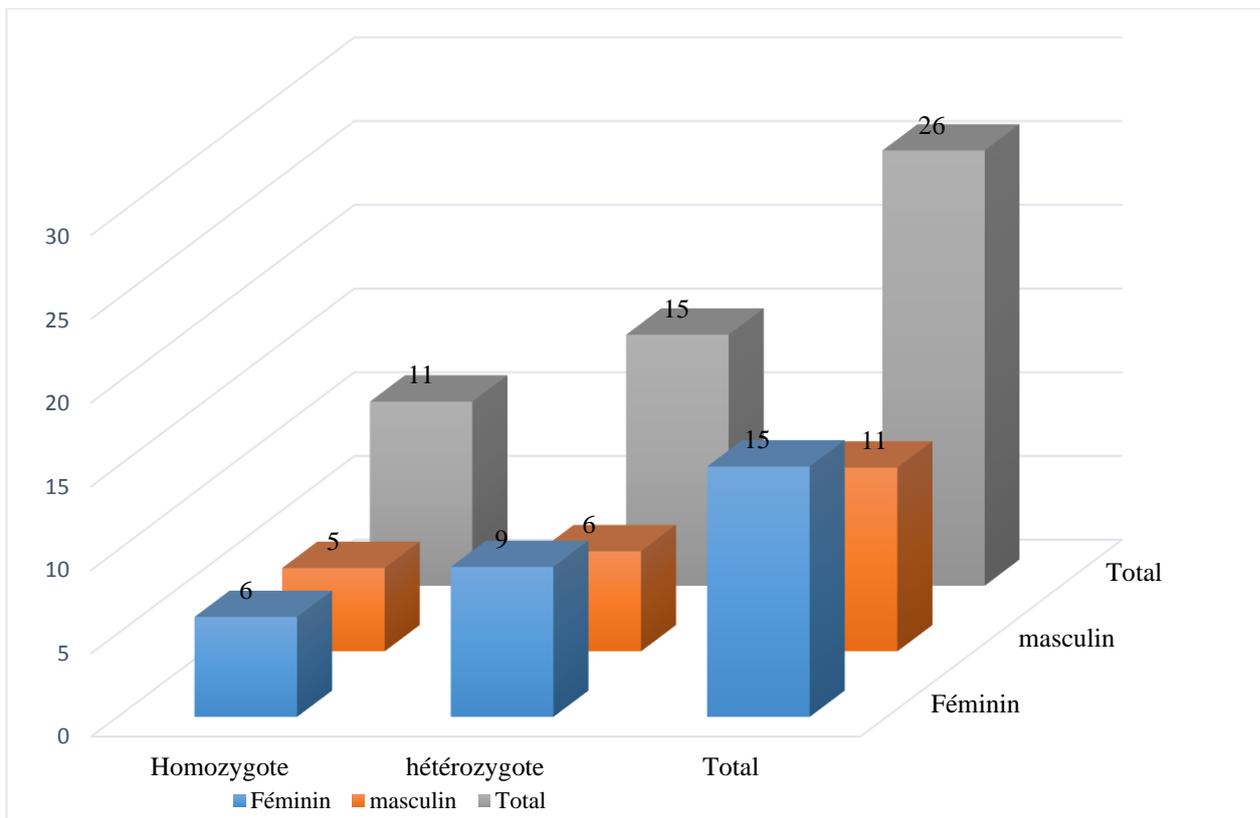


Figure 38 : Répartition des patients drépanocytaires par sexe

La transmission de la drépanocytose est somatique récessif, suit la loi de Mandel, et on remarque que la présence de la maladie soit hétérozygote ou homozygote est plus grande chez les féminins que les masculins, car dans notre cas et dans le cadre de l'enquête familiale on a remarqué la réponse et la coopération de sexe féminin plus que le sexe masculin.

II-3-3- Répartitions des patients drépanocytaires selon l'âge et le sexe

La figure 43, résume la répartition de la drépanocytose par tranche d'âge et sexe, d'où on remarque 05 féminins (03 homozygotes), et 04 patients masculins (02 homozygote) moins de 10 ans, 01 patient féminin hétérozygote, et 05 patients (03 homozygotes) entre 10 et 20 ans, 09 patients féminins (03 homozygotes), et 02 patients hétérozygotes masculin sont supérieur à 20 ans.

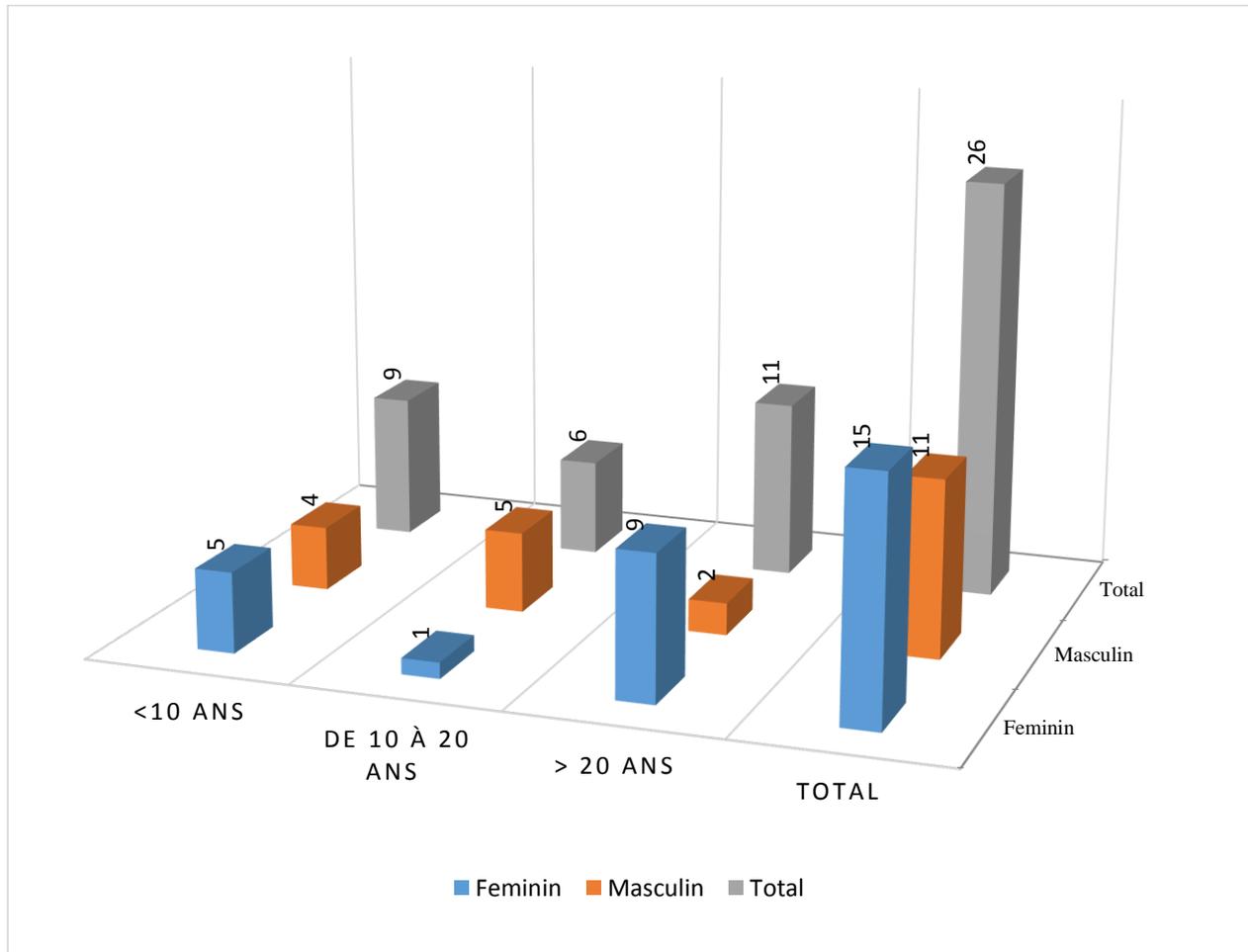


Figure 39 : Répartition des patients drépanocytaires selon l'âge et le sexe

La drépanocytose est congénitale, affecte a la naissance et reste tout au long de la vie des patients, on autre elle touche les deux sexes, c'est pour cela qu'on la trouve dans toute les tranche de société, et elle présente des symptômes sévère.

Conclusion

Conclusion

La drépanocytose dans la région de Ghardaïa est connue chez certaines familles, elle consiste la coopération des données de diagnostic clinique et biologique (hématologique et électrophorétique) pour être identifiée.

L'électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin est la technique utilisée dans le laboratoire de l'EPH de Ghardaïa.

A travers notre étude, on a observé que le nombre de drépanocytaires s'accroît surtout la forme hétérozygote.

Les tests NFS présentent une anémie légère pour les drépanocytaires hétérozygotes avec une moyenne de 11,33 g/dl d'hémoglobine, et une anémie sévère pour les drépanocytaires hétérozygotes d'une moyenne de taux de l'hémoglobine égale à 7.77 g/dl.

Les Frottis sanguins et les tests de falciformation révèlent la présence des drépanocytes, et le taux de réticulocyte est dans la plupart des cas régénérative, sauf pour quelques patients qui possèdent des problèmes de l'hématopoïèse.

L'électrophorèse de l'hémoglobine a confirmé les tests hématologiques, le taux de l'hémoglobine S est inférieur à 41,1% chez les drépanocytaires hétérozygote, tandis que son moyen est de 84,3 % pour les drépanocytaires homozygote,

Cependant, d'une part, le diagnostic en laboratoire par électrophorèse présente plusieurs difficultés, surtout en ce qui concerne la collecte du sang et la disponibilité des produits ; d'autre part, le faible équipement des laboratoires rendent difficile la prise en charge des syndromes drépanocytaires dans notre wilaya, d'où la nécessité d'une sensibilisation sur la maladie.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

Arnal C., Girot R., 2002 : Drépanocytose chez l'adulte. Encycl Méd Chir. Éditions : Elsevier SAS. Paris. 154p

Audigie Cl., Dupont G., Zonszain F., 1995 : Principes des méthodes d'analyse biochimique. Edition : DOIN, paris. 25-37 pp.

Bain B.J., Bardakdjian-Michau J., Dhondt J.L., Ducrocq R., Galactéros F., Guyard A., 2006 : Haemoglobinopathy diagnosis. Edition : Blackwell Publishing. London. 313 p.

Balédent F., 2000 : Génétique et diagnostic biologique de la drépanocytose. Rev. Développement et santé N° 182, France. 15-21 pp.

Barden V., F. Geneviève F., Troussard X., Châtelain B., 2014 : Hématologie microscopique du frottis sanguin. Feuille de biologie. Rev N° 317. France.

Berchel C., Diara J.P., Loret H., Foucan L., Leturdu C., Samuel Y., 1992 : Histoire naturelle de la drépanocytose. Rev. Prat I. Paris. 15-42 pp.

Bernnard D., 1992 : Hématologie. Edition : médecine science Flammarion. Paris. 205 p.

Bernard J., Levy JP., Clauvel J., Rain JD., Varet B., 1976 : Abrégé d'Hématologie Déficits en globules rouges. Edition: Masson. Paris, 45-59 pp.

Beyeme M., Chiabi O., 2004: Epidemiologie de la drepanocytose Clinics in Mother and Child Health medical journal Vol I.France. 6-8 pp.

Choquet S., 2007 : Hématologie. Edition : Ellipses Edition Marketing S.A. Paris. 354 p.

Colomba Ph., binet Ch., Desbois I., Lamagnere P., Boiron M., 1998 : Hematologie pratique. Edition : Doin. Pris. 16-33 pp.

Couque N., De Montalembert M., 2013 : Diagnostic d'une hémoglobinopathie

Feuillets de Biologie. Vol : 311. N° 17. 15-18 pp.

Dora B., Belabes S., Smalli F., Bouzid K., 1989 : Hematologie. edition : l'office des publications universitaires. Alger. 259 p.

Dickerson R.E., 1985: Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology.: Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA. 176 p.

- Elion J., 2014** : Drépanocytose. Magazine Science et Santé N°14.Paris. 27 p.
- Elion J., Labie D., 1992** : Bases physiopathologique de la drépanocytose. Hématologie n° 6, Vol 2.Paris. 36p.
- Favier A., 2003** : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. 108-115 pp.
- Girot R., Bégué F., Galacteros F., 2003** : La drépanocytose .Edition : Eurotext. Paris. 177 p.
- Girot R., Maier-Redelsperger M., Grazia Neonato M., 2003** : Diagnostic biologique des maladies génétique de l'hémoglobine. Revue de laboratoire. Vol :91. N° : 12. France.11-15 pp.
- Hemladji RM., Bouzid K., 1992** : Recommandations pour la prise en charge des syndrome drépanocytaire majeur 7eme journée de la société algérienne d'hématologie et transfusion sanguine. Alger.
- Huisman S., 2006** : Hématologie. Edition : Springer media. Berlin. 302 p.
- Kamoun P., 1997** : Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Edition : Flammarion. Paris. 236 p.
- Lainé A., 2004** : La drépanocytose. Edition : Kartahala.Paris. 1-19 P.
- Medkour T., 2008** : Modélisation mathématique et simulation numérique de la polymérisation de l'hémoglobine drépanocytaire. Thèse de doctorat de biologie cellulaire et moléculaire. Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (Créteil). Paris.257p.
- Polonovski M., 1977** : Biochimie médical. Edition : Masson. Paris. 40-75 pp.
- Renaudier P., 2014** : Physiopathologie de la drépanocytose. Edition : Elsevier Masson SAS. Pris. 178-181 pp.
- Rouessac A., Daniel C., Guy O., 1992** : Analyse chimique, Méthode et technique instrumental. Edition : Masson .Paris.153-169 pp.
- Serge M., Pierre M., 2009** : Toute la biochimie. Edition : SNEL Grafics, Belgique. 408-411 pp.
- Shirish M., Kawthalkar MD., 2013**: Essentials of Haematology. Edition: Jaypee brothers' medical publisher .London.354 p.
- Siguret V., Andreux J-A. 1997** : Laboratoire d'hématologie, Groupe hospitalier Charles-Foix Jean-Rostand, 103 p.

Tienderbiogo T-J., 2013 : Prise en charge des syndromes drépanocytaire majeurs chez les enfants, caractéristiques clinique et cout médical direct de la prise en charge. Mémoire pour l'obtention du grade de docteur en medecine.Burkina faso. 150 p.

Zandecki M., Genevieve F., Gerard J., Godon A., 2011: Spurious counts and spurious results on haematology analysers. a review. Part II: International Journal Of Laboratory Hematology. 21-41 pp.

Annexe

Annexe N° : 1

Etablissement Hospitalier Dr : Tirichine Brahime

Sidi Abaz Ghardaia

Laboratoire central de Biologie

Fiche de renseignement

L'électrophorèse de l'hémoglobine

Date :

Nom et Prénom :

Date de naissance :

Origine Géographique :.....

Nom du médecin :

Service :.....

Données Cliniques :

Antécédents personnel :.....

.....

Antécédents familiaux :.....

.....

Signes Cliniques :.....

.....

.....

Annexe N° : 2



Tube de prélèvement sanguin contient l'anticoagulant EDTA



Automate Sysmex

Paramètre	Valeur
WBC	9.4 $\times 10^9/L$
RBC	3.16 $\times 10^{12}/L$
HGB	9.1 g/dL
HCT	26.1 %
MCV	82.6 fL
MCH	28.8 pg
MCHC	34.9 g/dL
PLT	172 $\times 10^9/L$
LYM%	14.1 %
MXD%	12.5 %
NEUT%	73.4 %
LYM#	1.3 $\times 10^9/L$
MXD#	1.2 $\times 10^9/L$
NEUT#	6.9 $\times 10^9/L$
RDW-SD	39.3 fL
RDW-CV	12.9 %
PDW	13.2 fL
MPV	10.0 fL
P-LCR	27.1 %
PCT	0.17 %
Reseach#1	3.26 $\times 10^9/L$
Reseach#5	1.23 $\times 10^9/L$
Reseach#M	1.75 $\times 10^9/L$
Reseach#L	6.25 $\times 10^9/L$

: Résultat de la NFS



Solution d'hémolyse